

**Chimärer anti-Tumor/CD3 ζ -Kette-Rezeptor („*T-Body*“)
für die Therapie von humanen B-Zell-Neoplasien**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologin Alexandra Bähre
aus Ruit a. d. Fildern
August 2004

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologin Alexandra Bähre
aus Ruit a.d. Fildern
2004

Tag der mündlichen Prüfung:

**Chimärer anti-Tumor/CD3 ζ -Kette-Rezeptor („*T-Body*“)
für die Therapie von humanen B-Zell-Neoplasien**

Gutachter: Prof. Dr. Melvyn Little
Prof. Dr. Stefan Dübel

Für meine Mutter

Zusammenfassung

Um Therapieansätze für Non-Hodgkin-Lymphom zu erweitern, ist es Ziel dieser Arbeit gewesen, einen chimären Rezeptor herzustellen, der die humoralen und zellulären Bereiche des Immunsystems zusammenführt. In dieser Arbeit wurde ein „*T-Body*“ gegen den B-Zell-Lymphom-Marker CD22 generiert. Der „*T-Body*“ setzt sich aus drei Domänen zusammen: einer Signal-, Transmembran- und einer extrazellulären Domäne. Nach Transfektion exprimieren und präsentieren T-Zellen diesen „*T-Body*“ auf ihrer Oberfläche und werden damit in die Lage versetzt Tumorgewebe unabhängig von einer MHC/TCR-Interaktion anzugreifen.

Um zu einer hohen T-Zellzahl, mit dem Ziel der adoptiven Immuntherapie im klinischen Maßstab, zu gelangen, wurde in der vorgelegten Arbeit das „Immortalisierungskonstrukt“ hTERT zum Einsatz gebracht. Dieses System wurde parallel zu primären Spender T-Zellen auf seine Wirksamkeit und Funktionalität in Antigen-spezifischen T-Zellklonen untersucht.

Zu Beginn stand die Klonierung des „*T-Body*“ Expressionsvektors und die Amplifikation des Immortalisierungsvektors hTERT. Bei der Wahl der Transfektionsmethode wurde eine transiente der stabilen Transfektion gegenübergestellt. Die Herstellung der Verpackungszelllinien mit einer hochgradigen Virustiterproduktion wurde verhältnismäßig rasch und problemlos durchgeführt. Die Kontrolltests mittels FACS-Analyse und Fluoreszenzmikroskopie der transfizierten Verpackungslinien sowie die der später infizierten T-Zellen wiesen die Präsenz des „*T-Body*“ auf der Zelloberfläche, sowie auch eine Integration der hTERT-DNA nach. Weiterhin konnte über die Effektivität des „*T-Body*“ in Kombination mit hTERT durch die Bestimmung deren Zytotoxizität eine eindeutige Aussage getroffen werden.

Das Versuchsvorhaben bezweckte die Untersuchung der *in vivo*-Wirksamkeit eines neuen Therapiekonzeptes („*T-Body*“) zur Behandlung humaner Krebserkrankungen im Modell eines humanen B-Zell-Lymphoms. Die bisherige klinische Therapie dieses Tumors beschränkt sich auf eine chemotherapeutische Behandlung. Das hier dargestellte Therapiekonzept hat zum Ziel, nach der Chemotherapie verbliebenen oder neu auftretenden Zellen durch einen gezielten immuntherapeutischen Eingriff anzugreifen, und somit die Überlebenszeit der Patienten zu verlängern. Das „*T-Body*“-Konzept läßt sich auch auf die meisten anderen humanen Krebsarten übertragen, sofern tumorspezifische Antikörper verfügbar sind.

Summary

The aim of this work was to create a chimeric receptor combining the humoral and cellular arms of the immune system. In order to develop a new strategy for therapy of Non-Hodgkinlymphoma, the "*T-Body*" was directed against the B-celllymphoma marker CD22. The "*T-Body*" consists of three domains: signal, transmembrane, and extracellular domain. T-cells expressing this receptor on their surface are supposed to be enabled to attack the tumor independent of an MHC/TCR interaction.

One step towards the adoptive immune therapy in a clinical setting is to expand the T-cell numbers to a suitable amount. The hTERT construct has been chosen for the immortalisation of T-cells. This system has at the same time been tested for its effectivity and functionality in antigenspecific T-cells clones. The first step was the cloning of the "*T-Body*" expression vector and subsequent amplification of the immortalisation vector hTERT. Transient and stable expression have been compared. Generation of packaging cell lines with high-grade virus titer production has been accomplished successfully. By FACS analysis and fluorescence microscopy of the transfected packaging cells, as well as of the finally infected T-cells the presence of the "*T-Body*" on the cell surface, and integration of the hTERT DNA has been demonstrated. Interesting information on the effectiveness of the "*T-Body*" in combination with hTERT by the analysis of their cytotoxicity could be accomplished. Up to date the conventional clinical therapy of B-cell NHL is limited to chemotherapy. The intention of this therapy concept described in this thesis is to attack remaining or newly arising cancer cells after chemotherapy by a purposeful immune-therapeutic strategy. This is supposed to extend the survival period of the patients and help to prevent a relapse. The "*T-Body*"-concept can be also transferred to other cancer entities as far as specific antibodies are available.

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	1
II	Abkürzungsverzeichnis	IX
III	Einleitung	1
3.1	Tumorimmunologie	1
3.2	Zytotoxische T-Zellen (CTL)	4
3.3	Apoptose	7
3.4	Tumoren	9
3.5	Tumorthherapie	11
3.6	B-Zell-Lymphome	14
3.7	Adoptiver Transfer	18
3.8	„T-Body“	23
3.9	Zielsetzung der Arbeit	24
IV	Materialien	25
4.1	Chemikalien, Enzyme und Zytokine	25
4.2	Puffer	25
4.2.1	Plasmidisolierung	25
4.2.2	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	26
4.2.3	PCR-Puffer	26
4.2.4	Native Agarose-Gelelektrophorese für DNA	26
4.2.5	10 x TBE-Puffer	27
4.2.6	Transformationspuffer	27
4.2.7	Bicarbonatpuffer („Coating“ Puffer)	27
4.2.8	MACS-Puffer (Isolationspuffer)	27
4.3	Lösungen	28
4.3.1	50 x TAE-Lösung	28
4.3.2	TE-Lösung	28
4.4	RNA- und DNA-Extraktion vitaler Zellen	28
4.4.1	Lyse-Lösungen	28
4.5	Bakterien	28
4.6	Plasmide/Vektoren	29
4.7	Medien	29
4.7.1	Bakterienkulturmedien	29
4.7.2	Einfriermedium	30
4.8	Antikörper	30
4.8.1	Primärantikörper	30
4.8.2	Detektions-Antikörper	31
4.8.3	Sekundärantikörper	31
4.8.4	Sonstige Antikörper	31
4.9	Antikörper gegen Interleukine/Interferone (anti-human)	31

4.10	Verwendete Zelllinien	32
4.10.1	Verpackungslinien	32
4.10.2	Humane Zelllinien	32
4.10.3	Murine Zelllinie	32
4.11	Oligonukleotide zur Polymerase-Kettenreaktion	33
4.12	Peptide zur Restimulation von CTL-Klonen	33
V	Methoden	34
5.1	Molekularbiologische Methoden	34
5.1.1	Behandlung mit Restriktionsendonukleasen	34
5.1.2	TAE-Agarose-Gelelektrophorese	34
5.1.3	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	34
5.1.4	DNA-Fällung	35
5.1.5	Phosphorylierung und Dephosphorylierung	35
5.1.6	Isolierung von Plasmid-DNA	35
5.1.7	Ligation	36
5.1.8	RNA Isolierung aus transfizierten vitalen CTL zur Detektion des hTERT-Konstruktes	36
5.1.9	Primerentwurf	36
5.1.10	Reverse Transkription	37
5.1.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
5.2	Mikrobiologische Methoden	39
5.2.1	Transformation von E.coli	39
5.2.2	Transformation mit Hitzeschock	39
5.2.3	DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung	40
5.3	Zellbiologische Methoden	41
5.3.1	Standard Methoden	41
5.3.2	Supplementierung von Zellkulturmedien	41
5.3.3	Kultivierung von adhären wachsenden Zellen	42
5.3.4	Kultivierung von Suspensionszellen	42
5.3.5	Bestimmung von Zellzahl und Vitalität von Zellen	42
5.3.6	Transfektion von eukaryontischen Zellen	43
5.3.7	Transfektion von adhären Zellen	43
5.3.8	Produktion und Isolierung retrovialen Überstandes	44
5.3.9	PBL/Granulozyten-Isolation aus PBS-Blut	45
5.3.10	Isolation von CTL	45
5.3.11	Gewinnung humaner B-Lymphozyten aus peripheren Blutlymphozyten	46
5.3.12	Langzeitkultivierung CD40-aktivierter humaner B-Lymphozyten	46
5.3.13	Langzeitkultivierung humaner T-Lymphozyten	47
5.3.14	Retroviral vermittelte Transduktion durch Retronektin	47
5.3.15	Humanes T-Zell-Nukleofektions –Protokoll	51
5.4	Immunbiologische Methoden	53
5.4.1	Immunfluoreszenz und Durchflußzytometrie	53
5.4.2	Intrazelluläre Färbung	53
5.4.3	Bestimmung von GFP-positiven Zellen	54
5.4.4	Bestimmung von toten Zellen durch PI-Färbung	54
5.4.5	FACS-Sorter	54
5.4.6	Immunhistochemie von transfizierten GFP-Zellen mittels „Cyto-Spin-Verfahren“	55
5.4.7	Fluoreszenzmikroskopie	56
5.4.8	Bestimmung der Zytotoxizität	56
5.4.9	IFN- γ -ELISPOT-Test unter Ausschluß der MHC-Funktionalität	57
VI	Ergebnisse	58
6.2	T-Body-anti-CD22	59
6.2.1	Klonierung des Expressionsvektors	59
6.2.2	Restriktionskarte des „T-Body“-anti-CD22-Konstruktes	59
6.2.3	Ligation und Transformation	60
6.2.4	Kontrolle der Klonierung auf DNA-Ebene	60

6.3	<i>hTERT Immortalisationskonstrukt</i>	61
6.3.1	Transformation	61
6.4	<i>Generierung von Verpackungslinien mit einer hochgradigen Virustiterproduktion</i>	62
6.4.1	Transfektion	62
6.4.2	Retrovirale Infektion von Verpackungszelllinien	63
6.4.3	FACS-Analyse der transfizierten Verpackungszellen vor der „Zell-Sortierung“	63
6.4.4	„Sortierung“ der positiven transfizierten Verpackungszelllinien (FACS-Sort)	66
6.4.5	Fluoreszenzmikroskopie	71
6.5	<i>Zytotoxische T-Zellen (CTL)</i>	76
6.5.1	Isolation von CTL	76
6.5.2	FACS	77
6.6	<i>Retrovirale Infektion von CTL</i>	80
6.6.1	FACS-Analyse retroviral infizierten CTL	80
6.6.2	Phänotypische Charakterisierung von humanen CTL nach retroviraler Infektion wie auch Stimulation	82
6.6.3	RT-PCR: Nachweis hTERT-spezifischer mRNA in retroviral infizierte CTL mittels reverser Polymerasekettenreaktion	84
6.6.4	Phänotypisierung nach retroviraler Infektion von CTL	86
6.6.5	anti- <i>c-myc</i> Detektion des „ <i>T-Body</i> “-anti-CD22-Konstruktes auf retroviral infizierter CTL	89
6.6.6	Fluoreszenz-Nachweis bei retroviral infizierter CTL	91
6.6.7	Vitalitätsbestimmung retroviral infizierter CTL	93
6.6.8	Bestimmung der Zytotoxizität retroviral infizierter CTL	94
6.6.9	INF- γ -spezifischer ELISPOT in Ergänzung einer MHC I und II Blockierung	96
6.7	<i>Transiente Transformation von CTL mittels Nukleofektion</i>	98
6.7.1	Phänotypische Charakterisierung von humanen CD8 ⁺ -, PBL- und PBLCD8 Populationen, vor und nach Nukleofektion wie auch Stimulation	102
6.7.2	anti- <i>c-myc</i> Detektion des „ <i>T-Body</i> “-anti-CD22-Konstruktes auf mittels Nukleofektion transformierter CTL	104
6.7.3	RT-PCR: Nachweis hTERT-spezifischer mRNA in CTL mittels reverser Polymerasekettenreaktion nach Nukleofektion	105
6.7.4	Fluoreszenz-Nachweis transfizierter CTL mittels Nukleofektion	107
6.7.5	Vitalitätsbestimmung von mittels Nukleofektion transformierter CTL	109
6.7.6	Bestimmung der Zytotoxizität transfizierter CTL mittels Nukleofektion	110
6.7.7	INF- γ -spezifischer ELISPOT in Ergänzung einer MHC I und II Blockierung	111
6.8	<i>Retrovirale Infektion von CTL-Klonen</i>	113
6.8.1	Expandierung von CTL-Klonen	113
6.8.2	Retrovirale Infektion von CTL	114
6.8.3	FACS-Analyse nach retroviraler Infektion von CTL-Klonen (5H10)	114
6.8.4	anti- <i>c-myc</i> Detektion des „ <i>T-Body</i> “-anti-CD22-Konstruktes auf retroviral infizierter CTL-Klonen	116
6.8.5	RT-PCR: Nachweis hTERT-spezifischer mRNA in CTL-Klone (5H10) mittels reverser Polymerasekettenreaktion nach retroviraler Infektion	117
6.8.6	Fluoreszenz-Nachweis retroviral infizierter CTL-Klone	119
6.8.7	Vitalitätsbestimmung retroviral infizierter CTL-Klone	121
6.8.8	Bestimmung der Zytotoxizität retroviral infizierter CTL-Klone	122
6.8.9	INF- γ -spezifischer ELISPOT in Ergänzung einer MHC I und II Blockierung	123
VII	<i>Diskussion</i>	125
7.1	<i>Klonierung des „T-Body“-Konstruktes (αCD22)</i>	126
7.2	<i>Generierung von Verpackungszelllinien mit hochgradiger Virustiterproduktion</i>	127
7.3	<i>Retrovirale Infektion von CTL</i>	131
7.4	<i>Transiente Transformation von CTL mittels Nukleofektion</i>	133
7.5	<i>Retrovirale Infektion von CTL-Klonen</i>	134

7.6	<i>Ausblick</i>	138
VIII	<i>Literaturverzeichnis</i>	139
IX	<i>Anhang</i>	152

II Abkürzungsverzeichnis

α	anti
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APC	Antigenpräsentierende Zelle („ <i>antigen presenting cell</i> “)
Amp	Ampicillin
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
AB ^R	Antibiotika-Resistenz
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin
CEA	Karzinogenes Antigen („ <i>carcinoembryonic antigen</i> “)
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
C _H	konstante Region der schweren Kette
C _L	konstante Region der leichten Kette
cip	„ <i>calf intestinal phosphatase</i> “ (alkalische Phosphatase)
CTL	CTL („ <i>cytotoxic T-lymphocyte</i> “)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ds	doppelsträngig
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor („ <i>epidermal growth factor</i> “)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FACS	Fluoreszenz aktivierter Zellsortierer („ <i>fluorescence activated cell sorter</i> “)
Fc	Konstanter Teil eines Antikörpers
FCS	Fötale Kälberserum
Fv	Bindungsdomäne eines Ak
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
GFP	grün-fluoreszierendes Protein („ <i>green fluorescent protein</i> “)
gr	griechisch
γ hinge.....	hinge-Region des IgG
h	Stunde
HIV	Humaner Immunsystem schwächender Virus („ <i>Human immunodeficiency virus</i> “)
HLA-DR.....	humane Leukozyten- Antigene, entsprechen den MHC-Klasse II-Molekülen
kb	Kilobasen
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
l	Liter
LAK	Lymphokinaktivierte „Killerzellen“ („ <i>lymphokine-activated killer</i> “)

mA	Milli-Ampere
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („ <i>major histocompatibility complex</i> “)
M_r	relative Molmasse
min	Minuten
μ l	Mikroliter = 10^{-6} Liter
ml	Milliliter = 10^{-3} Liter
μ M	mikromolar = 10^{-6} M
mM	millimolar = 10^{-3} M
ms	Millisekunden
nM	nanomolar = 10^{-9} M
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK	Natürliche „Killerzellen“
OD	optische Dichte
ori	„ <i>origin of replication</i> “ (Startpunkt der Replikation)
p	Plasmid
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphate-Buffered-Saline (Puffer)
PDGF	von Thrombozyten produzierter Wachstumsfaktor („ <i>platelet-derived growth factor</i> “)
Pen	Penicillin
pM	picomolar = 10^{-12} Liter
psec	Picosekunde = 10^{-12} Sekunde
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
scFv	einkettiger Fv-Antikörper
ss	einzelsträngig

Strep	Streptomycin
TAA	Tumorassoziertes Antigen („ <i>tumor associated antigen</i> “)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-(Puffer)
TBS	Tris-Buffered-Saline (Puffer)
TCR	T-Zellrezeptor („ <i>T-cell receptor</i> “)
TGF	Entwicklungs-Wachstumsfaktor („ <i>transforming growth factor</i> “)
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor („ <i>tumor necrosis factor</i> “)
TE	Tris-EDTA (Puffer)
TIL	tumorinfiltrierende Lymphozyten („ <i>tumor-infiltrating lymphocytes</i> “)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3 propandiol)
w/v	Weight per volume
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	variable Domäne der schweren Kette
v/v	Volume per volume
V _L	variable Domäne der leichten Kette
W	Watt
 <i>DNA-Basen</i>	
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

III Einleitung

3.1 Tumorimmunologie

Bereits um die Jahrhundertwende vermutete man, daß dem Immunsystem bei der Abwehr von Krebserkrankungen eine bedeutsame Rolle zukommt (Ehrlich 1909). Erst viel später wurde erkannt, daß die Zellen des Immunsystems eine humorale und zelluläre Überwachungsfunktion im Organismus übernehmen: ihre Aufgaben bestehen nicht nur darin, eingedrungene Bakterien und Viren zu erkennen und auszuschalten, sondern auch "entartete" körpereigene Zellen zu bekämpfen (Knuth et al. 1984; Old 1981). Einige Krebsformen können besonders dann auftreten und sich ausbreiten, wenn das Immunsystem geschädigt oder geschwächt ist (Spina et al. 2000). Der Gedanke der Interaktion zwischen Immunsystem und Neoplasie wurde in Untersuchungen zu tumorspezifischen Transplantationsantigenen und durch das Konzept der Immunüberwachung aufgegriffen und weiterentwickelt (Burnet, 1970; Coulie et al. 1994; van der Bruggen et al. 1991; Wolfel et al. 1995; Wolfel et al. 1994). Eine Immunantwort gegen einen Tumor, welche an den oftmals massiven Lymphozyteninfiltraten erkennbar ist, war hier festzustellen. Bei der Karzinogenese geht man von einer Hauptrolle der T-Zell-vermittelten Immunreaktion aus. Antigenunabhängige antitumorale Reaktionen werden zellulär und humoral, durch Makrophagen und NK-Zellen, vermittelt. Als spezifische Angriffsziele für die Antikörper und T-Effektorzellen dienen bestimmte Antigene, bzw. von ihnen stammende und von Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen („*Major Histocompatibility Complex*“, *MHC*) präsentierte Peptide, welche im Tumor neu oder verstärkt exprimiert werden. Für die Tumorimmunologie der vergangenen Jahre stellte die Identifizierung solcher tumorspezifischer Antigene ein Hauptanliegen dar, denn sie wären als Angriffspunkte gezielter therapeutischer Strategien geeignet. Bereits im Jahr 1943 wurde erkannt, daß Mäuse gegen einen Tumor immunisiert werden konnten, welcher in einem Tier des gleichen Stammes gewachsen war, was zur Postulierung der Existenz von Tumorantigenen führte (Gross, 1943). Mit Hilfe molekularbiologischer, biochemischer und serologischer Methoden ist in den letzten 10 Jahren die Identifizierung einer Vielzahl tumorassoziierter Antigene (*TAA*) gelungen. Je nach Gewebsexpressionsmuster, Funktion oder Entstehungsursache werden heute 5 Untergruppen TAA unterschieden:

1. „Cancer-Testis“ (CT)-Antigene, welche in verschiedenen soliden Tumoren (z.B. Mammakarzinom u. a.) und hämatologischen Erkrankungen, wie dem Non-Hodgkin-Lymphom (NHL), exprimiert werden. Zu dieser Gruppe gehören u. a. die Antigene der

MAGE-, BAGE-, GAGE- und NY-ESO-1-Familie (Cheever et al. 1995;Coulie et al. 1994;Dutoit et al. 2002;Labrecque et al. 1993).

2. Differenzierungsantigene, die in Malignomen und den entsprechenden Normalgeweben exprimiert sind und zu denen die Antigene Melan A, Tyrosinase, gp100, CEA und NY-BR-1 zählen (Boon and Old 1997;Muller et al. 2004;Salgaller et al. 1996;Tosi et al. 2004).

3. Punktmutationen normaler Gene, die in individuellen Tumoren aufgrund einer spezifischen CD8⁺-T-Zell- Reaktion mit dem mutierten Genprodukt identifiziert wurden. Beispiele für diese „individual“ spezifischen Antigene sind MUM-1, R24C und β -Catenin (Castelli et al. 2000;Kirkin et al. 1998;Neumann et al. 1998).

4. Überexprimierte „Selbst“-Antigene, wie p53 und HER2/neu, welche in Normalgeweben schwach und in einigen Tumoren stark überexprimiert sein können, können tumorselektive Targets für zelluläre Immunreaktionen darstellen (Munster and Norton 2001;Slamon et al. 1987).

5. Virale Antigene (HBV, HPV, HCV) werden in verschiedenen Tumoren (z.B. hepatozelluläres Karzinom und Zervixkarzinom) exprimiert, für die auch ein ursächlicher Zusammenhang zwischen Virusinfektion und Tumorentstehung belegt ist. Für einige Antigene konnten ein oder mehrere Peptide identifiziert werden, die gebunden an unterschiedliche MHC-Klasse-I Moleküle eine effektive Stimulation von spezifischen CD8⁺-T-Lymphozyten *in vitro* bewirken (Munoz and Bosch 1997;Rickinson 1995).

Das progradiente Wachstum von Tumoren legt allerdings nahe, daß das System der Immunüberwachung offensichtlich Mängel aufweist oder der Tumor Möglichkeiten hat, diesem System auszuweichen. Diese Vermutung wurde, wie in den letzten Jahrzehnten durch die Entdeckung verschiedener sogenannter tumor escape-Mechanismen bestätigt. Tumorzellen entziehen sich dem Zugriff des Immunsystems durch verringerte Expression von MHC Klasse I (Algarra et al. 2000;Hicklin et al. 1998;Wang et al. 1998), das Fehlen kostimulatorischer Moleküle (Armstrong et al. 1998;Speiser et al. 1997) und die gesteigerte Produktion von immunsuppressiven Zytokinen (Barth et al. 1996) und anderen Molekülen (wie z.B. CD95L/FasL/Apo-1L) in sich bergen, werden dafür verantwortlich gemacht (Pawelec et al. 2000). Für die Induktion einer zytotoxischen Immunantwort sind kostimulatorischen Molekülen obligatorisch. Das Fehlen kostimulatorischer Moleküle auf Tumoren kann eine Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten („*Cytotoxic T-Lymphocytes*“, CTL) verhindern (Speiser et al. 1997). Dadurch kann eine Anergie der CTL, die zuvor effektiv an der Antigenerkennung teilgenommen haben, auftreten (Staveley-O'Carroll et al. 1998). Eine verminderte Immunantwort wurde bei der lokalen Freisetzung von

immunsuppressiven Zytokinen, wie TGF- β und IL-10, auf der Zelloberfläche beobachtet (Andres et al. 1998; Costello et al. 1999; Torre-Amione et al. 1990). Die Interaktion von den inhibitorischen Molekülen mit den zugehörigen Rezeptor oder CD95L auf CTL führt oft, nicht unbedingt bei inhibitorischen Molekülen wie IL-10, TGF- β , zur Apoptose in diesen Effektorzellen. Eine Fülle von Tumorzellen exprimieren konstitutiv funktionell CD95L, was auch nach einer chemotherapeutischen Behandlung in Erscheinung treten kann (Hahne et al. 1996). Dieser Zustand macht es den Tumorzellen möglich, gegen den Tumor gerichtete Lymphozyten auszulöschen und eine Immunantwort zu unterdrücken (Cardi et al. 1998). Dieses Phänomen wird als „Tumorgegenangriff“ („*tumor counter attack*“) bezeichnet (Igney et al. 2000).

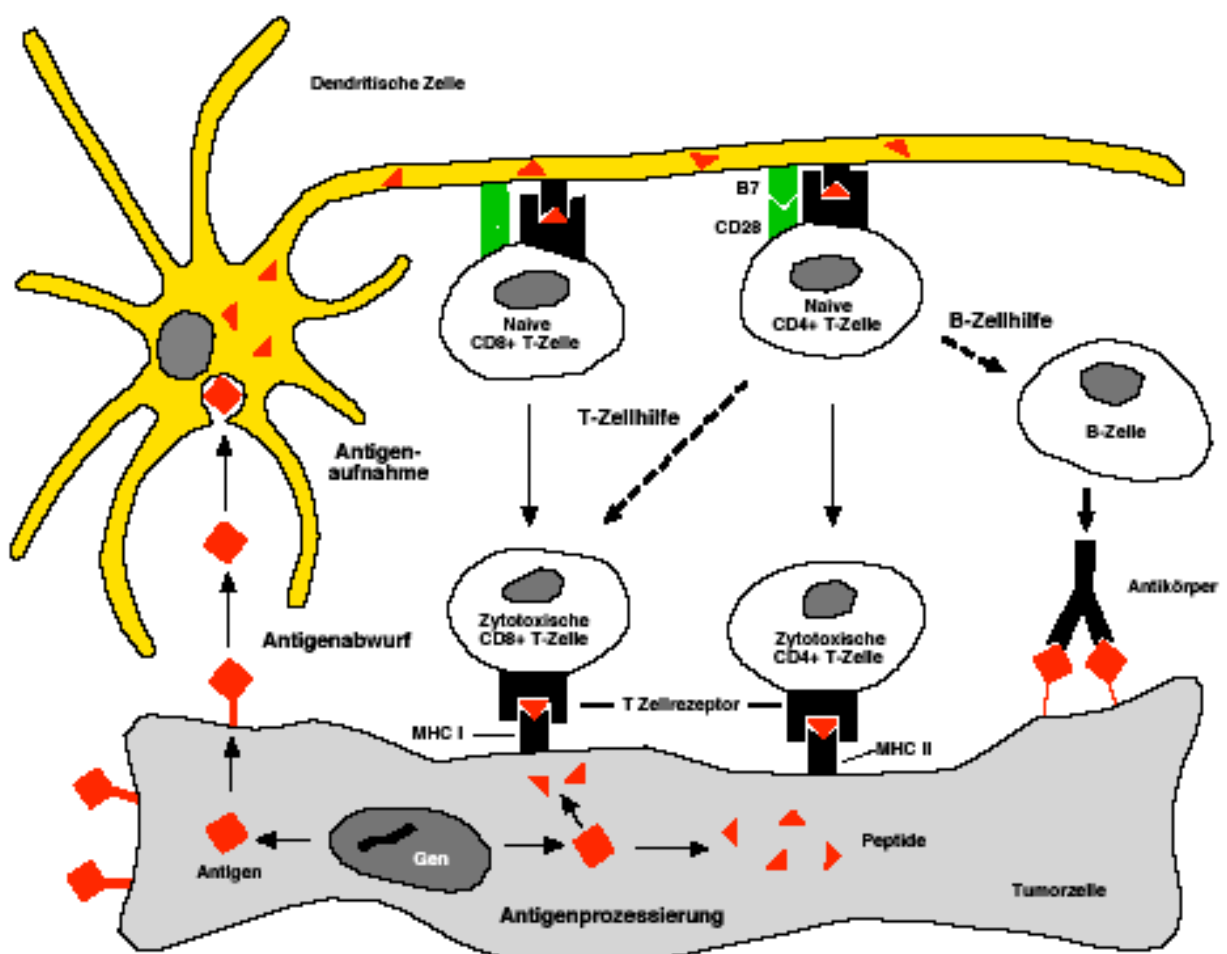


Abbildung 1: Interaktion von dendritischen Zellen, B-Zellen, T-Helferzellen, CTL und Tumorzellen. (Quelle: Peschel et al. , 1999)

3.2 Zytotoxische T-Zellen (CTL)

Die CD8⁺-CTL als Teil der zellulären Immunabwehr gelten heute als die wesentlichen Effektoren bei der spezifischen Abwehr maligner Tumoren. Beobachtungen, die auf eine spezifische Interaktion von CD8⁺-T-Lymphozyten mit autologen Tumorzellen hinweisen, entstanden erstmals Anfang der 80er Jahre aus *in vitro*-Arbeiten mit autologen Melanomsystemen (Knuth et al. 1984; Mukherji and MacAlister 1983). Naive CD4⁺ T-Zellen entwickeln sich zu T-Helferzellen, die als Th1-Zellen den CTL zu Hilfe kommen, oder als Th2-Zellen eine tumorgerichtete B-Zellantwort unterstützen. CD4⁺ T-Zellen können sich ebenfalls zu CTL entwickeln, die Tumorzellen lysieren können, vorausgesetzt, daß diese MHC-Klasse II Moleküle tragen.

Antigenpräsentation und T-Zell-Erkennung

CTL haben die Aufgabe durch Zytolyse Zielzellen zu zerstören. Periphere Effektor-T-Zellen erkennen Fremdantigene, wenn deren Peptide von Molekülen des MHC-Komplexes präsentiert werden (Sant'Angelo et al. 1998). Die Zielstruktur für den T-Zell-Rezeptor („*T-cell-receptor*“, TCR) ist ein Komplex aus MHC-Klasse-I-Molekül und einem Peptid von 9–10 Aminosäuren Länge, welches einem intrazellulär prozessierten Antigen entstammt und aufgrund seiner Aminosäurenkonstellation eine Bindung zum jeweiligen MHC-Klasse-I-Molekül eingeht. Die Spezifität von CD8⁺-T-Lymphozyten gegenüber definierten Antigenen wird durch die Konfiguration des TCR bestimmt. Der TCR ist ein Heterodimer, welches aus α - und β -, bzw. γ - und δ -Ketten besteht. Durch Rearrangement verschiedener Gene (*variable* = V; *diversity* = D; *joining* = J) entsteht eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher Rezeptormoleküle. Das TCR-Rearrangement ist für die jeweiligen CTL-Klone einzigartig (Zinkernagel and Doherty 1979). Dieser TCR-Rezeptor besteht aus einer Gruppe invarianter Proteine (CD3-Komplex), und dem TCR-Anteil. Die Einheit aus TCR, CD3 und weiteren signalübertragenden Molekülen wird auch als funktioneller TCR-CD3-Rezeptor-Komplex bezeichnet. CD3 ist nicht-kovalent mit dem TCR assoziiert, gleichwohl besteht die Funktion des CD3-Rezeptor-Komplexes in der Initiation der Signaltransduktion, nachdem ein Antigen-MHC-Komplex an den TCR gebunden hat. Die Erkennung von konventionellen Antigenen wird durch hypervariable Regionen der α - und β -Ketten des TCR vermittelt. Nur antigenpräsentierende Zellen („*Antigen-Presenting-Cells*“, APC) mit passendem Haplotyp können die Peptidfragmente konventioneller Antigene bestimmten T-Zellen präsentieren. Zusätzlich zu ihren Antigen-spezifischen Rezeptoren exprimieren T-Zellen Korezeptoren. T-Helferzellen exprimieren CD4, welches über MHC-Klasse-II-Moleküle bindet und die

Adhäsion an APC (Dendritische Zellen, Makrophagen, B-Lymphozyten) verstärkt. CTL besitzen den Oberflächenmarker CD8, der für MHC-Klasse-I-Moleküle spezifisch ist. (Alberts 1994; Lanzavecchia et al. 1999; Waldmann 1986). Die Aktivierung von T-Zellen über den TCR bei gleichzeitiger Kostimulation hat grundsätzlich zwei Konsequenzen: Die Teilung und Proliferation der T-Zelle und ihre Reifung und Differenzierung in Effektor-T-Zellen. Die Phase der Aktivierung läßt sich in drei Hauptschritte gliedern: Für den ersten Schritt der Aktivierung („1. Signal“) zur funktionell aktiven Effektor-T-Zelle ist nur der funktionelle TCR verantwortlich. CD8⁺-T-Zellen erkennen Antigenpeptide im Komplex mit MHC-Klasse-I-Molekülen und CD4⁺-T-Zellen Antigenpeptide im Komplex mit MHC-Klasse-II-Molekülen; ein Phänomen, das als MHC-Klasse-II- bzw. -I-Restriktion der CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Zellen bezeichnet wird (Janeway 1999). Eine „künstliche“ T-Zellaktivierung ist auch z.B. durch Dimere des MHC-Klasse-I-Peptidkomplexes oder durch Monomere, die den TCR mit dem Korezeptor CD8 Lck Kinasekomplex quervernetzen, möglich (Delon et al. 1998). Die sekundäre kostimulatorische Signalinduktion („2. Signal“) beruht auf der Interaktion bestimmter Rezeptoren auf der Oberfläche der T-Zelle mit spezifischen Liganden der APC-Oberfläche. Denn außer MHC-Klasse-I- und -II-Molekülen exprimieren APC kostimulatorische Moleküle, die zur T-Zellaktivierung und zur Aufrechterhaltung einer spezifischen Immunantwort notwendig sind.

Die Aktivierung von T-Zellen wird darüber hinaus durch das Zusammenspiel von Adhäsionsmolekülen (z.B. LFA-ICAM1; LFA-3-CD2) verstärkt, durch die weitere Aktivierungssignale in das Zellinnere geleitet werden. Diese werden in drei Hautfamilien eingeteilt, Selektine, Integrine und die Immunglobulin-(Ig) Superfamilie. Diese Signalmoleküle sind notwendig für Zell-Zellkontakt, Immunüberwachung und Effektorfunktionen (Peter et al. 1999; Zawisza 1994).

CTL töten Zielzellen auf zweierlei Weise: über den Perforin/Granzym-Weg und durch rezeptorvermittelte Induktion von Apoptose. Perforin, stellt ein Kanal- oder Porenbildendes Molekül dar und wird von aktivierten CTL, natürlichen Killer- („*Natural Killer*“, NK)-Zellen und Makrophagen, produziert. Durch die Bindung der Effektorzelle an die Zielzelle kommt es zur Exozytose von Perforin aus den zytoplasmatischen Granula. Perforin polymerisiert in der Plasmamembran der Zielzelle, wodurch durchlässige Transmembrankanäle entstehen. Die Apoptose wird dann durch Granzym, eine Serin-Protease, initiiert, das über den Perforinkanal in die Zielzelle eindringen kann.

Das Perforin/Granzym-System spielt bei den Abläufen der Infektion, und auf den Gebieten der Autoimmunität, Alloantigenantwort und der zielgerichteten Vernichtung von abnormen

Zellen eine wichtige Rolle. Außerdem reguliert das Perforin die Zahl der CTL, indem er zur Hemmung der Proliferation beiträgt und am induzierten Zelltod überzähliger CTL mitwirkt (Stepp et al. 2000; Waugh et al. 2000).

Den zweiten Weg der T-Zell-induzierten Zielzellvernichtung stellt die rezeptorvermittelte Induktion von Apoptose dar, deren System das CD95-Rezeptorsystem (APO-1/Fas-System) ist (Walczak and Krammer 2000). Das CD95-System besteht aus dem CD95-Rezeptor und seinem Ligand (CD95L), die jeweils auf verschiedenen Zellen exprimiert sind. Beide Proteine sind Transmembranproteine der Tumor-Nekrose-Faktor („*Tumor-Necrosis-Factor*“, *TNF*)-Rezeptorfamilie (Friesen et al. 1996; Fulda et al. 2000; Igney et al. 2000; Klas et al. 1993). Ein Teil der Aufgaben, die man dem CD95-System zuordnet, ist die Eliminierung aktivierter CTL während der Suppression einer Immunantwort. Des Weiteren ist das CD95-System an der Beseitigung autoreaktiver CD8⁺-T-Zellen und der Eliminierung von CD95L-positiven Tumorzellen beteiligt (Buzyn et al. 1999; Demjen et al. 2004; Igney et al. 2000; Krammer 1999). Diese Abläufe stützen sich auf die Rezeptor-Liganderkennung des TCR- und CD95-Komplexes. Die durch CD95 vermittelte Apoptose ist im beträchtlichen Maße vom Aktivierungsstatus der T-Zellen abhängig. Innerhalb des CD95-Rezeptorsystem (APO-1/Fas-System) spielt die FLIP („*Fas-associated death domain-like ICE inhibitory protein*“)-Expression, die die Interaktion zwischen Adaptermolekülen verhindert, eine Rolle (French and Tschopp 1999; Igney and Krammer 2002; Kaufmann and Vaux 2003; Kinoshita et al. 2000; Schmitz et al. 2004; Viard et al. 1998). Diese wird mit dem „*tumor escape*“-Mechanismus der T-Zellimmunität, wie auch mit einer verstärkten Tumorentwicklung, in experimentelle Studien gezeigt, als Tumorprogressionsfaktor in Verbindung gebracht (Behrens et al. 2001; Debatin and Krammer 2004; French and Tschopp 1999; Kang et al. 1997). Ein weiteres Rezeptorsystem (TRAIL/Apo-2L) weist eine hohe Komplexität auf und konnte aufgrund seiner Sequenzhomologie zu anderen Mitgliedern der TNF Superfamilie identifiziert werden (Walczak et al. 2000; Wiley et al. 1995). Ähnlich dem CD95L, ist TRAIL („*TNF-related apoptosis-inducing ligand*“, *TRAIL*), ein zweites Transmembranprotein, das konstitutiv im größeren Umfang auf dem Gewebe exprimiert wird, jedoch von der Zelloberfläche proteolytisch abgespalten werden kann. Somit sind viele Faktoren, verschiedene Rezeptorsysteme bzw. Oberflächenmarker (TCR, CD2, CD3, CD28) und Zytokine (IL-2, IL-4, IL-7, IL-15) zur Modulation der T-Zellsensitivität notwendig und nehmen demzufolge an der Induktion dieser Art des Zelltodes teil (Ehl et al. 1996; Klas et al. 1993; Scaffidi et al. 1999).

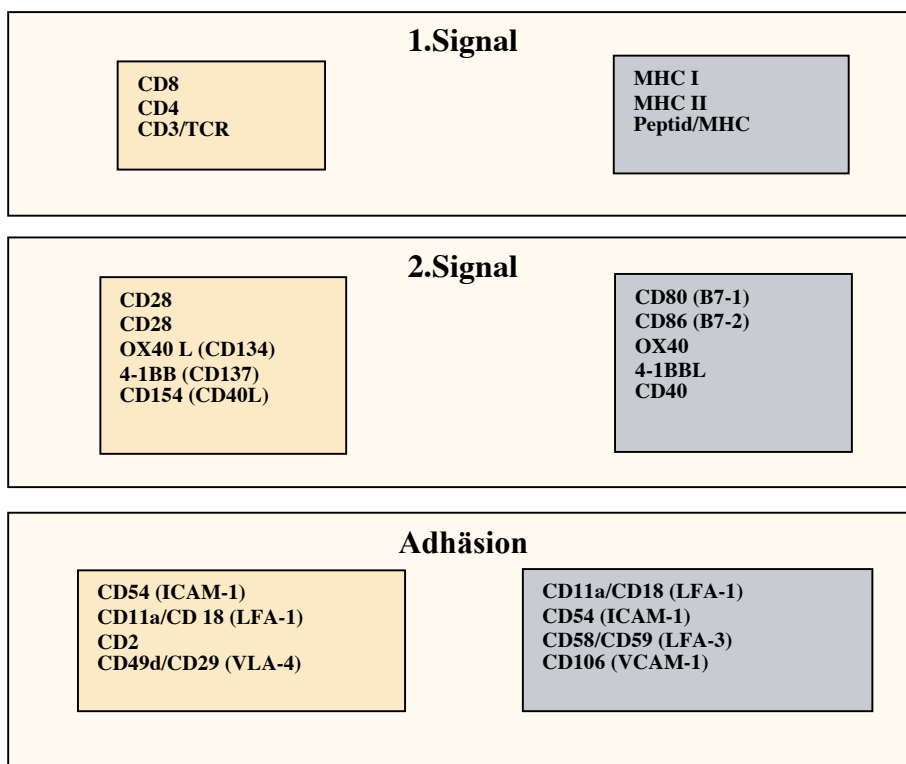
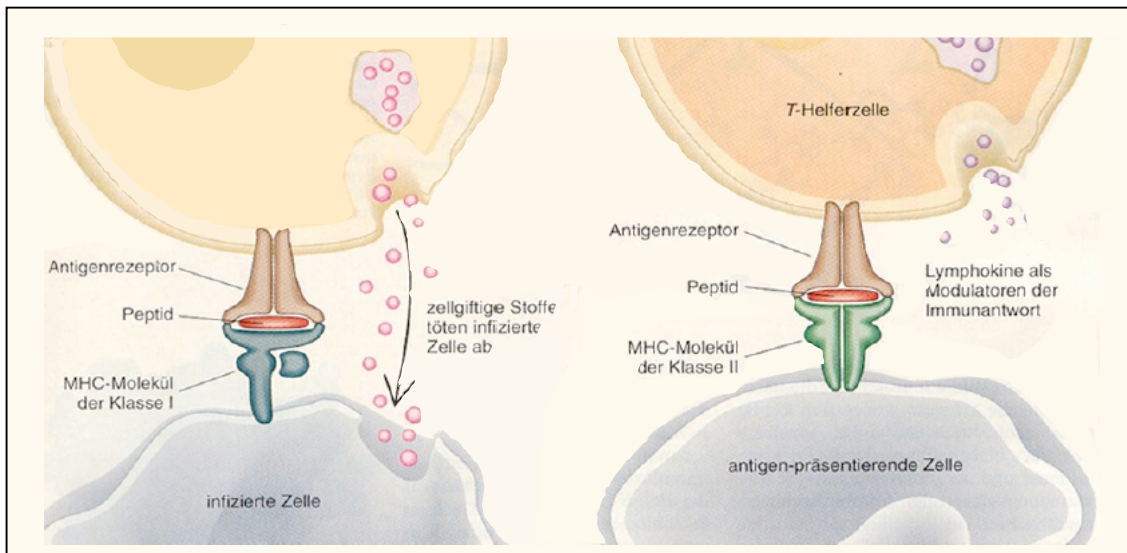


Abbildung 2: Systematischer Überblick über die Aktivierung von T-Zellen. (Quelle der Abb. nach Peschel et al. , 2001)

3.3 Apoptose

Die Apoptose, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, ist ein physiologischer Prozeß, aber auch durch externe Stimuli (Röntgenstrahlen, Zytostatika) ausgelöst, der u.a. in der Homöostase und die Induktion und Erhaltung von Immuntoleranz eine wichtige Rolle spielt.

Die Gene, die den programmierten Zelltod regulieren, wurden während der Evolution stark konserviert, wie das bcl-2-Gen, das für einen intrazellulären Hemmstoff des Programms für den Tod der Zelle kodiert. Zu wenig sterbende Zellen können für den Organismus genauso gefährlich sein, wie eine zu starke Vermehrung oder Mutationen. So wurde die Überexpression von bcl-2, welche die Apoptose verhindert, mit der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht (Engelmann and Bauer 2000). Es wurde versucht in den meisten klinischen und präklinischen Studien, die Expression der apoptotischen Regulatoren, insbesondere, des Bcl-2 und des Bax bei Krebspatienten einfließen zu lassen. Demgemäß sind kurz- und langfristigen Studien in größerem Umfang einschließlich für Lymphome durchgeführt worden (Bosch et al. 1994; Delia et al. 1992; Rassidakis et al. 2002); (Colomo et al. 2003; Debatin and Kramer 2004; Vassallo et al. 2003). Somit können verschiedene Dysregulationen der Apoptose zu einem ungeordneten Zellwachstum führen und dadurch zur Karzinogenese beitragen. Der Ablauf der Apoptose kann in zumindest drei unterschiedliche Phasen eingeteilt werden: die Regulationsphase, Effektorphase, Abräumphase („engulfing“) (Strasser et al. 2000). Die Phase der Regulation umfasst alle Signalwege, die für die Auslösung („commitment“) des Zelltods nötig sind. Einige dieser Signalwege steuern ausschließlich den Zelltod, andererseits besitzen viele von ihnen überlappende Wirkungen in der Kontrolle von Proliferation, Differenzierung und Reaktion auf Zellstress und Homeostase. Wichtig für die Apoptose sind die „Initiator“-Caspasen, deren Bedeutung darin besteht, die „Effektor-Caspasen zu aktivieren, welche die für die Apoptose typischen morphologischen Veränderungen wie z. B. die Fragmentation von Zelle und Nukleus auslösen. Dann folgt die „Engulfing“-Aktivität der umgebenden Zellen (Abräumphase) (Stewart et al. 2003). Die Apoptose unterscheidet sich morphologisch von der Nekrose. Zellen, die in ein apoptotisches Signal übergehen, weisen charakteristische morphologische und biochemische Veränderungen auf. Während Zellen, die durch Nekrose sterben, den Inhalt ihres Zytoplasmas in den extrazellulären Raum ergießen und eine Entzündungsreaktion hervorrufen, verschwinden die der Apoptose erlegenen Zellen auf eine für den Organismus rationelle Weise. Sie werden von Makrophagen (oder anderen benachbarten Zellen) so schnell phagozytiert, daß es nicht zum Auslaufen von Zytoplasma-Bestandteilen und nicht zu einer Entzündungsreaktion kommt. Sind sie erst einmal in den Makrophagen, werden die apoptotischen Zellen schnell degradiert und wiederverwertet. Um diesen Entsorgungsvorgang zu aktivieren, verändern apoptotische Zellen ihre Oberflächenchemie. In manchen Fällen spürt anscheinend ein Lektinmolekül auf der Oberfläche des Makrophagen veränderte Zuckergruppen an der apoptotischen Zelle auf. In der Frühphase der Apoptose verliert die Zelle die Asymmetrie ihrer Phospholipide, so daß

Phosphatidylserin, ein negativ geladenes Phospholipid, von der Innenseite der Plasmamembran an der Oberfläche exponiert wird. Weitere Merkmale sind die Kondensation des Chromatins, des Zellkerns und des Zytoplasmas, die Fragmentierung der DNA und die Bildung apoptotischer Körperchen. Die Apoptose ist aufgrund dieser charakteristischen Veränderungen von der Nekrose deutlich zu unterscheiden, die durch äußere Umstände wie Toxine oder Anoxine verursacht wird (Alberts 1994; Duke et al. 1986; Wyllie 1992).

3.4 Tumoren

Das Entstehen eines Tumors aus einer Zelle (Klonalität) und deren verändertes genetisches Programm haben unmittelbare Auswirkungen auf die Proteinausstattung und das funktionelle Repertoire der Tumorzellen. Diese Veränderungen bleiben damit auch nicht ohne Auswirkungen auf die Umgebung. Zellen im Gewebeverband sind keine solitären, autonomen Gebilde, sondern stehen über Signalmoleküle, Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle in stetem Kontakt mit der Umgebung. Krebszellen vermehren sich ohne die Kontrollmechanismen einer normalen Zelle und werden deshalb auch neoplastisch genannt. Tumoren werden meist aggressiv, d.h. invasiv, da sie sowohl in benachbartes, als auch in weiter entferntes, gesundes Gewebe eindringen und es besiedeln. Gewöhnlich behalten Krebszellen viele Merkmale der Zellen bei, aus denen sie hervorgegangen sind. Deshalb lassen sich Tumoren nach dem Gewebe aus dem sie phylogenetisch hervorgegangen sind unterscheiden: (1) Epitheliale Tumoren stammen aus dem Ektoderm und Entoderm. Ihnen werden das Adenom, welches einen benignen Tumor darstellt, und das Karzinom, welches zu den malignen Tumoren zählt, zugerechnet. (2) Aus dem Mesoderm entstehen mesenchymale Tumoren, wie benigne Lipome und maligne Sarkome. (3) Die letzte Gruppe sind embryonale Tumoren aus undifferenziertem Gewebe (Pschyrembel 1998).

Krebs entsteht aus einer schrittweisen Entartung einer vorher normalen somatischen Zelle. Die Nachkommen einer solchen Zelle müssen sich aber weiter verändern und mehrere Mutationen durchmachen, bevor sie zu Krebszellen werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als Tumorprogression. Er dauert normalerweise viele Jahre und spiegelt einen „Mikro-Evolutionsprozeß“ wieder, welcher durch Mutation und natürlicher Auslese unter den Zellen zustande kommt. Mutagene Substanzen, sogenannte Tumorinitiatoren, sowie nicht-mutagene Wirkstoffe, sogenannte Tumorpromotoren, können diesen Prozeß in Gang setzen oder ihn beschleunigen.

Die genetische Veränderung kann dabei durch mehrere Faktoren ausgelöst worden sein, wie z.B. durch kanzerogene Substanzen (wie Aflatoxin, Benzol oder Phenol) aber auch durch Strahlung (z.B. UV-B) oder Tumorzellen (z.B. Papillomvirus, Rous-Sarcom-Virus) (Trosko and Ruch 1998). Durch Mutationen erlangt der Tumor neue Fähigkeiten, die es ihm ermöglichen in umliegendes Gewebe einzuwandern und zu metastasieren, was zu einer Ausbreitung der Tumorzellen im Organismus führt. Diese Tumorzellen verlassen den Gewebeverband, um über den Blutkreislauf in andere Körperregionen zu gelangen und dort neue Geschwülste zu bilden (Dolcetti and Boiocchi 1996). Krebszellen beinhalten meist auch mutierte Gene, die massive Auswirkungen auf den Ablauf der Mitose und auf weitere wichtige zellphysiologische Prozesse haben können. Onkogene sind abweichende Formen von Proto-Onkogenen, die normale Gene darstellen und Zellwachstum und Entwicklung regulieren, während Anti-Onkogene Zellwachstum und Proliferation hemmend regulieren (Fishleder 1990). Mutierte oder überexprimierte Produkte von Onkogenen stimulieren die Mitose hauptsächlich durch die Abwesenheit normaler Wachstumssignale. Beispiele hierfür sind der von Thrombozyten produzierte Wachstumsfaktor („*platelet-derived growth factor*“, *PDGF*) und *ErbB*, der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors („*epidermal growth factor*“, *EGF*). Diese Gene sind dominant, d.h. nur ein Allel muß mutieren um in der Zelle eine Prädisposition zu erzeugen, die letztendlich zu Krebs führen kann. Weitere Beispiele für Onkogene sind die Tumorsuppressorgene, die gewöhnlich die Mitose inhibieren. Hierzu zählt das Genprodukt p53, welches den Zellzyklus mitreguliert. Wird es durch Mutation funktionsunfähig, entartet die Zellen in der Regel (Trosko and Ruch 1998).

Weitere Veränderungen in der Mitose beziehen sich auf die Telomerasefunktion. Normale Zellen verlieren bei jeder Mitose Abschnitte ihrer Telomerenenden. Um einen Verlust des Genmaterials zu verhindern, verlängert das Enzym Telomerase wieder die Telomere (Dhaene et al. 2000). Die Hypothese, daß erhöhte Telomeraseaktivität unbedingt zur Immortalität der Zellen führt, geht von den Beobachtungen aus, daß in normalen Zellen die Telomeraseaktivität vermindert ist. Dies ist auch der Fall bei Zellen, die der Seneszenz unterliegen, während in immortalisierten und neoplastischen Zellen die Telomeraseaktivität wiederhergestellt oder gar erhöht ist (Bodey 2002;Hooijberg et al. 2000;Meyerson 2000).

Ein weiteres wichtiges Merkmal von Tumorzellen ist die sogenannte Kontaktinhibition, das Verhalten normaler Zellen, nach einem Kontakt mit einer anderen Zelle weitere Zellwanderungen zu unterlassen. Ein Zusammenwirken von Zelloberflächenmolekülen führt zu dieser Kontaktinhibition. Tumorzellen, welche Mutationen durchlaufen haben, zeigen keine homo- und heterotypischen Kontaktinhibition, wodurch malignen Zellen konstantes

Wachstum sowie Invasivität möglich wird (Abercrombie 1979; Campbell et al. 1995; Parish et al. 1987; Trosko and Ruch 1998).

3.5 Tumortherapie

Die Behandlungsmöglichkeiten bei Lymphomen bestanden zunächst aus Chirurgie, Radiotherapie (AC 1991) und systemischer Chemotherapie. Lokalisierte Primärtumoren lassen sich bei rechtzeitiger Erkennung meist problemlos durch chirurgische Eingriffe oder Bestrahlung entfernen. Maligne Krebserkrankungen mit metastasierenden Zellen erschweren die Behandlung, da sie entfernt gelegene Organe besiedeln und deshalb nicht operativ beseitigt werden können. Als Standardtherapie wird nach wie vor die Chemotherapie eingesetzt. Auch bei dieser Behandlung sind Metastasen oft unzugänglich oder stark widerstandsfähig. Trotzdem sind Behandlungserfolge zu verzeichnen. Wobei Nebenwirkungen, in Folge eingesetzter Zytostatika, die gesunde, schnell wachsende Zellen schädigen, auftreten. Zytostatika wie Alkylanzien, Topoisomerase-I-Hemmer, die Antimetabolite, Platinkomplexe oder Mitosehemmstoffe werden bereits seit mehreren Jahren angewendet. Die nahezu 60 Jahre andauernde Forschungsaktivität zur Entdeckung und Entwicklung von „klassischen“ Zytostatika hat zu etwa 100 zugelassenen Verbindungen geführt, die zur Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzt wurden. Alkylanzien führen zu DNA-Schäden an Zucker, Phosphat und Basen und zu Strangbrüchen, welche die replikative und transkriptionelle Funktion der DNA einschränken.

Ein weiteres Problem der Krebstherapie liegt im Ausbalancieren schwerer Nebenwirkungen und effektiver Antitumoreffekte. Oftmals spielt die Dosis eine entscheidende Rolle, da sie für einen positiven Therapieeffekt häufig an einer letalen Grenze liegt. Die alleinige Strahlentherapie ist als Primärbehandlung bei Beispielsweise malignem Melanom nur in Einzelfällen indiziert, bei denen ein operativer Eingriff unmöglich oder nicht sinnvoll ist. Innerhalb interdisziplinärer Behandlungskonzepte bei der Therapie der malignen Melanome spielt die Strahlentherapie aber eine zunehmende Rolle. Diese galten in früheren Zeiten als strahlenresistent, jedoch zeigen zahlreiche klinische Studien, aber auch strahlenbiologische Untersuchungen, daß eine klinisch relevante Wirkung vorliegt. Neben einer hyperthermen Perfusion in Kombination mit Chemotherapie kann zur Wirkungssteigerung der Strahlenbehandlung eine regionale Hyperthermie eingesetzt werden („Thermoradiotherapie“).

Durch die Hyperthermie wird die radiotherapeutische Wirksamkeit verstärkt, so daß Ansprechraten von 88% erreicht werden können (Emami et al. 1988;Engin et al. 1993).

Seit die Stellung des Immunsystems für den Verlauf von Krebserkrankungen erkannt und näher erforscht wurde, gewinnt die Immuntherapie zumindest bei einzelnen Krebsarten an Bedeutung. Eine der ältesten Methoden, im Bereich der Immuntherapie, basiert auf dem Versuch die Immunantwort des Patienten unspezifisch zu verstärken (aktive unspezifische Immunstimulation). Dies konnte durch die Injektion von Bakterienpräparaten erreicht werden wodurch in einigen Fällen eine Regression des Tumors beobachtet werden konnte (Coley 1896).

Viel später wurden Experimente mit Zytokinen durchgeführt, jedoch wurden in der klinischen Anwendung starke Nebenwirkungen beim Patienten festgestellt, so daß eine weitere Behandlung oft nicht mehr möglich war. Allerdings konnte bei geringeren Konzentrationen z.B. von rekombinantem und natürlichem Interferon- α und IL-2, eine Tumorregression in einigen Patienten festgestellt werden (Steis et al. 1987). Aus diesem Grund sind neue Ansätze entwickelt worden, welche erfolversprechender scheinen: Zytokine werden mit verschiedensten Vakzinen (zelluläre, DNA-, Peptid- und Proteinvakzine), Antikörpern, Lymphozyten und/oder zytotoxischen Medikamenten, kombiniert (Andres et al. 1998;Bremers and Parmiani 2000;Chang and Shu 1996;Hanson et al. 2000;Jantscheff et al. 1999;Rosenberg et al. 1985). Vakzinierungsstrategien, setzen auf die Aktivierung des Immunsystems z.B. gegen bekannte oder unbekannte TAA auf der Zelloberfläche. Modifizierte Tumorzellen, die in der Umgebung des Tumorgewebes ein immunaktivierendes Zytokin sezernieren können, lösen infolgedessen eine Destruktion des Tumorgewebes aus (Jaffee 1999). Neuere Methoden effektiver Tumorkvakzinierung sind protein-und peptidbasierende Vakzine sowie DNA-basierende Vakzine, die eine dauerhafte Immunantwort induzieren können (Minev et al. 1998). Vakzinierung gegen lymphom-spezifische Antigenstrukturen (Davis et al. 1998) und spezifische molekularpharmakologische Interventionen, wie sie bei anderen Erkrankungen schon eingesetzt werden, sollen in den nächsten Jahren in die klinische Praxis eingeführt werden.

Bemerkenswert ist, daß schon im frühen Mittelalter spezielle Karzinombehandlungen, mit dem Hintergrund der Antikörpertherapie durchgeführt wurden. Durch die Verabreichung der „vier Lebenssäfte“ in einem gewissem Mengenverhältnis, konnte eine Verringerung der Geschwulst festgestellt werden, da im Blutserum Antikörper enthalten sind. Dies stützt sich auf die These des Heilkundigen Hippokrates (460-370 v. Chr.), der darin festlegte, daß die

Gesundheit des Menschen durch die Mischung der vier angeblichen Hauptsäfte des Körpers (Galle, Blut, Schleim und Wasser), bedingt sei (Alberts 1887).

Im letzten Jahrzehnten sind die Verfahren um die Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern (Maloney et al. 1997) sowie die autologe und allogene Blutstammzelltransplantation weiter ergänzt worden. Antikörpertherapien basieren auf der Behandlung mit monoklonalen Antikörpern (mAk), Immuntoxinen, bispezifischen rekombinanten Antikörpern (biAk) und Radioisotop-gekoppelten Antikörpern. Die Fähigkeit mAk an Membranrezeptoren zu binden und intrazelluläre Signale zu induzieren, ist Teil des Mechanismus, mit welchem man Tumorwachstum zu kontrollieren versucht.

Neue Ergebnisse zeigen, daß mAk Tumoren für konventionelle DNA-schädigende Medikamente empfindlich machen kann (Cragg et al. 1999). Bei mAk-Therapie kann auch die Immunreaktion speziell auf gewünschte Krebszellen gerichtet werden. Der Fc-Teil des mAk bindet an den Fc-Rezeptor auf der Effektorzelle. So ist in klinischen Studien ein mAk eingesetzt worden, der in seiner Wirksamkeit und seiner Resistenz mindestens genauso gute Erfolge erzielt, wie man es mit chemotherapeutischen Maßnahmen erreichen kann (Kosits and Callaghan 2000). 1991 wurde die mAk-vermittelte Therapie durch die Aufklärung relevanter Zelloberflächenstrukturen auf abnormalen Zellen, die Zielstrukturen für monoklonale Antikörper sind, verbessert. Außerdem können mAk durch gentechnische Methoden weiterentwickelt werden, so daß sie weniger immunogen und gleichzeitig effektiver werden. Fragmente (meist sogenannte „*single-chain*“-Fv Fragmente, scFv) dieser mAk lassen sich zum Beispiel mit Toxinen oder Radionukliden koppeln. Im Endeffekt konnte damit eine Verbesserung der Effektorfunktion erreicht werden (Waldmann 1991). Der enge Kontakt zwischen einem radioaktiven Antikörperkonjugat und der Zielzelle ermöglicht die Absorption der radioaktiven Dosis auf der Seite des malignen Gewebes, ohne das umliegend gesunde Gewebe zu schädigen (Bruland 1995).

Während der letzten beiden Jahrzehnte erbrachten radiomarkierte tumorspezifische mAk erhebliche Fortschritte in der Krebsdiagnose und Krebstherapie.

Immuntoxine sind mit toxischen Molekülen (meist von pflanzlichen oder mikrobiologischen Quellen stammend) gekoppelte Antikörper. In einem Beispiel immuntoxischer Strategien werden monoklonale Antikörper, die mit abgewandelten Toxinen oder deren Untereinheiten ausgestattet sind, gegen die Zelloberflächenantigene CD19 und CD22 des NHL gerichtet (Herrera et al. 2000). Weiter konnten rekombinante Immuntoxine aus der Fusion von scFv-Antikörpern und bakteriellen Toxinen hergestellt werden.

Der Vorteil von scFv gegenüber vollständigen Antikörpern liegt in ihrer geringeren Immunogenität und einer erleichterten Penetration massiven Tumorgewebes. Um verbesserte Anti-Tumoreffekt zu erzielen wurden zum Beispiel bispezifische Antikörper entwickelt, die sowohl gegen ein Tumorantigen als auch gegen Antigene auf NK-Zellen, T-Lymphozyten oder Makrophagen gerichtet sind und damit beide Bindungspartner in räumliche Nähe bringen können (Penna et al. 1994). Ein Beispiel hierfür ist die Behandlung des humanen Lymphoms im Tiermodell mit einem CD3 x CD19 „Diabody“ (Cochlovius et al. 2000;Kipriyanov et al. 2002).

Gängige immuntherapeutische Konzepte basieren auf der Identifikation von tumorspezifischen Antigenen und ihrer Erkennung durch tumorspezifische T-Zellen (Schultze 1997). Durch retrovirale Transduktion eines chimären Rezeptor in die gewünschten humanen Lymphozyten, welcher die T-Zell-Effektorfunktion und die Antikörperspezifität miteinander kombiniert und gegen einen Tumor gerichtet ist, können solche Konzepte umgesetzt werden (Hwu and Rosenberg 1994).

3.6 B-Zell-Lymphome

Wie jede andere Körperzelle können auch die Zellen der lymphatischen Gewebe entarten und Ausgangspunkt einer Krebserkrankung werden. Das NHL stellt eine biologisch, klinisch und pathohistologisch heterogene Einheit von Erkrankungen dar, deren Kennzeichen die Abstammung von den Zellen des lymphatischen Systems ist. Das NHL kann in Lymphknoten, Milz, Thymus, Adenoiden, Mandeln und im Knochenmark auftreten. Vorwiegend wird NHL bei Erwachsenen, am häufigsten bei 45- bis 60-Jährigen, diagnostiziert. Zurzeit sind rund 4,5 Millionen Menschen weltweit von NHL betroffen, bei etwa 300 000 Patienten pro Jahr verläuft die Krankheit tödlich (Quelle: Robert-Koch-Institut „Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends“, 2002).

Das NHL manifestiert sich klinisch als Lymphome, Leukämien oder Plasmozytome. Maligne Lymphome sind klonale Tumorerkrankungen, die von einer einzelnen, klonal expandierenden Zelle des lymphatischen Systems abstammen. Bei immunsupprimierten Patienten (AIDS, medikamentöse Immunsuppression nach Transplantationen) können Lymphome jedoch auch aus oligo- oder polyklonalen Proliferationen entstehen. Mehr als 90% der malignen Lymphome sind B-Zell-Lymphome, d.h. sie stammen von B-Lymphozyten ab, ca. 10% sind T- bzw. NK-Zell-Lymphome (Harris et al. 1994;Jaffe et al. 1999)

Epidemiologie

Die Zahl maligner NHL nimmt kontinuierlich zu (Levi et al. 1996;Wingo et al. 1998). Dabei ist der Anstieg aggressiver (hochmaligner) NHL besonders auffallend (Devesa and Fears 1992). Bei Patienten mit Autoimmun-lymphoproliferativen Syndrom ist das Risiko der Entwicklung eines NHL 14-fach höher (Diehl et al. 2004;Straus et al. 2001) Die früheren, in Europa (Kiel-Klassifikation) und Nordamerika (Working-Formulation, 1985) verwendeten Lymphom-Klassifikationen sind abgelöst worden. Inzwischen wird die Einteilung von malignen Lymphomen nach der neuen 2001 erschienenen WHO-Klassifikation vorgenommen, die zwischen Lymphomen der B- und T-Zell-Reihe unterscheidet sowie zwischen Lymphomen, die von frühen und späteren, sogenannten „peripheren“ Vorläuferzellen der Lymphopoese ausgehen (Jaffe et al. 1999).

Klinische Gruppierung maligner Lymphome

Nach pathologischen Kriterien werden bei B-Zell-Lymphomen Vorläufer- („Precursor“-) Lymphome sowie periphere oder reife B-Zell-Lymphome unterschieden. B-Zell-Lymphome, die dem Keimzentrum entspringen, sind in der Regel hochmaligne. Dieses sind die unreifsten und am stärksten proliferierenden Lymphome, insbesondere das Burkitt-Lymphom, das zentroblastische Lymphom mit verschiedenen Veränderungen wie auch die folliculären Lymphome in verschiedenen Malignitätsgraden. Die anfänglich als hochmaligne NHL bezeichneten aggressiven Lymphome zeigen im Gegensatz zu den langsam wachsenden indolenten Lymphomen einen schnellen progradienten klinischen Verlauf und sind ohne Behandlung innerhalb weniger Wochen oder Monate tödlich. Die diffus großzelligen B-Zell-Lymphome stellen dabei fast ein Drittel aller Lymphomerkrankungen dar und schließen die in Deutschland zentroblastischen und immunoblastischen NHL inklusive weitere Untergruppen, mit ein. Auf Grund ihrer klinischen und histologischen Charakteristika werden lymphoblastische Lymphome (B- und T-Vorläuferzell-NHL nach WHO) und die Burkitt-Lymphome von den hochmalignen oder aggressiven Lymphomen abgegrenzt. Viele chromosomale Veränderungen sind bei den NHL bekannt. Bei einem Teil der B-Zell-Malignome Gene, die die Synthese von leichten und schweren Ketten der Ig kontrollieren, wurden translatiert. Es existieren neuere Hinweise darauf, daß eine Störung der normalen immunregulatorischen Abläufe zur Entwicklung maligner Lymphome prädisponiert ist.

Die reifere Form der Keimzentrumslymphome stellt eine Gruppe von Entitäten dar. Kennzeichnend dafür zeigen „niedrigmaligne“ bzw. indolente folliculäre Lymphome in ihrer Histologie und Graduierung ein schwaches folliculäres Wachstum und können abhängig von

deren Differenzierungsgrad neoplastische Keimzentren darstellen. Die Tumorzellen sind positiv für CD10, CD38 und bcl-2. Sie exprimieren regulär die pan-B-Zell-Marker CD20 und CD79a. IgM ist häufig membranständig nachweisbar.

Das Mantelzellenlymphom steht außerhalb des Keimzentrums und weist dementsprechend auch keine somatische Hypermutation auf. Es setzt sich aus teils nodulär und teils diffus wachsenden B-Zellen zusammen. Charakteristisch für das Mantelzellenlymphom ist die Expression von membranständigen IgM±IgD. Daneben ist zwischen einer Positivität für CD5, CD20 und einer negativen Expression für CD10 und CD23 zu unterscheiden. Die Gesamtheit der aggressiven B-Zell-Lymphome exprimieren im Allgemeinen die B-Zellmarker CD19, CD20, CD22 und CD79a sowie MHC-Klasse II-Moleküle (HLA-DR). Ferner können B-Zell-Lymphome Marker unterschiedlicher Aktivierungsstadien der B-Zellen und rekombinierte Immunglobuline zeigen (Herrera et al. 2000). Bei manchen Lymphomformen kann auch eine virale Genese wahrscheinlich sein; bekanntestes Beispiel hierbei ist das Burkitt-Lymphom, das mit einer Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektion assoziiert ist (Carbone et al. 2000; Dolcetti and Boiocchi 1996). Der Immunphänotyp ähnelt typischen Keimzentrumszellen mit der Expression von CD20, CD10 und CD38. Zytogenetisch ist eine Translokation bzw. Verlagerung des Onkogens *c-myc* zu finden.

Periphere T-Zell-Lymphome sind in Europa und Nordamerika selten und machen hier etwa 10–15% aller malignen Lymphome aus (Armitage et al. 1989; Armitage and Weisenburger 1998; Melnyk et al. 1997). T-Zell-Lymphome werden entsprechend ihrer Pathologie in Vorläufer-T-Zell-Lymphome und periphere T-Zell-Lymphome eingeteilt, die den Immunphänotyp von postthymischen T-Lymphozyten zeigen. Das häufigste T-Zell-Lymphom ist das angioimmunoblastische Lymphom. Die Tumorzellen können sowohl CD4- als auch CD8-positiv sein, in der Regel sind Kombinationen von derartigen Populationen zu beobachten. Es können sehr unterschiedliche Veränderungen in der Zytogenetik gefunden werden, wie Trisomie 3, Trisomie 5 und ein zusätzliches X-Chromosom. Eine EBV-Assoziation ist wiederholt beschrieben worden (Siegert et al. 1995). Ein T-Zell-Rezeptor-Rearrangement ist auch bei den T-Zell-Lymphomen zu finden.

Klinisch repräsentieren die chronische lymphatische Leukämie vom T-Zelltyp (T-CLL) und die primären kutanen Lymphome Erkrankungsbilder, die zwar langsam progredieren, jedoch nicht geheilt werden können. Differenzialdiagnostisch lassen sie sich meistens gut von den aggressiv verlaufenden T-NHL oder B-NHL abgrenzen. Periphere T-NHL sind in Europa und Nordamerika die häufigsten T-Zell-NHL. In mehreren Studien wurde gezeigt, daß

Prognose und klinischer Verlauf dieser Subgruppe von T-NHL schlechter als die der diffusgroßzelligen B-NHL ist.

Angioimmunoblastische Lymphome sind nach peripheren T-Zell-NHL das zweithäufigste T-Zell-NHL. Diese systemische Erkrankung, die häufig primär nicht als lymphomtypische Symptome gekennzeichnet ist, nimmt vor allem auf Grund von Immunsuppression und opportunistischer Infektionen einen progredienten Verlauf.

In der Klinik sind zur Zeit verschiedene NHL-Therapien üblich: Radiotherapie, auch in Kombination mit Chemotherapie, Chemotherapie mit einem einzelnen alkylierten Agens (z.B. Chlorambucil) und Kombinationschemotherapien.

Eine Sekundärbehandlung, die nach einer hochdosierten Chemo- oder Radiotherapie anknüpft, ist die autologe oder allogene Knochenmarks-Transplantation, um den Stammzellpool des Patienten wiederherzustellen. Dabei konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, daß ein wesentlicher Teil der Patienten von einer solchen Behandlung wesentlich profitierten (Vose 1996). Der zusätzliche Einsatz einer Chemotherapie, z.B. Methotrexat, verbessert die Krankheitssituation insgesamt. Bei den meisten Patienten konnte eine dauerhafte Remission und teilweise sogar eine Heilung erzielt werden (DeAngelis 1999). Konventionelle systemisch verabreichte Kombinationen von Medikamenten, wie Cyclophosphamid, Doxorubicin und Prednison sind nicht effektiv. Dagegen werden die besten Ergebnisse bei aggressiven NHL mit anthrazyklinhaltigen Polychemotherapien erzielt (Meyer et al. 1995; Sonneveld et al. 1995; Tirelli et al. 1998). Seit einigen Jahren werden verstärkt hämopoetische Wachstumsfaktoren (G-CSF, GM-CSF) verwendet, die das Risiko von Neutropenien und/oder Infektionen signifikant verringern (Doorduijn et al. 2003; Laver et al. 1998). Die Ergebnisse einer randomisierten Studie bei 60–80-jährigen Patienten mit aggressiven NHL, denen und Rituximab bzw. nur CHOP (Cyclophosphamid, Adriamycin, Vincristin, Prednison) verabreicht wurde, war nach Therapiebeginn in der mit CHOP und Rituximab behandelten Gruppe ereignisfrei und die Gesamtüberlebensrate erhöht (Mounier et al. 2003).

MAK, die in der Therapie von B-Zell-Lymphomen eine breite Anwendung erfahren, haben sich auf Grund des Fehlens zugelassener, T-Zell-epitopspezifischer Antikörper und der teilweise hohen immunsuppressiven Nebenwirkungen bei antikörpervermittelter T-Zell-Depletion noch nicht durchsetzen können. Der Antikörper Campath-1H (MabCampath®), der gegen CD52 gerichtet ist, liefert bei Chronischer lymphatischer Leukämie sowie bei T-Zell-Prolymphozyten-Leukämie Responseraten zwischen 60 und 70%, die eine Zulassung des

Antikörper für Indikationen erwarten lassen (Pawson et al. 1997). Ob sich diese Ergebnisse auch auf periphere T-NHL übertragen lassen, ist Gegenstand aktueller PhaseI/II-Studien.

3.7 Adoptiver Transfer

Adoptiver Transfer von aktivierten Lymphozyten in einen tumortragenden Wirt vermittelt direkt oder indirekt Anti-Tumoreffekte (Chang and Shu 1996). Die transferierten Immunzellen können entweder durch direkte Anti-Tumormechanismen wie die zytotoxische Lyse oder indirekt durch die Freisetzung von Zytokinen eine Immunität auf die Rezipienten übertragen. Die zu transferierenden Lymphozyten können systemisch oder lokal durch Injektion ins Tumorgewebe appliziert werden. Tumorreaktive Lymphozyten müssen dazu *in vitro* aktiviert und expandiert werden. Mit der Entdeckung von Interleukin-2 ist ein potentieller Zugang zur Aktivierung und Expansion von T-Zellen eröffnet worden (Morgan et al. 1976).

Beim adoptiven Transfer von *in vitro* generierten Zellen besteht das Problem des „Homings“. Die Zelle besitzt spezielle Oberflächenrezeptoren, sogenannte „Homing-Rezeptoren“ die ihr spezifisch den „Weg“ zu ihrem Ziel weisen. *In vitro* kultivierte tumorspezifische CTL, die durch adoptiven Transfer wieder in den Organismus eingebracht werden, sind nicht in der Lage an ihr entsprechendes malignes Targetgewebe zu binden. Sie werden häufig nach einer Retransplantation, in das Milz- und Lungengewebe eingeschlossen. Eine Annäherung zur Wiederherstellung der natürlichen „Homing“-Eigenschaften kann auf den *in vitro* Transfer von äquivalenten Rezeptormolekülen basieren (Cochlovius et al. 1998).

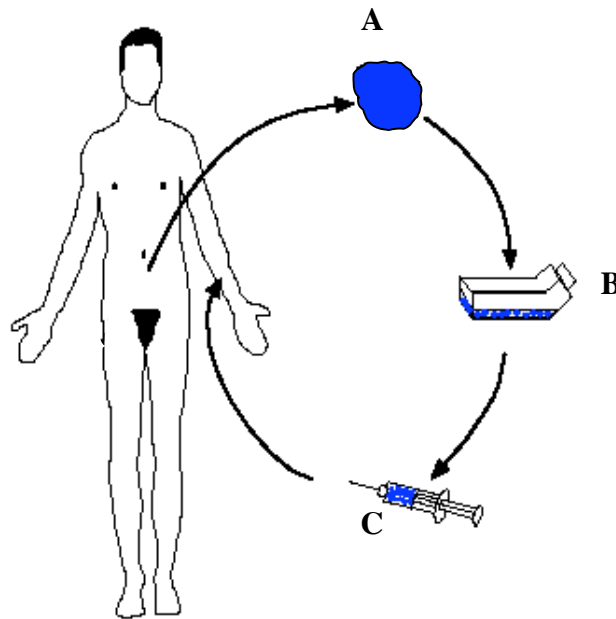


Abbildung 3: Adoptiver Transfer von T-Zellen. Entnahme von T-Zell-Lymphozyten (z.B. über Leukapherese) (A); Expansion der Lymphozyten (B); adoptiver Transfer der sensibilisierten und expandierten Lymphozyten (C) (Quelle: Peschel et al., 1999).

Adoptiver Transfer von unspezifischen T-Zellen

Erste Ansätze zum adoptiven Transfer von malignomreaktiven Lymphozyten bei Patienten mit malignen Erkrankungen wurden von Rosenberg und Mitarbeitern am National Cancer Institute in Bethesda durchgeführt (Rosenberg et al. 1985). Die Lymphozyten der Patienten wurden mittels Leukapherese gewonnen, *in vitro* angereichert und mit IL-2 versetzt. Den so expandierten Lymphozyten ist es möglich, Tumorzellen *in vitro* abzutöten. Demzufolge werden sie lymphokinaktivierte Killerzellen (LAK) genannt. LAK stellen eine heterogene Population von T-Lymphozyten und NK-Zellen dar, dementsprechend ist ihre „Killeraktivität“ nicht tumorspezifisch. Daneben sind LAK-Zellen imstande Tumorzellen in einer MHC-unabhängigen Reaktion abzutöten (Frost and Bonavida 2000). Um die LAK-Zellen auch *in vivo* weiter zu stimulieren, wurden im Rahmen von klinischen Studien autologe LAK-Zellen den Patienten zusammen mit hochdosiertem Interleukin-2 transfundiert. Nebenwirkungen wurden durch toxische Effekte hochdosiertens Interleukin-2 und hauptsächlich durch die erhöhte Gefäßpermeabilität geprägt. Remission wurden vor allem bei Patienten mit malignen Melanomen und Nierenzellkarzinomen beobachtet. Da beide Tumorentitäten sensitiv gegenüber einer alleinigen Interleukin-2-Therapie sind, wurde eine randomisierte Studie konzipiert, die den adoptiven Transfer von LAK-Zellen und Interleukin-2 mit der alleinigen Gabe von Interleukin-2 überprüfte. Diese Studie konnte keinen zusätzlichen Nutzen der LAK-Zellen gegenüber einer Interleukin-2-Monotherapie zeigen, so daß dieses Therapiekonzept weitgehend verlassen wurde (Rosenberg et al. 1993).

Adoptiver Transfer von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL)

Unter der Vorstellung, daß tumorreaktive T-Zellen natürlicherweise in den Tumor wandern und entsprechend in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden konnten (Rosenberg et al. 1986), entwickelten sich Bestrebungen, diese TIL als Quelle für tumorreaktive T-Zellen zu verwenden. Zur Gewinnung der TIL erfolgt zunächst die Tumorresektion. Aus dem resezierten Tumor wird eine Zellsuspension hergestellt, die aus einem Gemisch von Tumorzellen und T-Zellen besteht. Durch Zugabe von Interleukin-2 wird die Expansion der TIL induziert, wobei darin enthaltene Tumorzellen während der Kultur zugrunde gehen. Es ist darüber hinaus möglich mit geringen Konzentrationen IL-2 und anderen Zytokinen konnten diese expandiert werden (Robbins et al. 1994; Rosenberg et al. 1994; Steger et al. 1995). In klinischen Studien wurde die Effektivität intravenös infundierter TIL bei Patienten mit Tumoren unterschiedlichen Ursprungs überprüft. Dabei wurden die TIL zusammen mit hohen Dosen an Interleukin-2 infundiert, unter der Vorstellung, daß transfundierte TIL auf diese Weise eine längere Überlebenszeit *in vivo* haben. Objektive Remissionsrate von 20–30% ergaben sich vor allem bei Patienten mit malignem Melanom und Nierenzellkarzinom (Rosenberg et al. 1994). Die Klonierung und Charakterisierung von tumorspezifischen TIL läßt auf weitere Entdeckungen von TAA, die durch CTL erkannt werden, hoffen (Frost and Bonavida 2000). Transferierte tumorspezifische T-Zellen bleiben *in vivo* funktionell und besitzen die Befähigung kleine wie auch größere etablierte Tumore abzustößen und / oder zu bekämpfen (Frost and Bonavida 2000).

Adoptiver Transfer von tumorsensibilisierten T-Zellen

Maligne Tumore, wie maligne Gliome, produzieren Moleküle die zu einer Immunsuppression führen. Zur Überwindung der Immunsuppression *in vivo* und zur Gewinnung tumorreaktiver T-Zellen wurde ein neues Konzept von der Arbeitsgruppe Shu in Cleveland, Ohio, entwickelt. Das Konzept basiert auf der *in vivo*-Sensibilisierung von tumorreaktiven T-Zellen durch eine autologe Tumorstoffimpfung, die dem adoptiven T-Zelltransfer vorgeschaltet wird (Chang et al. 1997).

Erste Zielgruppe dieses Therapiekonzeptes waren Patienten mit Melanomen und Nierenzellkarzinomen, bei denen teilweise Remissionen beobachtet wurden. In einer Folgestudie wurden tumorsensibilisierte T-Zellen zum adoptiven Transfer bei Patienten mit malignen Gliomen eingesetzt, wobei den adoptiv transfundierten T-Zellen kein Interleukin-2 hinzugefügt wurde (Plautz et al. 1998). Bei diesem gering immunogenen Tumor konnte bei zwei von zehn behandelten Patienten eine Tumorregression beobachtet werden.

Adoptiver Transfer von Antigen-spezifischen T-Zellen

Der adoptive Transfer von Antigen-spezifischen T-Zellen beim Menschen wurde bisher vor allem bei der Behandlung von Virusinfektionen oder virusassoziierten Tumorerkrankungen eingesetzt. Das Auftreten einer Erkrankung durch CMV nach allogener Knochenmarktransplantation ist mit dem Fehlen einer CMV-spezifischen T-Zellantwort verbunden. Darausfolgend wurde das Konzept für einen adoptiven Transfer von CD8⁺ CMV-spezifischen T-Zellen, die von dem immunkompetenten Knochenmarkspender generiert wurden, entwickelt. Greenberg und Mitarbeiter setzten dieses erstmals beim Menschen ein (Riddell et al. 1992). Die Therapie verursachte keine Nebenwirkungen und alle Patienten entwickelten eine Immunität gegen CMV. Ähnlich dem Cytomegalievirus, kann sich das EBV in Patienten nach allogener Knochenmarktransplantation reaktivieren und in Abwesenheit von EBV-reaktiven T-Zellen immunoblastische Lymphome induzieren. EBV-reaktive T-Zellen des Knochenmarkspenders, die dem immunsupprimierten KM-Empfänger adoptiv transferiert werden, sind in der Lage, die Immunität gegen EBV wiederherzustellen und die Entstehung EBV-induzierter Lymphome zu verhindern (Heslop et al. 1996).

Adoptiver Transfer von Spenderlymphozyten nach allogener Stammzelltransplantation

Die Therapie der allogenen Stammzelltransplantation basiert auf zwei Wirkprinzipien:

1. Die Stammzelltransplantation ist für eine myeloablativen Hochdosis-Chemotherapie unumgänglich.
2. Durch eine allogene Transplantation wird eine immunologische Tumorabwehr induziert. Transplantierte Effektorzellen des Spenders erkennen das Empfängergewebe als „nicht körpereigen“ und führen zur Alloreaktion. Die Immunreaktion wird hauptsächlich durch alloreaktive T-Zellen vermittelt und richtet sich einerseits gegen normale Empfängerzellen – der „*Graft versus Host (GvH)*“ Effekt – und andererseits auch gegen noch vorhandene Leukämiezellen (Kolb and Holler 1997; Kolb et al. 1990).

Adoptiver Transfer von T-Zellen und bispezifischen Antikörpern

Abgesehen von dem autologen T-Zelltransfer, wurde ein anderes Konzept erstellt, bei dem autologe T-Zellen zusammen mit einem bispezifischen Antikörper eingesetzt werden. D.h., daß zum einen ein Molekül auf den T-Zellen, z.B. CD3, zum anderen ein Antigen auf den Tumorzellen erkannt wird. So sollen alle CD3⁺ T-Zellen, unabhängig von ihrer Antigen-spezifität, mit den Tumorzellen verankert werden und konsekutiv den Tumor lysieren,

auch wenn die T-Zellen keinen Antigen-spezifischen T-Zellrezeptor besitzen (Brandl et al. 1999; Chen et al. 2000).

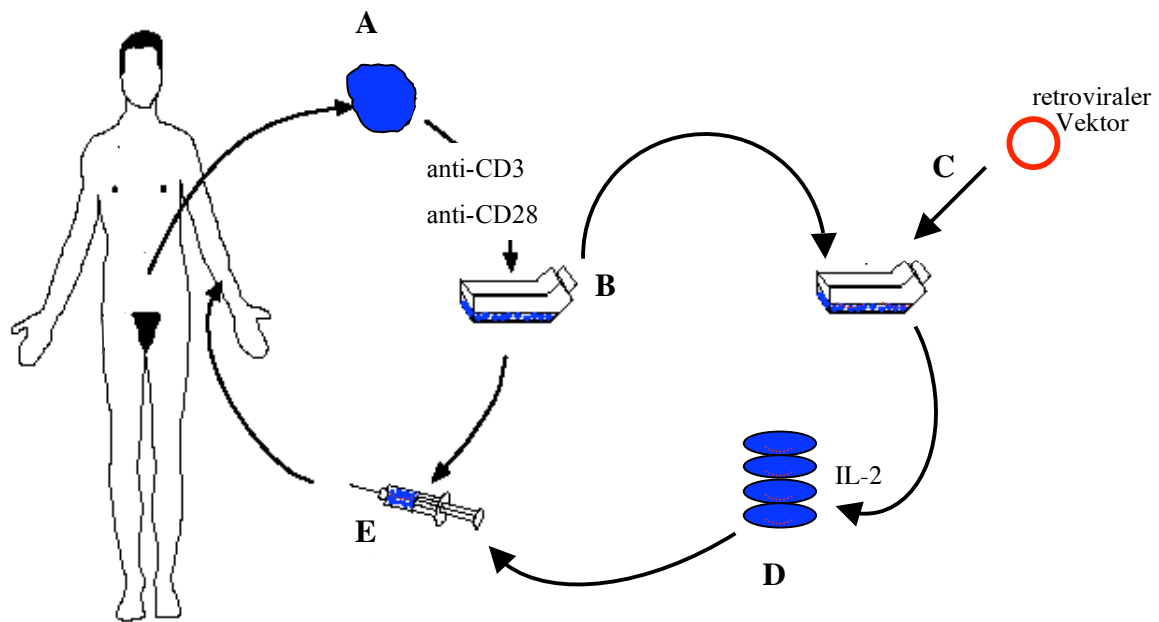


Abbildung 4: Adoptiver Transfer von T-Zellen mittels des „T-Body“-Konzeptes. Entnahme von T-Zellen (A); Aktivierung mit den Antikörpern anti-CD3 und anti-CD28 (B); Retrovirale Transduktion mittels des retroviralen Vektors, welcher den chimären Rezeptor („T-Body“) beinhaltet (C); Expansion mit Interleukin-2 (D); Reinjektion der behandelten T-Zellen in den Patienten (E).

3.8 „T-Body“

(Eshhar et al. 1996)

Das Konzept des „T-Body“ an sich kombiniert eine Antikörpererkennung und eine T-Zell-Effektorfunktion miteinander. Der „T-Body“ setzt sich aus drei Domänen zusammen: einer Signal-, Transmembran- und einer extrazellulären Domäne und wird deshalb als ein chimärer Rezeptor bezeichnet.

In der hier beschriebenen Arbeit wurden „T-Body's“ entwickelt, deren extrazelluläre Domäne gegen das B-Zell-Lymphomantigen CD22 gerichtet sind. Als intrazelluläre Signaldomäne dient die ζ -Kette des CD3-Komplexes, während die Transmembrandomäne von CD28 stammt. Der chimäre Rezeptor ist ein integraler Teil einer T-Zelle, durch den eine gezielte Signalinduktionskaskade der Immunantwort ausgelöst wird. Durch die konstante Expression des „T-Body“ besitzt dieser das Potential, im Patienten für eine längere Zeitspanne zu bestehen (Daly et al. 2000; Eshhar 1997; Eshhar and Fitzer-Attas 1998; Eshhar et al. 2001; Pinthus et al. 2003; Willemsen et al. 2000).

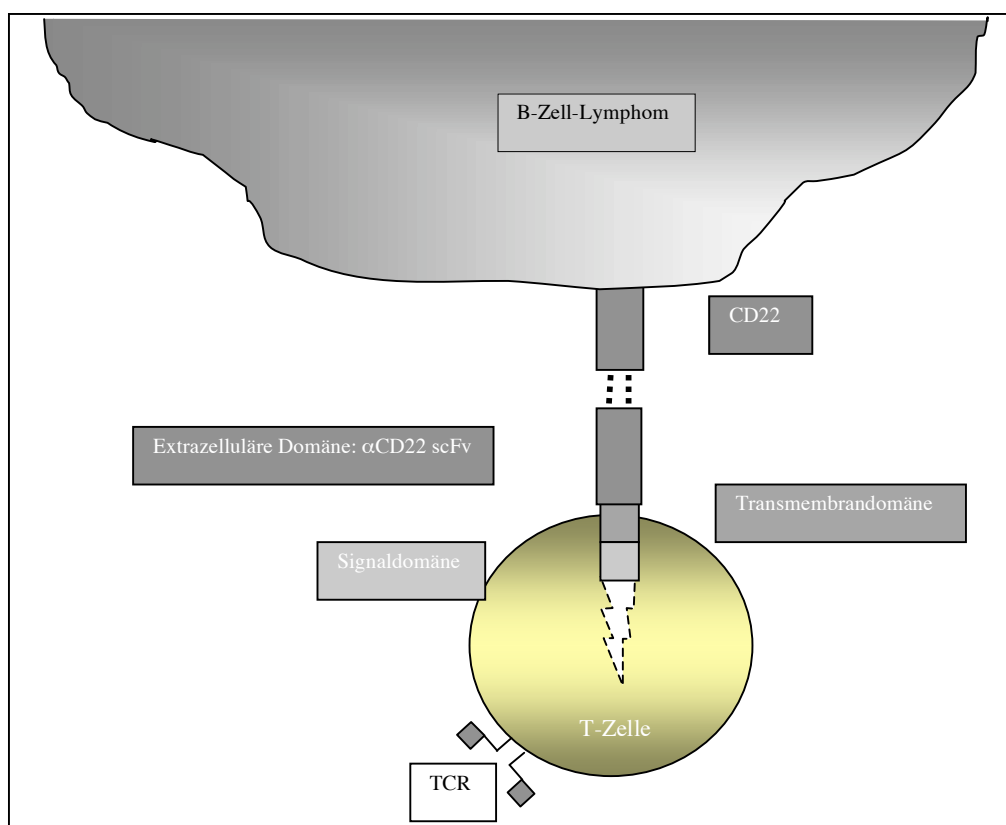


Abbildung 5: Schematische Darstellung der T-Zellaktivierung und Tumorerkennung über den „T-Body“.

3.9 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit verfolgt das Ziel der Verbesserung immuntherapeutischer Strategien für die Behandlung der B-Zellymphome (NHL).

Es sollte untersucht werden, ob das „*T-Body*“-Modell - gerichtet gegen das NHL CD22-Antigen – in Kombination von CTL zu einer effektiven adoptiven Therapie führen kann.

1. Konstruktion des retroviralen Vektors für die Expression von anti-CD22-„*T-Body*“ (Klonierung).
2. Amplifikation und Transfektion des retroviralen Immortalisationsvektors hTERT
3. Herstellung von Verpackungslinien mit einer hochgradigen Virustiterproduktion.
4. Kultivierung einer peptidspezifische CTL-Klonlinie, als Positivkontrolle für den Einsatz von hTERT-DNA.
5. Isolation von primären CTL aus Spenderblut.
6. Infektion aktivierter primärer CTL und CTL-Klone mittels des expandierten Retrovirus.
7. Vergleich der verschiedenen Transfektionsmethoden, der retroviralen Infektion und der Nukleofektion.
8. Bestimmung von Zellzahl und Vitalität von „*T-Body*“-positiven CTL wie auch in Kombination des hTERT-Konstruktes.
9. Phänotypisierung von PBL bzw. CTL, vor und nach Nukleofektion bzw. Infektion, wie auch Stimulation.
10. Nachweis der zytotoxischen Effizienz des exprimierten „*T-Body*“ in Kombination des hTERT *in vitro*.

IV Materialien

4.1 Chemikalien, Enzyme und Zytokine

Chemikalien wurden von den Firmen Gibco BRL, Fluka (Buchs, CH), ICN Biochemicals (Eschwege, D.), Life Technologies GmbH (Karlsruhe, D.), Merck Eurolab (Darmstadt, D.), Riedel de Haen (Seelze, D.), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D.) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, D.) bezogen. Retronektin stammt von der Firma BioWhittaker (Verviers, B.). Alle Radiochemikalien wurden von Amersham Buchler GmbH & Co. KG (Ismaning, D.) geliefert. Restriktionsenzyme und modifizierende Enzyme stammten von Invitrogen BV (Groningen, NL) und MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D.). Zytokine wurden von und Strathmann Biotech AG (Hamburg, D.) geliefert. Sämtliche Reagenzien für die Zellkultur (synthetische Medien, Seren, Antibiotika) wurden von oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, D.) bezogen.

4.2 Puffer

4.2.1 Plasmidisolierung

Mini- und Midi-Präparationen nach Angaben der Qiagen-Protokolle

P1:

RNase A	100µg/ml
EDTA	50mM, pH 8

P2:

NaOH	200mM
SDS	1% (w/v)

P3:

Potassium Acetat	3M; pH5,5
------------------	-----------

QC:

NaCl	1M
MOPS	50mM; pH 7,0
Isopropanol	15% (v/v)

QF:

NaCl	1,25mM
Tris-HCL-Cl	50mM; pH 8,5
Isopropanol	15% (v/v)

TE:

Tris-HCL-Cl	10mM; pH 8,0
-------------	--------------

4.2.2 *Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen*

QG:

Zusammensetzung wird vom Hersteller nicht angegeben.	Konzentration wird vom Hersteller nicht angegeben.
--	--

PE:

Zusammensetzung wird vom Hersteller nicht angegeben.	Konzentration wird vom Hersteller nicht angegeben.
--	--

4.2.3 *PCR-Puffer*

10x PCR Puffer	Life Technologies GmbH, Karlsruhe
----------------	-----------------------------------

4.2.4 *Native Agarose-Gelelektrophorese für DNA*

10x Probenpuffer:

Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Xylencyanol	0,25% (w/v)
Saccharose	60% (v/v)
in ddH ₂ O	

Die Bestandteile des Ladepuffers werden in Aqua-bidest gelöst und anschließend sterilfiltriert. Wichtig ist hierbei die Lagerung der Gebrauchslösung bei 4°C. Die Aufbewahrung der Stammlösung über einen längeren Zeitraum kann sowohl bei 4°C als auch bei -20°C erfolgen.

4.2.5 10 x TBE-Puffer

Tris-HCL-Base	2M	(w/v)
Borsäure	1M	(w/v)
EDTA	0,1M	(w/v)

Die Gebrauchskonzentration des TBE-Puffers liegt bei 1 x TBE. Hierzu wird die Lösung vor Gebrauch 1:10 (v/v) mit Aqua-bidest verdünnt.

4.2.6 Transformationspuffer

(TfbI):

C ₂ H ₃ KO ₂	1,47	g	30	mM
RbCl ₂	6,05	g	100	mM
CaCl ₂	0,74	g	10	mM
MnCl ₂	4,95	g	50	mM
add Glycerol			15%	(v/v)
pH 5,8				

(TfbII):

MOPS	0,42	g	10	mM
CaCl ₂	2,20	g	75	mM
RbCl ₂	0,24	g	10	mM
add Glycerol			15%	(v/v)
pH 6,5				

4.2.7 Bicarbonatpuffer („Coating“ Puffer)

NaHCO ₃	2,9g	34,5	mM
NaN ₃	0,2g	3,1	mM
Na ₂ CO ₃	1,6g	15,1	mM

pro 1000ml mit Aqua-bidest pH-Wert 9,6.

4.2.8 MACS-Puffer (Isolationspuffer)

EDTA	0,58g	2	mM
FCS	2,5ml	0,5%	(v/v)

steril autoklaviert

Diese Zusätze werden in 1x PBS (500ml) gegeben und bei bei 4°C gelagert.

4.3 Lösungen

4.3.1 50 x TAE-Lösung

Tris-HCL	242	g	2	M
konzentrierte Essigsäure	57,1	ml	5,7%	(v/v)
EDTA-Lösung	100	ml	5	mM
ddH ₂ O	1000	ml		

4.3.2 TE-Lösung

Tris-HCL			10%	(w/v)
EDTA			2%	(w/v)

4.4 RNA- und DNA-Extraktion vitaler Zellen

4.4.1 Lyse-Lösungen

Lyse-Lösung zur Detektion des hTERT-Konstruktes

Nonidet			0,5 %	(v/v)
Tris-HCL			10	mM
NaCL			10	mM
MgCL ₂			3	mM

4.5 Bakterien

Kompetente Bakterien werden von der Gruppe von Herrn Prof. Dr. Z. Eshhar (Weizmann Institut, Rehovot, Israel), bereitgestellt. Verwendet wird der Bakterienstamm E-coli-XL1-blue (Sigma, Taufkirchen).

Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lacF'proAB lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^r)

Weitere prokaryontische kompetente Zelllinien wie E. coli DH5α werden von der Firma Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Karlsruhe, D., erworben.

Genotyp: supE44 ΔlacU169 (F80 lacIqZΔ•15) hsdR17 recA1 end A1 gyr A96 thi-1 rel A1.

4.6 Plasmide/Vektoren

Im Rahmen dieser Arbeit wird der retrovirale pBullet-yol-sNDF-CD28-g-IRES-GFP eingesetzt. Dieser wird freundlicher Weise von Herrn Dr. D. Schindler (Abt. Immunologie, Weizmann Institut, Rehovot, Israel) zur Verfügung gestellt. Des weiteren wird das Plasmid RSV-scoCD22-Ig-gamma im Rahmen einer Zusammenarbeit der Gruppen von Herrn Prof. Dr. Z. Eshhar (Weizmann Institut, Rehovot, Israel) und von Herrn Prof. Dr. M. Little (Abt. Rekombinante Antikörper, DKFZ, Heidelberg), bereitgestellt. Von Dr. Erik Hooijberg (Vrije Universiteit Medical Center, Amsterdam, Niederlande) stammt der retrovirale LZRS-hTERT-IRES-GFP-Vektor.

4.7 Medien

4.7.1 Bakterienkulturmedien

SOC-Medium:

Trypton	2 %	(w/v)
Hefeextrakt	0,5%	(w/v)
NaCl	1%	(w/v)
KCl	0,2 %	(w/v)
MgCl ₂	1%	(w/v)
MgSO ₄	1%	(w/v)
Glucose	2%	(w/v)

LB- (Grund-)Medium:

pH 7,0:

Hefeextrakt	0,3%	(w/v)
NaCl	1%	(w/v)
Trypton	1%	(w/v)

LB-Agar:

pH 7,0:

Trypton	1,0%	(w/v)
Hefeextrakt	0,3%	(w/v)
NaCl	1%	(w/v)
Agarose	1,5%	(w/v)

Die Inhaltsstoffe der Nährmedien werden in Aqua-bidest gelöst und nach Einstellen des pH auf 7,0, 30 min bei 121°C autoklaviert. Wenn das Medium auf mindestens 55°C abgekühlt ist, wird es je nach gewünschtem Selektionsdruck z.B. mit 50 µg/ml Ampicillin, Penicillin oder Kanamycin versetzt.

4.7.2 Einfriermedium

RPMI-Medium

FCS	30%	(v/v)
DMSO	10%	(v/v)
L-Glutamin (100x):	200	mM

Steril bei 4°C gelagert in 5ml Portionen bei -20°C aufbewahrt.

4.8 Antikörper*4.8.1 Primärantikörper**Leukozytenantikörper (anti-human):*

Marker/Spezies	Ig-Klasse	Klon/Hersteller
CD3-PE	m IgG1, κ (SK7)	BD Biosciences, Heidelberg, D.
CD3	m IgG2a (OKT3)	Hybridomkultur von Herrn Dr. G. Moldenhauer, DKFZ, Heidelberg, D.
CD4-PE	IgG2a	Caltag Laboratories, Hamburg, D.
CD8	m IgG1, κ	BD Biosciences, Heidelberg, D.
CD11c	m IgG1, κ	BD Biosciences, Heidelberg, D.
CD14-PE	IgG2a	Caltag Laboratories, Hamburg, D.
CD16	m IgG1, κ	BD Biosciences, Heidelberg, D.
CD22-PE	IgG2a	Caltag Laboratories, Hamburg, D.
CD25 IL-R	IgG1	BD Biosciences, Heidelberg, D.
CD28	m IgG1 (15E8)	Hybridomkultur von Herrn Dr. G. Moldenhauer, DKFZ, Heidelberg, D.

Marker/Spezies	Ig-Klasse	Klon/Hersteller
CD40	m IgG1, κ	Hybridomkultur von Herrn Dr. G. Moldenhauer, DKFZ, Heidelberg, D.
CD45RO	m IgG2a, κ	BD Biosciences, Heidelberg, D.
CD56-PE	m IgG1, κ	BD Biosciences, Heidelberg, D.
CD80-PE	m IgG2a	Caltag Laboratories, Hamburg, D.
HLA-DR-PE	m IgG2b	Caltag Laboratories, Hamburg, D.
MHCI	mIgG1, λ	Caltag Laboratories, Hamburg, D.

4.8.2 Detektions-Antikörper

Marker	Ig-Klasse	Hersteller
α -myc	IgG1	Invitrogen BV, Groningen, NL.

4.8.3 Sekundärantikörper

Farbstoff	Ig-Klasse	Hersteller
R-Phycoerythrin (PE)	m IgG1	BD Biosciences, Heidelberg, D.
R-Phycoerythrin (PE)	gm IgG1	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA

4.8.4 Sonstige Antikörper

Marker	Hersteller
anti Asialo GM1	Wako Pure Chemical Industries, Osaka, J.

4.9 Antikörper gegen Interleukine/Interferone (anti-human)

Marker	Ig-Klasse	Hersteller
IL-2	r IgG2a	Caltag Laboratories, Hamburg, D.
IL-4	r IgG1	Caltag Laboratories, Hamburg, D.

4.10 Verwendete Zelllinien

4.10.1 Verpackungslinien

PG-13, PA-317 und GPE-86; Eotropische (GP+E-86) und amophotropische (PA-317 und PG13) Verpackungslinien werden in Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM, mit 10%igem FCS, Glutamin und Antibiotika) kultiviert. Alle drei Zelllinien wird von Frau Dr. T. Waks (Abt. Immunologie Weizmann Institut, Rehovot, Israel) zur Verfügung gestellt.

Zur Produktion des retroviralen hTERT-Überstandes wird die Phönix Zelle NX- ϕ , die ein Derivat von 293 Zellen ist, freundlicher Weise von Herrn Dr. E. Hooijberg bereitgestellt. Die Kultivierung dieser Zellen erfolgt in ISCOVE Medium mit 10%igem FCS, Glutamin und Antibiotika.

4.10.2 Humane Zelllinien

Die Raji-Zelllinie ist eine CD22-positive Tumor-B-Zelllinie (B-Lymphoblast; Burkitt's Lymphom). Die Zelllinie K562 stammt von einem Lymphoblast ab und hat ihren Ursprung in der chronischen myeloiden Leukämie. Für die Langzeit-Kultur von T-Lymphozyten mittels aktivierten B-Zellen wurden bereits etablierte CTL-Klone FSP 31-A6 und FSP 31-5H10 von Frau Dr. Y. Schwitalle und Herrn Dr. M. Linnebacher der Abteilung Molekulare Pathologie, Prof. Dr. med. M. von Knebel-Doerberitz, Universität Heidelberg, freundlicher Weise zur Verfügung gestellt. Die CTL-Klone FSP 31-A6 und FSP 31-5H10 sind gegen das von MSH-31(-1) abgeleitete Frameshift-Peptid (FSP) FSP-31 gerichtet. Die zur Restimulation notwendigen B-Zellen stammen ebenfalls von dieser Arbeitsgruppe.

4.10.3 Murine Zelllinie

NIH3T3-CD154 ist eine Embryonale Fibroblastenlinie und stabil positiv für CD154 transfiziert (Schultze et al. 1997). Diese Zelllinie wurde ebenfalls von der Arbeitsgruppe Molekulare Pathologie, Universität Heidelberg, bereitgestellt.

4.11 Oligonukleotide zur Polymerase-Kettenreaktion

Die Oligonukleotide werden mittels des Programms HUSAR selbst entworfen und von der Abteilung Hunzika R1000 „Oligonukleotidsynthese und DNA-Sequenzierung“ des DKFZ, Heidelberg, D., synthetisiert. Der Synthesemaßstab lag jeweils zwischen 7,4 und 13,9µM/ml; die Aufreinigung erfolgt über HPLC.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Sequenz 3' → 5'
hTERT	gaa cgt tcc gca gag aaa ag	ctg tcg cat gta cgg gta cgg ctg

4.12 Peptide zur Restimulation von CTL-Klonen

„Frameshift“- Peptide FSP31: ^402- LIVSRTLLV (abgeleitet von MSH-3(-1), Nummer: AAB47281).

Diese Peptid stammt von der Abteilung Molekulare Pathologie, Prof. Dr. med. M. von Knebel-Doeberitz, Universität Heidelberg.

V Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Behandlung mit Restriktionsendonukleasen

(Fuchs und Blakesly, 1983)

Der analytische beziehungsweise präparative Restriktionsansatz wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Vor Weiterverarbeitung der geschnittenen DNA erfolgte eine Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen für 20 min bei 65°C.

5.1.2 TAE-Agarose-Gelelektrophorese

(McDonell et al., 1977)

Zur Präparation und Analyse von DNA-Fragmenten wurden 0.8-2%ige TAE-Agarosegele verwendet, die DNA mit 5 x Probenpuffer versetzt und einer Elektrophorese bei 5-6V/cm unterworfen. Um die DNA sichtbar zu machen, wurde in der Agarose Ethidiumbromid gelöst (0.5 µg/ml) und das Gel auf einer UV-Lichtplatte (260-360 nm) analysiert. Fotografische Aufnahmen wurden mit dem MidiDoc Dokumentationssystem (Herolab, Wiesloch) erstellt.

5.1.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente größer als 100 bp aufzureinigen, erfolgte eine Isolierung aus dem Gel (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden). Kleinere Fragmente (<100 bp) wurden mit Zentrifugensäulen aus dem QIAquick-spin Purification Kit (Qiagen, Hilden) abgetrennt.

Eine Phenol-Extraktion (Kirby et al., 1957) diente zur Abtrennung von Proteinen aus wässrigen Nukleinsäurelösungen. Dazu wurde mit TE-Puffer äquilibriertes Phenol (pH 7.5) im Verhältnis 1:1 zugegeben, 10-15 sec kräftig gemischt und anschließend zur Phasentrennung zentrifugiert (5000 rpm, 10 min, 4°C). Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig von der Phenolphase abgehoben und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um Phenolreste aus der wässrigen Phase zu entfernen, wurde anschließend eine Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) durchgeführt. Dabei wurde analog der oben beschriebenen Phenol-Extraktion verfahren.

5.1.4 DNA-Fällung

(Sambrook et al., 1989)

Um Salze zu entfernen wurden wässrige DNA-Proben gefällt. Dazu wurden Natriumacetat (Endkonzentration 0.3 M) und 2.5 Volumen 100% Ethanol (oder 0.7 Volumen Isopropanol) zugegeben. Die Fällung erfolgte für mindestens 1 h bei -20°C . Bei niedrigen DNA-Konzentrationen (<1 mg/ml) und geringen DNA-Mengen (<1 μg) wurde Glycogen (Endkonzentration 1%) als Fällungshilfe zugegeben. Das Sediment wurde anschließend durch Waschen mit 75% Ethanol von restlichem Salz gereinigt und luftgetrocknet. Die getrocknete DNA wurde in einem geeigneten Volumen Wasser oder TE aufgenommen.

Konzentrationsbestimmungen der DNA erfolgten mit einem Spektralphotometer (Ultrospec II, Pharmacia, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Die DNA-Konzentration wurde wie folgt berechnet: eine OD_{260} von 1.0 entspricht einer Konzentration von 50 mg/ml bei DNA, 40 mg/ml bei RNA und 30 mg/ml bei Oligonukleotiden.

5.1.5 Phosphorylierung und Dephosphorylierung

Um die Ligation von PCR-Fragmenten mit glatten Enden zu ermöglichen, wurden die 5'-OH Enden mit T4 Polynukleotidkinase nach Angaben des Herstellers phosphoryliert. Anschließend wurde nach einer Inkubation von 20 min bei 65°C die DNA mit 0.8 Volumen Ethanol und Ammoniumacetat (Endkonzentration 2.5 M) gefällt (Inaktivierung der Kinase). Vor der Ligation wurden die 5'-Phosphat Enden mit Alkalischer Phosphatase abgespalten. Dadurch wurde die Religation des Vektors vermieden und somit die Ligationseffizienz gesteigert. Zu 10 μg DNA wurde 1 U Alkalische Phosphatase (Boehringer, Mannheim) direkt in den Restriktionsansatz gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für mindestens 30 min. Um die Alkalische Phosphatase zu inaktivieren, wurde nach erfolgter Dephosphorylierung EDTA-Lösung (Endkonzentration 5 mM) hinzugefügt und für 20 min bei 65°C inkubiert.

5.1.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Präparation von Plasmid-DNA im kleinen, mittleren und großen Maßstab (sogenannte Mini-, Midi- oder Maxi-Präparationen) wurden entsprechenden Kits der Firma Qiagen eingesetzt. Dabei wird die Plasmid-DNA durch Alkalische Lyse aus Bakterien extrahiert und mit Hilfe von Anionenaustauschersäulen nach den Angaben des Herstellers gereinigt.

5.1.7 Ligation

(Sambrook 1989)

Die T4 DNA-Ligase katalysiert die kovalente Verknüpfung von 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Enden. Nach Präparation und Aufreinigung der jeweiligen DNA-Fragmente erfolgt die Ligation mit T4 Ligase nach dem Protokoll des Herstellers. Ein typischer Ligationsansatz enthält 50 ng DNA (das Verhältnis Insert : Vektor beträgt 1:3 bis 1:5) und 1 U Ligase in einem Volumen von 10-15 µl. Das molare Verhältnis zwischen Vektorfragment und zu inserierendem DNA-Fragment sollte 1:1 bis 1:3 betragen. Der Reaktionsansatz wird über Nacht bei 10-16°C inkubiert.

5.1.8 RNA Isolierung aus transfizierten vitalen CTL zur Detektion des hTERT-Konstruktes

(Maniatis 1987)

Das Protokoll ist optimiert für eine Präparation von ca. 1×10^4 - 1×10^5 Zellen. Zu erwarten ist eine Endkonzentration von genomische RNA (100 µg/ml).

Das gesamte Medium wird vollständig aus der Gewebekulturflasche entfernt und die Zellen in einer Tischkühlzentrifuge bei 1300 rpm für 5 sec bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Dem Zellpellet werden 10-20 µl eiskalte Lyselösung, unter 4.4.1, zugesetzt, kurz vorsichtig gevortext und auf Eis für ca. 5 min inkubiert. Im Anschluß mit maximaler Geschwindigkeit für 2 min bei 4°C zentrifugiert. Der hierbei entstandene Überstand wird für die nun folgende RT-PCR als Template dienen. Die Qualität wird photometrisch bestimmt. Die Lagerung der RNA erfolgt bei -80°C.

können.

5.1.9 Primerentwurf

Für den Entwurf eines entgegengesetzt verlaufenden Primerpaares, müssen individuelle Vorgaben berücksichtigt werden. Um eine gewünschte sequenzspezifische Hybridisierung der Primer an die Matrizen-DNA zu erreichen, müssen diese zum einen eine entsprechende Länge aufweisen, die im günstigsten Fall 18 bis 25 Nukleotiden beträgt. Zusätzlich sollte die gewählte Sequenz GC-reich sein, um eine hohe Anlagerungs-Temperatur (Annealing-Temperatur) und die hiermit einhergehende stabile Bindung der Primer generell gewährleisten zu können (Guanin und Cytosin bilden drei Wasserstoffbrücken zueinander aus, während bei

Thymidin und Adenin nur zwei ausgebildet werden). Zur groben Bestimmung der Annealing-Temperatur können für jedes G und C 4°C und für jedes T und A je 2°C addiert werden, um einen ungefähren Richtwert zu erhalten, der aber meistens noch optimiert werden muß. Der Bereich selbst, der durch ein Primerpaar amplifiziert werden kann, liegt zwischen 200 und 20.000 bp.

5.1.10 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription wurde mit der SuperScript™ II Reverse Transkriptase (RT) (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Die zuvor aus hTERT transfizierten CD8⁺ T-Zellen isolierte total-RNA wird zuerst bei 75°C für 5 min denaturiert und sofort danach auf Eis gestellt. Für einen Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl, werden der RNA (10 pg-1 µg), 2 µl 10-facher Amplifikationspuffer, 1 µl Primer und 1 µl 20 mM dNTP, 50 mM MgCl₂ und schließlich 1 µl 20 units/µl plazentaler RNase-Inhibitor, zu gegeben. Nach Zugabe von 1 µl 100-200 units/µl SuperScript™ II RT erfolgte die cDNA-Synthese für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine Inkubation für 5 min bei 95°C gestoppt, die RT inaktiviert und der cDNA-Komplex denaturiert. Die so synthetisierte cDNA ist einzelsträngig und kann bei -20°C aufbewahrt werden.

5.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(Saiki et al. 1988)

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 50 µl. Der Reaktionsansatz enthielt 10-100 µg DNA, 25 pmol von jedem Primer, 300 µmol Desoxy-Nukleotidtriphosphate, 5 µl 10xPolymerasepuffer und 0.5 Einheiten DNA-Polymerase („*Expand High Fidelity Polymerase*“, Boehringer Mannheim). Auf einem automatischen Thermocycler (Perkin-Elmer) werden 10 bis 30 Zyklen mit einem der jeweiligen Reaktion angepaßten Temperaturprofil durchlaufen. Es wurden stets Heißstart-Reaktionen („*hot start PCR*“) durchgeführt. Nach Abschluß der Reaktion wurden die jeweiligen Amplifikate in einer TAE-Agarosegel-Elektrophorese untersucht.

Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
94°C	3min	1
94°C	45sec	25-35
55-68°C	30sec	
72°C	1min	
72°C	10min	1

Tabelle 1: hTERT/GAPDH-,Thermocycler“- Protokoll

Nach Beendigung des Programms kann die Testreaktion, wie auch die dazugehörigen Kontrollen, mittels eine Elektrophorese auf dem Gel analysiert werden.

5.2 Mikrobiologische Methoden

5.2.1 Transformation von *E.coli*

(Ibelgaufts 1992)

Präparation von kompetenten *E.coli* Zellen (chemisch für Hitzeschock Transformation):

Nach Selektion der gewünschten Bakterien werden mit einer Einzelkolonie 5 ml LB inokuliert und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wird mit dieser 5 ml-Kultur 100 ml oder 250 ml LB-Medium (eventuell mit Selektions-Antibiotikum) angeimpft und solange bei 180 rpm geschüttelt, bis eine OD von 0,4-0,5 erreicht ist. Nachdem die Bakteriensuspension für 5 min auf Eis gekühlt worden ist, wird sie bei 4°C und 4500 rpm für 10 min sedimentiert. Der Überstand wird möglichst vollständig entfernt, und das Bakterienpellet wird in 20 ml (oder 2/5 Volumen) Transformationspuffer I (Tfbl) resuspendiert. Dies inkubiert für 5 min auf Eis und wird bei 4°C, 4500 rpm und 5 min zentrifugiert. Die Bakterien werden in 2 ml (oder 1/25 Volumen) Transformationspuffer (TbfII) resuspendiert, wieder für 12-30 min auf Eis gestellt. 50 µl Aliquots werden in flüssigem Stickstoff eingefroren.

5.2.2 Transformation mit Hitzeschock

Bei der Transformation einer Ligation wird 1/3 des Ansatzes (d.h. 3,3 µl) ca. 10 ng und bei Transformationen von („supercoiled“) Plasmiden 100 pg eingesetzt. Die zuvor hergestellten kompetenten Bakterien werden langsam auf Eis aufgetaut. Zu einem Aliquot chemisch kompetenter *E.coli*-Bakterien wird die gewünschte DNA dazu pipettiert und 15 min auf Eis stehen gelassen und alle 5 min das Reaktionsgefäß leicht invertiert. Anschließend sofort für genau 2 min bei 42°C in ein Wasserbad und hinterher 1 min auf Eis gestellt. Im nächsten Schritt wird 0,4 ml LB-Medium zugegeben und 45 min bei 37°C geschüttelt. Letztendlich werden 0,2 ml auf je einer LB-Platte (eventuell mit Selektions-Antibiotikum) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.2.3 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

(Sambrook 1989)

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgt mit einem Spektralphotometer (Pharmacia Ultraspec II, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen H₂O. Die DNA wird hierzu 1:500 in H₂O verdünnt. Die DNA-Konzentration errechnet sich wie folgt:

eine OD₂₆₀ von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 mg/ml bei DNA, 40 mg/ml bei RNA und 30 mg/ml bei Oligonucleotiden.

5.3 Zellbiologische Methoden

5.3.1 Standard Methoden

Alle zellkulturtechnischen Arbeiten werden unter einer sterilen Arbeitsbank der Klasse II Typ A/B3 der Firma Baker, USA durchgeführt. Vor Beginn der Arbeit werden alle nötigen Utensilien autoklaviert bzw. desinfiziert. Zur Desinfizierung der sterilen Arbeitsbank erfolgt zusätzlich nach Beendigung der Arbeit eine Bestrahlung mit UV-Licht.

Soweit im Folgenden nicht anders beschrieben, werden alle in dieser Arbeit verwendeten eukaryontischen Zelllinien bei 37°C, 5% CO₂ und in einer humiden Atmosphäre von 92% Luftfeuchtigkeit angezogen. Ein Austausch der jeweiligen Medien erfolgt alle zwei bis vier Tage unter Zugabe der erforderlichen Supplemente.

5.3.2 Supplementierung von Zellkulturmedien

Generell werden allen Zellkulturmedien 100 µg/ml Streptomycinsulfat, 50 µg/ml Penicillin G und 245,7 µg/ml L-Glutamin zugesetzt.

Zelllinie	Medium	Supplement
Humane Tumorzellen	RPMI 1640	10% FCS
Humane T- Lymphozyten	RPMI 1640	10% FCS 25U/ml IL-2 (Tag 10) CD28/OKT3 (Tag 2)
Humane T-Lymphozyten (Klone)	ISCOVES	10% autologes Serum 100IU/ml IL-2 (ab Tag 21) 50IU/ml IL-7 (bis Tag 28) 10µl/ml Insulin-Transferrin
Humane B-Lymphozyten	ISCOVES	10% autologes Serum 50IU/ml IL-4 5,5×10 ⁻⁷ M Cyclosporin A (bis Tag 21) 10µl/ml Insulin-Transferrin
NIH3T3 (CD154 transfizierte)	MEM/F12	10% FCS Gentamycin

5.3.3 Kultivierung von *adhärent wachsenden Zellen*

Die Verpackungszelllinien PG13, PA317, GP+E-86, NAI und NX-φ-Phönix sind *adhärent wachsende Zellen*.

Sie werden in DMEM-Medium mit Zusätzen in Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zellen werden bei 37°C und 5% CO₂ im Zellinkubator kultiviert. Wenn eine konfluente Zelldichte erreicht ist, werden die Zellen passagiert. Das Medium wird entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Der Überstand wird verworfen und die Zellen mit PBS/EDTA-Lösung (10mM EDTA) für ca. 5 min und anschließend mit Trypsin/EDTA (1x PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU) im Zellinkubator inkubiert, bis sie sich ablösen, ein Teil der Zellen wird in frisches Medium in eine neue Flasche überführt. Eine Alternative dazu ist, die Zellen mit einem Zellschaber abzulösen.

5.3.4 Kultivierung von *Suspensionszellen*

Mit den in Suspension wachsenden Zelllinien (wie z.B. CTL) wird mit der Kultivierung ebenso verfahren wie mit *adhärenten Zelllinien*. Sie werden in RPMI 1640-Medium oder DMEM mit Zusätzen in Plastikflaschen kultiviert. Die Zellen werden bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator (Forma Scientific, Vertrieb Fa. Labotect, Göttingen) kultiviert. Nach einigen Tagen wird ein Aliquot (ca. 1/5 des Volumens) der Zellen in frisches Nährmedium in eine neue Flasche überführt, um die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten.

5.3.5 Bestimmung von *Zellzahl und Vitalität von Zellen*

Zellen wurden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Es wurden jeweils vier große Quadrate gezählt, der Mittelwert mal 10⁴ ergab die Zellzahl pro ml. Die Bestimmung der Vitalität erfolgte durch Färbung der Zellen mit Trypanblau-Lösung (5 mg/ml in PBS) und Auszählen der nicht-gefärbten (lebenden) Zellen im Mikroskop.

5.3.6 *Transfektion von eukaryontischen Zellen*

(Greene 1991)

Die Transfektion eukaryontischer Zellen ist ein DNA-vermittelter Gentransfer mittels doppelsträngiger Plasmid-DNA.

Man kann zwischen transienter und permanenter Transfektion unterscheiden. In dieser Arbeit persistieren die eingeschleusten Fremdgene, weil sie in das Genom der Wirtszelle eingebaut wurden, somit spricht man hier von permanenter Transfektion. Dies ist aber bei der transienten Transfektion nicht der Fall, denn bei dieser sind die eingeschleusten Gene nur vorübergehend aktiv. Die Art der Transfektion, die zur Durchführung gewählt wurde, stellt die Lipofektion dar. Mit dieser Methode werden die mit Nukleinsäuren beladenen Phospholipid-Vesikel mit der Zellmembran einer Zelle fusioniert, so daß ihr Inhalt durch Endozytose ins Zellinnere gelangt. Die Fusion dieses Komplexes mit der Membran der zu transfizierenden Zellen führt zu dem Aufnehmen und der Expression der DNA. Im Vergleich mit anderen Transfektionsmethoden wie Calciumphosphat oder DEAE-Dextran zeichnet sich das Lipofektin-Reagenz als besonders effizient und ungiftig aus. Als Negativkontrolle wird die gleiche Anzahl an Zellen der beiden Zelllinien unter gleichen Bedingungen gehalten.

5.3.7 *Transfektion von adhärennten Zellen*

Die Verpackungszelllinien PA317 und GP+E-86 werden in dieser Arbeit über Nacht zusammen in einer 6-Lochplatte inkubiert (Abb. 6.).

Die Konfluenz muß 40-80% betragen. Pro Transfektion werden je 2 µg der „*T-Body*“ anti-CD22-DNA (Konzentration der DNA beträgt 1 µg/µl in TE-Puffer pH 7,5), in Lipofektin-Kit, bestehend aus DNA—Kondensation Puffer EC, gegeben. Danach erfolgt die Zugabe des „Enhancer“ und Vortexen für 1 sec. Der Transfektionsansatz wird 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt die Zugabe von „Effectene Transfections Reagent“ zu der „DNA-Enhancer“ Mixture und Vortexen. Um eine Komplexbildung zu ermöglichen inkubiert man für 5-10 min. Währenddessen werden die Zellen zur Transfektion vorbereitet; das Medium wird von den Zellen abgenommen und einmal mit gekültem mit PBS gewaschen. Schließlich gibt man frisches DMEM-Medium (mit Zusätzen) auf die Zellen. Man vermischt nun das Transfektionsgemisch mit 1 ml DMEM-Medium durch resuspendieren. Letztendlich gibt man das Transfektionsgemisch tropfenweise auf die Zellen. Um die Zellen gut mit dem Reaktionskomplex in Verbindung zu bringen wird die 6-Lochplatte etwas geschwenkt. Die Inkubation erstreckt sich über zwei bis drei Tage im Brutschrank bei 37°C.

5.3.8 Produktion und Isolierung retrovialen Überstandes

Um eine Erhöhung des Virustiters zu erreichen, werden Retrovirus-produzierende Verpackungslinien (GP+E-86 und PA317) kokultiviert, was einer Vereinfachung des „ping-pong“-Verfahrens entspricht. Nach der Transfektion kultiviert man die Zellen zur Erholung für ca. drei Tage im Brutschrank. Zusätzliche zwei bis drei Tage sind zur Expansion der Zellen und des retrovialen Überstandes erforderlich. Der gesammelte Überstand wird steril filtriert und bei 4°C gelagert. Um die Methode zur Produktion eines erhöhten Virustiters zu optimieren, wird die Verpackungszelllinie PG13 mit dem retroviralen Überstand der GP+E-86- und PA317-Zelllinien infiziert. Diese Infektion erfolgt bei 32°C, 7 h und 7,5% CO₂-Gehalt. Im Anschluß daran wird der retrovirale Überstand abgenommen und frisches DMEM-Medium auf die Zellen gegeben. Am folgenden Tag wird eine zweite Infektion durchgeführt. Die Zellen benötigen danach eine Erholungsphase, die sich über ca. zwei Tage erstreckt (Abb. 6.).

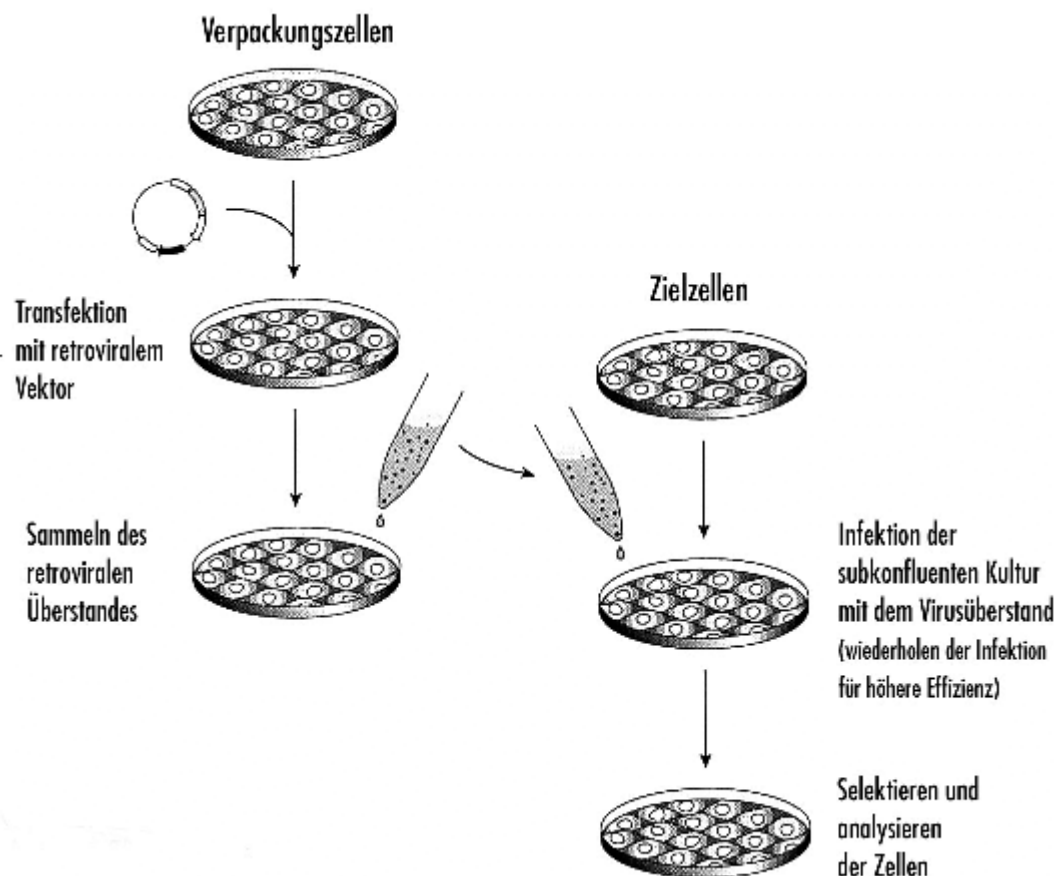


Abbildung 6: Entwicklung eines retroviralen Expressionssystem.

5.3.9 PBL/Granulozyten-Isolation aus PBS-Blut

Anfänglich wird 25 ml Gradient in ein 50 ml Falcon geschichtet. Es muß darauf geachtet werden, daß das „Pancoll“ wie auch das PBS Raumtemperatur haben. Das Blut wird mit PBS im Verhältnis 1:1 gemischt und je 25 ml auf den Gradienten geschichtet. Um die Auftrennung in Phasen zu erhalten, zentrifugiert man für 20 min, 20°C, 2000 rpm. Dabei ist es sehr wichtig ohne Bremse der Zentrifuge zu zentrifugieren. Im Anschluß daran wird das Plasma und die Monocytenschicht (PBL) abgenommen und die Granulocytenschicht absaugt und in ein neues Falcon überführt. Der erste Waschschrift erfolgt mit kaltem PBS und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 4°C, 1400 rpm. Eine Einstellung einer Bremse oder schwachen Bremse ist nicht mehr erforderlich. Zum Schluß müssen die Zellen zweimal gewaschen und die Zellzahl bestimmt werden.

5.3.10 Isolation von CTL

Aus Leukozytenkonzentrat frischen Blutes können mittels des MACS-Verfahrens („*magnetic cell sorting of human leukocytes*“) (Miltenyi Biotec, Köln, D.) gewonnen werden. Lymphozyten sind in den zuvor isolierten PBL enthalten.

Mit Hilfe der MACS-CD8-„Microbeads“ ist es möglich CD8⁺-Zellen zu selektionieren bzw. diese aus periphere Blutlymphozyten zu gewinnen. Kolloidale super-paramagnetische „Microbeads“ sind konjugiert mit einem monoklonalen anti-humanen CD8-Maus-Antikörper. Das Prinzip beruht auf mit CD8-„Microbeads“ magnetisch gekennzeichneten Zellen, die eine Säule, die sich in einem magnetischen Feld befindet, passieren. Im Durchfluß befinden sich CD8⁻ Zellen, während dessen die CD8⁺-Zellen in der Säule zurückbehalten werden. Nach der Beseitigung der Säule aus dem magnetischen Feld können die magnetisch gekennzeichneten CD8⁺-Zellen eluiert werden.

Nachdem periphere Blutlymphozyten mittels „Pancoll“ gewonnen und mit PBS gewaschen wurden, werden 10⁷ Zellen in 80 µl MACS-Puffer resuspendiert. 20 µl der „MACS-CD8-MicroBeads“ werden auf die Zellen gegeben. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei 6°-12°C wird der CD8 Antikörper dazu gegeben und für weitere 5-10 min inkubiert. Anschließend wird mit dem 10-20x Gesamtvolumen des MACS-Puffers gewaschen und bei 1800 rpm für 10 min abzentrifugiert. Um die Zellen nun magnetisch aufzutrennen werden pro 10⁸-Zellen in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen und über die zuvor mit MACS-Puffer eluierte Säule gegeben. Der Durchfluß wird verworfen und nachdem die Säule sich nicht

mehr in dem magnetischen Feld befindet, werden die CD8⁺-Zellen durch das Spülen der Säule mit MACS-Puffer gewonnen.

5.3.11 Gewinnung humaner B-Lymphozyten aus peripheren Blutlymphozyten

Die Gewinnung humaner B-Lymphozyten verläuft nach demselben Protokoll wie bei der Gewinnung humaner CTL über einen Ficoll-Gradient wie zuvor beschrieben (5.3.9). Der Durchfluß der CTL-Isolation (5.3.10) wird mit supplementiertem ISCOVES-Medium in Kultur genommen und alle nicht adhärenen Zellen werden nach einer 4 stündigen oder über Nacht Kultivierung durch Spülen mit 1×PBS entfernt. Die adhärenen Zellen werden mit Antibiotika, autologem Serum, 100 U/ml IL-4 und $5,5 \times 10^{-7}$ M Cyclosporin A supplementiertem ISCOVES zur Langzeitkultivierung auf CD154-transfizierte NIH3T3-Zellplatten ausgebracht. Die Zugabe von Cyclosporin A diente hierbei der Suppression von T-Lymphozyten und NK-Zellen.

5.3.12 Langzeitkultivierung CD40-aktivierter humaner B-Lymphozyten

Zur Langzeitkultivierung CD40-aktivierter B-Lymphozyten werden mittels Ficoll isolierte B-Zellen in einer Konzentration von anfangs 2×10^6 Zellen pro well einer 6-well Platte auf bestrahlte CD154-transfizierte NIH3T3-Zellen ausgebracht. Hierzu werden die CD154-transfizierten NIH3T3-Zellen einen Tag zuvor geerntet, bestrahlt (60 Gy) und in einer Konzentration von jeweils 3×10^5 Zellen pro well einer 6-well Platte in supplementiertem DMEM/F12 Medium ausgebracht. Die Supplementierung der B-Zellen erfolgt wie beschrieben bis ca. Tag 21 zusätzlich mit Cyclosporin A zur Suppression von T-Lymphozyten und NK-Zellen. Alle drei bis fünf Tage werden die B-Zellen auf neue CD154-transfizierte NIH3T3-Zellen umgesetzt und ihre Konzentration stetig bis 1×10^6 Zellen pro well einer 6-well Platte gesenkt. Das Wachstum- und Reifestadium der CD40-aktivierter B-Lymphozyten wird ab Tag 15 kontinuierlich mittels FACS-Analysen bestimmt.

5.3.13 Langzeitkultivierung humaner T-Lymphozyten

Zur Langzeitkultivierung humaner T-Lymphozyten werden wie unter 5.3.9 beschrieben mittels Ficoll separiert und im Verhältnis 4:1 mit peptidbeladenen bestrahlten (30Gy) CD40-aktivierten B-Lymphozyten des selben Spenders kultiviert. Hierbei werden pro well einer 24-well Platte jeweils 1×10^6 T-Lymphozyten angezogen. Dem supplementierten Medium werden bis Tag 21 an Zytokinen ausschließlich IL-7, ab Tag 21 bis Tag 28 zusätzlich IL-2 und ab Tag 28 nur noch IL-2 zugesetzt. Alle sieben Tage werden die T-Lymphozyten restimuliert (geerntet, gewaschen, mit neuen B-Lymphozyten versorgt). Das Verhältnis 4:1 von T- zu B-Lymphozyten wird, je nach Zustand der CTL, beibehalten. Das Wachstum- und Reifestadium der T-Lymphozyten wird mittels FACS-Analysen und Zytotoxizitätstests bestimmt.

5.3.14 Retroviral vermittelte Transduktion durch Retronektin

(Pollok et al. 1998)

Beschichtung mit Antikörper:

Periphere Blut-Lymphozyten müssen mittels den Antikörpern CD28 und OKT3 voraktiviert werden. Die Beschichtung der 6-Lochplatten mit den Antikörpern CD28 und OKT3:

Die einzusetzende Konzentration der OKT3 und CD28-Antikörper beträgt 2 µg/ml. Für den „Beschichtungsmix“ werden die Antikörper CD28/OKT3 im Verhältnis 1:1 mit Bicarbonatpuffer verdünnt. Davon werden 4ml pro Vertiefung in eine 6-Lochplatte pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wird 3x mit PBS gewaschen und die Platten „trockengeschlagen“. Anschließend blockt man mit 3 ml PBS/2%FCS für 1h/37°C und es folgt ein PBS-Waschschritt und sorgfältiges Der nächste Schritt ist das „Trockenschlagen“ der Platten. Die beschichteten Antikörperplatten können bei 4°C mit PBS gelagert werden.

Retronektin-Beschichtung:

Um die Transfektionseffizienz zu verstärken, verwendet man Retronektin. Retronektin ist ein chimäres Peptid des humanen Fibronektins, welches von E-coli-Bakterien hergestellt wurde. Dieses Fragment besitzt drei funktionelle Domänen, eine zentrale zellbindende Domäne, eine heparinbindende Domäne und eine CS-I-Seite mit einer alternativen gespleißten IIICS-Region des Virus. Die Funktion des Retronektins unterstützt die retroviralvermittelte Gentransduktion in Säugerzellen. Virus Partikel binden an dieses Molekül durch die Interaktion mit der heparinbindenden Domäne II. Zielzellen können hauptsächlich durch die

Interaktion mit dem Fibronectin-Liganden über die „virale Seite“ lokalisiert werden. Retronektin 1mg/ml Stock (in sterilem Bicarbonatpuffer). Die Retronektin-Platten werden mit 15 µg/ml Retronektin beschichtet, das ergibt ein Volumen von 2ml Retronektin/Bicarbonatpuffer pro Vertiefung. Die Platten werden über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Platten 3x mit PBS gewaschen und „trockenschlagen“. Das Blocken des Retronektins geschieht mit 3 ml PBS/2%FCS für 1 h / 37°C. Anschließend einmal mit PBS waschen und „trockenschlagen“. Die mit Retronektin beschichteten 6-Lochplatten können mit PBS bei 4°C gelagert werden.

Aktivierung der PBMC:

Verwendet wird Komplett-Medium (RPMI 1640, mit 10%igem FCS, 1%igem Glutamin, 1%igem Pen/Strep). Die Aktivierung erfolgt mit 4×10^6 PBMC in 1 ml Komplett-Medium pro Vertiefung auf CD28/OKT3 beschichteten Platten. Die Inkubation verläuft für zwei Tage bei 37°C und 5%igem CO₂-Gehalt. Nach zwei Tagen werden die Zellen geerntet und gezählt.

Transduktion:

Die Transduktion erfolgt mit einer Zellzahl von 5×10^5 Zellen pro Vertiefung einer 6-Lochplatte.

Erste Infektion:

In mit Retronektin vorbeschichteten 6-Lochplatten werden mit 2 ml 5×10^5 Zellen pro Vertiefung, 3 ml retroviralen Überstand und 25 U/ml IL-2 versetzt und für 7h bei 32°C und 7,5%igem CO₂-Gehalt inkubiert. Nach 7h wird der retrovirale Überstand sorgfältig abgenommen. Dieser kann vorsichtshalber bei 1400 rpm, 6 min und 4°C abzentrifugiert werden, um restliche nicht adhärente CTL zu gewinnen. Das Pellet wird in 25 U/ml IL-2-Medium aufgenommen und wieder in die 6-Lochplatte gegeben. Das Abzentrifugieren der CTL ist nicht unbedingt erforderlich, da durch vorsichtige Abnahme des Überstandes der größte Teil der CTL an Retronektin gebunden bleibt. Somit ist nur eine Zugabe von 25U/ml IL-2-Medium und die daraufhin folgende Inkubation über Nacht erforderlich.

Zweite Infektion:

Nach einer ÜN Inkubation wird das Medium mit den CTL abgenommen und die Zellen abzentrifugiert, 1400 rpm, 4°C, 6 min. Anschließend werden die CTL in 2 ml 25 U/ml IL-2-Medium aufgenommen und in mit Retronektin beschichtete Vertiefungen überführt. Nach der Zugabe von 3 ml steril filtriertem retroviralem Überstand und 7 h, 32°C, 7,5%igen CO₂ - Inkubation, wird der retrovirale Überstand wieder vorsichtig abgenommen. Die CTL werden mit 25 U/ml IL-2 -Medium vermischt und wieder auf die 6-Lochplatte gegeben und ÜN inkubiert. Am nächsten Tag werden die Zellen, durch intensives resuspendieren, gerntet und bei 1400 rpm, 6 min, 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, in 25 U/ml IL-2-Medium aufgenommen und in eine unbeschichtete 6-Lochplatte überführt. Daran wird eine Inkubation für zehn Tage, bei 37°C angeschlossen.

Nach diesem Zeitraum werden die Zellen auf CD28/OKT3 beschichteten Platten drei Tage restimuliert. Um die CTL weiter in Kultur zu halten empfiehlt es sich, eine Restimulation durch CD28/OKT3 und IL-2 im Wechsel durchzuführen.

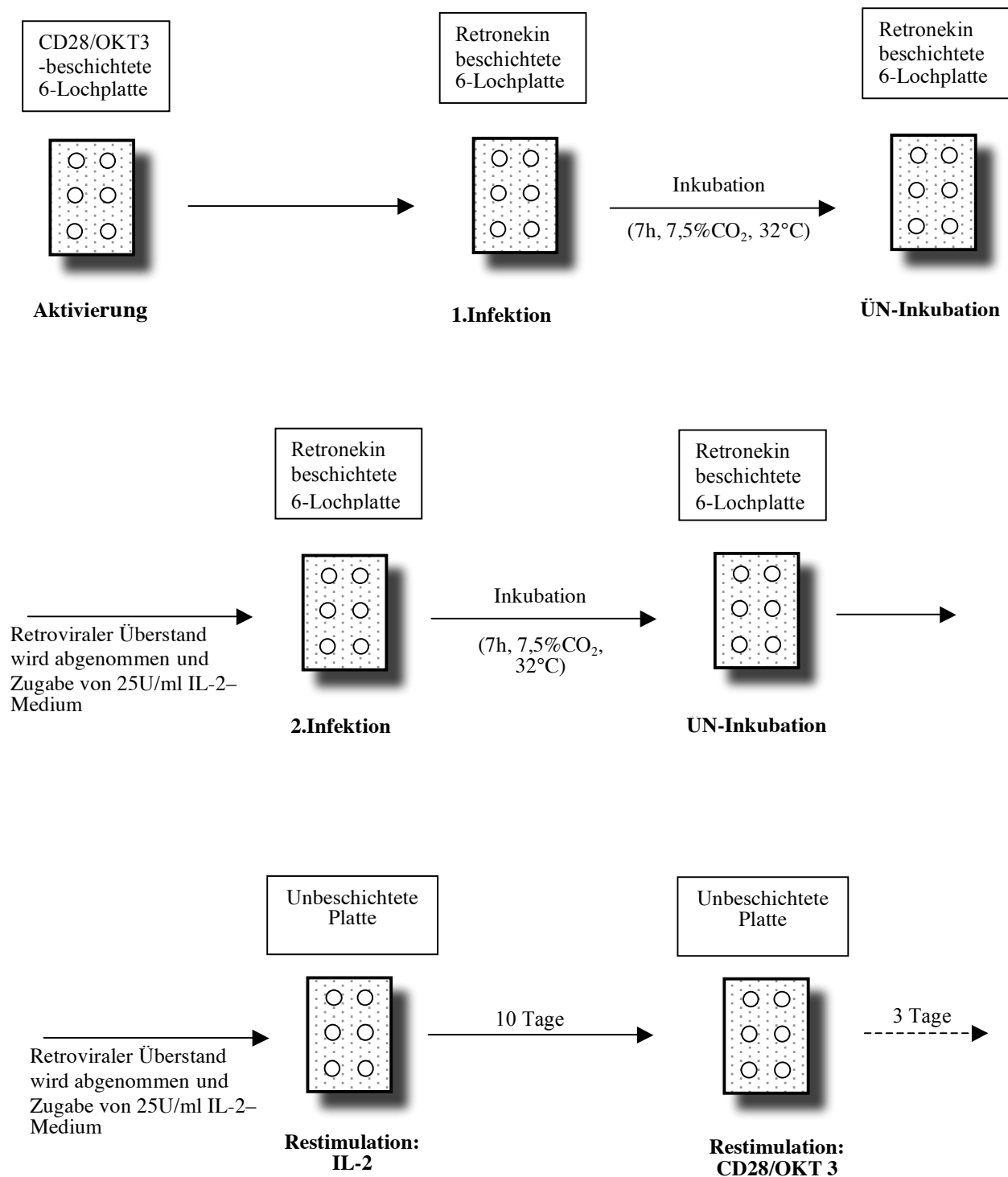


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Transduktion von CTL.

5.3.15 *Humanes T-Zell-Nukleofektions –Protokoll*

(Amaya GmbH, 2002)

Die Qualität und die Konzentration der zu verwendenden DNA bestimmt die Effizienz des Gentransfers. Die aufgereinigte DNA sollte in Bidest oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCL/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) resuspendiert werden und die Konzentration sollte zwischen 1-5 µg/µl eingestellt sein. Die Vorbereitung schließt die Herstellung der „*Nucleofector Solution™*“ durch Zugabe von 0.5 ml Supplement zu 2,25 ml „*Nucleofector Solution™*“ mit ein. Die minimale Zellzahl sollte 2×10^5 betragen, da eine niedrigere Zellzahl zu einer verstärkten Zelmortalität führen kann. Es wird empfohlen die Zellzahl-Maximum im Bereich von 1×10^7 Zellen aus zu wählen. Falls im weiterführenden Protokoll die CTL nach Nukleofektion stimuliert werden, sollte eine Plasmid-DNA-Menge von 1-2 µg eingesetzt werden.

Die Aufreinigung der CTL und ihre Isolation erfolgt wie unter 2.4.10. beschrieben. Für kryogelagerte Zellen ist vor Nukleofektion eine Inkubation der aufgetauten Zellen für 1-2h bei 37°C in Kulturmedium erforderlich. Es wird 1-5 µg DNA (in 1-5 µl H₂O oder TE) für jeden Ansatz in ein Eppendorfgefäß vorpipettiert. Die Zellzahl wird mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und mit PBS bei 1600 rpm und 4 min bei 4°C gewaschen. In der Zwischenzeit wird die „*Human T Cell Nucleofector™ Solution*“ mit Supplement versetzt und bei Raumtemperatur vorgewärmt. Das einzusetzende Medium wird in 6-Lochplatten gegeben und ebenfalls auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wird das Zellpellet auf die gewünschte Zellzahl pro 100 µl „*Human T-Cell-Nucleofector™ Solution*“ Endvolumen eingestellt. Es sollte vermieden werden die Zellsuspension länger als 20 min in der „*Human T Cell Nucleofector™ Solution*“ zu inkubieren, da dies die Lebensspanne der CTL und die Gentransfereffizienz senkt. Es werden dann 100 µl der Zellsuspension mit den 1-5 µl DNA vermischt und zwei bis drei mal resuspendiert. Hiernach wird das Gemisch in die Nukleofektions-Kuvette überführt, mit dem Deckel verschlossen und darauf geachtet, daß während des Pipettierens keine Luftblasen gebildet werden.

Protokoll für stimulierte humane T Zellen

Die isolierten CTL (siehe 5.3.9.) werden vor der Nukleofektion zwei bis fünf Tage stimuliert. Dies erfolgt in, mit den Antikörpern OKT3 und anti-CD28 vorbeschichteten 6-Lochplatten (siehe 5.3.14.), für zwei Tage.

Zur Nukleofektion von stimulierten CTL wird das Programm T-23 oder T-20 ausgewählt. Der weitere Versuchsablauf ist im folgenden Abschnitt „Protokoll für unstimulierte humane T Zellen“ beschrieben.

Protokoll für unstimulierte humane T Zellen

Die Küvette wird in den Nukleofektor gestellt, das Programm U-14 ausgewählt und das Programm wird durch Betätigen des Startknopfes gestartet. Um die Zellen nicht zu schädigen, ist es ratsam die Küvette sofort nach Beendigung des Programms herauszunehmen und mittels einer Plastikpipette die Zellsuspension in die mit Medium vorbereiten 6-Lochplatten zu überführen. Die Küvette wird danach nochmals mit Medium gespült. Nun wird das Programm des Nukleofektors auf Anfang zurückgestellt, dies geschieht durch Drücken einer beliebigen Taste. Die weiteren Versuchsansätze werden wie zuvor beschrieben durchgeführt. Die behandelten Zellen werden nach der Nukleofektion im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach 4-12 h sollte ein Mediumwechsel stattfinden. Es ist wichtig, daß man nicht direkt nach der Nukleofektion die Zellen stimuliert, da das die Sterblichkeitsrate der Zellen erhöht. Die Genexpression kann dann nach verschiedenen Zeiten per FACS bestimmt werden. Es ist, je nach Gen, möglich die Expression nach 3-8 Stunden zu detektieren. Falls dies nicht der Fall sein sollte, ist eine längere Inkubationszeit erforderlich. Nach 4-12 h Stunden werden die CTL zur Stimulation auf mit OKT3/CD28 beschichteten 6-Lochplatten überführt und nach gewünschtem Protokoll weiter verfahren.

5.4 Immunbiologische Methoden

5.4.1 Immunfluoreszenz und Durchflußzytometrie

Die quantitative durchflußzytometrische Analyse wird am FACScan mit CELLQuest Software durchgeführt. Es wird je nach Zellkonzentration 5000 bis 20 000 Ereignisse gezählt. Als Negativkontrolle bzw. Hintergrundkontrolle dienen bei der direkten Färbung ungefärbte Zellen bzw. bei der indirekten Färbung nur mit Zweitantikörper inkubierte Zellen.

Bei der Analyse der Zellen werden Analysefenster entsprechend der Zellgröße (FSC = s) und Zellgranularität (SSC = side scatter) gesetzt, so daß nur die gewünschte Zellpopulation wie z.B. T-Lymphozyten, betrachtet werden können.

Einfachfärbung

$0,1-1 \times 10^6$ Zellen werden pro Vertiefung einer 96er-well Mikrotiterplatte auf Eis pipettiert. Anschließend werden die Proben 3× gewaschen, in 50 µl Erstantikörper resuspendiert und für 45 min bei 4°C inkubiert. Die hierbei jeweils zu verwendenden Antikörperkonzentrationen werden vorher ausgetestet und variierten von 1-10 µg/ml. Im Anschluß an die Inkubation werden die Proben erneut 3× mit der PBS-Lösung gewaschen und auf Eis mit 50 µl Fluorochrom-markiertem Zweitantikörper in erforderlicher Verdünnung versetzt. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 30 min bei 4°C werden die Proben abschließend 3× gewaschen und sofort analysiert bzw. resuspendiert in einer 2%igen Formalinlösung gelagert.

5.4.2 Intrazelluläre Färbung

Zur Markierung intrazellulärer Antigene werden $0,1-1 \times 10^6$ Zellen werden pro Vertiefung einer 96er-well Mikrotiterplatte auf Eis pipettiert und mit 50 µl einer 2%igen Formalinlösung für 30 min bei 4°C fixiert. Anschließend werden die Zellen 3× mit PBS/10%FCS gewaschen und mit einer 1%igen Tween 20-Lösung für 15 min bei 4°C permeabilisiert. Im Anschluß an die Inkubation werden die Proben erneut 3× mit der PBS-Lösung gewaschen. Zur Beendigung des Färbeprotokolls wird wie unter Abschnitt Einfachfärbung weiterverfahren.

5.4.3 Bestimmung von GFP-positiven Zellen

Getestet werden Zellen, die mit dem Konstrukt einschließlich GFP transfiziert worden sind. Die PA317/GP+E-86-, PG13- und NX- ϕ -Phönix-Transfektanten müssen in großen Mengen expandiert werden. Es sind mindestens 50 000 Zellen zur Messung nötig. Die Zellen werden geerntet und bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert und nach zweimaligem Waschen der Zellen in PBS in 100 μ l PBS resuspendiert. Als Negativkontrolle wird die untransfizierte Zelllinie PA317/GP+E-86, PG13 bzw. die untransfizierte Zelllinie NX- ϕ -Phönix verwendet, bei welcher keine Transfektion mit dem Konstrukt erfolgte, so ist diese Zelllinie negativ für GFP. Daran kann die Autofluoreszenz für transfizierte Verpackungslinie PA317/GP+E-86-anti-CD22, PG13-anti-CD22 bzw. NX- ϕ -Phönix-hTERT eingestellt werden. Gemessen wird mit Hilfe eines FACScans (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA). Die Zellen werden mit einem Argonlaser bei 488 nm angeregt und die relative Grünfluoreszenz im FITC (Fluorescein-5-isothiocyanat) -Kanal, welcher der Wellenlänge des GFP entspricht, für etwa 10^4 Zellen bestimmt.

5.4.4 Bestimmung von toten Zellen durch PI-Färbung

Propidiumiodid (PI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der im spätapoptotischen und nekrotischen Zustand der Zellen sofort nach einsetzender Permeabilisierung der Zellmembran inkorporiert wird und so Aufschluß über die prozentuale Anzahl toter Zellen in der Gesamtzellpopulation geben kann. PI-Färbungen wurden im Zuge von Zytotoxizitätsmessungen durchgeführt. Zellen werden für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert und in 200 μ l PBS aufgenommen. Anschließend wurde erst kurz vor der Messung am FACScan 1 μ g/ml Propidiumiodid zugegeben.

5.4.5 FACS-Sorter

(Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA)

Dieses Verfahren zur „Sortierung“ fluoreszenzmarkierter, biologischer Objekte, wie Zellen oder Chromosomen aufgrund ihrer Fluoreszenzintensität, entspricht in der Grundfunktion des schon beschriebenen des FACScans. Im Prinzip beruht die Technik auf der Fluoreszenzmarkierung der Chromosomen, hier durch Klonierung eines fluoreszenzmarkierten Proteins z.B. GFP in das gewünschte Konstrukt. Diese Zellen, welche

mit diesem Konstrukt transfiziert wurden und den Fluoreszenz-Marker enthalten, werden in einem Flüssigkeitsstrahl transportiert. Dieser wird hierzu nach Austritt aus einer feinen Düse durch Hochfrequenzvibration in gleichförmige Tröpfchen zerrissen, die einen Laserlichtstrahl passieren. Je nach gemessener Fluoreszenzintensität im Tropfen, werden die Tropfen durch einen elektrischen Impuls aufgeladen. Die geladenen Tröpfchen passieren ein elektrostatisches Feld, wobei sie entsprechend ihrer Ladung abgelenkt und gesammelt werden. Ungeladenen Tröpfchen, negative Zellen (ohne GFP), können ungehindert passieren. Die Vorbereitung konzentriert sich auf das „Ernten“ der transfizierten Zellen PA317/GP+E-86-anti-CD22, PG13-anti-CD22 bzw. NX- ϕ -Phönix-hTERT und der entsprechenden untransfizierten Zelllinie als Negativkontrolle. Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen und gezählt, im Anschluß daran werden diese in einem geringen Volumen 1 ml PBS /Pen/Strep aufgenommen. Durch die Zugabe von 1 μ l Propidiumiodid werden die lebenden Zellen angefärbt. Die Zellsuspension wird durch einen Filter laufen gelassen, um Zellhaufen zu lösen. Nun können die Zellen durch den FACS-Sort sortiert werden.

5.4.6 Immunhistochemie von transfizierten GFP-Zellen mittels „Cyto-Spin-Verfahren“

(Wiley 2000)

Die Immunhistochemie (IHC) der Zellen ist ein System, um Studien von Gewebesektionen zu erhalten bzw. zu ergänzen. Gewebe können somit eine statische Abbildung eines Prozesses liefern, und bei kultivierten Zellen werden Einblicke in aktive Prozesse zur Verfügung gestellt. Einzelne Zellpräparationen von kultivierten Zellen können benutzt werden, um eine Vielzahl der immunologischen Reagenzien auszuwerten.

Zur Präparation der Zellen auf einen Objektträger wird eine „Cyto-Spin“-Zentrifuge verwendet. Die Objektträger, Filter und Klammern werden nach Herstellerangaben (Shandow, GB.) zusammengesetzt. Nach dem Ernten und Waschen der Zellen wird die Zellzahl bestimmt. 10^5 Zellen werden in 150-200 μ l PBS aufgenommen und in die „Cyto-Spin“-Kammer des Objektträgers gegeben. Diese Zellzahl ist für Leukozyten angemessen. Die Zellen sollten so schnell wie möglich in die Kammer überführt werden, da sich die Zellen sonst ansammeln und Zellhaufen bilden, welche schwer zu identifizieren bzw. zu analysieren sind. Es erfolgt die „Cyto-Spin“-Zentrifugation für ca 5 min bei 800 rpm und Raumtemperatur. Nach der Zentrifugation werden die Deckgläser und die Klammern von den Objektträgern entfernt und 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Schließlich werden die Zellen mit Glyceringelantine eingebettet.

5.4.7 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie beruht auf der Tatsache, daß gewisse Moleküle einen Teil des von ihnen absorbierten Lichts in Form einer langwelligeren (energieärmeren) Strahlung wieder abgeben. Ein Fluoreszenzmikroskop kann in zwei Ausführungen konstruiert werden: als Durchlicht- und als Auflichtfluoreszenzmikroskop. Das in dieser Arbeit verwendete Mikroskop ist ein Auflichtmikroskop. Das Kernstück der Auflichtmikroskopie ist eine Konstruktion im Strahlengang zwischen Objektiv und Okular, über die die anregende Strahlung zugeführt wird, und die aus Erregerfilter, Teilerspiegel und Sperrfilter besteht. Das Mikroskop wie auch das inverse Mikroskop sind kommerziell erhältliche Auflichtmikroskope vom Typ Axio der Firma Carl Zeiss, Jena. Die Aufnahme erfolgt über eine SIT camera C2400-08 (Hamamatsu, Japan). Die aufgenommenen Bilder werden über das Programm Simple PCI (Compix, Pittsburg, PI, USA) elektronisch erfaßt und abgespeichert.

5.4.8 Bestimmung der Zytotoxizität

(Matzinger 1991)

Ein charakteristisches Merkmal der Apoptose ist die enzymatische Spaltung der DNA in Fragmente. Diese DNA-Fragmentierung ist ein frühes Ereignis beim Zelltod der Zielzellen vermittelt durch CTL. Diese CTL vermittelte Lyse wird mit Hilfe des JAM-Tests gemessen.

Vorbereitung:

Die Zielzellen der Raji Zelllinie (CD22-positive B-Zelllinie) und die Kontroll-Zelllinie K562 - zum Ausschluß der NK-Zelllyse- werden über Nacht (bei 37°C) mit [H^3] Thymidin (150 $\mu\text{Ci}/10^7$ Zellen in 2 ml Vol. DMEM-Medium), markiert. Am darauf folgenden Tag werden die Tumorzellen gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Parallel werden transfizierte positive CTL aus periphere Blutlymphozyten isoliert und unter Standardbedingungen als Triplikate in 96-Lochbodenplatten gehalten. Zu diesen CTL werden 10^4 Zielzellen pro Vertiefung gegeben und bei 37°C für 4 h inkubiert. Anschließend wird der JAM-Test mittels eines „Tomtec-96-well-Harvester“ und eines Flüssigkeits-Szintillationsmeßgerät („Beta-Counter“) (Pharmacia Gaithersburg, MD) gemessen. Zusätzlich werden Tumorzellen mit untransfizierten periphere Blutlymphozyten als Negativkontrolle verwendet. Bei dem Verfahren des Erntens der Zellen durch den „Harvester“ werden die Zellen mit dem Medium auf einen Faserglasfilter gesaugt und nachfolgend wird der Filter gewaschen und getrocknet. Um das Trocknen des Filters zu beschleunigen wird eine Mikrowelle verwendet. Der Filter wird in eine Folie gelegt und

darauf Szintillationflüssigkeit gegeben. Danach dichtet man die Folie mittels eines Schweißgerätes ab und mißt den JAM-Test in einem Flüssigkeits-Szintillationzähler.

5.4.9 *IFN- γ -ELISPOT-Test unter Ausschluß der MHC-Funktionalität*

Einen Tag vor Durchführung des INF- γ -ELISPOT-Testes werden je nach Bedarf 96-well Nitrozelluloseplatten mit 1×PBS (100 μ l/well) angefeuchtet und im Anschluß 50 μ l des Erstantikörpers gegen INF- γ (15 μ g/ml) pro Vertiefung pipettiert. Der gesamte Ansatz wird über Nacht bei 4°C inkubiert. Um unspezifische Bindungen zu blockieren werden nach der Inkubationszeit die Platten einmal mit serumhaltigen Medium gewaschen und im Anschluß für 1 h bei Raumtemperatur abermals mit 100 μ l serumhaltigen Medium pro Vertiefung erneut inkubiert. Parallel werden die allogene Zielzellen (PBL) mit MHCI und MHCII-Hybridomüberstand bei 37°C für 1 h inkubiert. Nach den Blockierungsschritten werden pro Vertiefung die PBL (3×10^4), die T-Lymphozyten (2×10^4) mit entsprechenden Kontrollen pipettiert. Der gesamte Ansatz wird für mindestens 24 h bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung des überschüssigen Antikörpers wird im Anschluß an die Inkubationszeit 6mal mit einer 0,05%igen PBS-Tween20-Lösung gewaschen. Nun können jeweils 100 μ l des biotinylierten Zweitantikörpers Kaninchen-anti-human-INF- γ in einer Verdünnung von 1:1000 pro well zugegeben werden. Die Inkubation des Antikörpers erfolgt für 4 h bei Raumtemperatur. Im Anschluß wird erneut viermal mit einer 0,05%igen PBS-Tween20-Lösung gewaschen und 100 μ l Streptavidin-gekoppelte alkalische Phosphatase, verdünnt im Verhältnis 1:1000 mit PBS, pro Vertiefung pipettiert. Nach erneuter Inkubation von 2 h bei Raumtemperatur, werden die Platten viermal mit 1×PBS gewaschen und mit 50 μ l NBT/BCIP für 1 h bei Raumtemperatur versetzt. Die Entwicklung der Spots wird stetig kontrolliert und ca. nach 1 h mit Leitungswasser abgestoppt. Die Evaluation der Spot-Zahlen wird durch den „A·EL·VIS ELISPOT-Reader“ ermittelt. Die Daten basieren auf der Bestimmung der Mittelwerte von drei Einzelwerten pro Ansatz.

VI Ergebnisse

Übersicht über die durchgeführten Arbeiten

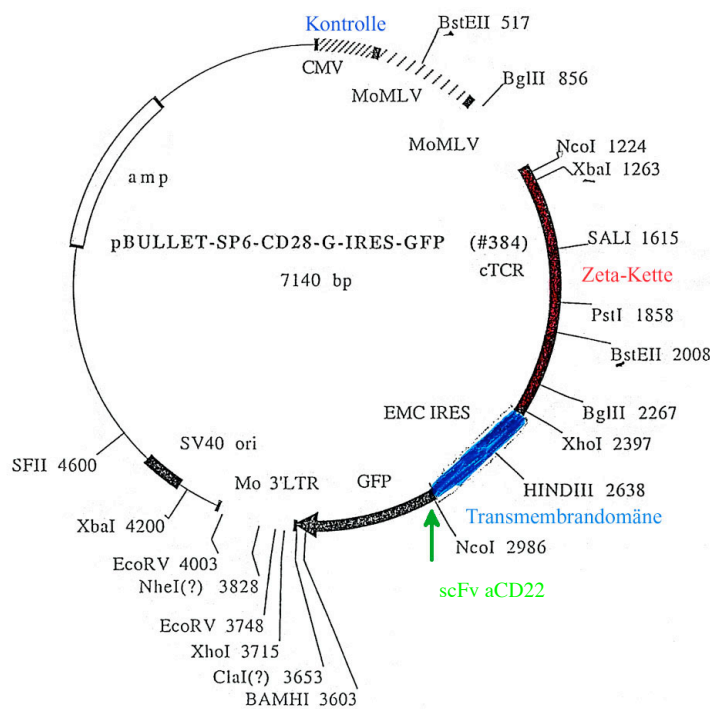
<i>T-Body-anti-CD22</i>	<i>Immortalisation hTERT</i>	<i>CTL-Klone FSP31 5H10 & FSP A6</i>						
<ul style="list-style-type: none"> ○ Klonierung des scFv-anti-CD22-„<i>T-Body</i>“ aus dem Plasmidvektor RSVscαCD22-Ig-gamma in den retroviralen Vektor pBullet-yol-sNDF-CD28-g-IRES-GFP 								
<ul style="list-style-type: none"> ○ Transfektion der Verpackungszelllinien PA317, GP+E-86 und PG13 mit dem pBullet-anti-CD22-CD28-g-IRES-GFP-Vektor. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Transfektion der Phönix-Verpackungszelllinie NX-φ mit dem LZRS-hTERT-IRES-GFP-Vektor. 							
<ul style="list-style-type: none"> ○ FACS-Analyse der GFP-positiven Verpackungszelllinien ○ Anreicherung der positiven Transfektanten mittels FACS-Sort ○ Expansion der positiven Zellen und Isolierung des retroviralen Überstandes ○ CTL-Gewinnung aus Spenderblut 								
		<ul style="list-style-type: none"> ○ Expansion der CTL-Klone FSP31 5H10 & FSP31 A6 						
<p style="text-align: center;">Transfektion der isolierten CTL:</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"><u>retrovirale Infektion</u></td> <td style="width: 50%; border: none;"><u>Nukleofektion</u></td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Ansätze:</td> <td style="border: none;">Ansätze:</td> </tr> <tr> <td style="border: none;"> <ul style="list-style-type: none"> - „<i>T-Body</i>“ –anti-CD22 - hTERT - „<i>T-Body</i>“ –anti-CD22/hTERT - -Kontrolle </td> <td style="border: none;"> <ul style="list-style-type: none"> - „<i>T-Body</i>“ –anti-CD22 - hTERT - „<i>T-Body</i>“ –anti-CD22/hTERT - -Kontrolle </td> </tr> </table>		<u>retrovirale Infektion</u>	<u>Nukleofektion</u>	Ansätze:	Ansätze:	<ul style="list-style-type: none"> - „<i>T-Body</i>“ –anti-CD22 - hTERT - „<i>T-Body</i>“ –anti-CD22/hTERT - -Kontrolle 	<ul style="list-style-type: none"> - „<i>T-Body</i>“ –anti-CD22 - hTERT - „<i>T-Body</i>“ –anti-CD22/hTERT - -Kontrolle 	<p style="text-align: center;">Transfektion der CTL-Klone:</p> <u>retrovirale Infektion</u> Ansätze: <ul style="list-style-type: none"> - „<i>T-Body</i>“ –anti-CD22 - hTERT - „<i>T-Body</i>“ –anti-CD22/hTERT - -Kontrolle
<u>retrovirale Infektion</u>	<u>Nukleofektion</u>							
Ansätze:	Ansätze:							
<ul style="list-style-type: none"> - „<i>T-Body</i>“ –anti-CD22 - hTERT - „<i>T-Body</i>“ –anti-CD22/hTERT - -Kontrolle 	<ul style="list-style-type: none"> - „<i>T-Body</i>“ –anti-CD22 - hTERT - „<i>T-Body</i>“ –anti-CD22/hTERT - -Kontrolle 							

6.2 T-Body-anti-CD22

6.2.1 Klonierung des Expressionsvektors

Zur Expression des gegen das B-Lymphom-Antigen CD22 gerichteten „T-Body“ wurde der retrovirale Vektor pBullet-yol-sNDF-CD28-g-IRES-GFP verwendet, der ein GFP-Gen als positiver Kontrollmarker enthält. Außerdem ist die für die CD28-Transmembran-Bindedomäne codierende Sequenz integriert. Zur Vorbereitung der Inserts wurde aus dem Plasmid RSV-s α CD22-Ig-gamma mittels eines Restriktionsverdau mit BstEII und NcoI die im Vektor vorhandenen Insert anti-CD22-scFv gewonnen. Anschließend wurden die Insertfragmente auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel präpariert. Um den Expressionsvektor zu klonieren wurde der retrovirale Vektor pBullet-yol-sNDF-CD28-g-IRES-GFP mit den Enzymen BstEII/SfiI und SfiI/NcoI verdaut, die Fragmente durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Danach wurde die gewünschte Vektorbande eluiert und es erfolgte die Präparation der DNA. Die Durchführungen sind im Methodenteil dargestellt. Die klonierten Insertsequenzen sind im Anhang aufgelistet.

6.2.2 Restriktionskarte des „T-Body“-anti-CD22-Konstruktes



6.2.3 Ligation und Transformation

Das Insertfragment wurde in den BstEII/Sfi und SfiI/NcoI verdauten Vektor ligiert. Chemischkompetente *E.coli* XL1-blue wurden mit dem Ligationsansatz durch das Hitzeschockverfahren transformiert. Weitere Verfahren wie der Mini- und Midi-Präparation und die DNA-Konzentrationsbestimmung wurden wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde die Konzentration der Plasmid-DNA pBullet-anti-CD22-CD28-g-IRES-GFP auf 1 µg/µl eingestellt.

6.2.4 Kontrolle der Klonierung auf DNA-Ebene

„T-Body“-anti-CD22-Konstruktes

Die Plasmid-DNA des Konstruktes wurde isoliert und die verschiedenen zu erwartenden Fragmentgrößen durch einen Einfachverdau mit PstI kontrolliert. Der Kontrollverdau ist durchführbar mit zwei verschiedenen Verdauansätzen, PstI und BstEII/NcoI (persönliche Angaben, Dr. D. Schindler; Abt. Immunologie, Weizmann Institut, Rehovot, Israel) wie im Anhang angegeben. Für diesen Kontrollverdau (siehe Abb.: 8) wurde das Restriktionsenzym PstI ausgewählt.

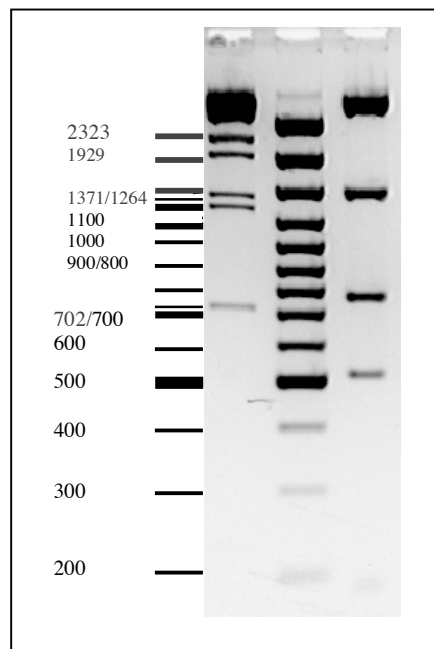


Abbildung 8: PstI-Kontrollverdau des DNA-Konstruktes: „T-Body“-anti-CD22.

(Auftrennung auf 2%-Agarosegel).

Spur 1: Marker Lambda DNA-BstEII

Spur 2: Marker 100bp-Leiter

Spur 3: „T-Body“-anti-CD22 → zu erwartende Fragmentgröße (bp):1456; 770; 559; 179.

Dieser Kontrollverdau zeigt, daß die Klonierung des Konstruktes erfolgreich war, da die zuerwartenden Fragmentgrößen erhalten wurden.

6.3 *hTERT* Immortalisationskonstrukt

(Hooijberg et al. 2000)

Replikatives Altern von CTL wurde mit Verkürzung der Telomerenden in Verbindung gebracht. Die Telomerase spielt eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der Telomerlänge. Folglich wurde angenommen, daß die Telomerase die Lebensspanne der CTL mitreguliert. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde in dieser Arbeit das hTERT-Konstrukt eingesetzt, um die Effektivität der „*T-Body*’s“ in ihrer Expression auf primären CTL und CTL-Klonen zu unterstützen bzw. zu vergrößern. Die ectopische Expression des menschlichen Telomerase führt zu Immortalization der CTL, ohne den Phänotypus zu ändern und ohne Verlust der Besonderheit oder der Funktionalität.

6.3.1 *Transformation*

Das LZRS-Plasmid ist schwer in E-coli-XL1-blue-Bakterien transformieren (persönliche Mitteilung von Dr. E. Hooijberg). Aus diesem Grund wurden „Max Efficiency DH5 α “ (Invitrogen BV, Groningen, NL) verwendet. Die Amplifikation und die DNA-Fällung ist im Methodenteil aufgeführt. Die Konzentration nach der Maxi- Preparation beträgt 1,3 μ g/ μ l.

Nach Angaben von Dr. E. Hooijberg erfolgte der Kontrollverdau für die cDNA LZRS-hTERT-IRES-GFP mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NotI. Da keine genauere Angaben seinerseits bezüglich der NotI-Schnittstelle gemacht wurde, war nur eine Verwendung einer abgewandelten Restriktionskarte des hTERT-Vektors möglich. Durch verschiedene Kontrollverdaus wurde die Gesamtgröße der cDNA auf 3,42Kb bestimmt (siehe Abb.: 9).

Aus diesen Gründen wurde entschieden eine RT-PCR als Nachweis eine für hTERT-Infektion von CTL’s (siehe 5.1.10) anzuwenden.

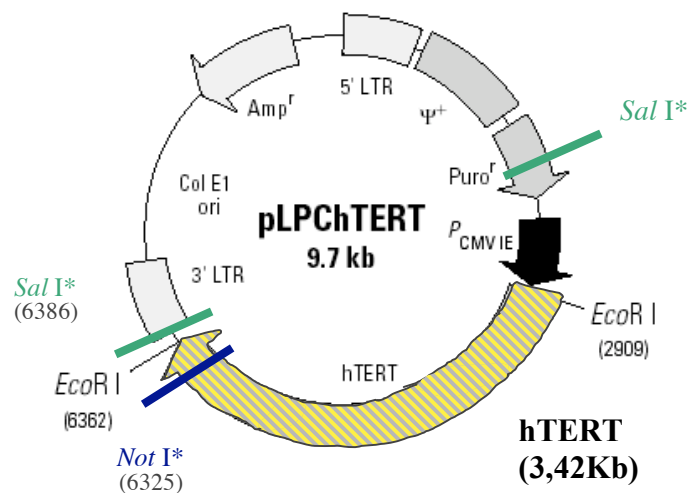


Abbildung 9: Modifizierte Restriktionskarte des retroviralen hTERT-Vektors. (*) Schnittstellen der Restriktionsenzyme, welche durch Angaben von Dr. Hoiijberg in den Expressionsvektor rekonstruiert wurden.

6.4 Generierung von Verpackungslinien mit einer hochgradigen Virustiterproduktion

6.4.1 Transfektion

Die Lipofektion der DNA-Konstrukte (pBullet-anti-CD22-CD28-g-IRES-GFP; LZRS-hTERT-IRES-GFP) erfolgte in die kokultivierte ekotrope GP+E-86 (Markowitz et al., 1988) und amphotrophe Verpackungslinie PA317 (Miller et al., 1986) bzw. in die Phönix Zelllinie NX-φ und ist im Methodenteil beschrieben. Als Negativkontrolle wurde die gleiche Anzahl an Zellen der beiden Zelllinien unter gleichen Bedingungen gehalten. Drei Tage nach der Transfektion wurden die GFP-positiven Zellen mittels eines „Sorters“ separiert, anschließend konnte der retrovirale Überstand isoliert und wie im Methodenteil aufgeführt weiter verfahren wurden.

6.4.2 Retrovirale Infektion von Verpackungszelllinien

Eine erhöhte Infektionsrate ist durch zweierlei Weisen zu erreichen: indem man den Virustiter erhöht oder bestimmte Chemikalien (z.B. Polybren, PLL) oder Proteine (z.B. Retronektin) verwendet. Die zusätzliche Verwendung von Polybren bzw. PLL und Retronektin unterstützt die Infektion der eingesetzten Zellen. Bei der retroviral vermittelten Transduktion des „*T-Body*“-anti-CD22-Konstruktes der Verpackungslinien wurden zwei virusproduzierende Verpackungslinien miteinander kultiviert, wodurch man zu einem exponentiellen Anstieg des Virustiters gelangt. Dies konnte unterstützt werden indem eine Zugabe von Polybren nach Protokollangaben (Cochlovius et al. 1998) stattfindet.

6.4.3 FACS-Analyse der transfizierten Verpackungszellen vor der „Zell-Sortierung“

Nach Lipofektion der kokultivierten Verpackungslinien PA317/GP+E-86 (siehe Abb.10 und Tab.3) und der Phönix Zelllinie NX- ϕ , wie auch der Infektion der Verpackungszelllinie PG13 (siehe Abb.11 und Tab.4) erfolgte nach dreitägiger Erholungsphase die Überprüfung der GFP-positiven Verpackungszelllinien mittels der Verwendung dreier Methoden:

Erstens über direkte Immunfluoreszenz. Durch eine Anregung mit blauem Licht leuchten die lebenden Zellen, die mit dem rekombinanten Konstrukt infiziert wurden, unter FITC-Fluoreszenzfilter auf (Stull et al. 2000).

Zweitens ist unter der Verwendung des FACS ebenfalls eine Kontrolle möglich und drittens durch Fluoreszenzmikroskopie (siehe 5.4.7).

Die nachfolgenden Untersuchungen der Transfektanten NX- ϕ -hTERT und PA317/GP+E-86-anti-CD22 bzw. PG13-anti-CD22 wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie durchgeführt. Es wurde die Expression und Präsentation des hTERT- und „*T-Body*“-Konstruktes auf den Verpackungszelllinien untersucht. Dies konnte mittels Koexpression, des zum hTERT-Konstrukt und „*T-Body*“-Konstrukt klonierten GFP-Gen überprüft werden. Die Messung erfolgte im FITC-Kanal. Als Negativkontrolle diente die Autofluoreszenz von untransfizierten NX- ϕ und PA317/GP+E-86 bzw. PG13-Zellen. Zur Analyse wurden die beiden Ergebniskurven übereinander projiziert, um so durch die Rechtsverschiebung im Vergleich zur Negativkontrolle den Anteil positive Transfektanten an der Gesamtpopulation ermitteln zu können. Diese Abweichung entspricht den Zellen, die eine stärkere Fluoreszenzintensität aufweisen, als Zellen, wie hier die Kontrolle, die eine generelle Autofluoreszenz besitzen (Abb:10-19).

Nach Lipofektion der NX- ϕ -Phönix-Verpackungszelllinie mit dem retroviralen hTERT-Vektor, wurde der prozentuale Anteil der positiven Zellen über eine FACS-Analyse überprüft. Durch die Subtraktion des Kontrollwertes der Autofluoreszenz (AF) untransfizierter Zellen von den transfizierten Zellen wurden die Prozentzahlen positiver Zellen ermittelt (Daten nicht gezeigt).

	Kontrolle Autofluoreszenz (AF) der untransfizierte NX- ϕ	Transfizierte NX- ϕ -hTERT nach Lipofektion
GFP positive Zellen (%)	0	44,9

Tabelle 2: Ergebnis der FACS-Analyse der NX- ϕ -hTERT nach Lipofektion. Die Tabelle stellt die prozentualen Werte der Negativkontrolle und der hTERT-transfizierten Zellen gegenüber.

PA317/GP+E-86 Autofluoreszenz / transfizierte PA317/GP+E-86 anti-CD22:

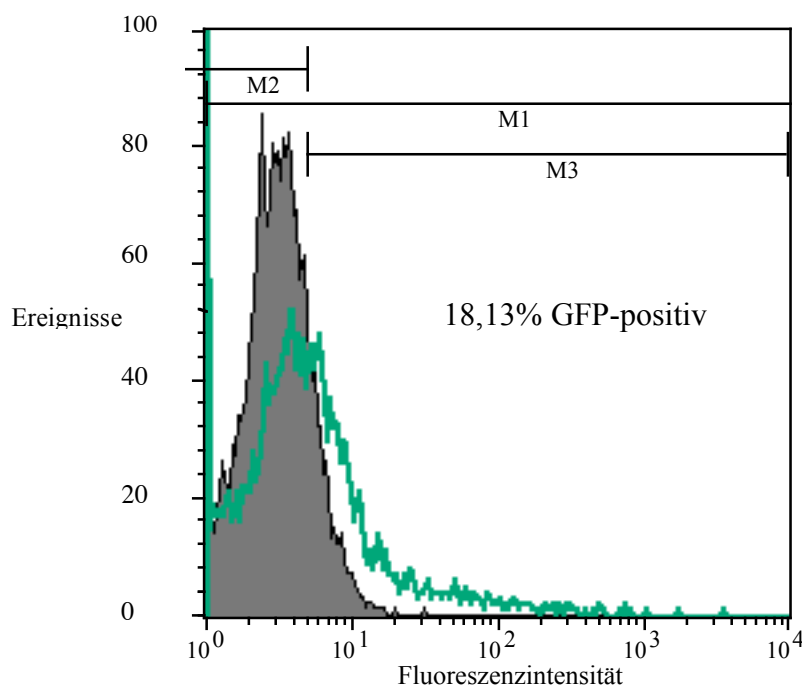


Abbildung 10: FACS-Analyse der PA317/GP+E-86-anti-CD22-Zellen nach Lipofektion. Auf der Abszisse sind die relativen Fluoreszenzeinheiten, auf der Ordinate die prozentuale Anzahl der positiven Zellen abgebildet.

Zur Veranschaulichung des unterschiedlichen Kurvenverlaufes zwischen transfizierten PA317/GP+E-86 und untransfizierten PA317/GP+E-86-Verpackungszelllinien sind

Histogramme mit Prozentzahlen positiver Zellen gezeigt. Dies ist durch eine Überlagerung der Negativkontrolle (untransfizierte PA317/GP+E-86) und der PA317/GP+E-86-anti-CD22 Kurve dargestellt.

	Kontrolle Autofluoreszenz (AF) der untransfizierte PA317/GP+E-86	Transfizierte PA317/GP+E-86 anti-CD22 nach Lipofektion
GFP positive Zellen (%)	14,72	32,85

Tabelle 3: Ergebnis der Prä-Sort-FACS-Analyse der anti-CD22-PA317/GP+E-86-Zellen (zu Abb. 10). Die Tabelle stellt die prozentualen Werte der Negativkontrolle und der anti-CD22-transfizierten Zellen gegenüber.

PG13 Autofluoreszenz / infizierte PG13anti-CD22:

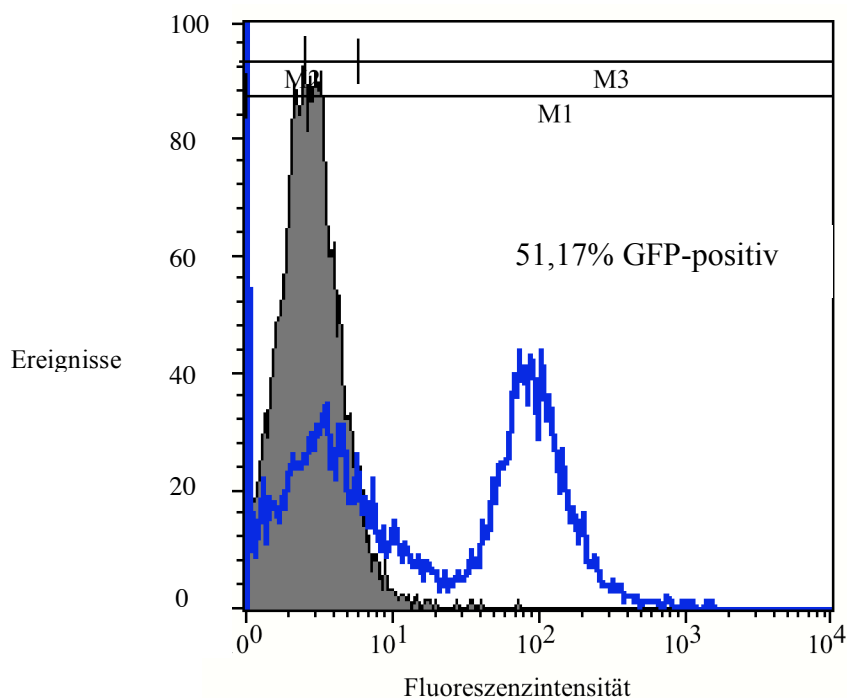


Abbildung 11: FACS-Analyse der PG13-anti-CD22-Zellen nach 1. Infektion mit retroviralem Überstand der PA317/GP+E-86anti-CD22-Zellen. Auf der Abszisse sind die relativen Fluoreszenzeinheiten, auf der Ordinate die prozentuale Anzahl der positiven Zellen abgebildet.

Zur Erläuterung des unterschiedlichen Kurvenverlaufes zwischen infizierten PG13 und nicht infizierten PG13-Verpackungszelllinien sind Histogramme mit Prozentzahlen positiver Zellen gezeigt. Dies ist durch eine Überlagerung der Negativkontrolle (nicht infizierte PG13) und der PG13-anti-CD22 Kurve dargestellt.

	Kontrolle Autofluoreszenz (AF) der nicht infizierte PG13	PG13-anti-CD22 nach Infektion
GFP positive Zellen (%)	4,03	55,20

Tabelle 4: Ergebnis der FACS-Analyse der anti-CD22-PG13-Zellen (zu Abb.: 11). Die Tabelle stellt die prozentualen Werte der Negativkontrolle und der anti-CD22-infizierten Zellen gegenüber.

6.4.4 „Sortierung“ der positiven transfizierten Verpackungszelllinien (FACS-Sort)

Vor einer Expandierung der zuvor dargestellten positiven Transfektanten, müssen diese von den negativen Zellen abgetrennt werden. Dies erfolgte durch die „Sortierung“ der Zellen mit Hilfe eines FACS-„Sorters“.

Die Messung erfolgte im FITC-Kanal. Als Negativkontrolle dienen untransfizierte Phönix NX- ϕ , PA317/GP+E-86 bzw. PG13-Zellen. Zur Analyse wurden die beiden Ergebnisse übereinander gelegt, um aus der Abweichung der Negativkontrolle positive Transfektanten zu ermitteln. Diese Abweichung entspricht CTL, die eine stärkere Fluoreszenzintensität aufweisen, als Zellen, wie hier die Kontrolle, die eine generelle Autofluoreszenz aufweisen.

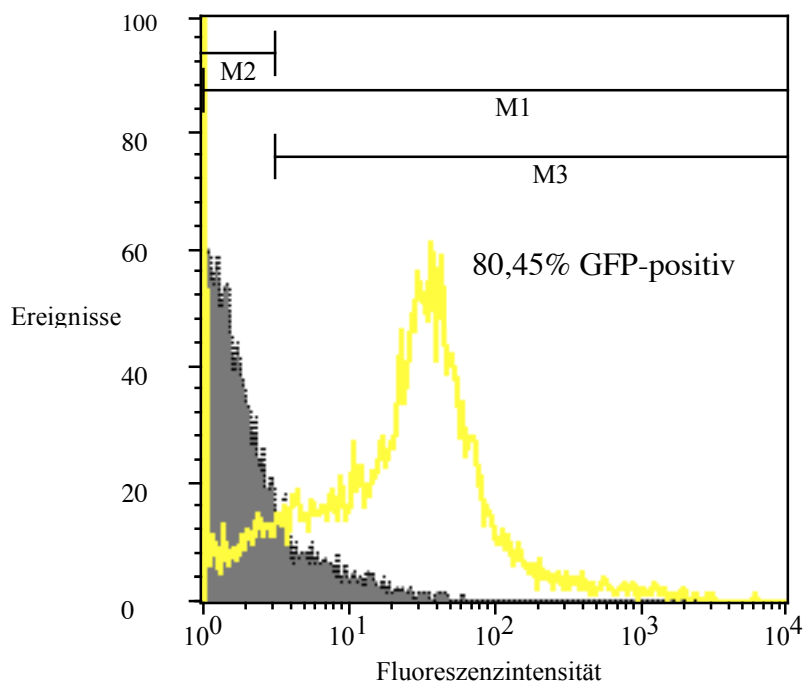
NX- ϕ Autofluoreszenz / transfizierte NX- ϕ hTERT:

Abbildung 12: FACS-Analyse der NX- ϕ hTERT nach Sortierung. Auf der Abszisse sind relative Fluoreszenzeinheiten, auf der Ordinate die prozentuale Anzahl der positiven Zellen abgebildet.

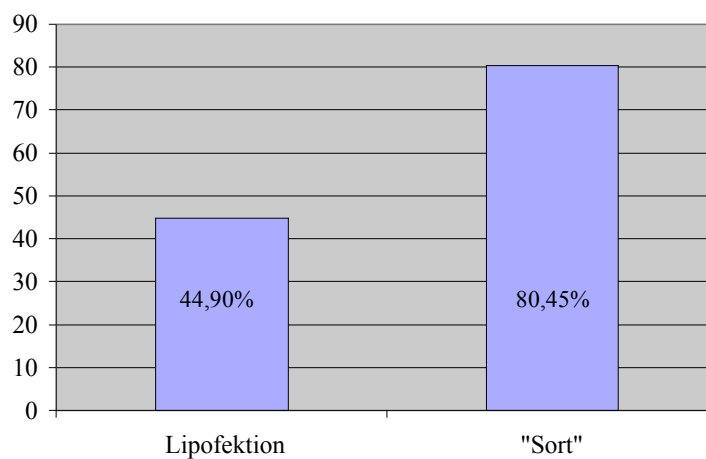
Lipofektion und "Sort": NX- ϕ -hTERT

Abbildung 13: Gegenüberstellung der FACS-Analyse positiver NX- ϕ -hTERT-Zellen nach der Lipofektion und dem Sortereignis. Auf der Abszisse sind die prozentuale Anzahl der GFP-positiven „gesorteten“ Zellen, auf der Ordinate transfizierte NX- ϕ -hTERT nach Lipofektion und jeweiligem „Sort“ abgebildet. Die Ergebniswerte sind abzüglich der jeweiligen Kontrollwerte entstanden.

Nach einer effizienten Lipofektion von 44,90% wurden die NX- ϕ -hTERT-Zellen durch eine einmalige Sortierung bis zu 80,45% angereichert (Abb.: 12 und 13).

PA317/GP+E-86 Autofluoreszenz / transfizierte PA317/GP+E-86 anti-CD22:

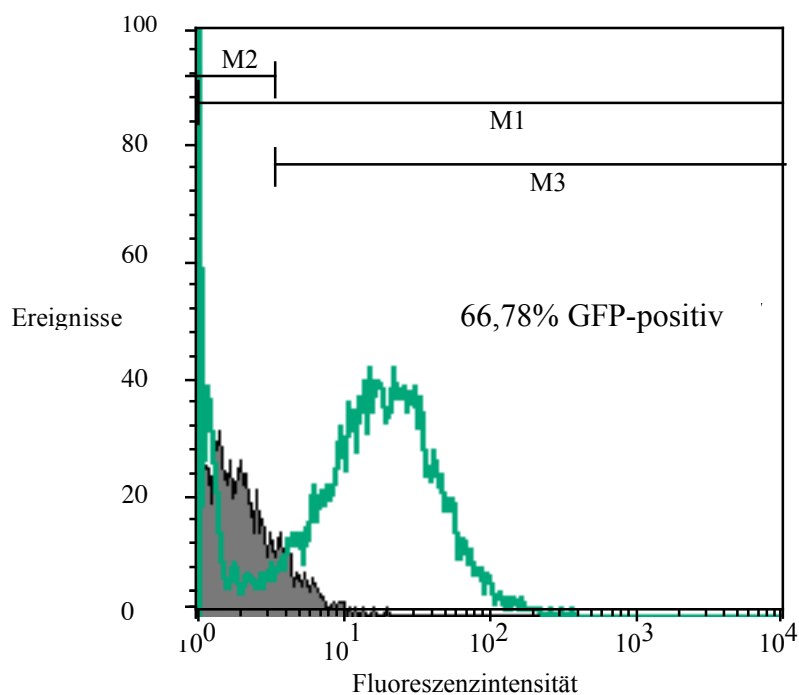


Abbildung 14: FACS-Analyse der PA317/GP+E-86-anti-CD22-Zellen nach 1. Sort. Auf der Abszisse sind relative Fluoreszenzeinheiten, auf der Ordinate die prozentuale Anzahl der positiven Zellen abgebildet.

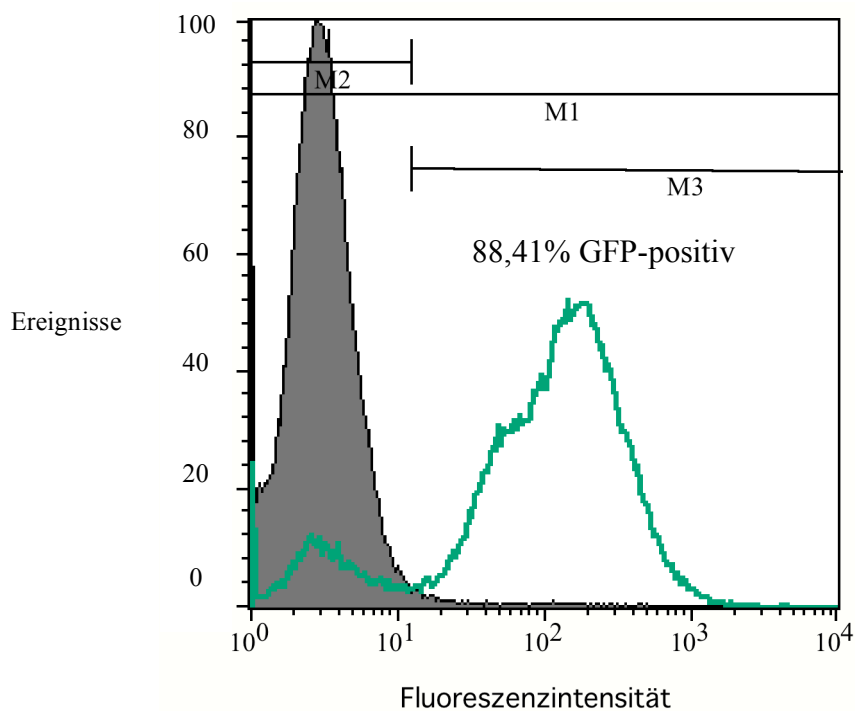


Abbildung 15: FACS-Analyse der PA317/GP+E-86-anti-CD22-Zellen nach 2. Sort. Auf der Abszisse sind relative Fluoreszenzeinheiten, auf der Ordinate die prozentuale Anzahl der positiven Zellen abgebildet.

Eine Zusammenfassung der Durchflußzytometrieanalyse vor den verschiedenen „Resortierungsschritten“ des Transfektanten PA317/GP+E-86-anti-CD22 läßt deutlich Unterschiede im Prozentsatz positiver Zellen zwischen den einzelnen Sortereignissen erkennen (Abb.: 16). Die höchsten prozentualen Anteile sind nach dem zweiten Sort, gefolgt vor dem ersten Sortvorgang zu erwarten. Diese Ergebnisse sind als Balkendiagramm dargestellt (Analyse-Funktionen von Microsoft Excel).

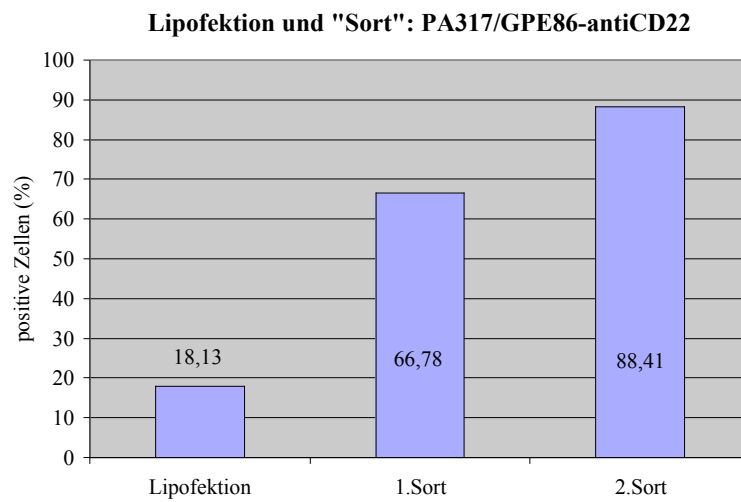


Abbildung 16: Gegenüberstellung der FACS-Analyse positiver PA317/GP+E-86-anti-CD22-Zellen nach der Lipofektion und den verschiedenen Sortereignissen. Auf der Abszisse sind die prozentuale Anzahl der GFP-positiven „gesorteten“ Zellen, auf der Ordinate transfizierten PA317/GP+E-86-anti-CD22-Zellen nach Lipofektion und jeweiligem „Sort“ abgebildet. Die Ergebnismwerte sind abzüglich der jeweiligen Kontrollwerte entstanden.

PG13 Autofluoreszenz / infizierte PG13 anti-CD22:

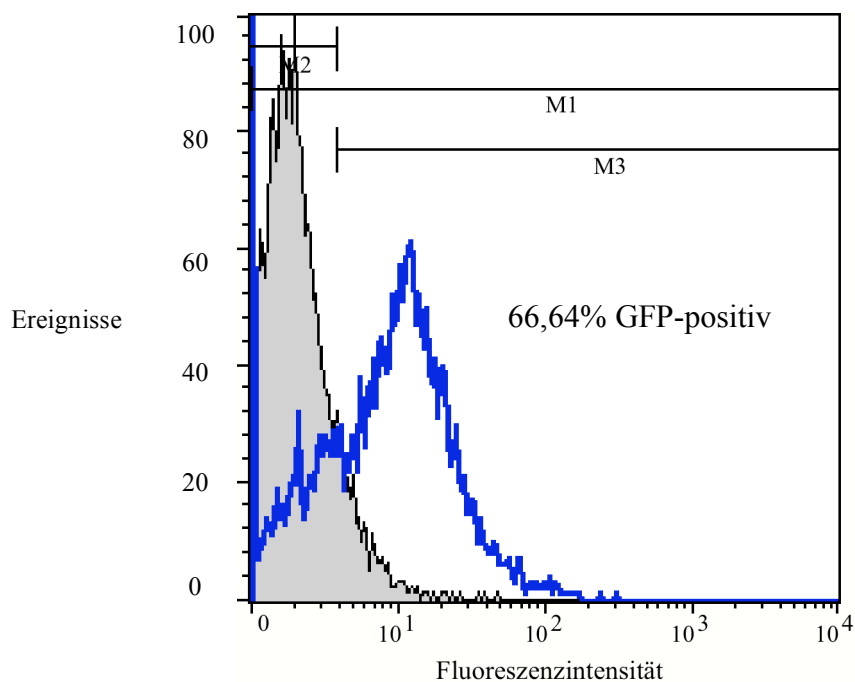


Abbildung 17: FACS-Analyse der PG13-anti-CD22-Zellen nach 1. Sort. Auf der Abszisse sind relative Fluoreszenzeinheiten, auf der Ordinate die prozentuale Anzahl der positiven Zellen abgebildet.

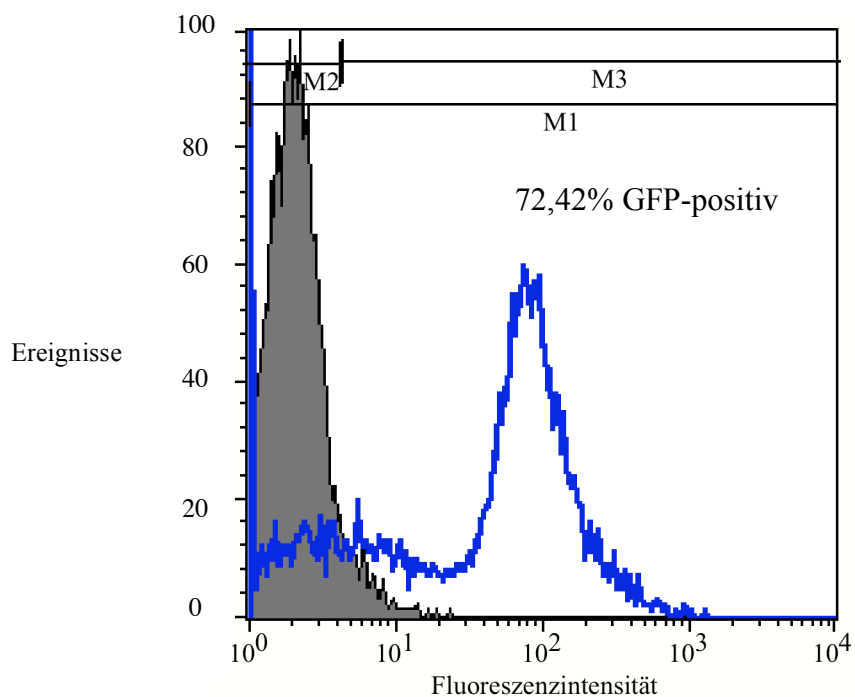


Abbildung 18: FACS-Analyse der PG13-anti-CD22-Zellen nach 2. Sort. Auf der Abszisse sind relative Fluoreszenzeinheiten, auf der Ordinate die prozentuale Anzahl der positiven Zellen abgebildet.

Eine Zusammenfassung der Durchflußzytometrieanalyse vor den verschiedenen „Resortierungsschritten“ des Transfektanten PG13-anti-CD22 läßt geringe Unterschiede im Prozentsatz positiver Zellen zwischen den einzelnen Sortereignissen erkennen (Abb.: 19). Die besten Ergebnisse sind nach dem zweiten Sortvorgang zu erwarten und ist als Pfeiler im Diagramm dargestellt (Analyse-Funktionen von Microsoft Excel).

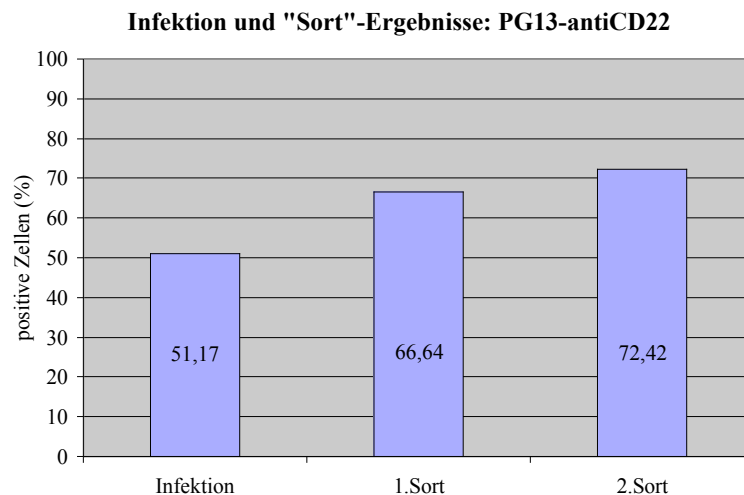


Abbildung 19: Gegenüberstellung der FACS-Analyse positiver PG13-anti-CD22-Zellen nach Infektion und verschiedenen Sortereignissen. Auf der Abszisse sind die prozentuale Anzahl der GFP-positiven „gesorteten“ Zellen, auf der Ordinate PG13-anti-CD22-Zellen nach Infektion und jeweiligem „Sort“ abgebildet. Die Ergebniswerte sind abzüglich der jeweiligen Kontrollwerte entstanden.

6.4.5 Fluoreszenzmikroskopie

Durch die „Cyto-Spin“-Zentrifugation wurden die Zellen auf „Cyto-Spin“-Plättchen oder Objektträger plaziert und eingebettet.

Die Fluoreszenz von GFP benötigt außer Sauerstoff keine Substrate oder andere Faktoren. GFP exprimierende Zellen können somit ohne spezielle Behandlung in lebenden oder toten Zellen bzw. Geweben mittels Durchflußzytometrie oder Konfokal- bzw. konventioneller Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden. GFP stellt ein relativ kleines Protein dar (238 Aminosäuren), aufgrund dessen können durch Diffusion feine Verästelungen in Zellen dargestellt werden (Brand 1995).

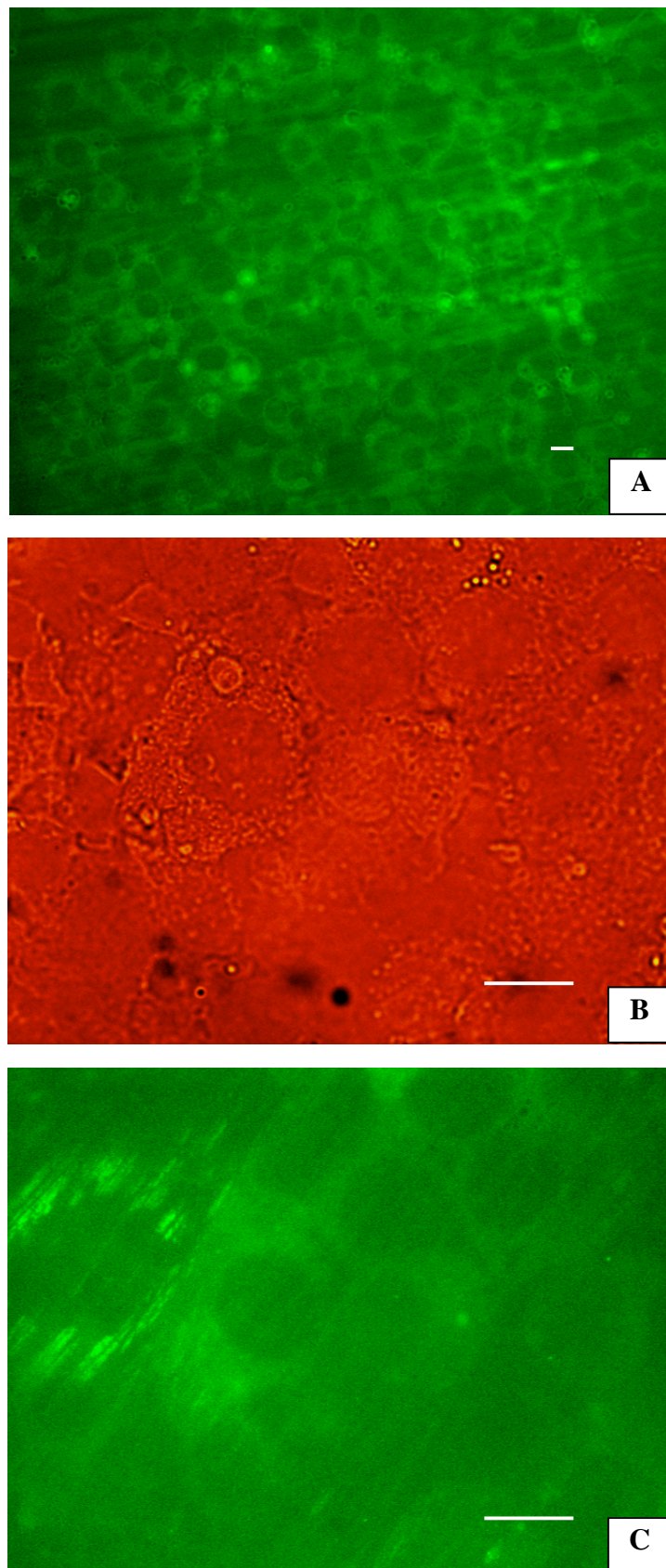


Abbildung 20: Transfizierte Verpackungszelllinie NX- ϕ -hTERT. Mikroskopische Aufnahme der Transfektanten mit Überlagerung zweier Kanäle (blauer Kanal mit Auflicht) und einer Belichtungszeit von 1 sec; Maßstab, 10 μ m (A). Lichtmikroskopische Aufnahme der Transfektanten mit einer Belichtungszeit von 1 sec; Maßstab, 10 μ m (B). Fluoreszenzaufnahme der GFP-positive Transfektanten mit einer Belichtungszeit von 1,5 sec; Maßstab, 10 μ m (C).

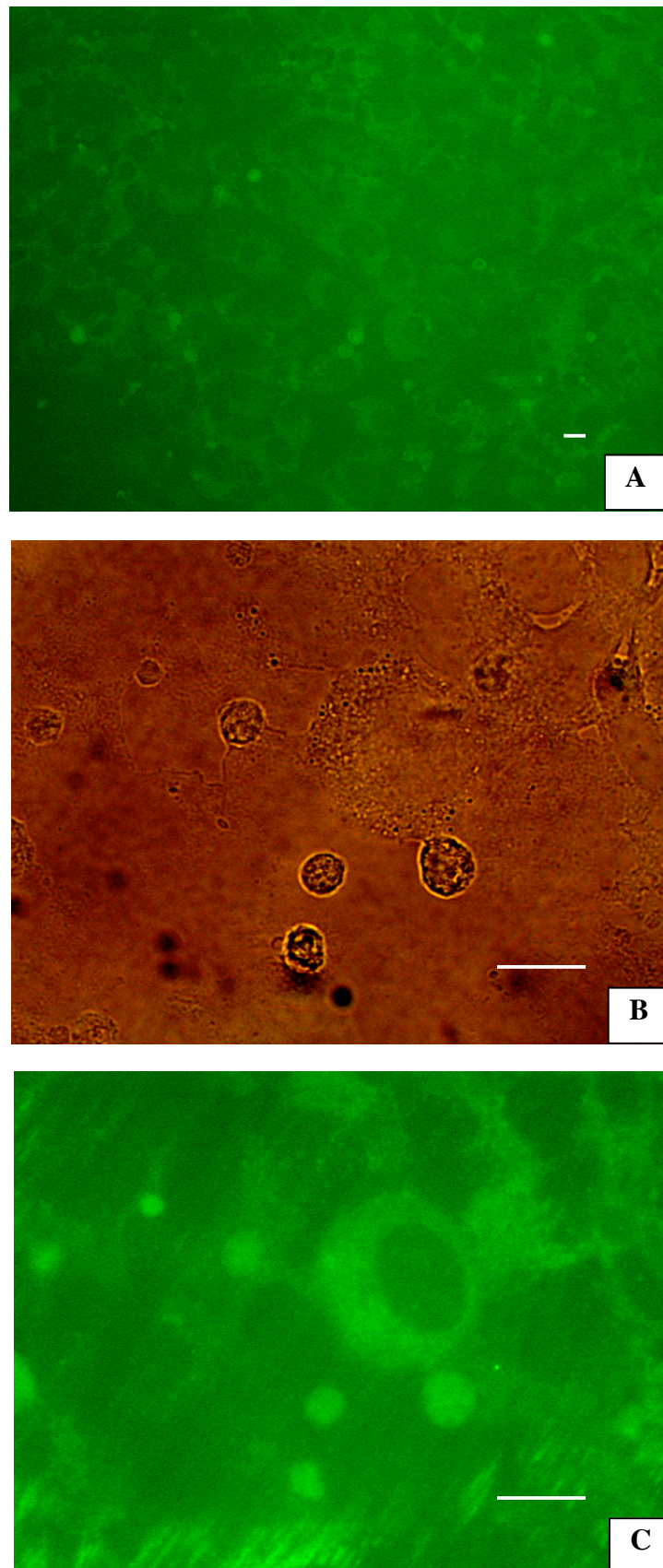


Abbildung 21: Kokultivierte und infizierte Verpackungszelllinie PA317/GP+E-86-,*T-Body*"-anti-CD22. Mikroskopische Aufnahme der Transfektanten mit Überlagerung zweier Kanäle (blauer Kanal mit Auflicht) und einer Belichtungszeit von 1sec; Maßstab,10µm (A). Lichtmikroskopische Aufnahme der Transfektanten mit einer Belichtungszeit von 1 sec; Maßstab,10µm (B). Fluoreszenzaufnahme der GFP-positive Transfektanten mit einer Belichtungszeit von 1,5 sec; Maßstab,10µm (C).

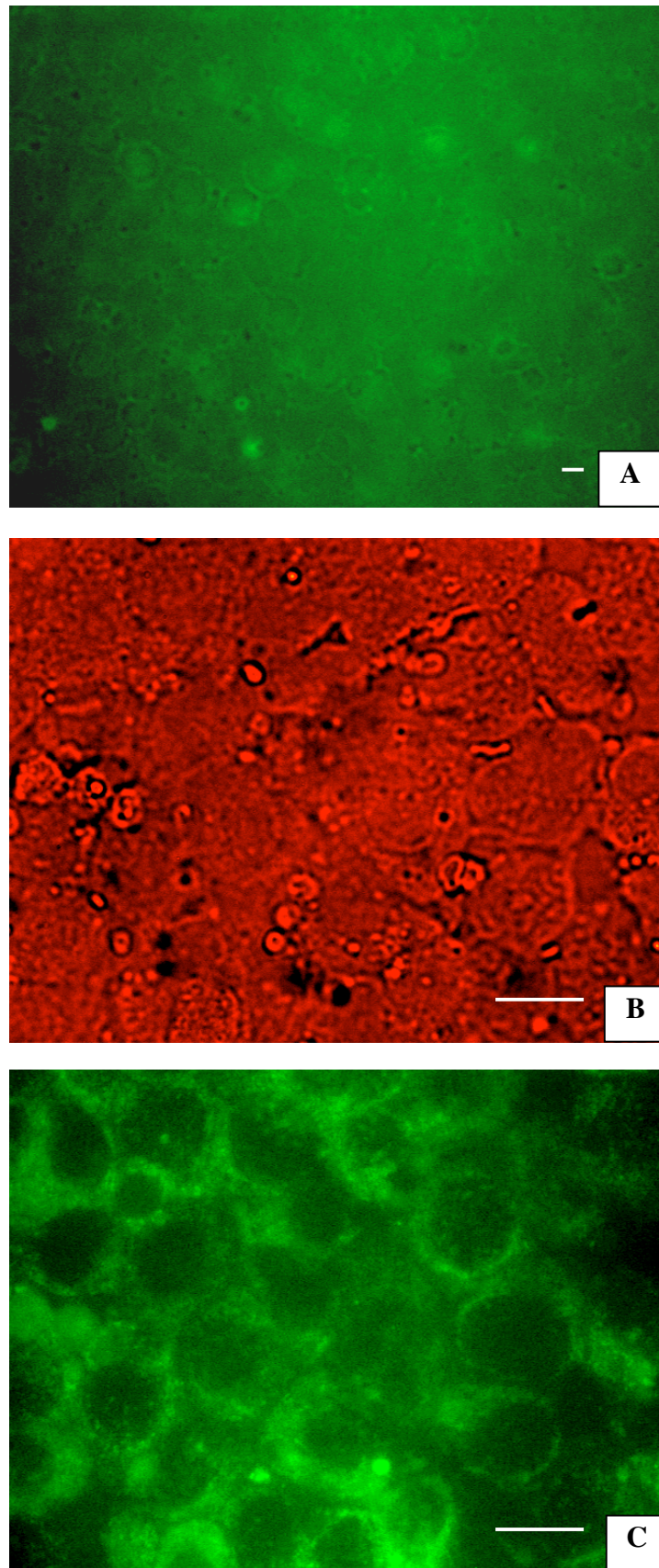


Abbildung 22: Kokultivierte und infizierte Verpackungszelllinie PG13-, *T-Body*'-anti-CD22. Mikroskopische Aufnahme der Transfektanten mit Überlagerung zweier Kanäle (blauer Kanal mit Auflicht) und einer Belichtungszeit von 1 sec; Maßstab, 10 μ m (A). Lichtmikroskopische Aufnahme der Transfektanten mit einer Belichtungszeit von 1 sec; Maßstab, 10 μ m (B). Fluoreszenzaufnahme der GFP-positiven Transfektanten mit einer Belichtungszeit von 1,5 sec; Maßstab, 10 μ m (C).

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde nach einem Kultivierungszeitraum von mehr als drei Monaten, was dreißig Passagen entspricht, durchgeführt. Somit sind bei diesen transfizierten Verpackungszelllinien, trotz längerer Passagen in Kultur, ein einheitlicher Phänotyp und eine stabile Expression des GFP-Transgens zu erkennen. Weiter konnten keine Unterschiede in der Proliferation im Vergleich zu den Kontrollzellen festgestellt werden.

Alle Fluoreszenzfotos der Gruppe A zeigen eine Aufsichtsaufnahme der Zellen. Es wurde eine Einstellung der Lichtquelle als „Super Imposition“ ausgewählt. Dabei fand eine Überlagerung zweier verschiedener Kanäle, einen Blaukanal und Normlicht- bzw. Auflichtkanal, statt. Das schwache Signal der Fluoreszenzfotos (B und C) kann auf die Methode der retroviralen Transfektion zurückgeführt werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Produktion des GFP im Zytosol und nicht im Zellkern stattfindet. GFP-markierte Verästelungen, wie unspezifische oder abgestorbene Artefakte der Zellen, sind in den Abbildungen B und C ebenfalls zu erkennen.

6.5 Zytotoxische T-Zellen (CTL)

6.5.1 Isolation von CTL

Die Isolierung der CTL aus peripheren Blutlymphozyten wurde in dieser Arbeit auf zwei verschiedene Arten durchgeführt. Die Durchführung ist im Methodenteil beschrieben. Man erhält verschiedene T-Zellausbeuten.

Bei einer T-Zellisolierung mit Hilfe der „Nylon-Wool“-Methode beträgt die eingesetzte periphere Blutlymphozyten-Zellzahl (PBL) 1×10^8 Zellen/ml.

Eingesetzte PBL- Anzahl	1×10^8 /ml	1×10^8 /ml	1×10^8 /ml	1×10^8 /ml
Zellzahl	8×10^6 /ml	2×10^7 /ml	1×10^7 /ml	6×10^6 /ml

Tabelle 5: Meßdaten des „Nylon-Wool“-Verfahrens

Bei der Isolation von CTL mittels des „MACS“-Verfahrens konnte die erhaltene periphere Blutlymphozyten-Zellzahl variieren, der Bereich erstreckt sich von 1×10^4 bis über 10^9 Zellen (Tab: 5) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach).

Eingesetzte PBL- Anzahl	2×10^7 /ml	$9,5 \times 10^6$ /ml	3×10^8 ml	1×10^7 ml
Zellzahl	1×10^7 /ml	4×10^6 /ml	1×10^8 ml	5×10^6 ml

Tabelle 6: Meßdaten der MACS-Methode.

Es sind weniger Verluste bei der T-Zellisolierung durch Verwendung der MACS-Methode (Tab.: 6) zu verzeichnen. Jedoch ist zu beachten, daß durch dieses Verfahren eine „negative“ Isolierung stattfindet, d.h. daß die Selektionsmarker, $CD8^+$ -Antikörper, mit Metallpartikeln („beads“) gekoppelt, an CTL gebunden bleiben. Dies muß bei anschließenden Durchführungen berücksichtigt wurden (siehe Abb.: 23).

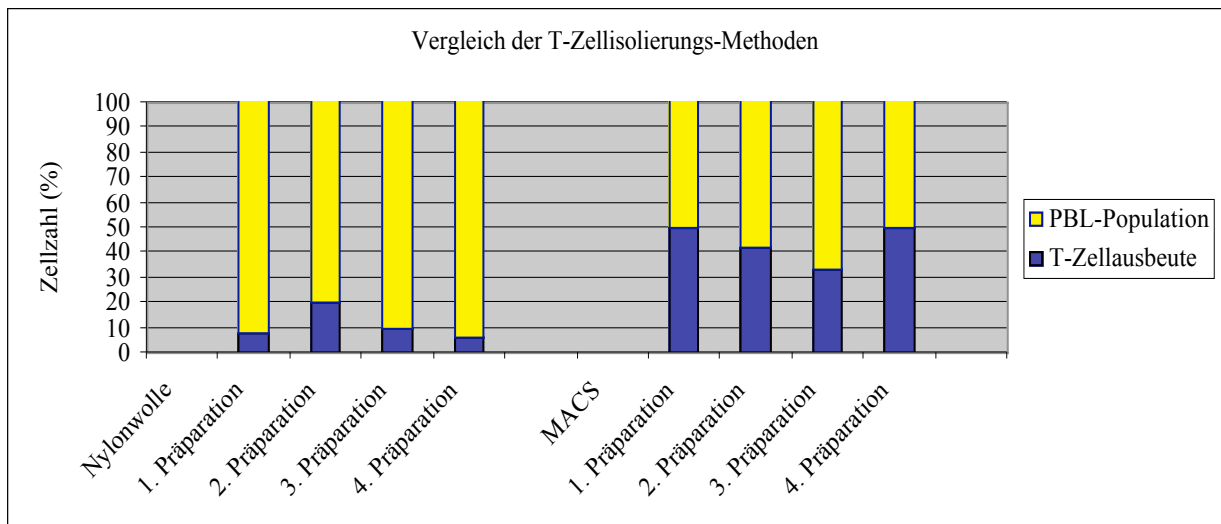


Abbildung 23: Gegenüberstellung der Ausbeuten zweier T-Zellisierungsmethoden

6.5.2 FACS

6.5.2.1 Phänotypisierung nach $CD8^+$ -MACS-Isolation

Die Phänotypisierung erfolgt mittels Bestimmung populationspezifischer Zelloberflächenproteine („*Clusters of Differentiation*“ oder CD-Marker). Diese lassen sich durch spezifische Antikörper identifizieren und durchflußzytometrisch analysieren. Um eine frisch isolierte CTL-Population zu phänotypisieren, wurden verschiedene von Interesse ausgewählte Antikörper verwendet, um die isolierten Zellen anhand spezifischer Oberflächenmarker zu charakterisieren. Die verwendeten Erstantikörper sind direkt mit einem zweiten fluoreszierenden Antikörper (PE) gekoppelt. Die Messung erfolgte im PE-Kanal. Der prozentuale Anteil der Messergebnisse wurde durch die Subtraktion der Messwerte und der Negativkontrolle des CTL-Autofluoreszenzwertes, d.h. unbehandelte CTL ohne Antikörper, ermittelt. Die Auswahl der Antikörper wurde durch die zu höheren Anteile vorkommenden Zelltypen in einer PBL-Population nämlich CTL, B- und NK-Zellen bestimmt. Der anti-*c-myc*-Antikörper wurde in späteren Experimenten als Kontrolle benötigt. Aufgrund dessen wurde dieser hier ermittelte Wert als Negativwert gedeutet (siehe Tab.: 7).

Antikörper (PE)	positiver Anteil in Prozent (%)
anti-CD4	0,02
anti-CD8	93,40
anti-CD11c	2,27
anti-CD14	17,24
anti-CD16	16,31
anti-CD22	0,47
anti-CD25	0,29
anti-CD28	0,15
anti-CD40	0,02
anti-CD45RO	13,10
anti-CD56	1,37
anti-CD80	0,57
anti-CD86	0,64
anti-IL-2	0,14
anti-IL-14	0,03
anti- <i>c-myc</i>	0,02

Tabelle 7: Phänotypisierung nach CD8⁺-MACS-Isolation

Aus diesen Daten (Tab.: 7) ist ersichtlich, daß die CD8⁺- MACS-Isolation zu erfolgreich war (93,40%). Eine geringe Expression von unter 1% des CD28-Oberflächenmarker ist zu erkennen. Eine geringere Aktivierung ist ebenfalls bei der Expression des Adhäsionsmolekül CD11c festzustellen. Bei dieser Isolation sind zu 17,24% Monozyten enthalten. Durch die Markierung der Antikörper anti-CD16 und anti-CD56 wurden NK-Zellen identifiziert, die zu 16,31% und 1,37% präsent sind. Dem CD56 wurden auch aktivierte T-Lymphozyten zugeordnet. U.a. sind T-Subpopulationen (CD45RO) vorhanden.

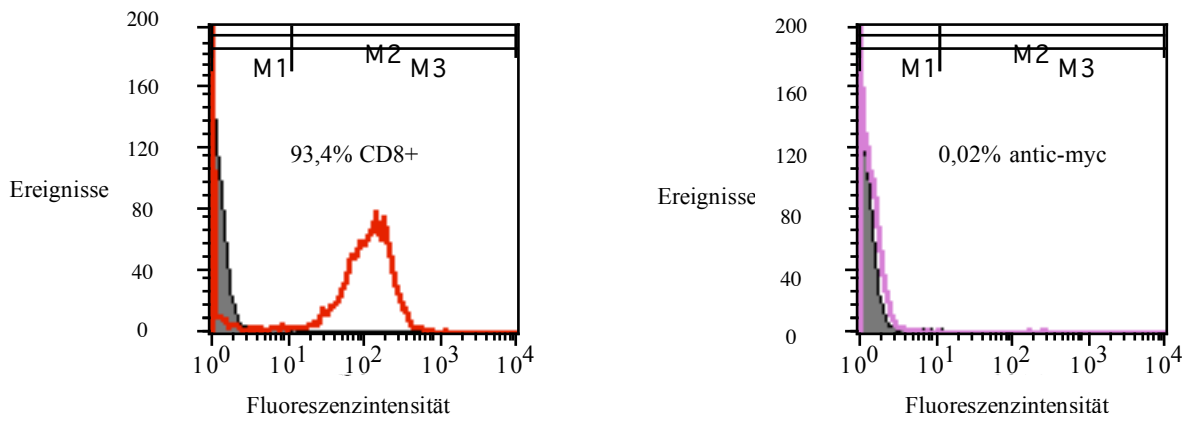


Abbildung 24: Exemplarische Darstellung der FACS-Analyse nach CD8⁺-MACS-Isolation. Die Messung erfolgte über den PE-Kanal. Auf der Abszisse sind die relativen Fluoreszenzeinheiten, auf der Ordinate die prozentuale Anzahl der positiven Zellen abgebildet. Durch eine Überlagerung der Negativkontrolle (Autofluoreszenz) und der mit Antikörper gekoppelten Zellen, ist aus den Kurven der Anteil der positiven Zellen ermittelbar.

6.6 *Retrovirale Infektion von CTL*

Die Infektion der CTL verläuft unter der Verwendung von Retronektin-beschichteten Platten. Durch den Einsatz des Retronektins konnte man eine Infektionsrate von nahe zu 96% laut Herstellerangaben (BioWhittaker, Verviers, Belgien) erhalten. Der Versuchsablauf ist im Methodenteil unter 5.3.15. aufgeführt.

6.6.1 *FACS-Analyse retroviral infizierten CTL*

Durch die Selektion der positiven PG13-anti-CD22 und NX- ϕ -hTERT konnte retroviraler Überstand gewonnen werden. Humane CTL wurden in einem Ansatz, mit dem „*T-Body*“-anti-CD22 und in einem zweiten Ansatz mit dem NX- ϕ -hTERT, infiziert. Nach dieser Infektion wurden die CTL im FACS auf GFP-positive Signale untersucht. Als Negativkontrolle wurden CTL verwendet, welche ohne die Zugabe des retroviralen Überstandes unter den gleichen Bedingungen kultiviert wurden. Die Messung erfolgte im FITC-Kanal. Zur Analyse wurden die beiden Ergebnisse aufeinander gelegt, um aus der Abweichung der Negativkontrolle positive Transfektanten zu ermitteln. Diese Abweichung entspricht CTL, die eine stärkere Fluoreszenzintensität aufweisen, als Zellen, wie hier die Kontrolle, die eine generelle Autofluoreszenz besitzen (siehe Abb.: 25 und 26).

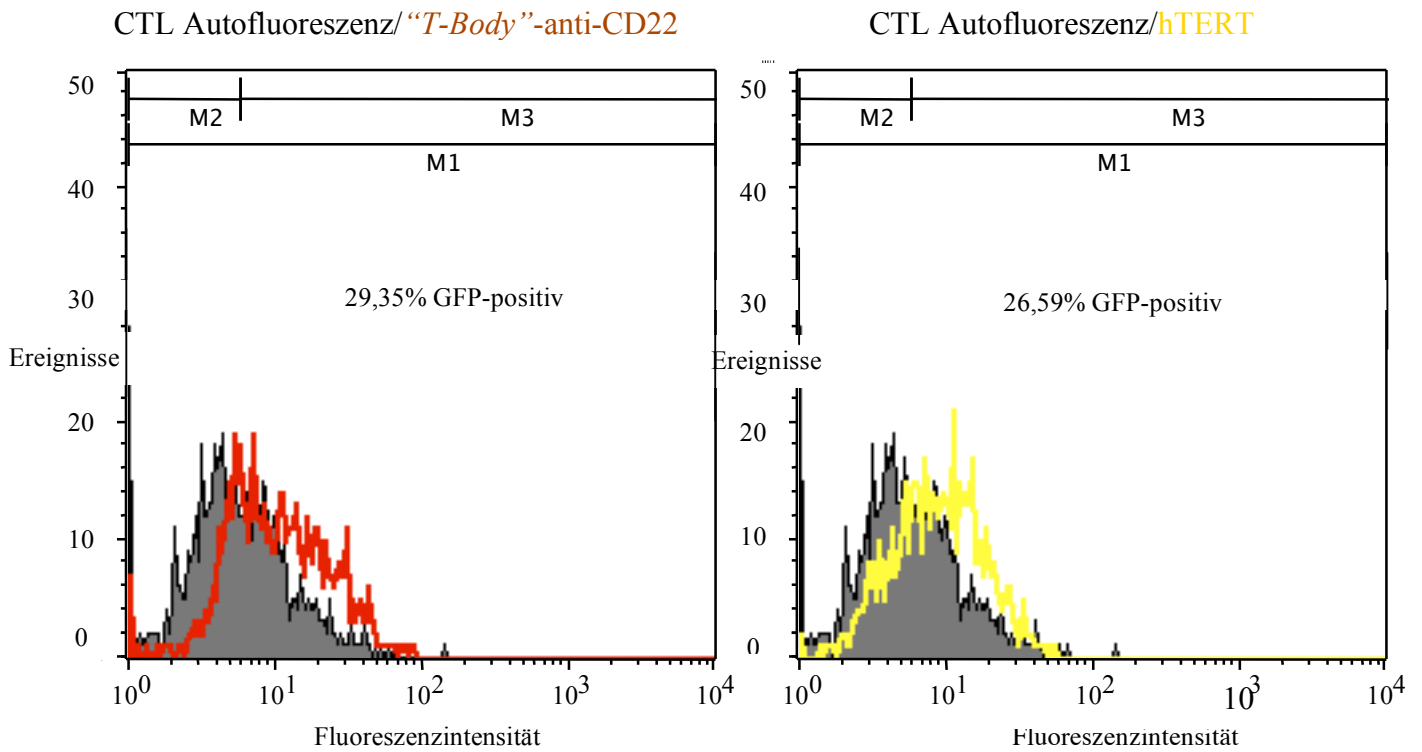


Abbildung 25: FACS-Analyse nach Infektion von CTL mit retroviralem Überstand „*T-Body*“-anti-CD22 (links) und hTERT (rechts). Auf der Abszisse sind relative Fluoreszenzeinheiten, auf der Ordinate die prozentuale Anzahl der positiven Zellen abgebildet.

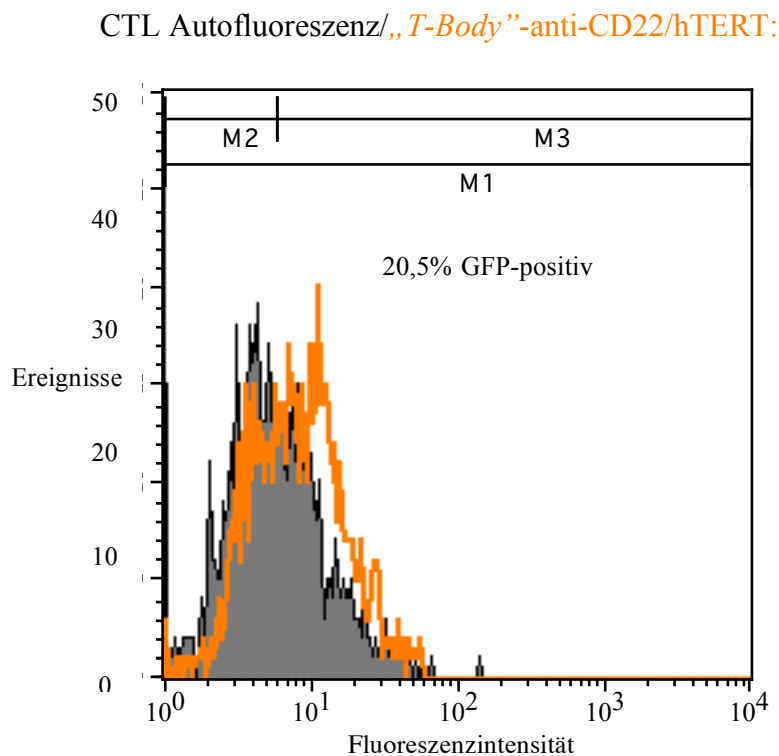


Abbildung 26: FACS-Analyse nach Doppel-Infektion von CTL mit retroviralem Überstand „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT. Auf der Abszisse sind relative Fluoreszenzeinheiten, auf der Ordinate die prozentuale Anzahl der positiven Zellen abgebildet.

In diesen Abbildungen (25 und 26) ist die Transfektionseffizienz der CTL nach retroviraler Infektion zu erkennen. Die für „*T-Body*“-anti-CD22 und hTERT positiven CTL sind zu 29,35% und 26,59% positiv transfiziert. Bei der Doppeltransfektion erhielt man einen prozentualen Anteil von 20,5%.

6.6.2 Phänotypische Charakterisierung von humanen CTL nach retroviraler Infektion wie auch Stimulation

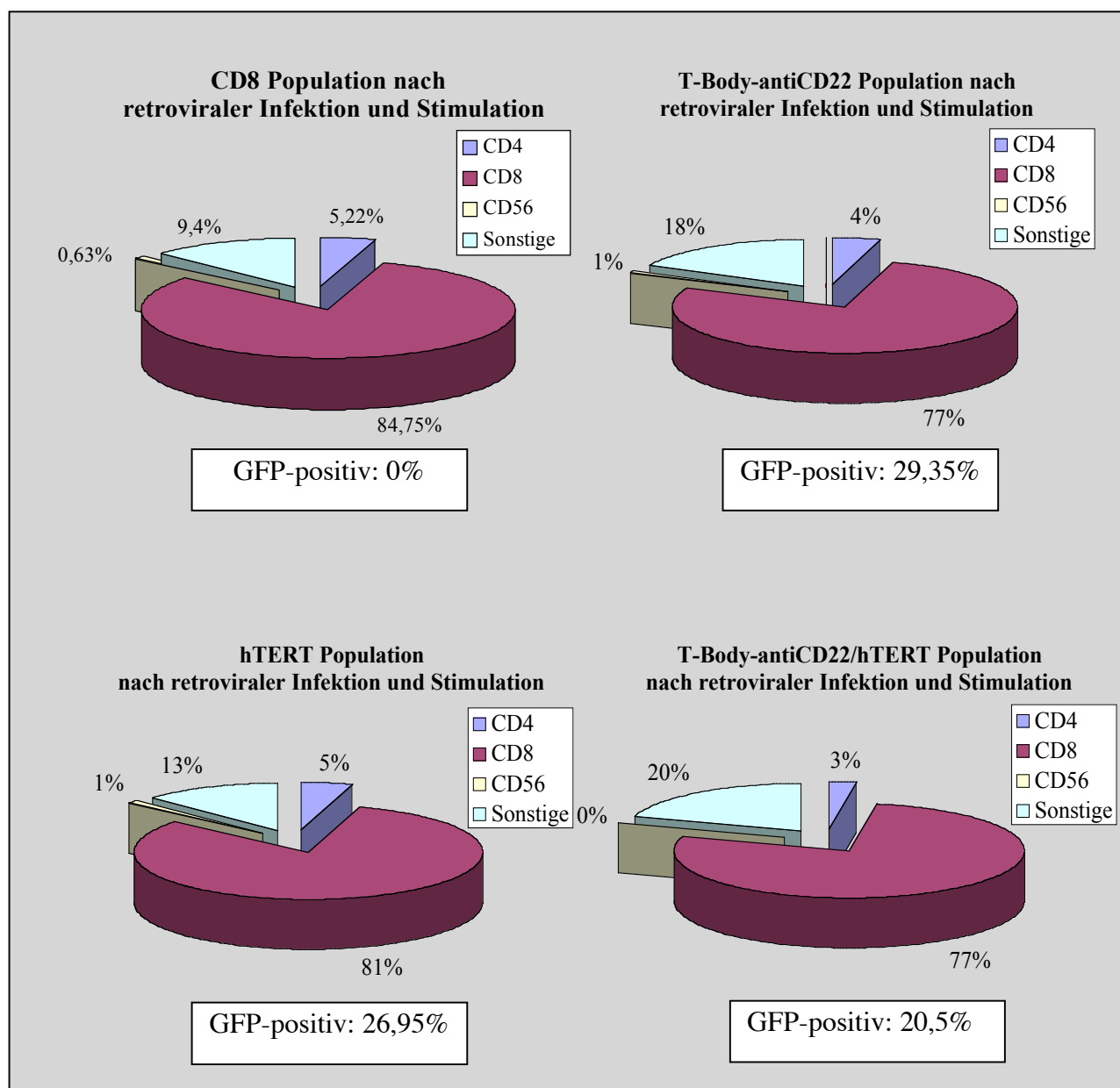


Abbildung 27: Humane CTL nach Stimulation mit CD3, CD28 Antikörper und Interleukin-2 und Infektion mit retroviralen Überständen (positive Transfektanten sind in Prozenten angegeben). Markierung mit CD4, CD8 und CD56. FACS Analyse wurde mit PE-gekoppelten Antikörper vollzogen.

Diese Phänotypisierung in Abb.: 27 zeigt die Relationen der CD4, CD8 und CD56-positiven Zellen in den verschiedenen transfizierten CTL-Populationen. Trotz der aus einer Ausgangspopulation stammenden CTL sind Unterschiede in den Verhältnissen der verschiedenen Transfektanten zu erkennen. Eine prozentuale Verlagerung der CD8⁺ Zellen zugunsten der „Sonstigen“- Zellen im Vergleich von untransfizierten und transfizierten CTL-Populationen hat stattgefunden. Dies kann auf die Behandlungsmethode der retroviralen Infektion zurückgeführt werden. Durch die Transfektion des „*T-Body*“-anti-CD22-Konstruktes wurde der CD8⁺-Anteil stärker verringert, als bei den hTERT-Transfektanten. Vermutlich hat während der Integration des größeren „*T-Body*“-Konstruktes in die CTL ein Absterben der Zellen und infolgedessen ein Verlust der CD8⁺ Positivität stattgefunden. Die Anteile der CD4 und CD56 positiven Zellpopulationen weisen hingegen keine signifikanten Unterschiede auf.

6.6.3 RT-PCR: Nachweis *hTERT*-spezifischer mRNA in retroviral infizierte CTL mittels reverser Polymerasekettenreaktion

Da das *hTERT*-Konstrukt (LZRS-*hTERT*-IRES-GFP), wie die „*T-Body*“-DNA ein GFP-Gen als positiver Kontrollmarker enthält, wurde die positive Transfektion des *hTERT*-Konstruktes in CTL über eine Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription (RT-PCR) nachgewiesen.

Es wurde zwei Tage nach Infektion Gesamt-RNA aus retroviral infizierten CTL isoliert, wobei die Ausbeuten etwa 280µg („*T-Body*“-anti-CD22), 350µg (*hTERT*), 700µg („*T-Body*“-anti-CD22/ *hTERT*) betragen. Jeweils 1 µg Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und amplifiziert.

Mittels der RT-PCR wurde *hTERT*-spezifische mRNA in CTL nachgewiesen. Diese cDNA wurde einer PCR unterzogen, bei der aus der *hTERT*-spezifischen cDNA ein Teilfragment von ~350 bp amplifiziert wurde. Als Primerpaar wurde eine Kombination aus *hTERT*-forward (gaa cgt tcc gca gag aaa ag) und *hTERT*-reverse (ctg tcg cat gta cgg gta cgg ctg) eingesetzt. Zur Standardisierung wurde das Housekeeping-Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) verwendet. Die Bestimmung der relativen Verhältnisse erfolgte durch den Vergleich der PCR-Zyklenzahl bis zum Erscheinen der PCR-Banden. Der Identitätsnachweis der Banden der PCR-Produkte erfolgte durch Gelelektrophorese auf einem 1 %igen Agarosegel.

Es wurden 1-20µl des cDNA-Syntheseansatzes mit je 10 mM Primer zusammen mit einem Gemisch aus hitzestabiler DNA-Polymerase, ATP, TTP, GTP, CTP und Polymerasepuffer hier im Beispiel in Form des im Handel gebrauchsfertig erhältlichen „PCR-Master-Mix“ der Firma Invitrogen BV, Groningen, NL., zum Einsatz gebracht. Es wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. der vorstehend beschriebene Reaktionsansatz mit „*T-Body*“-anti-CD22 transfizierten CTL,
2. der vorstehend beschriebene Reaktionsansatz mit *hTERT* transfizierten CTL,
3. der vorstehend beschriebene Reaktionsansatz mit „*T-Body*“-anti-CD22/*hTERT* doppeltransfizierten CTL,
4. der vorstehend beschriebene Reaktionsansatz mit untransfizierten CTL,
5. der vorstehend beschriebene Reaktionsansatz mit *hTERT*-Plasmid-DNA, („Positivkontrolle“)
6. Reaktionsansatz mit GAPDH-spezifischen Primern (Invitrogen BV, Groningen, NL.) mit „*T-Body*“-anti-CD22 transfizierten CTL,

7. Reaktionsansatz mit GAPDH-spezifischen Primern mit hTERT transfizierten CTL,
8. Reaktionsansatz mit GAPDH-spezifischen Primern mit „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT doppel-transfizierten CTL,
9. Reaktionsansatz mit GAPDH-spezifischen Primern mit untransfizierten CTL.

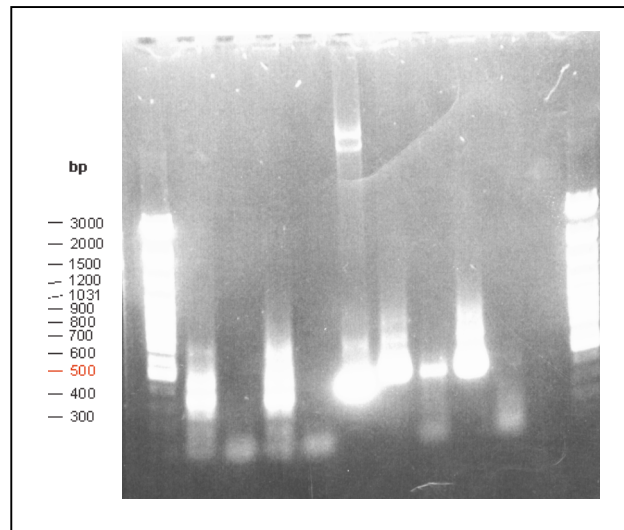


Abbildung 28: hTERT PCR-Produkte retroviral infizierter CTL.

(Auftrennung auf 1%-Agarosegel).

Die Reaktionsprodukte der PCR-Reaktion wurden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Diese Abb. 28 zeigt das Ergebnis einer hTERT-spezifischen PCR Reaktion.

Es zeigt:

- | | |
|--|-------------------------|
| Spur 1 = DNA Molekulargewichtsmarker 100 bp | |
| Spur 2 = „ <i>T-Body</i> “-anti-CD22/hTERT | } hTERT-spezifische PCR |
| Spur 3 = „ <i>T-Body</i> “-anti-CD22 | |
| Spur 4 = hTERT | |
| Spur 5 = untransfizierte Kontroll-CTL | |
| Spur 6 = hTERT Plasmid-DNA | } GAPDH-spezifische PCR |
| Spur 7 = „ <i>T-Body</i> “-anti-CD22/hTERT | |
| Spur 8 = hTERT | |
| Spur 9 = „ <i>T-Body</i> “-anti-CD22 | |
| Spur 10 = untransfizierte Kontroll-CTL | |
| Spur 11 = DNA Molekulargewichtsmarker 100 bp | |

Ein PCR-Produkt der erwarteten Größe von ~350 Bp wurde in den Spuren 2, 4, 6 nachgewiesen, d.h. mittels hTERT-Primern wurde hTERT-spezifische mRNA in den transfizierten CTL nachgewiesen. In Spur 6 fand sich eine Bande der hTERT-Vektor-Positivkontrolle.

Die GAPDH-spezifische PCR („GAPDH-Kontrolle“), Spuren 7-10, beweist, daß ein negatives PCR Ergebnis im hTERT-spezifischen Ansatz auf ein Vorhandensein von cDNA zurückzuführen ist, da in allen Reaktionsansätzen ein PCR-Produkt der erwarteten Größe von 355Bp und in den Ansätzen mit und GAPDH-spezifische cDNA nachweisbar war. Letzteres stellt den Beweis zur Anwesenheit der cDNA in der Probe.

Die RT-PCR ermöglicht den Nachweis der hTERT-Expression auch in Fällen, in denen der Nachweis des hTERT-Proteins aufgrund zu niedrigen Expressionsspiegels mit immunhistologischen Methoden, dem ELISA oder mit Immunoblot-Verfahren nicht gelingt.

6.6.4 Phänotypisierung nach retroviraler Infektion von CTL

Es wurden, wie schon zuvor unter 6.5.2.1. beschrieben, zur Phänotypisierung ausgewählte Antikörper verwendet, um die Zelloberfläche der isolierten Zellen spezifisch in Prozenten zu charakterisieren. Somit konnte über eine Veränderung der Zelloberfläche, ausgelöst durch retrovirale Infektion mit verschiedenen Konstrukten wie auch durch Stimulation, eine Aussage getroffen werden. Diese Erstantikörper sind direkt mit einem zweiten fluoreszierenden Antikörper (PE) gekoppelt. Der prozentuale Anteil der Messergebnisse wurde durch die Subtraktion der Messwerte und der Negativkontrolle des CTL-Autofluoreszenzwertes, das bedeutet unbehandelte CTL ohne Antikörper, ermittelt. Die Auswahl der Antikörper wurde durch die zu höheren Anteile vorkommenden Zelltypen in einer PBL-Population nämlich CTL, B- und NK-Zellen bestimmt. Der anti-*c-myc*-Antikörper wurde in späteren Experimenten als Kontrolle benötigt. Aufgrundessen wurde dieser hier ermittelte Wert als Negativwert gedeutet. Die Messung erfolgte zwei Tage nach stattgefundener Infektion (Tab.: 8).

Antikörper (PE)	„ <i>T-Body</i> “-anti-CD22 positiver Anteil in Prozent (%)	hTERT positiver Anteil in Prozent (%)	„ <i>T-Body</i> “-anti-CD22/hTERT positiver Anteil in Prozent (%)
anti-CD4	4,68	4,48	2,55
anti-CD8	77,63	81,99	77,48
anti-CD11c	60,12	3,38	6,25
anti-CD14	1,83	0	0
anti-CD16	2,47	1,56	1,01
anti-CD22	0	0,91	0,17
anti-CD25	4,2	9,6	4,4
anti-CD28	14,72	6,84	11,46
anti-CD40	2,2	0	1,19
anti-CD45RO	46,09	48,97	68,29
anti-CD56	0,93	0,91	0
anti-CD80	5,83	5,95	0
anti-CD86	1,29	2,02	0
anti-IL-2	0,04	0	0
anti-IL-14	0	3,2	0
anti MHC I	80,5	65,62	53,5

Tabelle 8: Phänotypisierung der verschiedenen Transfektanten.

Aus diesen Werten (Tab.: 8) ist ersichtlich, daß eine verstärkte Expression des Adhäsionsmolekül CD11c bei der „*T-Body*“-anti-CD22 Transfektante stattgefunden hat, was bei der Erkennung wie auch Bindung der T-Zelle und des Tumors von Vorteil sein könnte. Durch das Stimulationsprotokoll (5.3.15.) ist CD14 im Vergleich zur Phänotypisierung nach CTL-Isolation herunterreguliert worden, das bedeutet, daß Monozyten durch diese T-Zell-spezifische Kultivierung signifikant vermindert worden sind. Dies ist auch bei der Markierung der Antikörper anti-CD16 und anti-CD56 für NK-Zellen festzustellen, die beide nur noch zu 1% präsent sind. U.a. sind T-Subpopulationen (CD45RO) vorhanden. Trotz Stimulation mit dem anti-CD28 Antikörper ist bei der hTERT-Transfektante die Zellen mit anti-CD28 und OKT3 aktiviert wurden, ist ein geringer Aktivierungsstatus von unter 1% der CD3- und CD28-Oberflächenmarker zu erkennen. Weiter ist auffallend, daß durch die retrovirale Infektion der CTL mit dem retroviralen Überstandes des hTERT-Konstruktes eine Reduktion der MHC I-Expression erfolgte. Somit wurde dargestellt, daß sich durch die Transfektion des hTERT-Konstruktes der Phänotyp der CTL verändert hat.

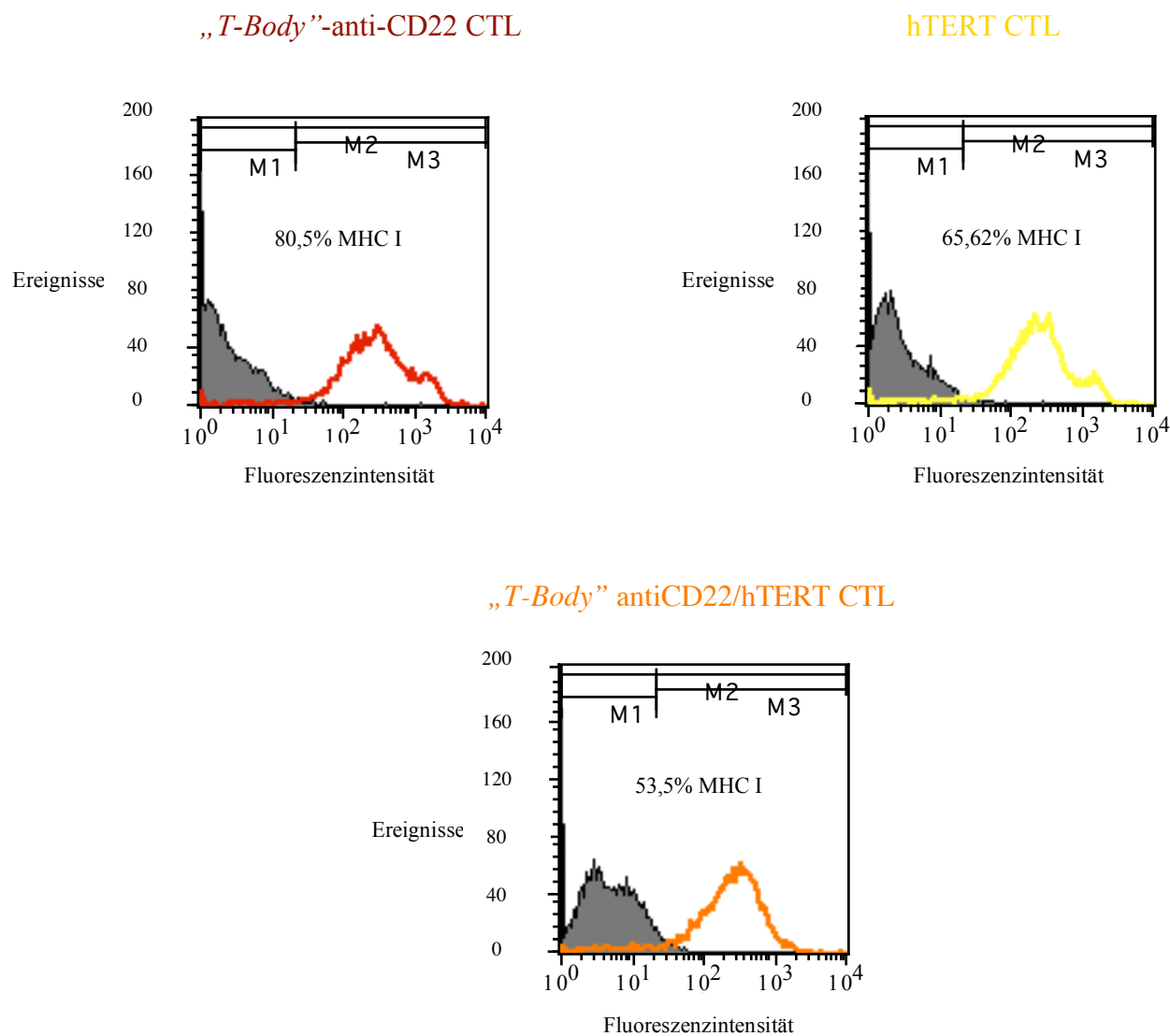


Abbildung 29: Exemplarische Darstellung der FACS-Analyse verschiedener Transfektanten spezifisch markiert für MHC I. Die Messung erfolgte über den PE-Kanal. Auf der Abszisse sind die relativen Fluoreszenzeinheiten, auf der Ordinate die prozentuale Anzahl der positiven Zellen abgebildet. Durch eine Überlagerung der Negativkontrolle (Autofluoreszenz) und der mit Antikörper gekoppelten Zellen, ist aus den Kurven der Anteil der positiven Zellen ermittelbar.

6.6.5 anti-*c-myc* Detektion des „*T-Body*“-anti-CD22-Konstruktes auf retroviral infizierter CTL

Zur weiteren Überprüfung der Expression des „*T-Body*“-anti-CD22 Rezeptors auf der Oberfläche von CTL, wurde eine FACS-Messung unter Verwendung des anti-*c-myc* Antikörpers durchgeführt. Dieser *c-myc* Bereich ist Teil der extrazellulären Domäne des „*T-Body*“ und wurde nach erfolgreicher Expression auf der CTL-Oberfläche mittels des Antikörpers detektiert (Abb.: 30).

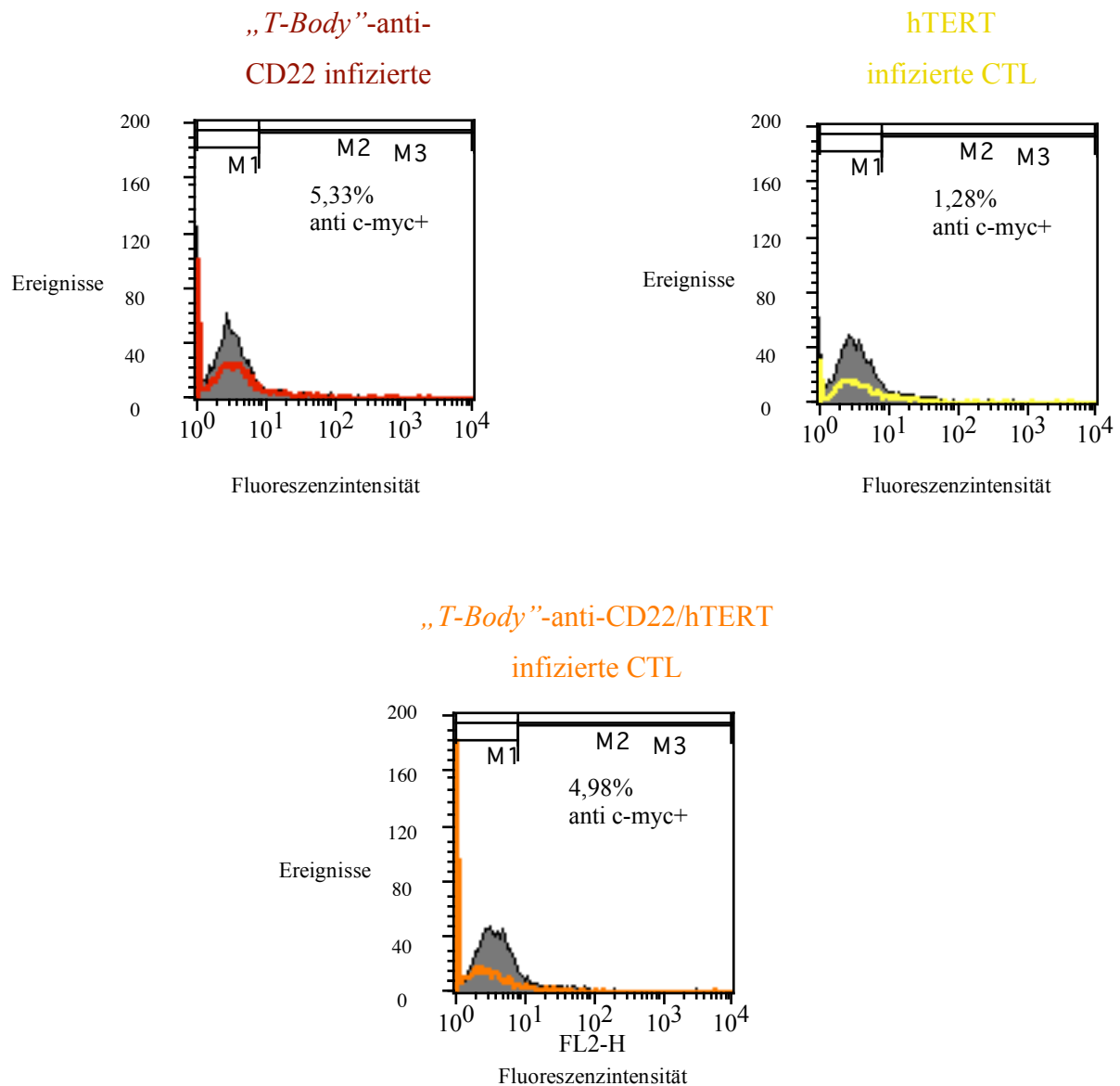


Abbildung 30: Darstellung der erfolgten Expression des chimären „*T-Body*“-anti-CD22 Rezeptors auf der CTL-Oberfläche nach retroviraler Infektion. Die Markierung erfolgte mit einem anti-*c-myc* Erstantikörpers und einem PE spezifischen Zweitantikörper. Somit erfolgte die Messung über den PE-Kanal. Auf der Abszisse sind die relativen Fluoreszenzeinheiten, auf der Ordinate die prozentuale Anzahl der positiven Zellen abgebildet. Durch eine Überlagerung der Negativkontrolle (Autofluoreszenz) und der mit Antikörper gekoppelten Zellen, ist aus den Kurven der Anteil der positiven Zellen ermittelbar.

Diese FACS-Analyse (Abb.: 30) gibt zusätzliche Auskunft über die erfolgte Infektion des „*T-Body*“-anti-CD22-Konstruktes. Abzüglich des Hintergrundwertes für *c-myc* negative hTERT-CTL konnten 4,1% der „*T-Body*“-anti-CD22- und 3,7% der „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT-CTL erhalten werden. Desweiteren ist es dadurch ersichtlich, daß nicht nur die intrazelluläre Positivität für das GFP-Protein besteht (siehe Abb.. 25 und 26), sondern daß die Proteinfaltung, wie auch letztendlich die Expression des Rezeptors erfolgreich war. Im Vergleich zu den GFP-Messungen ist hierbei ein geringerer prozentualer Anteil zu finden, da durch sterische Hinderungen die Bindung des anti-*c-myc* Antikörpers nicht im vollen Maße erfassen konnte. Wie erwartet ist im Falle der „*T-Body*“-anti-CD22 und der „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT ein *c-myc*-Teil detektierbar.

6.6.6 Fluoreszenz-Nachweis bei retroviral infizierter CTL

Nach erfolgter Infektion der CTL mittels der retroviralen Überstände „*T-Body*“-anti-CD22 und hTERT erfolgte die Überprüfung der GFP-positiven CTL mittels der Verwendung eines inversen Mikroskopes zur Messung der direkten Immunfluoreszenz (Abb.: 31 und 32)

„*T-Body*“-anti-CD22-positive CTL:

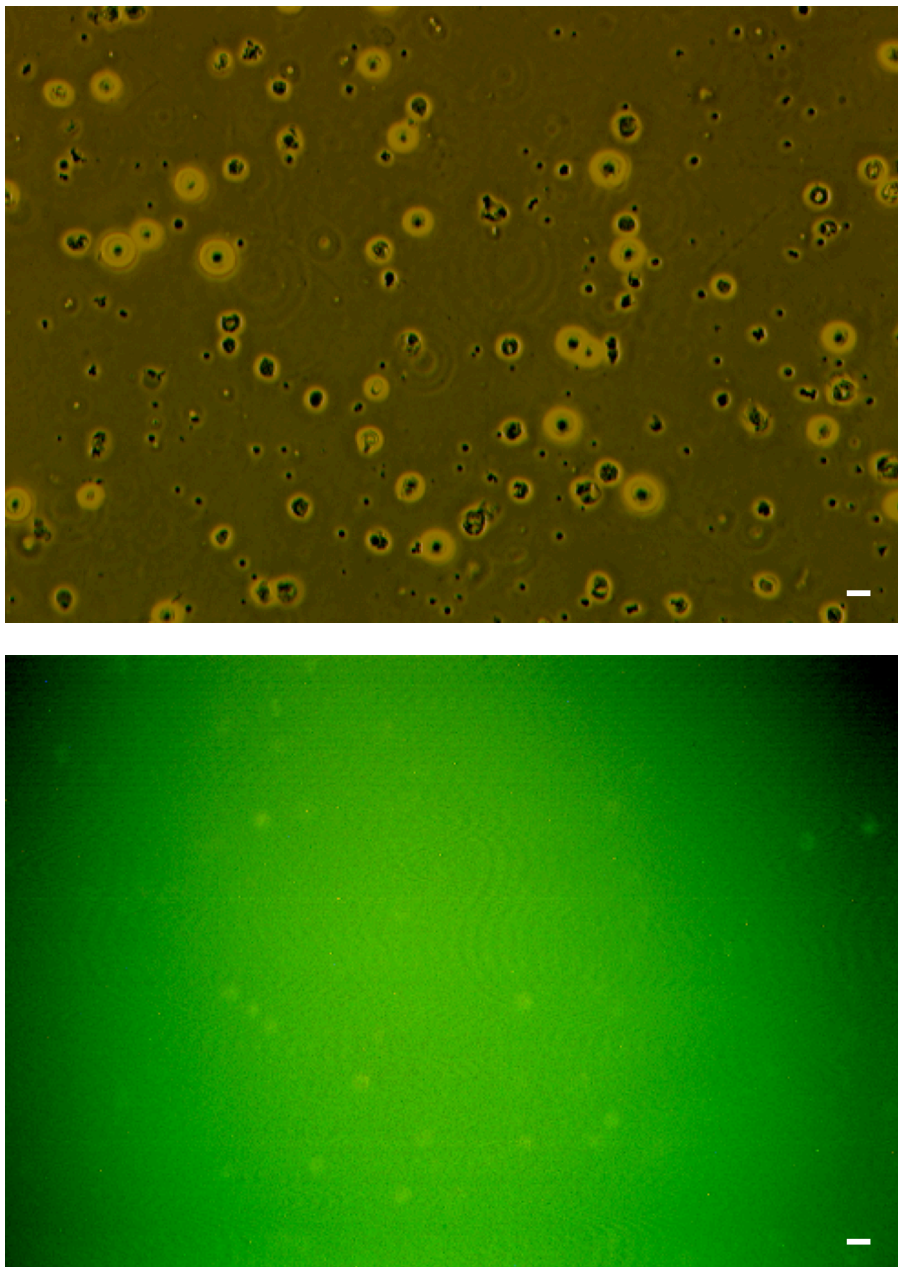


Abbildung 31: Retroviral infizierte CTL-„*T-Body*“-anti-CD22. Lichtmikroskopische Aufnahme der Transfektanten mit einer Belichtungszeit von 1sec; Maßstab, 20 μ m (A). Fluoreszenzaufnahme der GFP-positive Transfektanten mit einer Belichtungszeit von 3 sec; Maßstab, 20 μ m (B).

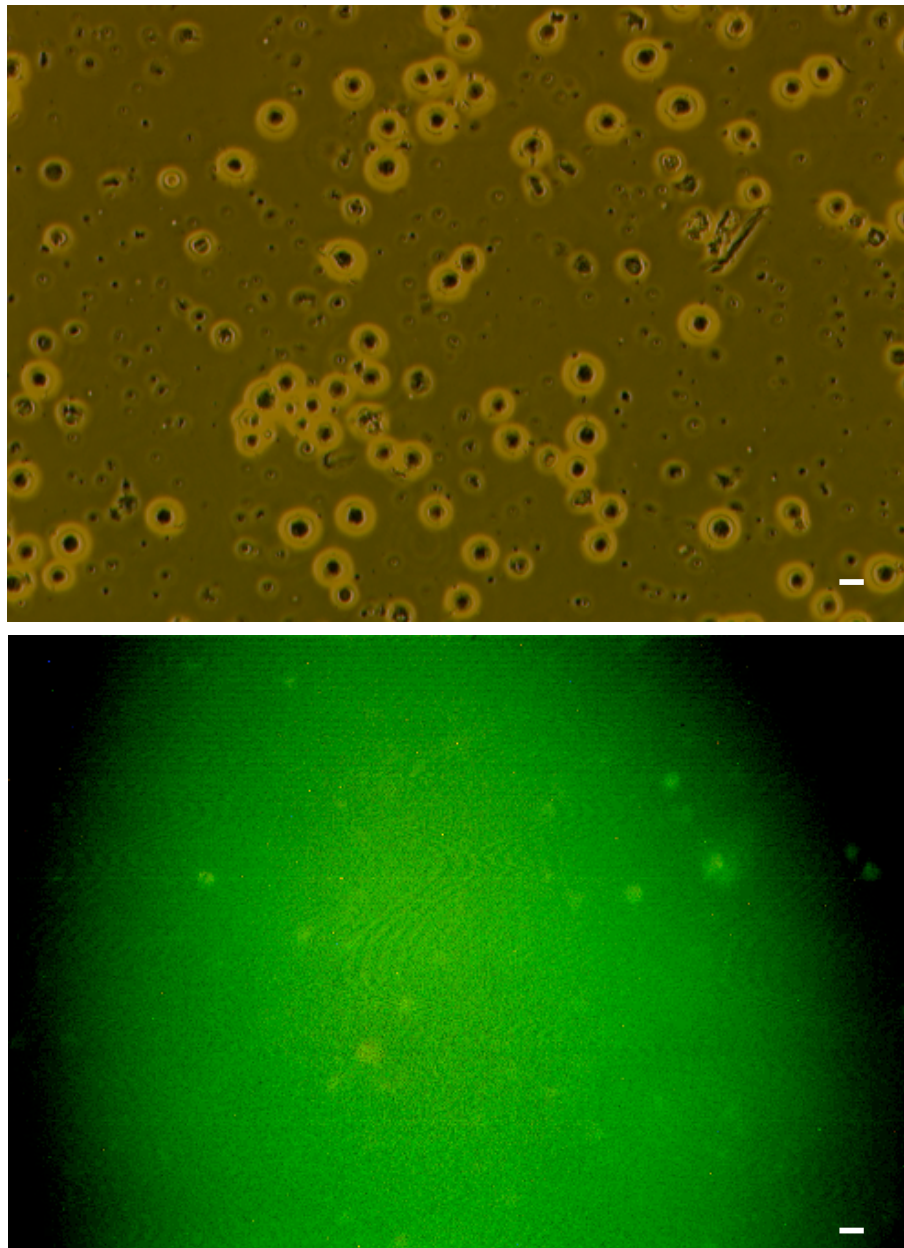
hTERT-positive CTL:

Abbildung 32: Retroviral infizierte CTL-hTERT. Lichtmikroskopische Aufnahme der Transfektanten mit einer Belichtungszeit von 1sec; Maßstab, 20 μ m (A). Fluoreszenzaufnahme der GFP-positive Transfektanten mit einer Belichtungszeit von 3 sec; Maßstab, 20 μ m (B).

Diese Fluoreszenzfotos (Abb.: 32) der infizierten CTL wurden mit Hilfe der inversen Mikroskopie erstellt. Mit den CTL konnte nicht wie mit den Verpackungszelllinien (6.5.2.) verfahren werden, somit mußten die Aufnahmen dieser CTL-Transfektanten in Suspension erfolgen. Es wird hier deutlich, daß trotz der geringeren Anzahl der „*T-Body*“-CTL (Auflichtfoto), eine höheres Spektrum an grünfluoreszierenden CTL (Fluoreszenzfoto), im Gegensatz zu den hTERT-positiven CTL, zuerkennen ist.

6.6.7 Vitalitätsbestimmung retroviral infizierter CTL

Um die Lebensspanne der CTL in Kultur über zwölf Tage zu beobachten wurde im Abstand von zwei Tagen die Zellzahl der verschiedenen Transfektanten bestimmt.

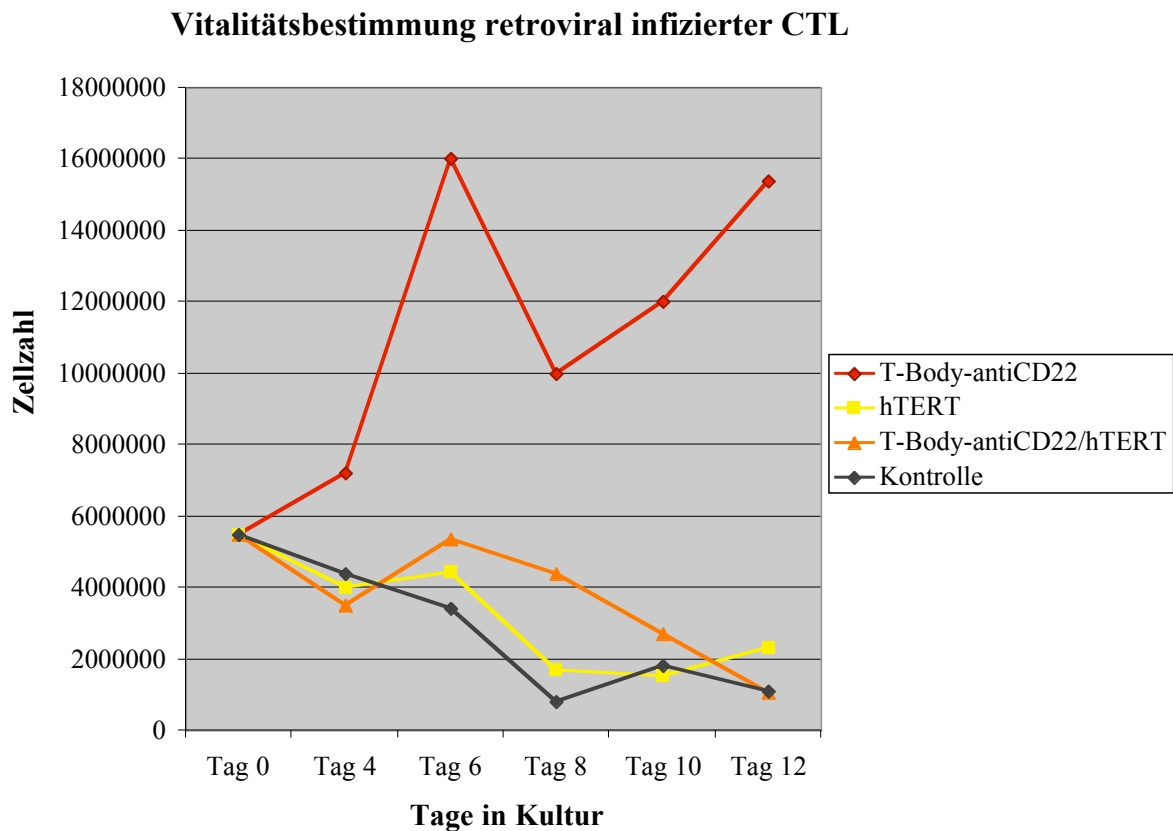


Abbildung 33: Vitalitätsbestimmung über Zellzahlzählung verschiedener CTL Transfektanten. Tag 0 entspricht der Population nach Isolation und vor retroviraler Infektion wie auch Stimulation.

Diese Graphik (Abb.: 33) gibt eine gesteigerte Proliferation der „*T-Body*“-anti-CD22-Transfektante, im Vergleich zu den weiteren dargestellten transfizierten CTL, wieder. Durch die ergänzende Infektion mit dem hTERT-Konstrukt ist eine Herabsetzung der Überlebensspanne während der Kultivierung zu erfassen. Desweiteren ist eine Unterscheidung durch die Behandlung der CTL mit dem alleinigen hTERT-Konstrukt und zwischen den untransfizierten CTL nur eine gering erhöhte Proliferation der Zellen nachzuvollziehen.

6.6.8 Bestimmung der Zytotoxizität retroviral infizierter CTL

Zur Überprüfung der zytotoxischen Reaktivität von „*T-Body*“-präsentierenden CTL auf Zielzellen wurde der JAM-Test angewandt. Die gesamte Population der zuvor infizierten und durch das FACS analysierten, jedoch wurden hier ungesorteten CTL eingesetzt. Als Zielzelle fungiert die Raji-Tumorzelllinie. Die [³H]-Thymidin-markierte Raji-Tumorzelllinie wurde mit diesen CTL koinkubiert und weiter verfahren wie im Methodenteil angegeben. Die Ansätze erfolgten im Verhältnis (Effektor-/Tumorzelle) 1:1, 10:1 und 25:1. Die gleiche Verfahrensweise wurde bei der Negativkontrolle (untransfizierte CTL) durchgeführt. Die durch die Berechnung des prozentualen spezifischen Zytotoxizität der „*T-Body*‘s“ erhaltenen Ergebnisse machen Angaben über die spezifische Lyse der „*T-Body*‘s“.

Berechnung des prozentualen spezifischen Zytotoxizität der „*T-Body*‘s“:

E = experimentell: DNA in Anwesenheit der zytotoxischen Zellen (in cpm),
 S = Standard; beibehaltene DNA in Abwesenheit der zytotoxischen Zellen
 (spontane natürliche Todesrate)

$$\text{Standardformel für die prozentuale Zerstörungssrate: } = \frac{S - E}{S} \times 100$$

Der so erhaltene Wert der Negativkontrolle wurde Null gesetzt. Aus der Differenz der Negativkontrolle (CTL/Raji-Zellen) und der „*T-Body*“-, hTERT und der „*T-Body*“ / hTERT Werte ergibt sich die prozentual spezifischen Zytotoxizität der zu untersuchenden CTL.

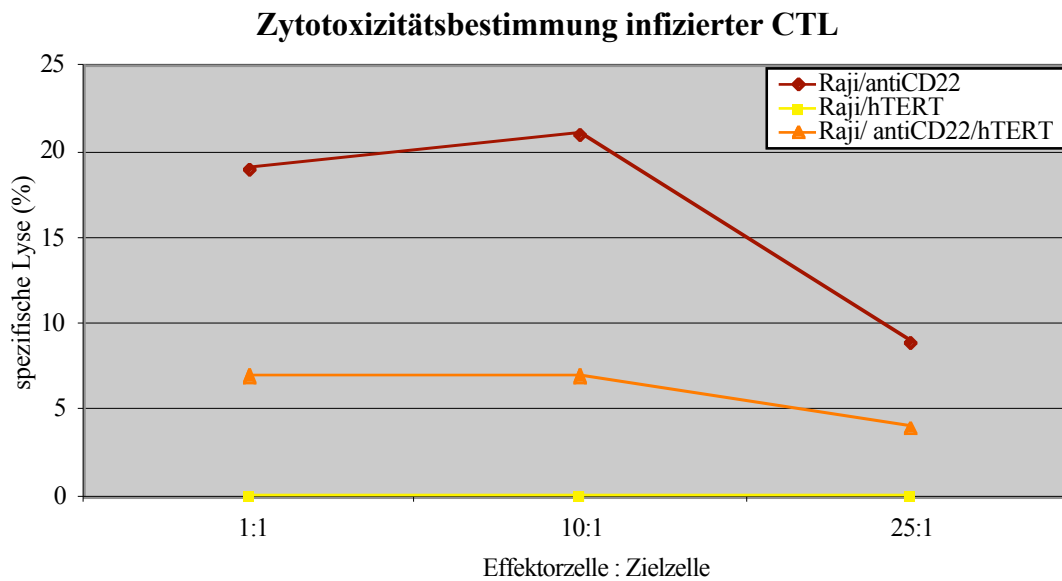


Abbildung 34: Zytotoxizität verschiedener retroviral infizierter CTL-Transfektanten: „*T-Body*“-anti-CD22; hTERT und der Doppeltransfektante „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT.

Die Daten (Abb.: 34) der „*T-Body*“-anti-CD22 positiven CTL, weisen bei einem Verhältnis von 10:1 eine spezifische Zytotoxizität von 21%, bei 1:1 eine Lyse von 19% und bei einer Relation von 25:1, 9% auf. Hingegen zu der reduzierten spezifischen Lyse von hTERT-transfizierten CTL. Hier wurde bei einem prozentualen Verhältnis 10:1 und 1:1 der Effektorzellen zu Zielzellen eine Lyse von 7% und bei 25:1 eine Zytotoxizität in Höhe von 4% erhalten. Dieses Ergebnis spiegelt sich im dritten Ansatz der hTERT retroviral transfizierten CTL wieder. Abzüglich der untransfizierten Kontroll-CTL ist keine Lyse der Tumorzellen zu erkennen. Durch die Transfektion mit dem hTERT-Konstrukt der CTL wurde hier eine Reduktion der Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen feststellbar. Daraus ist ersichtlich, daß CTL, welche mit dem „*T-Body*“-anti-CD22 transfiziert wurden, effektiv Tumorzellen erkennen und lysieren können. Somit ist auch trotz der Herabsetzung der Zytotoxizität des „*T-Body*“, aufgrund der Doppeltransfektion mit dem hTERT-Konstrukt weiterhin eine deutliche spezifische Lyse zu erkennen.

6.6.9 *INF- γ -spezifischer ELISPOT in Ergänzung einer MHC I und II Blockierung*

Dieses ELISA-Protokoll ist kreiert worden, um Zytokine (INF- γ), welche je nach Aktivierungsstatus der Zellen produziert wurden, in Zellkulturüberständen quantitativ zu messen. Da der „*T-Body*“ in der Lage ist, MHC-unabhängig den Tumor zu lysieren, wurden in diesem Experiment die MHC I und II-Komplexe der allogenen Zellen (PBL) mittels MHC I und II-Hybridomüberständen blockiert. Demzufolge findet die Lyse größtenteils über den „*T-Body*“ und nicht über den TCR statt. Vermittelt durch das Aufeinandertreffen der verschiedenen Zellpoulationen, wurden die Effektorzellen aktiviert. Der Aktivierungsstatus der Zellen korreliert mit der INF- γ -Sekretion. Durch die Detektion der Ausschüttung von INF- γ folglich die Aktivierung der verschiedenen Transfektanten wiedergegeben.

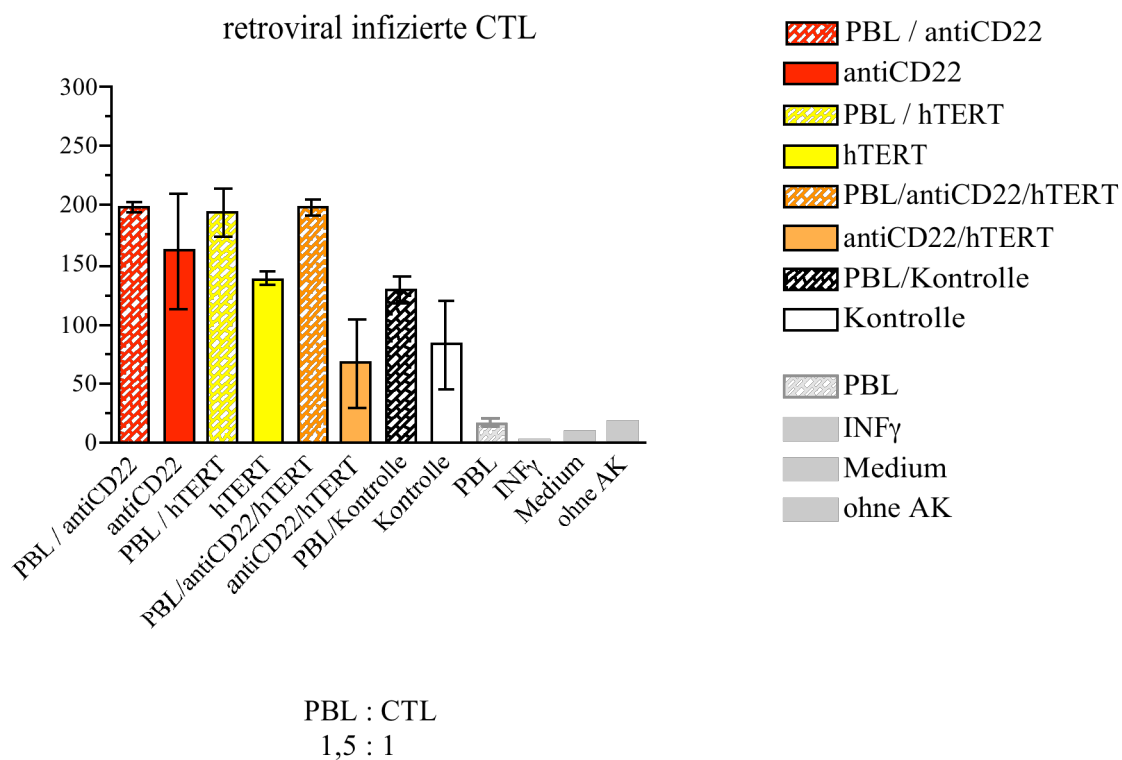


Abbildung 35: INF- γ -spezifischer ELISPOT unter Ausschluß der MHC I und II –Zytotoxizität. Effektorzellen wurden je nach Transfektion mit retroviralem Überstand behandelt. Dieser Versuch wurde nach Infektion und einwöchiger Kultivierung durchgeführt.

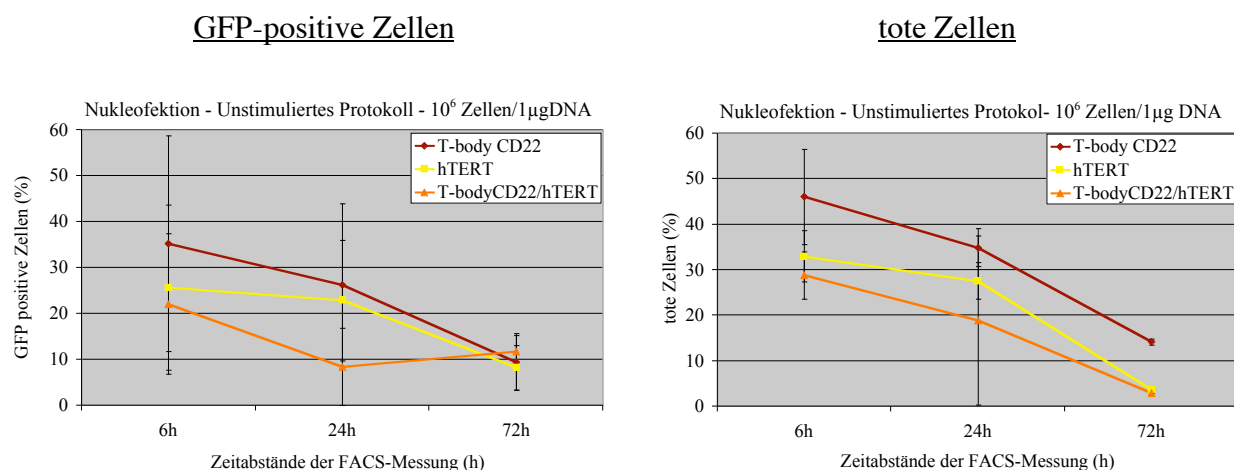
In diesem Experiment (Abb.: 35) wurde die INF- γ -Sekretion ermittelt, indem die „Spot“-Werte der Kontrollen (PBL und transfizierte CTL ohne PBL-Inkubation) von denen der Transfektanten abgezogen wurden. Die stärkste INF- γ -Ausschüttung ist unter der Doppeltransfektante „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT („Spot“-Wert: 114), gefolgt von den hTERT-positiven CTL („Spot“-Zahlen: 39) und schließlich mit der niedrigsten INF-

γ –Sekretion die CTL mit exprimierten „*T-Body*“-anti-CD22 („Spot“-Wert: 19). Zu beachten jedoch ist, daß die Zytokinproduktion der CTL ohne PBL sich umgekehrt zu der obig beschriebenen Reihenfolge verhält. In diesem Fall ist die INF- γ -Produktion der CTL, welche mit dem „*T-Body*“-anti-CD22 ausgestattet sind am höchsten. Bei der Doppeltransfektante ist eine Reduktion der INF- γ –Sekretion zu erkennen.

6.7 Transiente Transformation von CTL mittels Nukleofektion

Um dem umstrittenen Einsatz retroviraler Vektoren in klinischen Anwendungen auszuweichen wird in dieser Arbeit die Nukleofektion der retroviralen Infektion gegenüber gestellt. Das Verfahren der Nukleofektion ist im Methodenteil aufgeführt. Es wurden zwei verschiedene Protokolle getestet. Eine Differenzierung verschiedener DNA-Konzentrationen mit Kombination verschiedener Zellzahlen wurde untersucht. Im ersten Protokoll „für unstimulierte humane CTL“ wurde direkt nach CTL-Isolation die Nukleofektion durchgeführt, im Gegensatz zum zweiten Protokoll, welches „für stimulierte humane CTL“ angelegt ist. Nach diesem letzteren Protokoll wurden die isolierten CTL für zwei Tage auf mit OKT3/CD28 Antikörpern beschichteten Lochplatten aktiviert. Die FACS-Messung der transformierten CTL beider Protokolle auf GFP-positive Signale findet 6h, 24h und 72h nach Nukleofektion statt. Analog dazu erfolgte die FACS-Messung über den PE-Kanal zur quantitativen Bestimmung toter Zellen, die zuvor mit Propidiumiodid (PI) inkubiert wurden. Als Negativkontrolle wurden CTL verwendet, welche ohne Zugabe von DNA unter den gleichen Bedingungen transformiert wurden. Resultierend aus einer Subtraktion der Werte positiver Transfektionsansätze von den Kontrollzellen wurden die Relationen der Nukleofektion und toter Zellen gegenübergestellt.

Protokoll für unstimulierte humane CTL



GFP-positive Zellen

tote Zellen

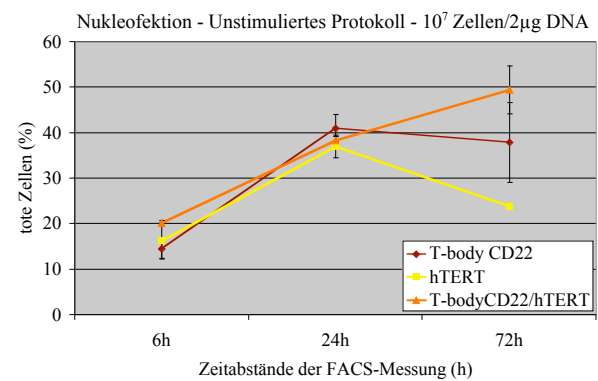
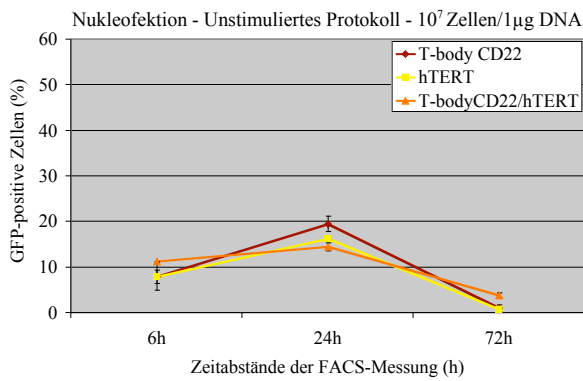
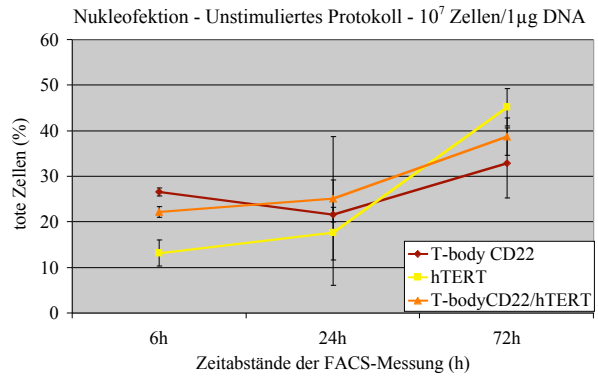
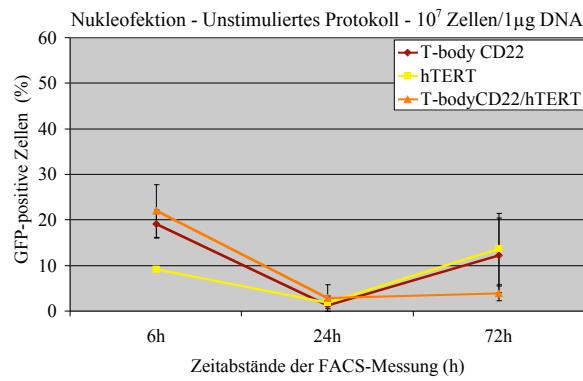
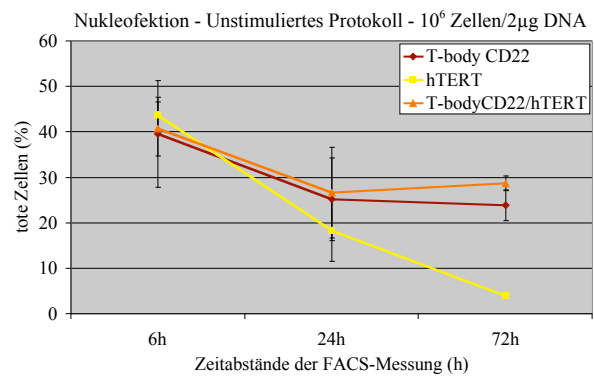
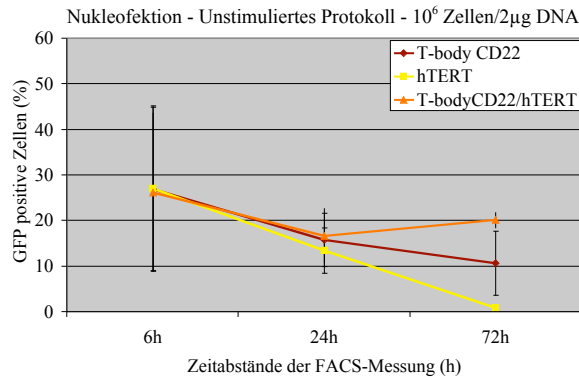


Abbildung 36: Protokoll für unstimulierte CTL. Darstellung der Transformationseffizienz und der Sterberate der CTL in Vergleich zu verschiedener CTL-Anzahl und DNA-Konzentrationen.

Protokoll für stimulierte humane CTL

GFP-positive Zellen

tote Zellen

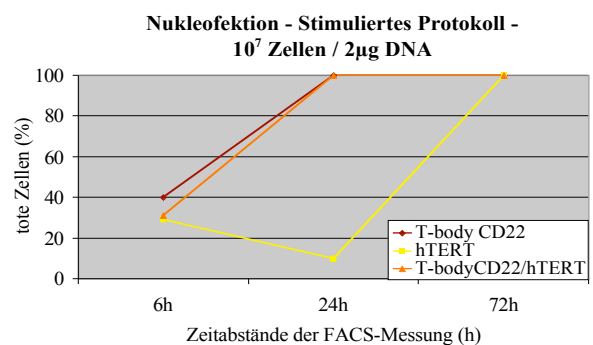
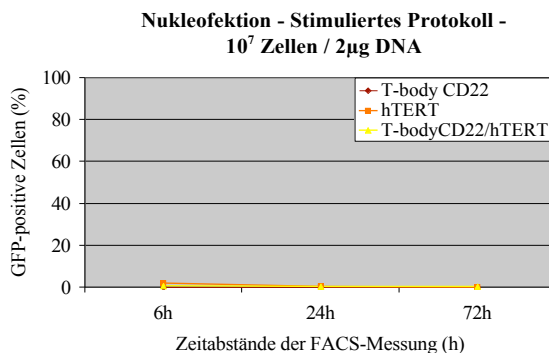
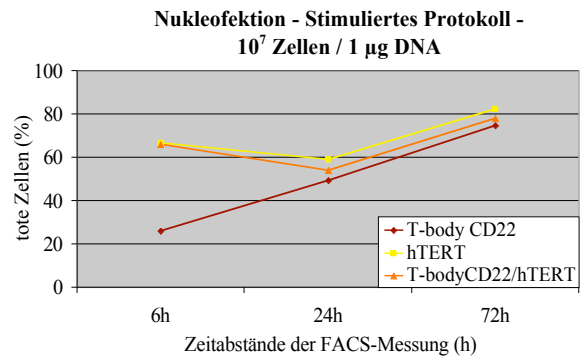
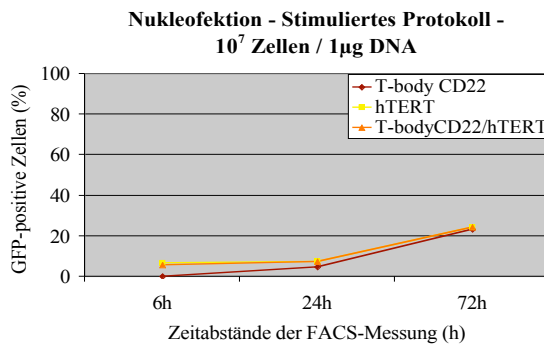
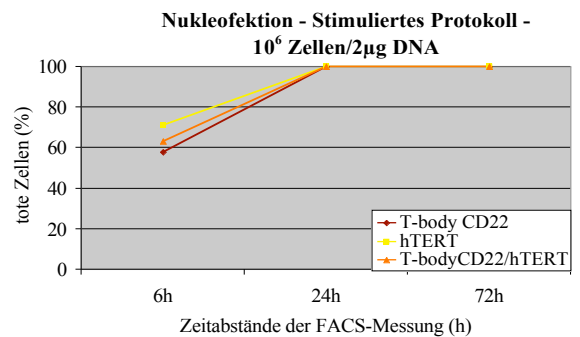
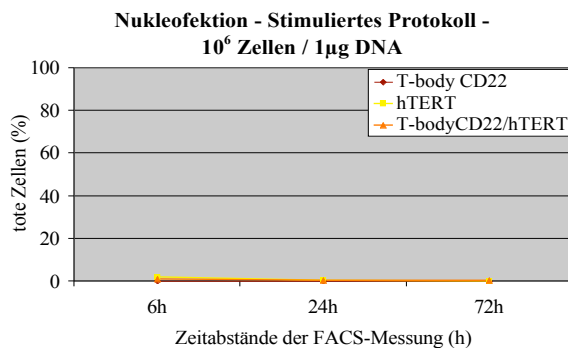
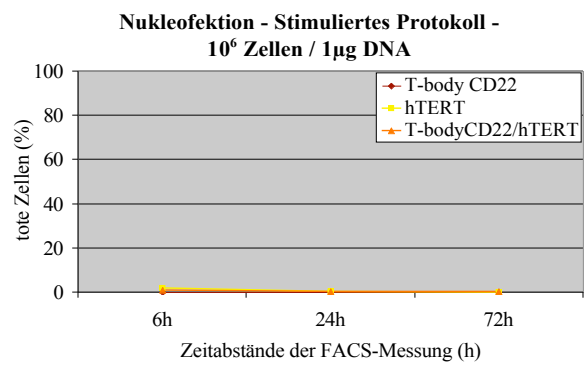
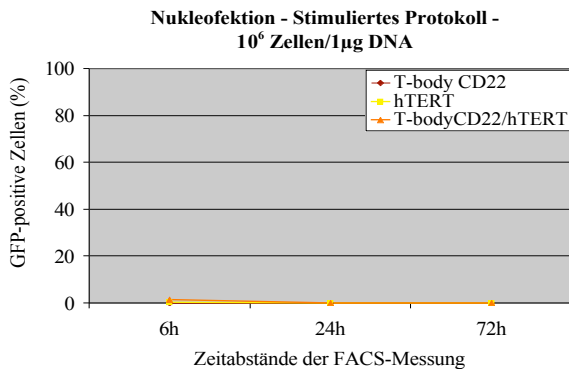


Abbildung 37: Protokoll für stimulierte CTL. Darstellung der Transformationseffizienz und der Sterberate der CTL in Vergleich zu verschiedener CTL- und DNA-Mengen.

Aus diesen Messungen (Abb.: 36 und 37) wurde deutlich, daß zur Anwendung von primären CTL das Protokoll „für stimulierte humane CTL“ nicht geeignet ist. Die transiente Transformationsmethode der Nukleofektion ist nur bei unstimulierten CTL anwendbar. Jedoch ist dabei zu beachten, den Einsatz der DNA-Menge und Zellzahl niedrig zu halten. Im Falle der Nukleofektion mit 1×10^6 Zellen und $1 \mu\text{g}$ DNA, ist das bestmögliche Ergebnis bezüglich der Transformationseffizienz zur Anzahl von toten Zellen zu erlangen. Deshalb wurde dieser Ansatz zur weiteren Versuchsdurchführungen ausgewählt. Jedoch ist trotz Reduzierung der DNA-Konzentration wie auch der einzusetzenden Zellzahl eine deutliche Korrelation zwischen einer positiven Transformation und Sterberate von CTL zu erfassen.

6.7.1 Phänotypische Charakterisierung von humanen $CD8^+$ -, PBL- und PBL $CD8^-$

Populationen, vor und nach Nukleofektion wie auch Stimulation

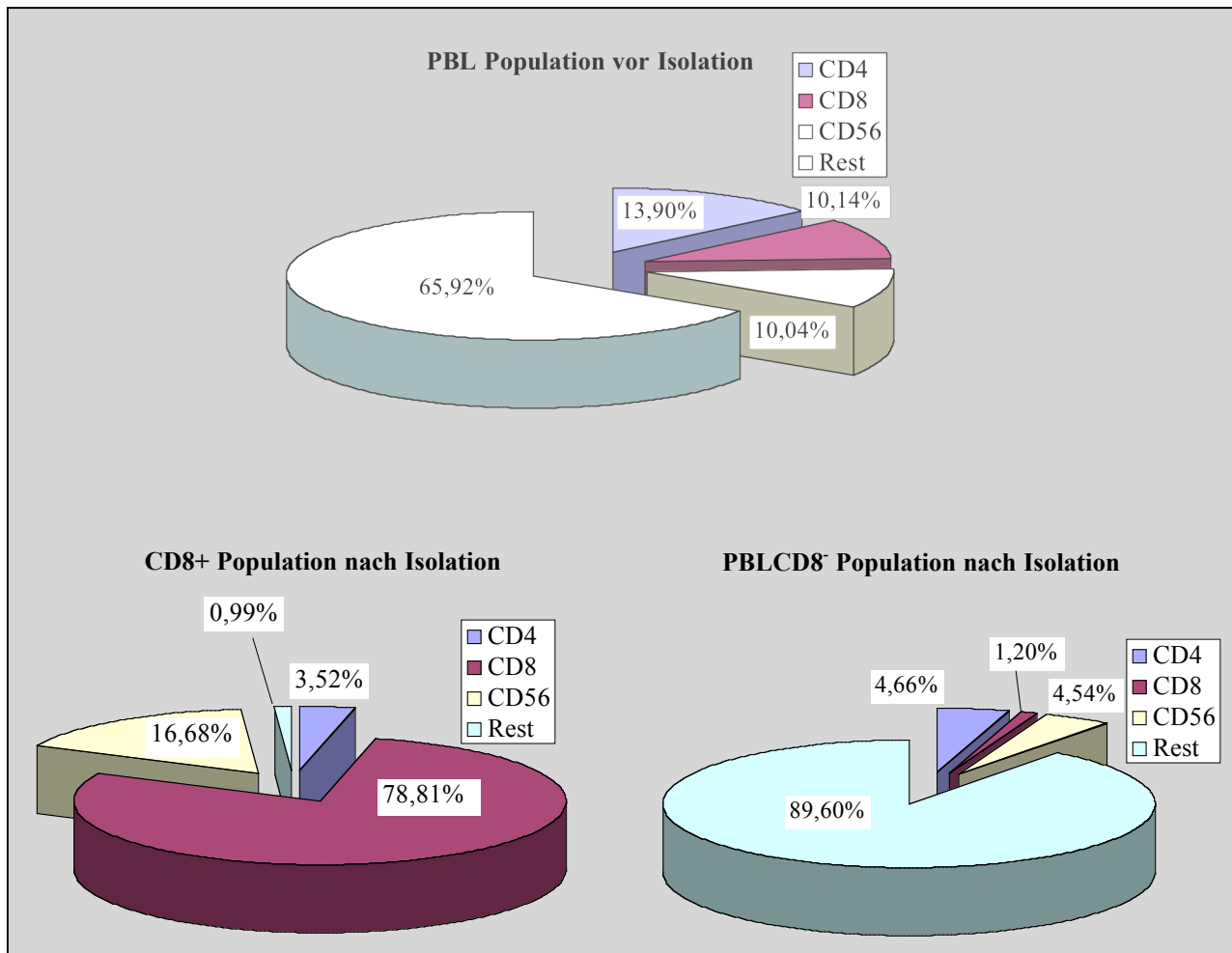


Abbildung 38: Humane $CD8^+$ -, PBL- und PBL $CD8^-$ - Population bevor und nach Isolation. Markierung mit CD4, CD8 und CD56. FACS Analyse wurde mit PE-gekoppelten Antikörper vollzogen.

Die Phänotypisierung in Abb.: 38 gibt Auskunft über den quantitativen Anteil von CD4-, CD8- und CD56-positiven Zellen der zuvor gewonnen PBL. Die $CD8^+$ Isolation war erfolgreich (78,81%). Diese Reinheit konnte mittels der Antikörper-Detektion der PBL $CD8^-$ Population nochmals überprüft werden. Es konnte dadurch festgestellt werden, daß nur ein sehr geringer prozentualer Anteil von 1,2% der $CD8^+$ -Zellen verloren gegangen sind. Außerdem wurde ein prozentualer Anteil in Höhe von 16,68% an CD56-positiven Zellen in der CTL-Population erhalten. Der Oberflächenmarker CD4 weist keine signifikanten Veränderungen auf.

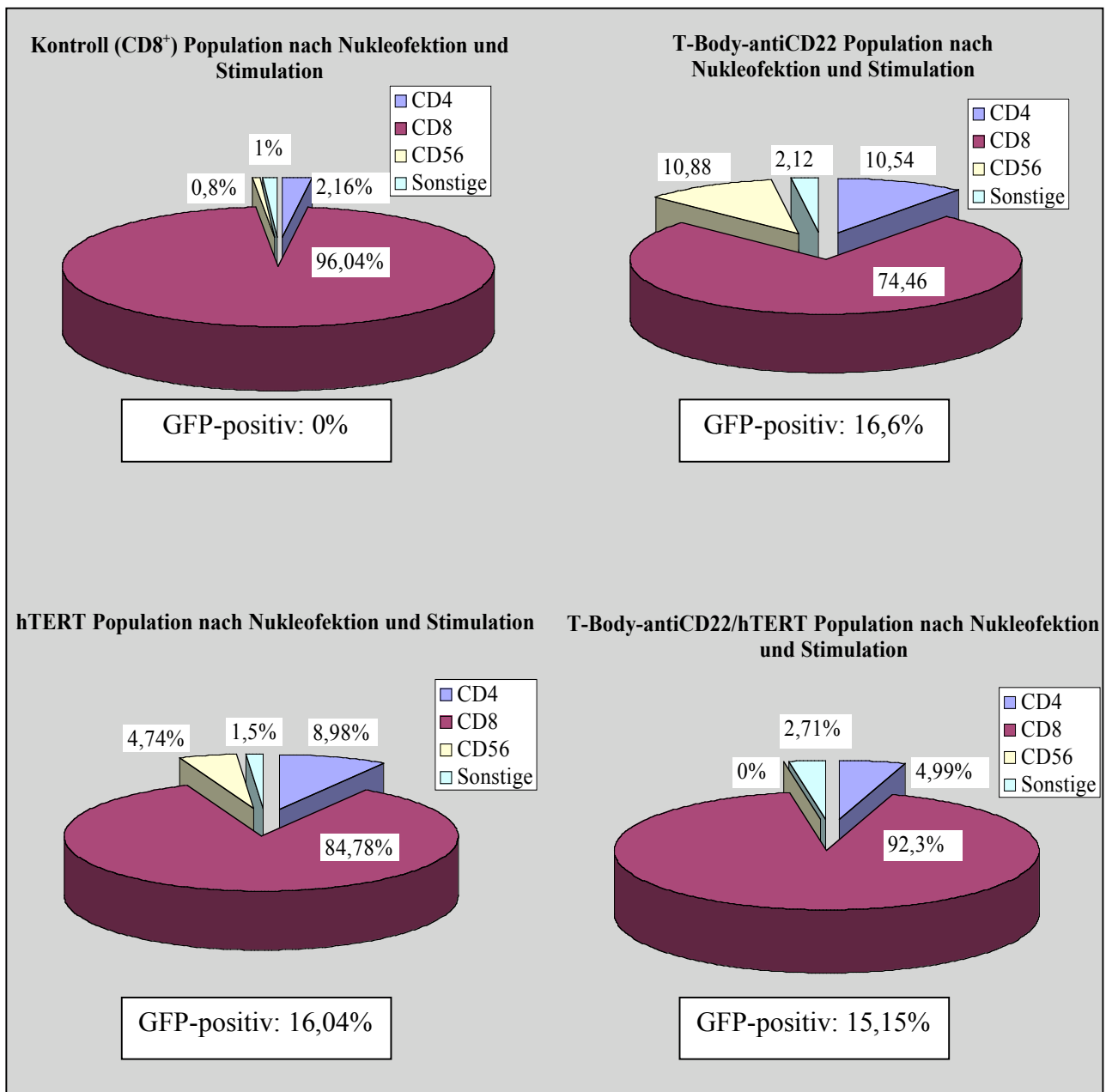


Abbildung 39: Humane CD8⁺, PBL⁻ und PBLCD8⁻ - Population nach Stimulation mit CD3, CD28 Antikörper und Interleukin-2 und Transfektion mit retroviralen Vektoren (positive Transfektanten sind in Prozenten angegeben). Markierung mit CD4, CD8 und CD56. FACS Analyse wurde mit PE-gekoppelten Antikörper vollzogen.

Nach Nukleofektion und Stimulation wurde eine wiederholte Phänotypisierung der verschiedenen Transfektanten durchgeführt (siehe Abb.: 39). Die Transfektanten entstammen derselben Ausgangspopulation an CTL. Es ist zu erkennen, daß die Transfektionseffizienz in Korrelation mit dem prozentualen Anteil der CD8⁺-CTL steht. Es folgt daraus, daß je höher die Transfektionseffizienz, desto niedriger der CD8⁺ Anteil in den zu untersuchenden CTL-Transfektanten, ist. Somit ist wie auch schon unter 6.6.2. eine Verschiebung der Positivität der CD8⁺-CTL hin zu „Sonstigen“-Zellen zu erkennen. Dies ist hier auf eine Erhöhung der CTL-Sterberate zurückzuführen. Im Vergleich zur retroviralen Infektion, tritt hier eine

Verdopplung der Sterberate in Erscheinung. Weiter ist die Transfektion des „*T-Body*“-anti-CD22 und hTERT positiven CTL-Klone zu 16,6% und 16,04% erfolgreich gewesen. Bei der Doppeltransfektion erhielt man einen prozentualen Anteil von 15,15%.

6.7.2 anti-*c-myc* Detektion des „*T-Body*“-anti-CD22-Konstruktes auf mittels Nukleofektion transformierter CTL

Wie unter 6.6.5. die Überprüfung der Expression des „*T-Body*“-anti-CD22 Rezeptors auf der Oberfläche von retroviral infizierter CTL, wurde im Falle von CTL, welche der Nukleofektion unterzogen wurden, ebenfalls eine FACS-Messung unter Verwendung des anti-*c-myc* Antikörpers durchgeführt. Diese FACS-Messung erfolgte am zweiten Tag nach Nukleofektion.

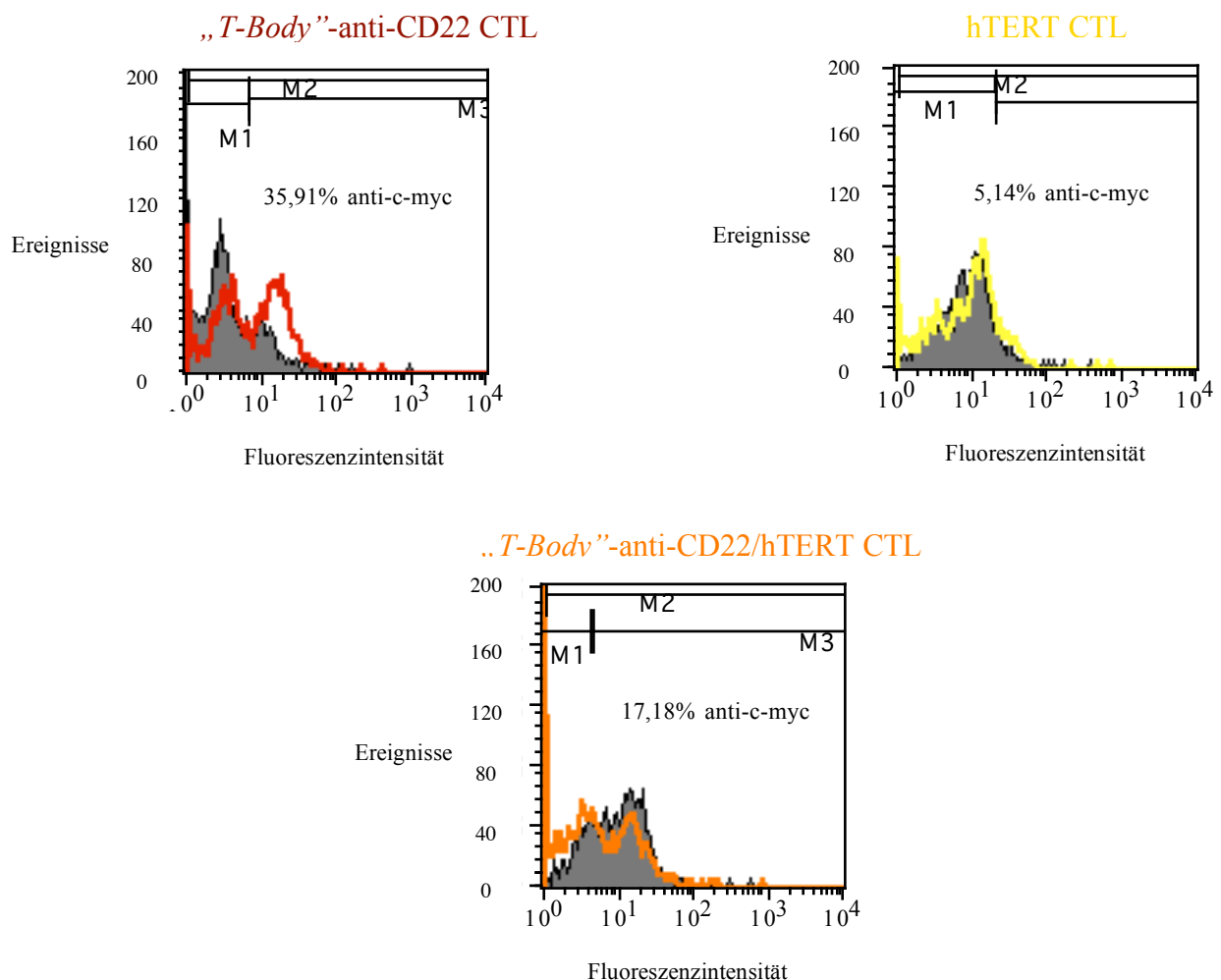


Abbildung 40: Darstellung der erfolgten Expression des chimären „*T-Body*“-anti-CD22 Rezeptors auf der CTL-Oberfläche nach Nukleofektion Die Markierung erfolgte mit einem anti-*c-myc* Erstantikörper und einem PE spezifischen Zweitantikörper. Somit erfolgte die Messung über den PE-Kanal. Auf der Abszisse sind die relativen Fluoreszenzeinheiten, auf der Ordinate die prozentuale Anzahl der positiven Zellen abgebildet. Durch eine Überlagerung der Negativkontrolle (Autofluoreszenz) und der mit Antikörper gekoppelten Zellen, ist aus den Kurven der Anteil der positiven Zellen ermittelbar.

Diese FACS-Analyse (Abb.: 40) gibt zusätzliche Auskunft über die erfolgte Infektion des „*T-Body*“-anti-CD22-Konstruktes. Im Vergleich zu den GFP-Messungen ist hierbei ein höherer prozentualer Anteil zu finden. Die Messung der hTERT-Transfektante stellt den Hintergrund des *c-myc* Antikörpers gekoppelt mit PE dar. Somit ist im Falle der „*T-Body*“-anti-CD22 und der „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT ein *c-myc*-Teil zu 30,77% und 12,04% detektierbar.

6.7.3 RT-PCR: Nachweis hTERT-spezifischer mRNA in CTL mittels reverser

Polymerasekettenreaktion nach Nukleofektion

Nach Nukleofektion wurde die positive Transfektion des hTERT-Konstruktes in CTL über eine RT-PCR nachgewiesen.

Es wurde Gesamt-RNA aus transformierten CTL isoliert, wobei die Ausbeuten etwa 455µg („*T-Body*“-anti-CD22), 875µg (hTERT), 1085µg („*T-Body*“-anti-CD22/ hTERT) betragen. Jeweils 1 µg Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und amplifiziert.

Es wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. der vorstehend beschriebene Reaktionsansatz mit „*T-Body*“-anti-CD22 transformierten CTL,
2. der vorstehend beschriebene Reaktionsansatz mit hTERT transformierten CTL,
3. der vorstehend beschriebene Reaktionsansatz mit „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT doppeltransformierten CTL,
4. der vorstehend beschriebene Reaktionsansatz mit hTERT-Plasmid-DNA, („Positivkontrolle“)

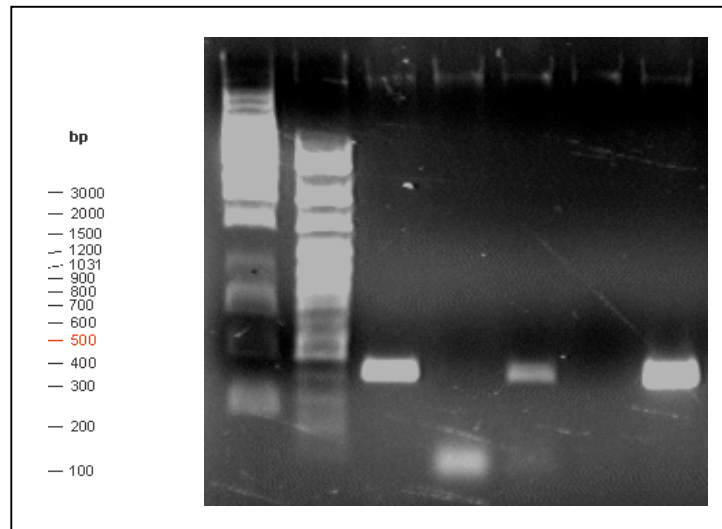


Abbildung 41: hTERT PCR-Produkte mittels Nukleofektion transfizierter CTL.

(Auftrennung auf 1%-Agarosegel).

Die Reaktionsprodukte der PCR-Reaktion wurden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Abb.: 41 zeigt das Ergebnis einer hTERT-spezifischen PCR Reaktion.

Es zeigt:

Spur 1 = DNA Molekulargewichtsmarker 100bp

Spur 2 = DNA Molekulargewichtsmarker 1Kb

Spur 3 = hTERT

Spur 4 = „*T-Body*“-anti-CD22

Spur 5 = „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT

Spur 7 = hTERT Plasmid-DNA

} hTERT-spezifische PCR

Ein PCR-Produkt der erwarteten Größe von ~350 Bp wurde in den Spuren 3 und 5 nachgewiesen, d.h. in den Spuren 3 und 5 wurde mittels hTERT-Primern hTERT-spezifische mRNA wurde in den transfizierten CTL nachgewiesen. In Spur 7 fand sich eine sehr starke Bande der hTERT-Vektor-Positivkontrolle.

6.7.4 Fluoreszenz-Nachweis transfizierter CTL mittels Nukleofektion

Nach erfolgter Nukleofektion der CTL unter Einsatz der „*T-Body*“-anti-CD22- und hTERT-DNA erfolgte die Überprüfung der GFP-positiven CTL durch Verwendung eines inversen Mikroskopes zur Messung der direkten Immunfluoreszenz.

„*T-Body*“-anti-CD22-positive CTL:

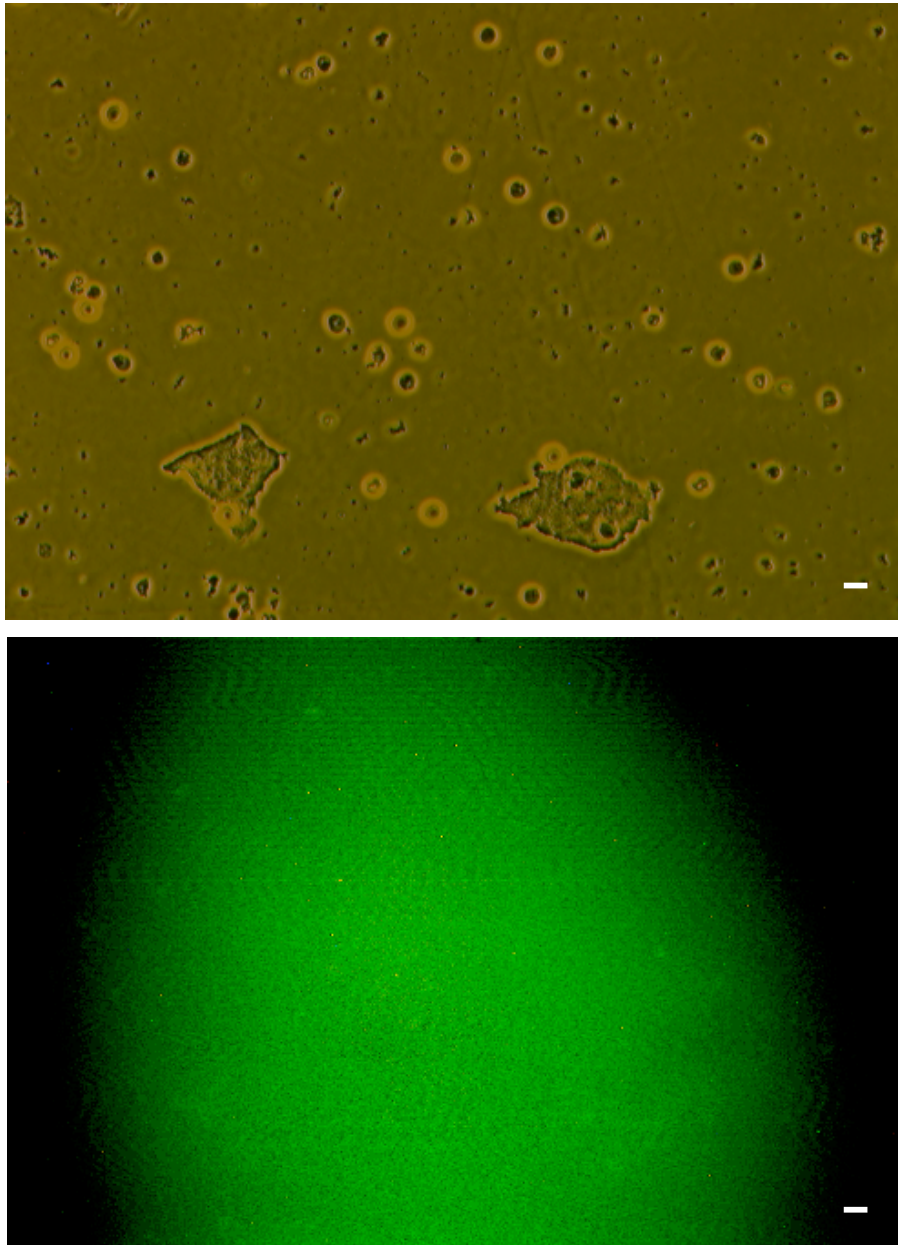


Abbildung 42: Mittels Nukleofektion transfizierte „*T-Body*“-anti-CD22-CTL. Lichtmikroskopische Aufnahme der Transfektanten mit einer Belichtungszeit von 1 sec; Maßstab, 20µm (A). Fluoreszenzaufnahme der GFP-positive Transfektanten mit einer Belichtungszeit von 3 sec; Maßstab, 20µm (B).

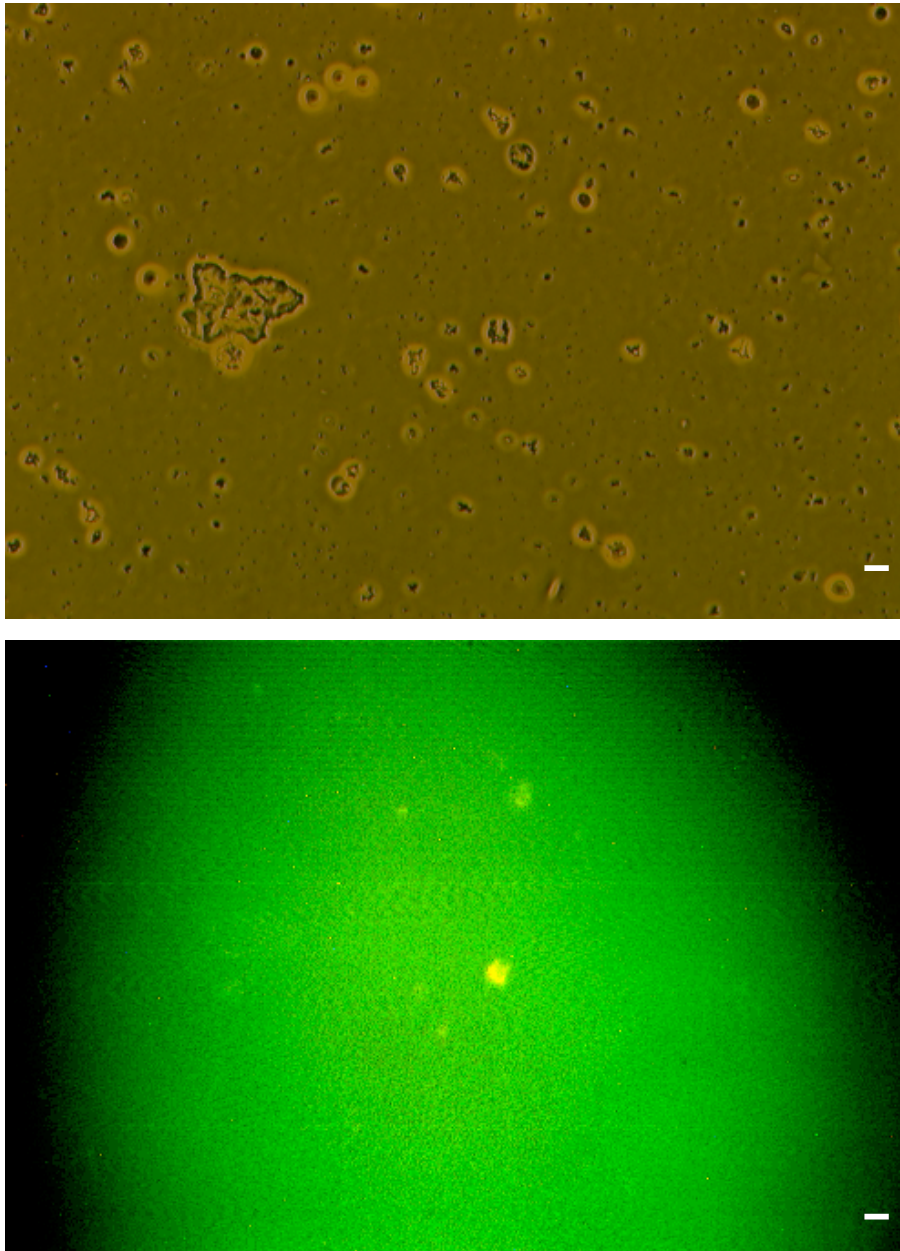
hTERT-positive CTL:

Abbildung 43: Mittels Nukleofektion transformierte hTERT-CTL. Lichtmikroskopische Aufnahme der Transfektanten mit einer Belichtungszeit von 1sec; Maßstab, 20 μ m (A). Fluoreszenzaufnahme der GFP-positive Transfektanten mit einer Belichtungszeit von 3 sec; Maßstab, 20 μ m (B).

Diese Fluoreszenzfotos (Abb.: 42 und 43) der transformierten CTL wurden wie unter 6.6.6. mit Hilfe der inversen Mikroskopie Signale erstellt. Es ist ersichtlich, daß durch das Verfahren der Nukleofektion in lichtmikroskopischen Aufnahmen mehr tote Zellen zuerkennen sind, als bei der Darstellung der Zellen, welche einer retroviralen Infektion unterzogen wurden. Jedoch sind Unterschiede innerhalb der Nukleofektion der „*T-Body*“-anti-CD22- und hTERT-DNA zu verzeichnen. „*T-Body*“-anti-CD22 positive CTL weisen

einen höheren Anteil an lebenden wie auch GFP-positiven Zellen, im Vergleich zu hTERT transfizierten CTL, auf.

6.7.5 Vitalitätsbestimmung von mittels Nukleofektion transformierter CTL

Um die Lebensspanne der CTL in Kultur über zwölf Tage zu beobachten, wurde im Abstand von zwei Tagen die Zellzahl der verschiedenen Transfektanten, wie auch schon unter 6.6.7. bestimmt.

Vitalitätsbestimmung transformierter CTL mittels Nukleofektion

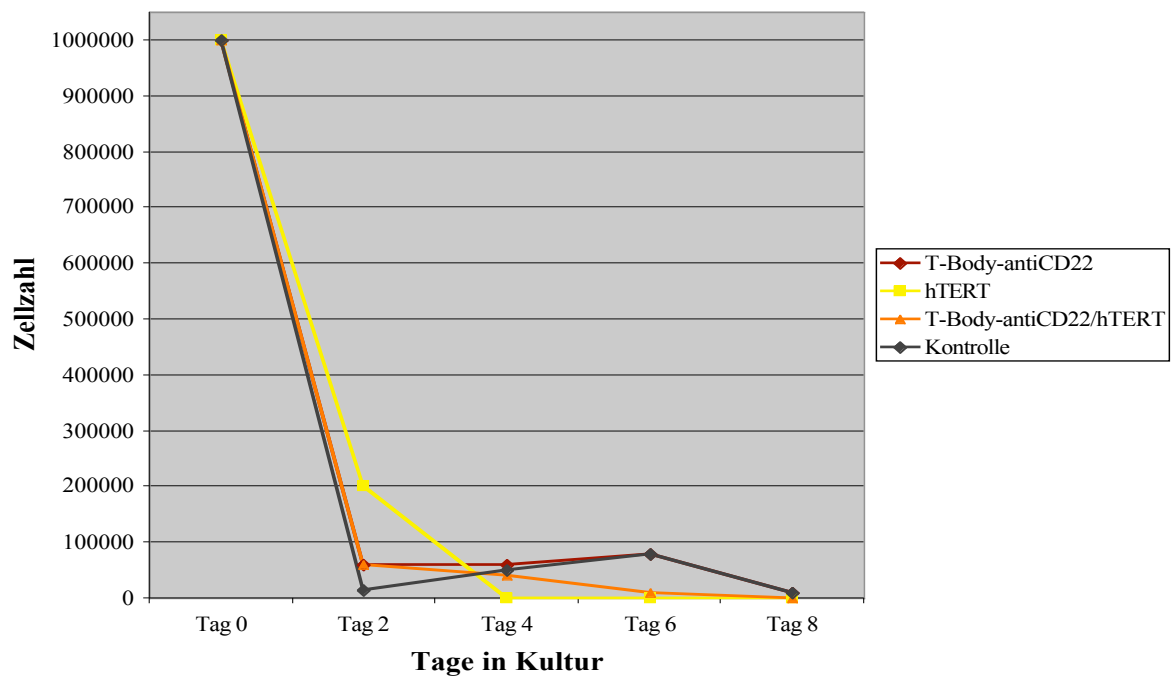


Abbildung 44: Vitalitätsbestimmung über Zellzahlzählung verschiedener CTL Transfektanten. Tag 0 entspricht der Population nach Nukleofektion wie auch Stimulation.

Diese Graphik unter Abb.: 44 zeigt an, daß wie zuvor schon zuvor erwähnt, ein rapides Sterbereignis bei allen Transfektanten bzw. untransformierten CTL zu beobachten ist. Trotz allem ist bei den „*T-Body*“-anti-CD22-positiven CTL und den unbehandelten Kontrollzellen eine höhere Überlebensrate im Vergleich zu den Transfektanten, welche mit dem hTERT-Konstrukt transformiert wurden.

6.7.6 Bestimmung der Zytotoxizität transfizierter CTL mittels Nukleofektion

Zur Überprüfung der zytotoxischen Reaktivität von „*T-Body*“-präsentierenden, hTERT-expimierenden und „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT mittels Nukleofektion transformierter CTL auf Zielzellen wurde der JAM-Test angewandt. Die Verfahrensweise ist identisch wie unter 6.6.8. aufgeführt. Diese Messung wurde ein Tag nach Nukleofektion durchgeführt.

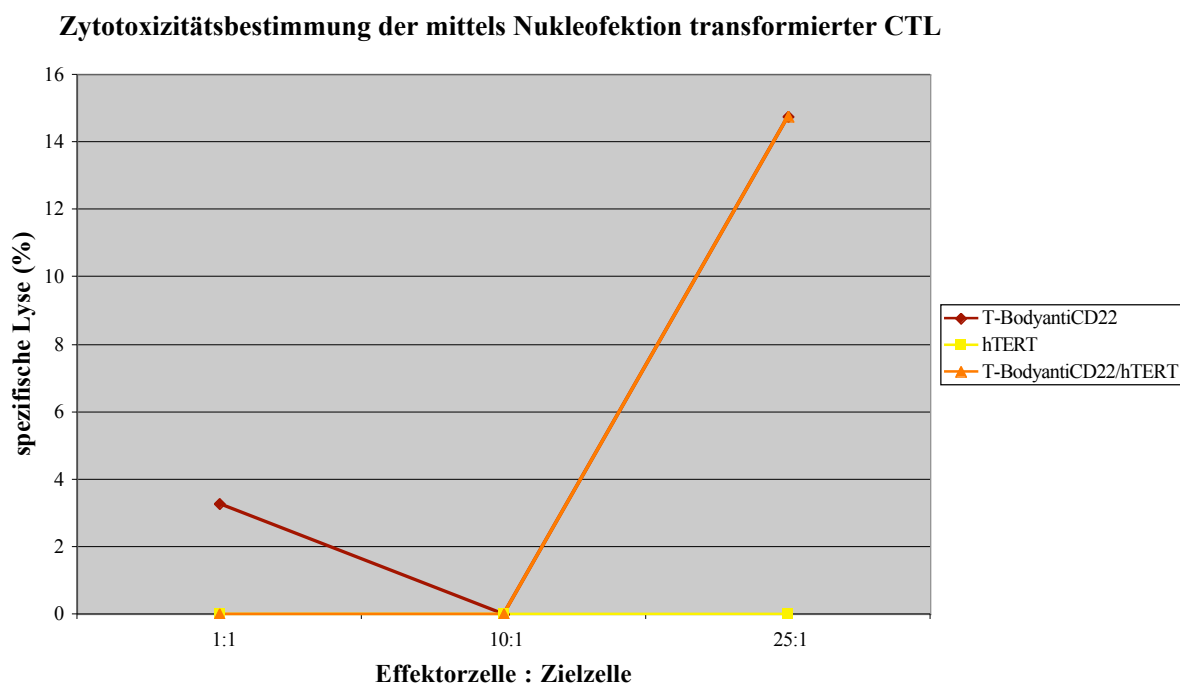


Abbildung 45: Zytotoxizität verschieden transformierter CTL mittels Nukleofektion: „*T-Body*“-anti-CD22; hTERT und der Doppeltransfektante „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT.

Die Daten (Abb.: 45) der „*T-Body*“-anti-CD22 positiven CTL, weisen bei einem Verhältnis von 1:1 eine spezifische Zytotoxizität von 3,28% und bei 25:1 eine Lyse von 14,75% auf. Hingegen zu der r spezifischen Lyse von hTERT-transfizierten CTL. Hier wurde bei allen Verhältnissen der Effektorzellen zu Zielzellen keine Lyse gemessen. Dieses Ergebnis spiegelt sich im Ansatz der „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT retroviral transfizierten CTL wieder. Abzüglich der untransfizierten Kontroll-CTL ist, außer bei einem Verhältnis von 25:1 mit einer Lyse in Höhe von 14,75%, keine Lyse der Tumorzellen zu erkennen. Durch die Transfektion mit dem hTERT-Konstrukt der CTL wurde eine, wie auch bei retroviral infizierten CTL, eine Reduktion der Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen feststellbar. Daraus ist ersichtlich, daß CTL, welche mit dem „*T-Body*“-anti-CD22 transfiziert wurden, effektiv Tumorzellen erkennen und lysieren können. Da dieses Experiment ein Tag nach Nukleofektion erfolgte, ist zu beachten, daß bei den verschieden transfizierten CTL ein hoher

prozentualer Teil an toten Zellen vorhanden ist und aufgrund dessen das Ergebnis zur Bestimmung der Zytotoxizität der Zellen beeinträchtigen konnte.

6.7.7 *INF- γ -spezifischer ELISPOT in Ergänzung einer MHC I und II Blockierung*

Dieses ELISA-Protokoll wurde unter gleichen Bedingungen wie unter 6.6.9. dargestellt, durchgeführt.

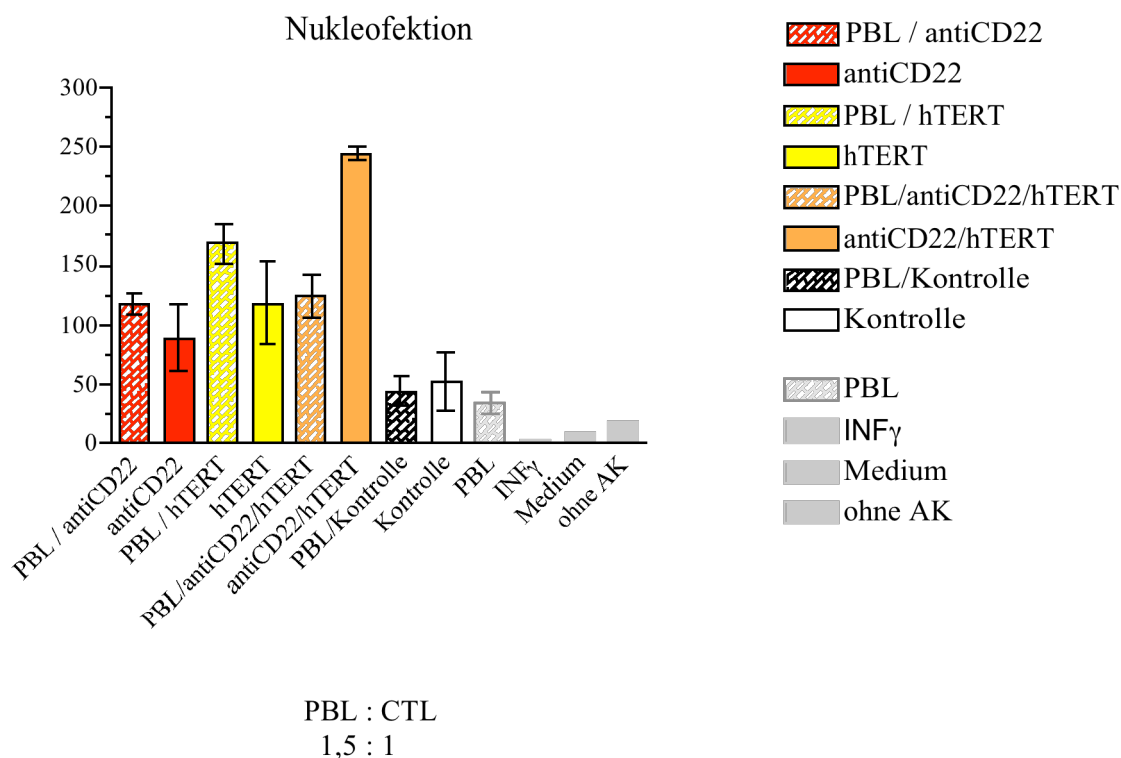


Abbildung 46: INF- γ – spezifischer ELISPOT unter Ausschluß der MHC I und II –Zytotoxizität. Effektorzellen wurden je nach Transfektion mittels Nukleofektion behandelt. Dieser Versuch wurde nach Nukleofektion und eintägiger Kultivierung durchgeführt.

In diesem Experiment (siehe Abb.: 46) wurde die INF- γ –Sekretion ermittelt, indem die „Spot“-Werte der Kontrollen (PBL und transfizierte CTL ohne PBL-Inkubation) von denen der Transfektanten abgezogen wurden. Die stärkste INF- γ –Ausschüttung ist unter der Transfektante „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT / PBL („Spot“-Wert:17). Im Falle hTERT-positiven CTL und „*T-Body*“-anti-CD22 CTL, mit PBL inkubiert, ist keine Produktion zu erkennen. Jedoch ist die Zytokinproduktion der CTL ohne PBL-Inkubation, welche mit dem „*T-Body*“-anti-CD22 ausgestattet sind am geringsten mit den hTERT-positiven CTL. Bei der

Doppeltransfektante ist eine Zunahme der INF- γ -Sekretion zu erkennen, die oberhalb des Wertes der unbehandelten CTL liegt. Jedoch ist hierbei ebenfalls zu erwähnen, daß bei den verschieden transfizierten CTL ein hoher prozentualer Teil an toten Zellen vorhanden ist, wie auch eine transiente Transformation vorliegt und aufgrund dessen das ELISPOT-Ergebnis beeinträchtigen konnte.

6.8 Retrovirale Infektion von CTL-Klonen

In dieser Arbeit soll die Umsetzung des Verfahrens zur Immortalisation von primären CTL, unter Verwendung des hTERT-Konstruktes, untersucht werden. Der Einsatz des Immortalisationsvektors wurde bei Antigen-spezifischen CTL-Klonen untersucht (Hooijberg et al. 2000). Aus diesem Grunde wurden CTL-Klone als positiver Kontrollansatz für den hTERT-Vektor ausgewählt und parallel zu primären CTL untersucht.

6.8.1 Expandierung von CTL-Klonen

Bei antigen-spezifische CTL-Klonen ist erst nach einer Kultivierung, die sich über 20-25 Verdopplungsphasen erstreckt eine *in vitro* Immortalisation zu erkennen. Aus diesem Grunde wurden zwei verschiedene CTL-Klone (FSP 31 A6, FSP 31 5H10) ausgewählt, für hundert Tage kultiviert und expandiert (Abb.: 47). Anschließend wurde der Effekt der ectopischen Expression von hTERT in Bezug auf die Lebensspanne dieser CTL-Klone überprüft. Ectopische Expression von hTERT führte zu einer drastischen Verlängerung der Lebensspanne von diesen CTL-Klonen, ohne den Phänotypus zu ändern, die Besonderheit und die Funktion der Zellen. Die CTL-Klone, die ectopisch hTERT exprimieren, blieben von den Zytokin- und von den Antigenstimulationen zur *in vitro* Expandierung abhängig (Hooijberg et al. 2000).

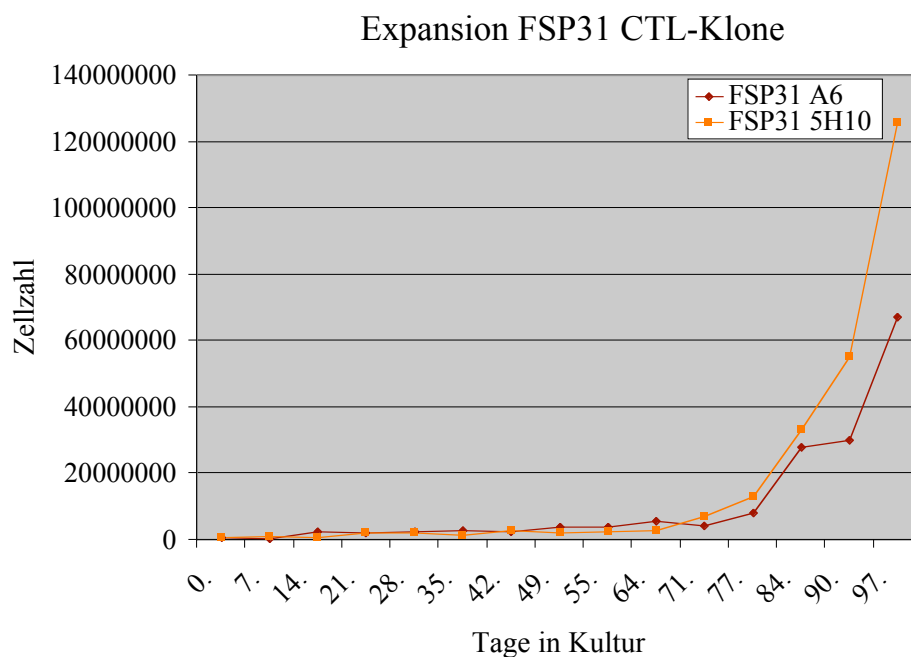


Abbildung 47: Expandierung zweier CTL-Klone. Ausgewählt wurden die FSP31 Klone A6 und 5H10.

6.8.2 Retrovirale Infektion von CTL

Die Infektion der CTL verläuft unter der Verwendung von retronektinbeschichteten Platten. Durch den Einsatz des Retronektins konnte man eine Infektionsrate von nahe zu 96% laut Herstellerangaben (BioWhittaker, Vervies, Belgien) erhalten. Der Versuchsablauf ist im Methodenteil unter 3.3.15 aufgeführt.

6.8.3 FACS-Analyse nach retroviraler Infektion von CTL-Klonen (5H10)

Wie auch unter 6.6.2 aufgeführt erfolgte die Messung, zwei Tage nach Infektion, über den FITC-Kanal. Zur Analyse wurden die beiden Ergebnisse aufeinander gelegt, um aus der Abweichung der Negativkontrolle positive Transfektanten zu ermitteln. Diese Abweichung entspricht CTL, die eine stärkere Fluoreszenzintensität aufweisen, als Zellen, wie hier die Kontrolle, die eine generelle Autofluoreszenz besitzen.

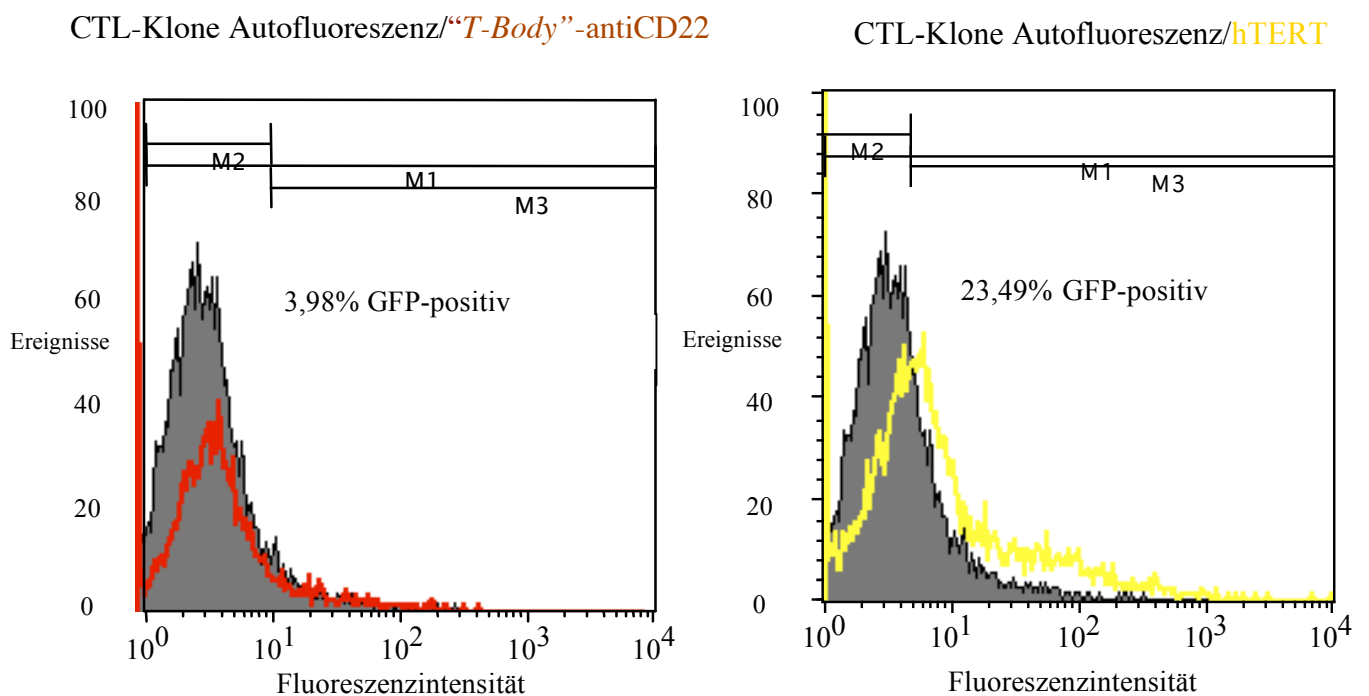


Abbildung 48: FACS-Analyse nach Infektion von CTL-Klonen mit retroviralem Überstand „T-Body“-anti-CD22 (links) und hTERT (rechts). Auf der Abszisse sind relative Fluoreszenzeinheiten, auf der Ordinate die prozentuale Anzahl der positiven Zellen abgebildet.

„*T-Body*“-anti-CD22 /hTERT infizierte CTL-Klone

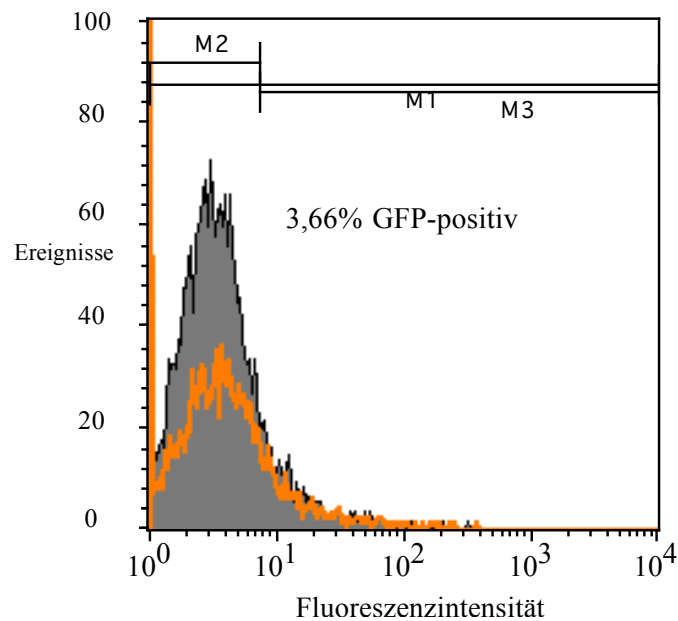


Abbildung 49: FACS-Analyse nach Doppelinfektion von CTL-Klone mit retroviralen Überstand „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT. Auf der Abszisse sind relative Fluoreszenzeinheiten, auf der Ordinate die prozentuale Anzahl der positiven Zellen abgebildet.

In diesen Abbildungen (48 und 49) ist die Transfektionseffizienz der CTL-Klone nach retroviraler Infektion zu erkennen. Die für „*T-Body*“-anti-CD22 und hTERT positiven CTL-Klone sind zu 3,98% und 23,49% positiv transfiziert. Bei der Doppeltransfektion erhielt man einen prozentualen Anteil von 3,66%.

6.8.4 anti-c-myc Detektion des „T-Body“-anti-CD22-Konstruktes auf retroviral infizierter CTL-Klonen

Wie unter 6.6.5. und 6.7.2. schon untersucht, wurde nach retroviralen Infektion der CTL-Klone die Überprüfung der Expression des „T-Body“-anti-CD22 Rezeptors auf der CTL-Klon-Oberfläche durchgeführt. Eine FACS-Messung erfolgte am zweiten Tag nach den zwei aufeinander gefolgt Infektionen.

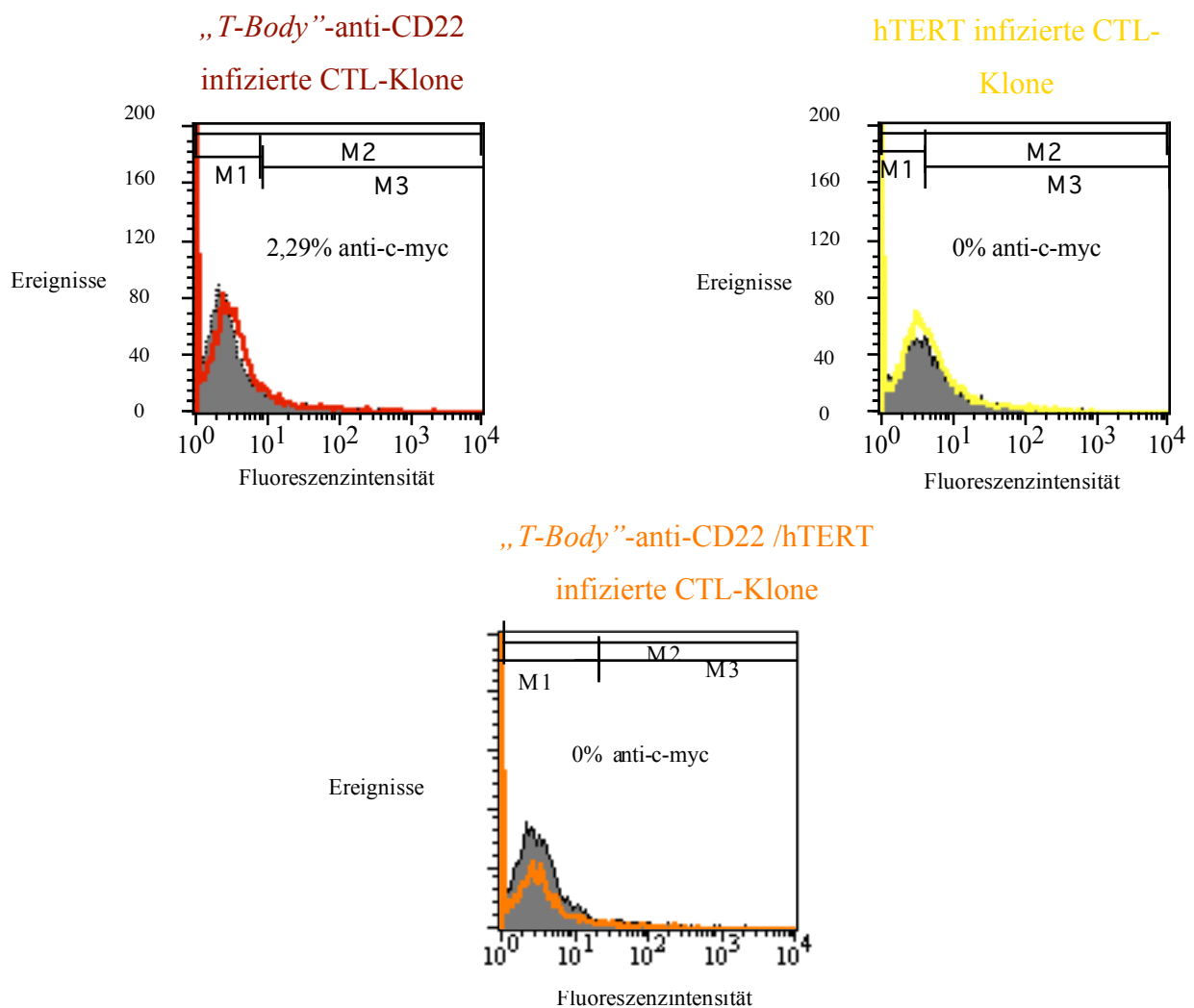


Abbildung 50: Darstellung der erfolgten Expression des chimären „T-Body“-anti-CD22 Rezeptors auf der CTL-Klon-Oberfläche nach retroviraler Infektion. Die Markierung erfolgte mit einem anti-c-myc Erstantikörper und einem PE spezifischen Zweitantikörper. Somit erfolgte die Messung über den PE-Kanal. Auf der Abszisse sind die relativen Fluoreszenzeinheiten, auf der Ordinate die prozentuale Anzahl der positiven Zellen abgebildet. Durch eine Überlagerung der Negativkontrolle (Autofluoreszenz) und der mit Antikörper gekoppelten Zellen, ist aus den Kurven der Anteil der positiven Zellen ermittelbar.

Diese FACS-Analyse in der Abb. 50 bestätigt die Infektion der CTL-Klone nur bei „*T-Body*“-anti-CD22 positiven CTL-Klonen. Der Nullwert der Messungen bei hTERT- und „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT- Transfektanten läßt sich auf den geringen prozentualer Anteil der GFP-positiven in der FACS-Analyse unter 6.8.3 zu erklären, was eine sterische Hinderungen der Bindung des anti-*c-myc* Antikörpers weiter begrenzt. Im Falle der „*T-Body*“-anti-CD22 positiven CTL-Klone ist ein *c-myc*-Teil detektierbar.

6.8.5 RT-PCR: Nachweis hTERT-spezifischer mRNA in CTL-Klone (5H10) mittels reverser Polymerasekettenreaktion nach retroviraler Infektion

Nach retroviraler Infektion wurde die positive Transfektion des hTERT-Konstruktes auch in CTL-Klone über eine RT-PCR nachgewiesen.

Es wurde Gesamt-RNA aus infizierten CTL-Klonen isoliert, wobei die Ausbeuten etwa 840µg („*T-Body*“-anti-CD22), 2660µg (hTERT), 1890µg („*T-Body*“-anti-CD22/hTERT) betragen. Jeweils 1 µg Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und amplifiziert.

Es wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. der vorstehend beschriebene Reaktionsansatz mit „*T-Body*“-anti-CD22 infizierten CTL-Klone,
2. der vorstehend beschriebene Reaktionsansatz mit hTERT infizierten CTL-Klone,
3. der vorstehend beschriebene Reaktionsansatz mit „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT doppel-infizierte CTL-Klone,
4. der vorstehend beschriebene Reaktionsansatz mit hTERT-Plasmid-DNA, („Positivkontrolle“)

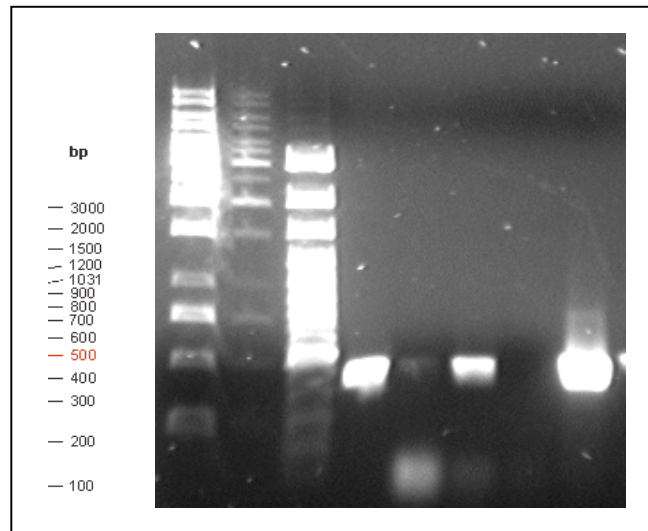


Abbildung 51 : hTERT-PCR-Produkte retroviral infizierter CTL-Klone.

(Auftrennung auf 1%-Agarosegel).

Die Reaktionsprodukte der PCR-Reaktion wurden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Abb. 51 zeigt das Ergebnis einer hTERT-spezifischen PCR Reaktion.

Es zeigt:

Spur 1 = DNA Molekulargewichtsmarker 100bp

Spur 2 = DNA Molekulargewichtsmarker 1Kb

Spur 3 = hTERT

Spur 4 = „*T-Body*“-anti-CD22

Spur 5 = „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT

Spur 7 = hTERT Plasmid-DNA

} hTERT-spezifische PCR

Ein PCR-Produkt der erwarteten Größe von ~350 Bp wurde in den Spuren 3 und 5 nachgewiesen, d.h. in den Spuren 3 und 5 wurde mittels hTERT-Primern hTERT-spezifische mRNA wurde in den infizierte CTL-Klone nachgewiesen. In Spur 7 fand sich eine sehr starke Bande der hTERT-Vektor-Positivkontrolle.

6.8.6 Fluoreszenz-Nachweis retroviral infizierter CTL-Klone

Nach erfolgter Infektion der CTL-Klone unter Einsatz der „*T-Body*“-anti-CD22- und hTERT-retroviralen Überstandes erfolgte die Überprüfung der GFP-positiven CTL-Klone mittels der Verwendung eines inversen Mikroskopes zur Messung der direkten Immunfluoreszenz.

„*T-Body*“-anti-CD22-positive CTL-Klone:

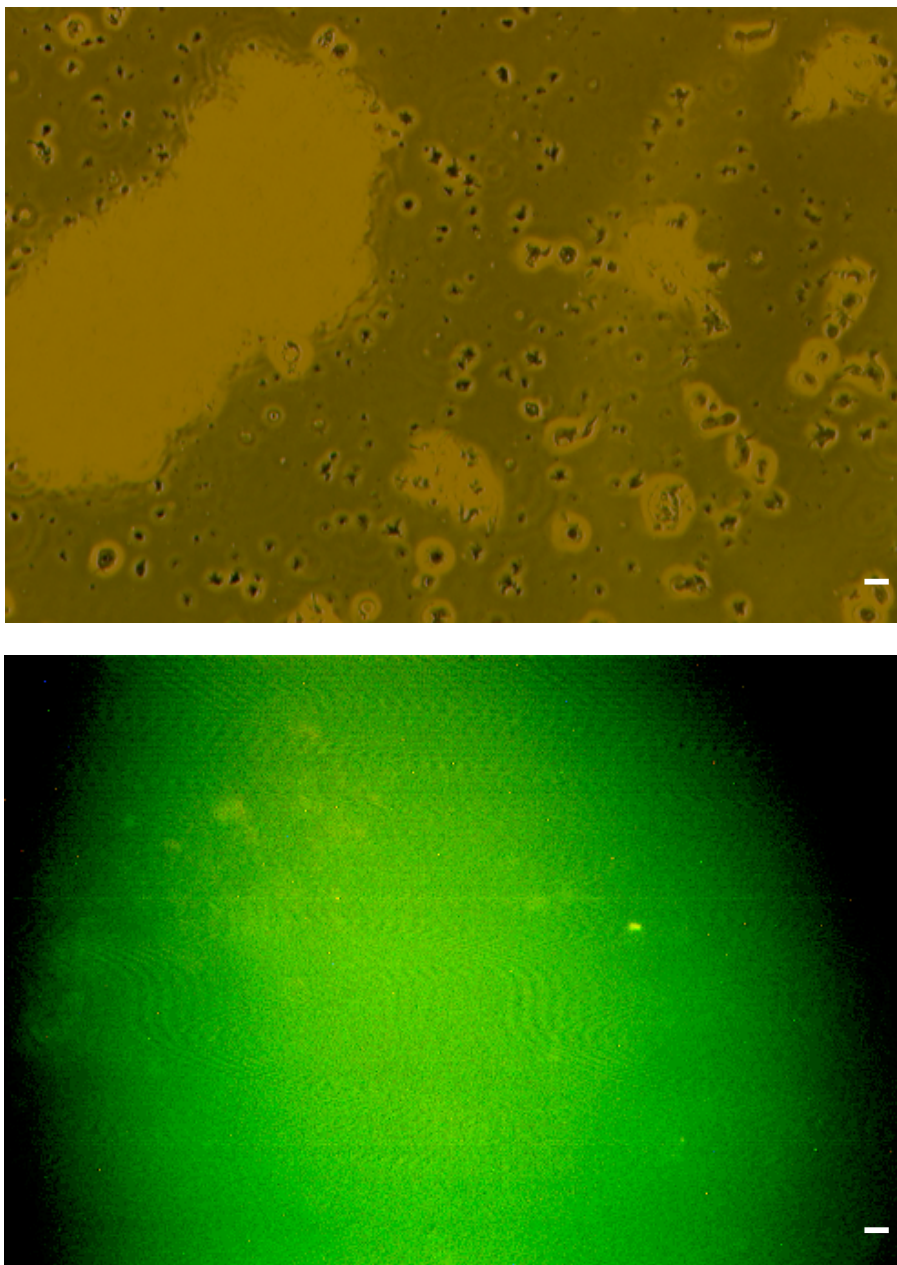


Abbildung 52: Darstellung retroviral infizierter „*T-Body*“-anti-CD22-CTL-Klone. Lichtmikroskopische Aufnahme der Transfektanten mit einer Belichtungszeit von 1sec; Maßstab, 20 μ m (A). Fluoreszenzaufnahme der GFP-positive Transfektanten mit einer Belichtungszeit von 3 sec; Maßstab, 20 μ m (B).

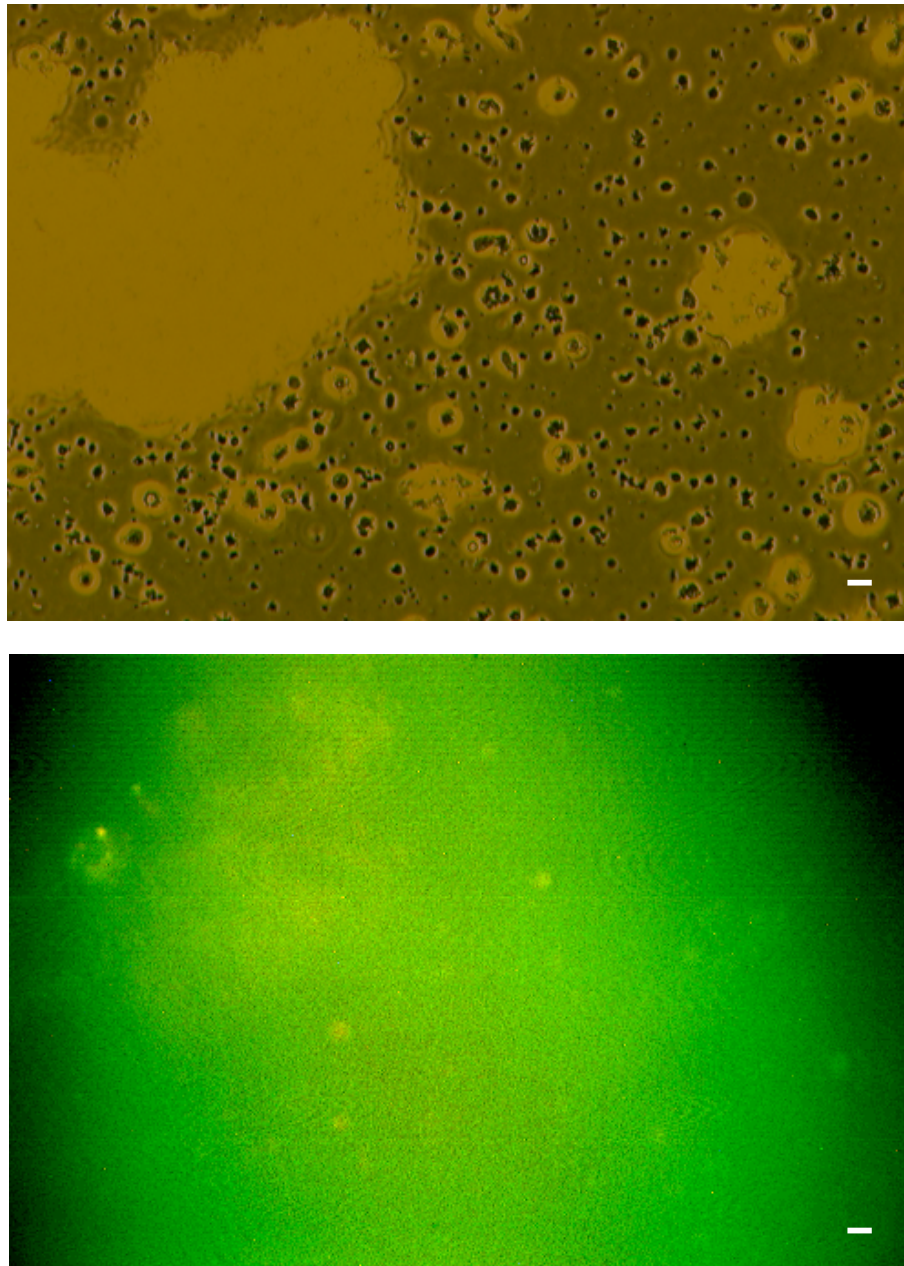
hTERT-positive CTL-Klone:

Abbildung 53: Darstellung retroviral infizierter hTERT-CTL-Klone. Lichtmikroskopische Aufnahme der Transfektanten mit einer Belichtungszeit von 1sec; Maßstab, 20 μ m (A). Fluoreszenzaufnahme der GFP-positive Transfektanten mit einer Belichtungszeit von 3 sec; Maßstab, 20 μ m (B).

Diese Fluoreszenzfotos (siehe Abb. 52 und 53) der retroviral infizierter CTL-Klone wurden wie unter 6.6.4. mit Hilfe der inversen Mikroskopie Signale erstellt. In den lichtmikroskopischen Aufnahmen sind große vitale CTL-Klon Kolonien zu erkennen. Jedoch sind weder bei den Transfektanten mit geringer Positivität der „*T-Body*“-anti-CD22-CTL, wie auch bei erhöhter Transfektionseffizienz der hTERT-positiven CTL in den Fluorezenzfotos keine GFP-positiven Zellen zu beobachten. Die erhaltenen Signale stellen Artefakte dar.

6.8.7 Vitalitätsbestimmung retroviral infizierter CTL-Klone

Um die Lebensspanne der CTL-Klone in Kultur über vierzehn Tage zu beobachten, wurde im Abstand von zwei Tagen die Zellzahl der verschiedenen Transfektanten, wie auch schon unter 6.6.7. und 6.7.5 bestimmt.

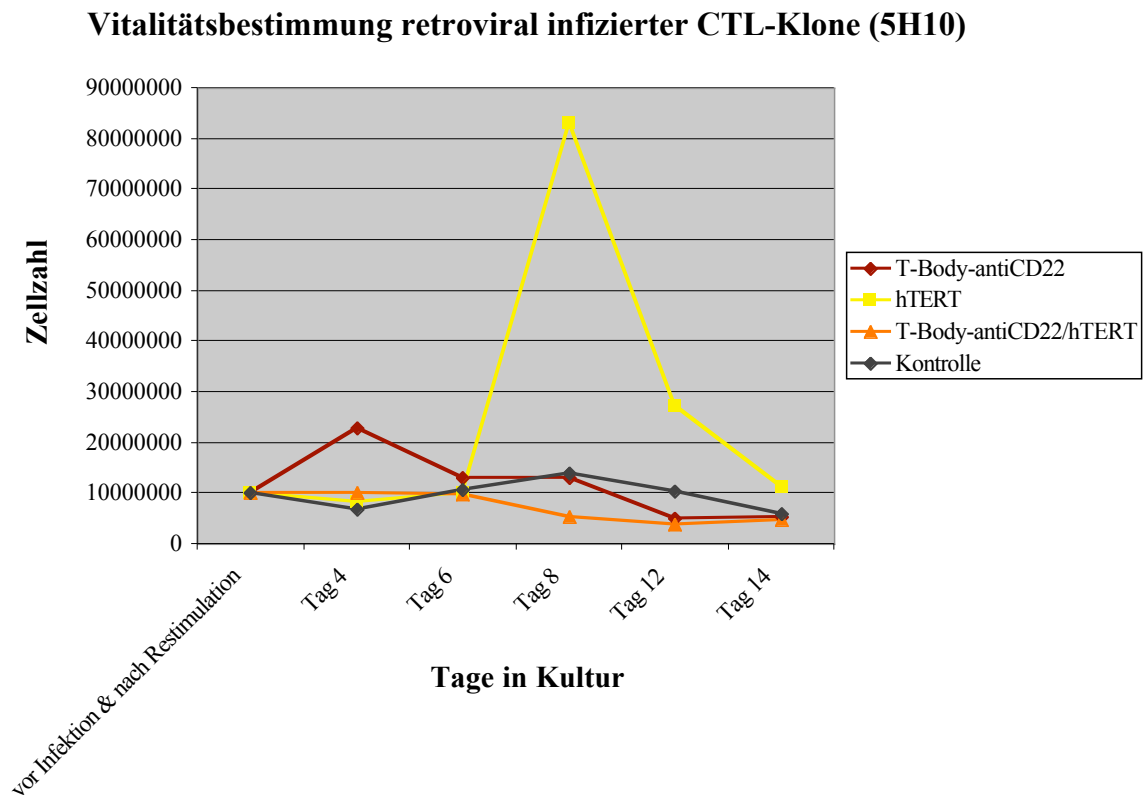


Abbildung 54: Vitalitätsbestimmung über Zellzahlzählung verschiedener CTL-Klon Transfektanten. Tag 0 entspricht der Population nach Infektion wie auch Restimulation.

Diese Graphik (Abb.: 54) gibt eine gesteigerte Proliferation der hTERT-Transfektante, im Vergleich zu den weiteren dargestellten transfizierten CTL-Klonen, wieder. Durch die ergänzende Infektion mit dem „*T-Body*“-anti-CD22-Konstrukt ist eine drastische Herabsetzung der Überlebensspanne während der Kultivierung zu erfassen. Desweiteren ist eine Unterscheidung durch die Behandlung der CTL mit dem alleinigen „*T-Body*“-anti-CD22-Konstrukt und zwischen den untransfizierten CTL nur eine mäßig erhöhte Proliferation der Zellen nachzuvollziehen.

6.8.8 Bestimmung der Zytotoxizität retroviral infizierter CTL-Klone

Zur Überprüfung der zytotoxischen Reaktivität von „*T-Body*“-präsentierenden und hTERT transfizierten CTL-Klonen auf Zielzellen wurde der JAM-Test angewandt (siehe Abb.: 55).

Diese Messung gibt die Zytotoxizität der drei verschiedenen transfizierten CTL-Klone wieder.

Im Falle der nur zu 3,98% positiven „*T-Body*“-anti-CD22 CTL-Klone, ist eine sehr geringe Zytotoxizität zu erkennen. Bei einem Verhältnis von 25:1 eine spezifische Zytotoxizität von 52% , bei einer Relation von 10:1 ergab 1%. Hingegen zu einer gering erhöhten spezifischen Lyse von hTERT-positiven CTL-Klone, die zu 23,49% positiv transfiziert eingesetzt wurden. Hier wurde bei einem prozentualen Verhältnis 25:1 der Effektorzellen zu Zielzellen eine Lyse von 39% und bei 10:1 eine Zytotoxizität in Höhe von 57,6% erhalten. Während wie im Falle der „*T-Body*“-anti-CD22 CTL-Klone bei einem Verhältnis von 1:1 keine spezifische Lyse zu erhalten wurde. Die zytotoxische Bestimmung der Doppeltransfektante ist mit den vorherigen Ergebnissen nicht in Zusammenhang zu bringen. Da bei diesen Doppeltransfektanten bei einem Verhältnis von 1:1 63% und bei 10:1 und 25:1 100% spezifische Lyse zu beobachten war, ist diese Ergebnisse vermutlich auf Meßartefakte zurückzuführen. Somit können diese Ergebnisse der maximalen Zytotoxizität als mögliche irrelle Werte interpretiert werden.

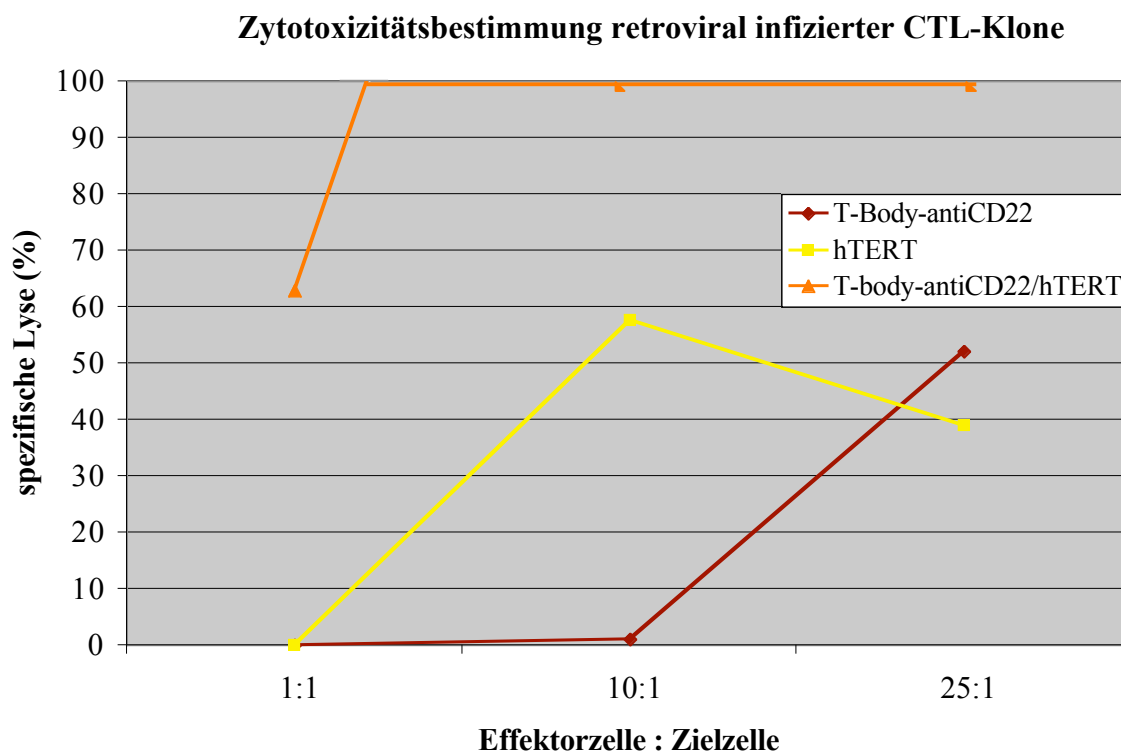


Abbildung 55: Zytotoxizität verschieden transfizierter CTL-Klone mittels retroviraler Infektion: „*T-Body*“-anti-CD22; hTERT und der Doppeltransfektante „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT.

6.8.9. *INF- γ -spezifischer ELISPOT in Ergänzung einer MHC I und II Blockierung*

Dieses ELISA-Protokoll entspricht der Durchführung wie unter 5.4.9. geschildert.

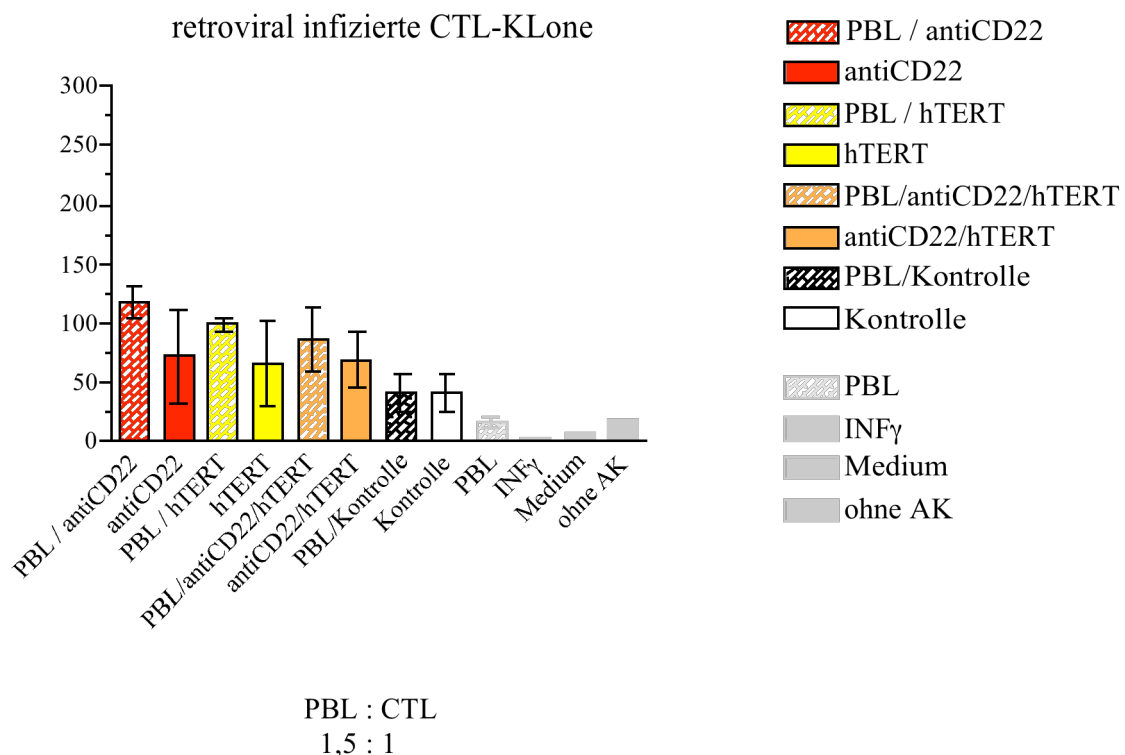


Abbildung 56: INF- γ spezifischer ELISPOT unter Ausschluß der MHC I und II –Zytotoxizität. Effektorzellen wurden je nach Transfektion mit retroviralem Überstand behandelt. Dieser Versuch wurde nach Infektion und einwöchiger Kultivierung durchgeführt.

In diesem Experiment (Abb.: 56) wurde die INF- γ –Sekretion ermittelt, indem die „Spot“-Werte der Kontrollen (PBL und transfizierte CTL-Klone ohne PBL-Inkubation) von denen der Transfektanten abgezogen wurden. Die stärkste INF- γ –Ausschüttung ist unter der „*T-Body*“-anti-CD22 Transfektante („Spot“-Wert: 29), gefolgt von den hTERT-positiven CTL-Klone („Spot“-Zahlen: 16,7) und schließlich mit der niedrigsten INF- γ –Sekretion die CTL-Klone mit doppelt transfizierten „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT-Konstrukt („Spot“-Wert: 1). Zu beachten jedoch ist, daß die Zytokinproduktion der CTL-Klone ohne PBL im Falle der CTL, welche mit dem „*T-Body*“-anti-CD22 ausgestattet sind und den Doppeltransfektanten „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT am Höchsten ist. Somit ist die niedrigste INF- γ –Sekretion bei den hTERT-Transfektanten zu erkennen.

T-Body-Therapie eines humanen NHL in SCID-Mäusen in Kombination des hTERT-Konstruktes

Das therapeutische Potential des „*T-Body*‘s“ in Kombination des hTERT-Konstruktes wurde in humanen Raji-Tumormodell in SCID-Mäusen untersucht. Es wurden transfizierte CTL-Klone zur Therapie ausgewählt, da transfizierte CTL vom Spender nicht ausreichend expandiert werden konnten. Zum Einsatz kamen Transfektanten, die zu 3,98% für „*T-Body*“-anti-CD22 und hTERT-CTL-Klone, die zu 23,49% positiv transfiziert waren. Die „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT-Klone wiesen 3,66% auf. Die Positivität des „*T-Body*‘s“ in CTL-Klonen war zu gering, dadurch lies sich keine tumorspezifische Zytotoxizität bestätigen und folglich konnte kein therapeutischer Erfolg nachgewiesen werden.

VII Diskussion

Oftmals ist die Immunreaktion eines Krebspatienten nicht ausreichend einen Tumor zu eliminieren, da die meisten Tumoren nur wenig immunogen sind. Die Immuntherapie eröffnet, zumindest bei einzelnen Krebsarten, neue Wege, zur Nutzung des Immunsystems gegen Krebserkrankungen.

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, daß adoptiv transferrierte T-Lymphozyten in der Lage sind, Tumoren *in vivo* zu bekämpfen. Sie reagierten entweder spezifisch für das Tumorgewebe (Kast et al. 1989) oder waren gegen Tumorantigene gerichtet, welche auch auf normalen Zellen, wenn auch in geringerer Dichte, exprimiert sind (Hu et al. 1993). Trotz aller Fortschritte konnte die zelluläre adoptive Immuntherapie viele technische Hürden noch nicht überwinden. Besonders die Isolierung und Expansion geeigneter Effektorzellen, wie auch der Verlust des Aktivierungsstatus *in vitro* aktivierter Lymphozyten nach Reinfundierung, stellen zur Zeit noch erhebliche Einschränkungen für die klinische Anwendbarkeit dar.

Das „*T-Body*“-Konzept kombiniert Antikörpererkennung und T-Zell-Effektorfunktion miteinander. Zelig Eshhar und Kollegen des Weizmann Institutes in Israel beschrieben die biophysikalischen Parameter der „*T-Body*“-Antworten, indem der Einsatz der V-Region auf einem anti-Trinitrophenyl (TNP) Antikörper getestet und diese in CTL-Hybridomen exprimiert wurden. Die von Antikörper hergestellten V-Regionen reagieren mit einem TNP-„Hapten“. Dadurch konnten sie zeigen, daß in diesem System T-Zelllinien den chimären Rezeptor exprimieren und in der Lage waren, nach dem Kontakt mit der Zielzelle IL-2 zu produzieren und zu sezernieren. Weitere Erkenntnisse, wie die Aktivierung unabhängig vom MHC-Weg konnten gezeigt werden. Zusätzlich konnten CTL, die den chimären Rezeptor exprimieren, Hapten-modifiziertes Zielgewebe eliminieren (Bitton et al. 1999; Eshhar 1997).

Um die Denkansätze des „*T-Body*“-Konzeptes weiter zu verfolgen und eine stabile Expression des „*T-Body*“ für eine Therapie von NHL zu erhalten, wurden im Rahmen dieser Arbeit entsprechende *in vitro*-Experimente durchgeführt. Zur Aufgabenstellung gehörte die Verbesserung der Isolierung und Expansion geeigneter Effektorzellen wie auch die Überprüfung deren Aktivierungsstatus *in vitro*. Desweiteren sollten zwei verschiedene Transfektionsmethoden, die retrovirale Infektion der Nukleofektion gegenübergestellt werden. Weitere Vergleiche zwischen primären CTL („bulk“) und CTL-Klonen wurden unternommen. Ziel war es die Klonierung, Expression und den *in vitro*-Nachweis der „*T-*

Body's“ in Kombination eines Immortalisationsvektors (hTERT) zum Einsatz von immortalisierten T-Zellen, zu untersuchen. Mit der Untersuchung zellulärer Interaktionen zwischen „*T-Body*“-, hTERT- exprimierenden T-Zellen und Tumorzelllinien (NHL) wurde die Effizienz des „*T-Body's*“ kontrolliert.

7.1 Klonierung des „*T-Body*“-Konstruktes (α CD22)

Der „*T-Body*“ besteht aus drei Domänen: einer Signal-, einer Transmembran- und einer Extrazellulären. Die extrazelluläre Domäne ist ein Antikörper-abstammendes scFv das gegen den NHL-Marker CD22 gerichtet ist. Die Intrazelluläre besteht aus der ζ -Kette des CD3-Komplexes. Als dritter Teil wurde die Transmembran Domäne des CD28 eingesetzt. Unter diesen Voraussetzungen ist es dem Rezeptor möglich die T-Zellspezifität zu verändern und eine MHC unabhängige Signalinduktion der T-Zelle zu aktivieren. Zur Detektion der „*T-Body*“-Expression dient die Koexpression des GFP. Die Klonierung des Expressionsvektors der variablen Antikörperregion erfolgte in einen retroviralen Vektor (Dr. D. Schindler, Abt. Immunologie, Weizmann Institut, Rehovot, Israel).

Die Wahl der variablen Antikörperregion fiel auf scFv anti-CD22 (Zewe-Welschhof 1997). Dieser erfüllt, die an den für dieses Projekt benötigten scFv gestellten Voraussetzungen. CD22 als tumorassoziiertes Antigen ist in malignem Gewebe exprimiert und kann demnach dem „*T-Body*“ als Zielantigene dienen. Das Trennen der Transmembranregion von der scFv-Bindungsstelle durch eine flexible Region („Hinge“-Region) soll dem chimären Rezeptor ermöglichen einen besseren Kontakt mit dem Zielzellantigen auszubilden.

Der „*T-Body*“ ist ein relativ kleines Molekül verglichen mit dem Plasmamembran-Glycocalyx auf Gewebe und Effektorzellen. Der chimäre Rezeptor ist zwischen größeren Proteinen eingebettet und dadurch kann der Ligand bei seiner Bindung eine sterische Hinderung erfahren. Aufgrund dessen ist der Abstand zwischen den scFv und der Plasmamembran ein flexibler „Spacer“ notwendig (IgG), denn dies ist möglicherweise wesentlich für die produktive Interaktion zwischen dem „*T-Body*“ und dessen Zielzellen (Bitton et al. 1999; Eshhar 1997).

Zur Aktivierung benötigen T-Zellen zwei simultane Signale: das Antigen-spezifische Signal (TCR/CD3), das der kostimulierenden Liganden B7, das mit dem T-Zell-CD28-Rezeptor interagiert und somit die Freisetzung des aktivierenden IL-2 Zytokins bewirkt. Eine direkte Stimulation nur durch den TCR führt zu Anergie. Dieses Problem existiert nachweislich in

inaktiven Zellen, die den „*T-Body*“ auf ihrer Oberfläche präsentieren. Wenn Zellen jedoch in Anwesenheit von IL-2 aktiviert werden, kann die Anergie vermieden werden. Es werden daher die zu transfizierenden CTL vorher mit OKT3 in Anwesenheit von IL-2 aktiviert.

7.2 Generierung von Verpackungszelllinien mit hochgradiger Virustiterproduktion

Eine der hauptsächlichsten technischen Beschränkungen dieses Konzeptes ist der ineffiziente Gentransfer in T-Zellen. Während adenoassoziierte Viren nicht in der Lage sind T-Zellen zu infizieren, ist ein vielversprechendes Ergebnis bei der Verwendung von Moloney murine leukemia Virus (MuLV)-basierenden Vektoren zu erzielen. Retrovirale Vektoren, abstammend von murinen Retroviren, werden in dieser Arbeit als Weg für eine Transkomplementation eingesetzt (Buchsacher and Wong-Staal 2000). Um diese Fähigkeit des Virus permanent in das Chromosom einer infizierten Zelle zu integrieren, kloniert man zunächst das gewünschte Konstrukt in das Plasmid (pBullet-yol-sNDF-CD28-g-IRES-GFP). Als Marker verwendet man GFP.

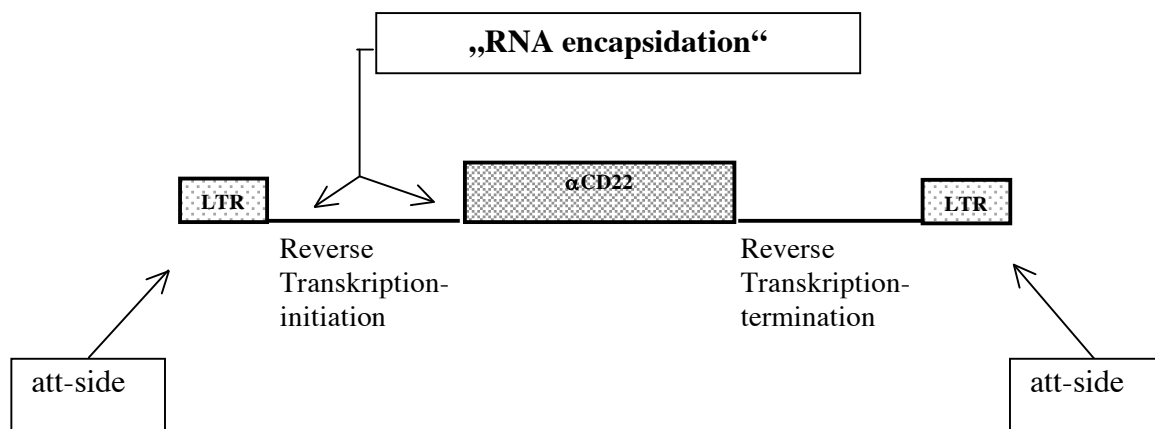


Abbildung 57: Schematische Darstellung des klonierten Konstruktes unter viraler Kontrolle. Provirusintegration: att-side („attachement side“); LTR („long terminal repeats“)

Von Retroviren hergestellte Vektoren, solche, wie zum Beispiel das MLV, infizieren und integrieren in das fremde Genom der Zielzelle. Jedoch sind diese Vektoren unfähig sich zu vervielfältigen und sich in anderen Zellen auszubreiten, da dies ohne eine Übertragung von viralen Genen von statten geht. Die Aktivität dieser prototypischen retroviralen Vektoren ist streng auf die transduzierten Zellen beschränkt, die sich nochmals kurz nach der Infektion teilen (Naldini et al. 1996).

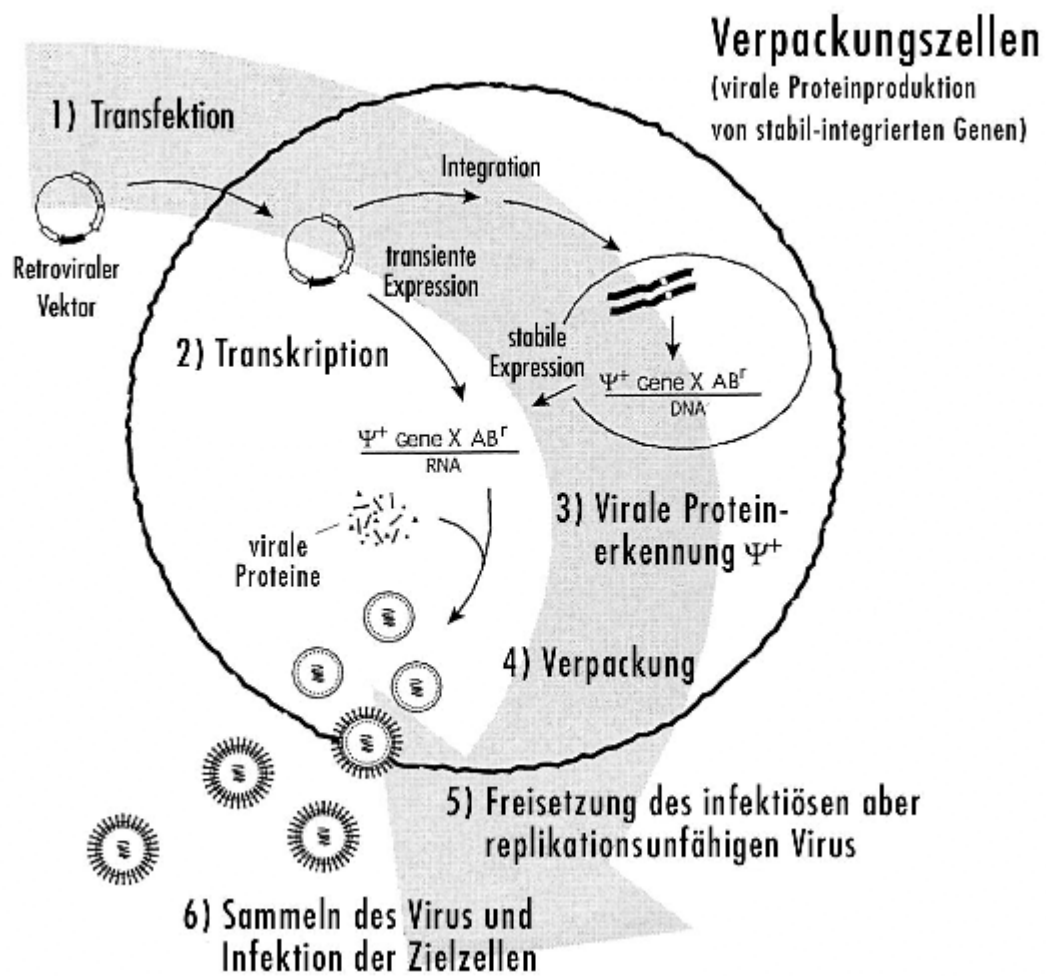


Abbildung 58: Verpackung von retroviralen Partikeln mit Hilfe von Verpackungszelllinien. Ein retroviraler Vektor enthält die Gene des gewünschten Inserts, Antibiotikaresistenzgene (AB^r) und ψ^+ , das Verpackungssignal für eine korrekte Viruspartikelformationsausbildung. Diese können stabil integrieren oder transient exprimieren. Die Verpackungszelllinien sorgen für die richtige Expression der Partikelformationsgene, die der Vektor nicht enthält: *gag* (strukturelles Kernprotein), *pol* (Reverse Transkriptase / Integrase) und *env* (Verpackung). Der von den Verpackungszelllinien freigesetzte Retrovirus beinhaltet die Genprodukte und ist weiterhin infektiös. Jedoch wird, durch das Fehlen seiner retroviralen Gene, eine Virusproduktion von schon infizierten Zellen verhindert.

Das Design von viralen Vektorsystemen baut auf die Trennung von nicht viralen *cis*-Sequenzen, die in die Infektion der Zielzellen durch den Retrovirus involviert sind, und von *trans*-Sequenzen, die die viralen Proteine kodieren. Die Sicherheit und Leistungsfähigkeit eines Vektorsystems hängt also vom Ausmaß ab, in wie weit eine ideale und komplette Abtrennung der *cis*- und *trans*-verantwortlichen Funktionen erreicht wird.

Der entscheidende Vorteil eines lentiviralen Vektors ist seine Integration in das Genom von nicht-teilungsfähigen Zellen.

Mit diesem Hintergrund wird der retrovirale Vektor beider Konstrukte („*T-Body*“-anti-CD22 und hTERT) in Verpackungslinien transfiziert. Verpackungslinien sind Zelllinien, welche virale Proteine exprimieren, die zur Verbreitung des Vektors nötig sind. Dazu werden ekotrope (GP+E-86) und amphotrope (PA317) Verpackungslinien verwendet (Dupraz et al. 1999). Zur Herstellung von retroviralem Überstand zur Immortalisierung der T-Zellen dienen Phoenix (NX- ϕ) Verpackungszelllinie. Hier erfolgt jedoch eine Transfektion mit dem immortalisierenden hTERT-Konstrukt und im Anschluß daran die Isolation des retroviralen Überstandes, ohne Einsatz einer weiteren Verpackungszelllinie (Hooijberg et al. 2000).

Einmal in der Zelle eingetroffen, kann die retrovirale Vektor-cDNA von ständig neuintegrierenden Exemplaren übertragen werden. Dieses RNA-Transkript wandert zum Zytoplasma und wird dort durch das Ψ^+ Signal der Virenproteine erkannt. Diese Proteine werden durch Verpackungszellen hergestellt und sind in infektiöse Viruspartikel verpackt. Die viralen Elemente in den Transkripten befinden sich zwischen 5' und 3' LTRs (lange terminale Wiederholungen, „*long terminal repeats*“). Alle Proteine, die für die Virusproduktion benötigt werden, *gag* (strukturelle Proteine), *pol* (Integrase, reverse Transkriptase), *env* (Verpackung), sind im Genom der Verpackungszelle vorhanden. Die Viruspartikel sind replikationsunfähig. Infolgedessen können keine weiteren Generationen des Virus produziert werden, da die *gag*, *env* oder *pol*-Gene nicht miteingeschlossen sind. Diese Partikel werden in das Kulturmedium freigegeben, welches dann, um die Zielzelle zu infizieren, gesammelt wird. Nur im Falle der „*T-Body*“ Produktion wird das in den Überstand abgegebene Retrovirus, mit dem klonierten Konstrukt abgenommen und damit die nächste Verpackungslinie PG13, eine Gibbonaffen-Leukemia-Virus-Zelllinie, infiziert. Dadurch steigt der Virustiter exponentiell an. Dies ist ein vereinfachtes Verfahren der sogenannten „ping-pong“-Technik.

Bei der Infektion auf zellulärem Niveau unterscheidet man verschiedene Infektionsverläufe. Der hier verwendete Lentivirus sorgt für eine persistierende Infektion. Dabei handelt es sich um eine über einen längeren Zeitraum anhaltende Infektion, bei der die infizierten Zellen teilungsaktiv bleiben und fortlaufend neue Viren produzieren.

Werden bereits mit Viren infizierte Zellen mit einem zweiten Virus der gleichen Art infiziert, so spricht man von Superinfektion, damit erreicht man eine Verstärkung der Infektion.

In dieser Arbeit wird zusätzlich eine Mock-Infektion durchgeführt, diese Infektion von Zellen ist eine Scheininfektion (Negativkontrolle). Es handelt sich um ein Kontrollexperiment, bei dem Zellen nicht infiziert, aber ansonsten so behandelt und weiterverarbeitet werden, wie die im Parallelansatz bearbeiteten, virusinfizierten Zellen (Mezzanzanica et al. 1998). Um festzustellen, ob die Integration des Inserts des „*T-Body*“-anti-CD22 wie auch des hTERT stattgefunden hat, verwendet man ein inverses Fluoreszenzmikroskop oder wendet das Verfahren der Durchflußzytometrie an.

Die Transfektionseffizienz des retroviralen Konstruktes „*T-Body*“-anti-CD22 in kokultivierter Verpackungszelllinie PA317/GP+E-86 konnten nach FACS-Analyse in Höhe von 18,13% ermittelt werden. Zur Herstellung einer höhergradigen Virusproduktion war es notwendig zweimalig zu „Sortieren“. Dadurch konnte nach der ersten, von 66,78% positiver Zellen und nach der zweiten Sortierung auf 88,41%, der prozentuale Anteil erhöht werden. Dieser angereicherte retrovirale Überstand wurde zur weiteren Infektion der dritten Verpackungszelllinie verwendet. Demzufolge konnte eine 51,17% positive PG13-„*T-Body*“-anti-CD22 Population erlangt werden. Zur weiteren Anreicherung dieser Zellen, wurde zunächst ein Ergebnis mittels FACS-Sort von 66,64% und schließlich von 72,42% erzielt. In beiden Fällen wirkte sich die zweite „Resortierung“ der Verpackungszelllinien in der Positivität vorteilig aus. Jedoch waren zuvor bei den Transfektanten PA317/GP+E-86-„*T-Body*“-anti-CD22 signifikante Unterschiede im Prozentsatz zwischen der Transfektion und Sortierungsereignissen zu finden. Im Gegensatz zu PG13-„*T-Body*“-anti-CD22 ließen sich geringere Abweichungen zwischen beiden Sortierungen erkennen.

Zur Erzeugung hTERT-positiver NX- ϕ -Verpackungszelllinien konnten nach Transfektion 44,9% detektiert werden. Nur bei dieser Zelllinie war es nicht nötig, nach erster Sortierung von 80,45%, eine weitere durchzuführen.

7.3 *Retrovirale Infektion von CTL*

Die Untersuchungen mit Hilfe der Durchflußzytometrie der infizierten CTL ergaben, daß der „*T-Body*“ auf der Zelloberfläche exprimiert, wie auch der hTERT erfolgreich integriert wurde. Diese Expression manifestierte sich als einheitliche Verschiebung der gesamten Zellpopulation im FACS-Diagramm. Bei „*T-Body*“-anti-CD22 CTL fand eine Infektionseffizienz von 29,35% statt, während das Ergebnis der CTL nach Behandlung mit hTERT-retroviralen Überstand 26,59% war. Ein weiterer verminderter Prozentsatz von 20,5% wurde durch die Doppel-Infektion erzielt. So ist erklärbar, daß beide retrovirale Vektoren, bei einer Infektion der Zielzelle, miteinander in Konkurrenz stehen.

Eine weitere Bestätigung der erfolgten Expression des „*T-Body*‘s“ auf der CTL-Oberfläche wurde über die *c-myc*-Detektion, das ein Teil der extrazellulären Domäne des „*T-Body*‘s“ ist, erhalten. Die Proteinfaltung, wie auch die Expression des Rezeptors konnte bestätigt werden. Da durch sterische Hinderungen die Bindung des anti-*c-myc* Antikörpers nicht im vollem Maße stattfinden konnte, sind die prozentualen Anteile der positiven „*T-Body*“-anti-CD22- (4,1%) und der „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT-CTL (3,7%) vermindert auf der CTL-Oberfläche detektierbar.

Die erfolgte Integration des Immortalisationskonstruktes konnte ebenfalls mittels einer zweiten Methode, durch Nachweis der hTERT spezifischen mRNA in den Transfektanten (spezifische PCR auf der cDNA der Zellen) eindeutig gezeigt werden.

Die mögliche klinische Anwendbarkeit solchermaßen transduzierter tumorspezifischer CTL hängt nicht nur von der Stabilität der Transfektion ab, sondern auch davon, ob die infizierten Zellen weiterhin ihre Funktion als Antitumor-Effektorzellen wahrnehmen können. Hierzu wurde zunächst die Expression von relevanten Lymphozyten-Oberflächenmolekülen untersucht. Das kostimulatorische CD28 Rezeptormolekül fördert die CD28/B7 Signaltransduktion und erlaubt dadurch die T-Zell-Proliferation und –Expansion (June et al. 1994). Die Gruppe um Rufer konnte mittels Einsatz von CTL-Klonen nachweisen, daß mehr als 95% der Zellen, CD28⁻ zum Zeitpunkt ihrer Seneszenz waren. Die immortalisierten Subklone stellten somit eine Korrelation zwischen der CD28-Expression und Immunseneszenz in den Vordergrund. Jedoch zeigten die hTERT transduzierten CTL-Klone unabhängig von der CD28-Expression, eine gesteigerte Zellteilung (Rufer et al. 2001). Ganz im Gegensatz zu primären CTL, die, auch im Falle des hTERT-Konstruktes, eine Veränderung des Phänotypus aufzeigten. Die verringerte CD28-Expression hatte zur Folge, daß die Stimulation und schließlich die Proliferation der Zellen beeinträchtigt wurde. Es war sogar zu beobachten, daß hTERT–transfizierte CTL eine rapide Reduktion ihrer

Lebensspanne aufwiesen. „*T-Body*“ positive CTL hingegen eine Steigerung ihrer Proliferation und Vitalität erfuhren. Auffallend ist u.a. eine signifikante Herabsetzung der Expression des MHC-I-Komplexes durch die hTERT-Transduktion. Dies spiegelt sich in der Zytotoxizität der hTERT-CTL wieder. Weiter untersuchte Oberflächenmoleküle CD3, CD8 oder CD56 zeigten keine, durch die Vorgänge der Transfektion, veränderte Expressionsdichte auf den Zellen.

Das zytotoxische Potential der Zellen, die *in vitro* solche chimären Gene exprimieren, ist gezeigt worden. CTL sind die in der Literatur am besten charakterisierten Effektorzellen, die in einer Immunantwort gegen Tumoren involviert sind. Eine direkte Eliminierung von Tumorzellen durch T-Zellen, die mit dem „*T-Body*“ ausgestattet sind, konnte in der Bestimmung der Zytotoxizität gemessen werden. Es wurde demonstriert, daß der, auf T-Zellen exprimierte „*T-Body*“-anti-CD22 eine starke zytotoxische Aktivität gegenüber Raji-Zellen aufweist. Die spezifische Lyse nahm von den Verhältnissen (Effektor-/Tumorzelle) 25:1 (9%), 1:1 (19%) über 10:1 (21%) zu. Aus diesem Grund kann festgehalten werden, dass der „*T-Body*“, trotz der Verwendung einer „ungesorteten“ T-Zellpopulation (29,35%) eine effektive spezifische Lyse aufweist. Um eine unspezifische Lyse ausschließen zu können, kann in Zukunft eine Kontrolle durchgeführt werden, die eine unspezifische scFv-Fusion darstellt, wobei die Menge der exprimierten Fusionsproteine dieser entsprechen müßte. Im Vergleich zu immortalisierten CTL ist aufgrund der zuvor schon erwähnten Veränderung des Phänotypes auch ein Unvermögen der zytotoxischen Funktionalität zu erkennen. Sind jedoch diese Zellen zusätzlich positiv für den „*T-Body*“-anti-CD22 so wird die Zytotoxizität wieder erhöht.

Somit läßt sich zusammenfassen, daß der Einsatz von „*T-Body*’s“ gegen den NHL-Marker CD22 zu einer Tumoreliminierung führt.

Die Aktivität der transfizierten CTL wurde über einen INF- γ -spezifischen ELISPOT-Test bestimmt. Bei einer Kokultivierung mit allogenen PBL ist eine erhöhte INF- γ -Ausschüttung bei den Doppeltransfektanten „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT, gefolgt von den hTERT-positiven CTL und schließlich mit der niedrigsten INF- γ -Sekretion die CTL mit exprimierten „*T-Body*“-anti-CD22, zu finden. Zu beachten jedoch ist, daß die Zytokinproduktion der CTL ohne PBL sich umgekehrt zu der obig beschriebenen Reihenfolge verhält. In diesem Fall ist die INF- γ -Produktion der CTL, welche mit dem „*T-Body*“-anti-CD22 ausgestattet ist, am höchsten. Bei der Doppeltransfektante ist eine Reduktion der INF- γ -Sekretion zu erkennen, die unter dem Wert der unbehandelten CTL liegt. Es konnte beobachtet werden, daß die

Zytotoxizität wie auch der Aktivierungsstatus der hier eingesetzten Zellen nicht in Relation miteinander stehen.

7.4 Transiente Transformation von CTL mittels Nukleofektion

Der Einsatz retroviraler Vektoren zur Gentherapie im Patienten ist in den letzten Jahren in Kritik geraten. Trotz aller Fortschritte wurde der gentherapeutische Denkansatz des adoptiven Transfers eingeschränkt. Die klinische Anwendung einer Gentherapie führte, durch Gabe eines adenoviralen Vektors, zu einem organischem Versagen mit tödlichem Ausgang (Marshall 1999).

Mit diesem Hintergrund wurde zur medizinischen Vorbereitung des Einsatzes retroviraler Vektoren in der Gentherapie, die Methode der Nukleofektion als Ausweichmöglichkeit untersucht.

Diese Untersuchungen haben ergeben, daß die Verwendung der Nukleofektion ein ineffizienter Gentransfer in T-Zellen ist. Trotz des Vorteils, sich von dem Prinzip der retroviralen Infektion distanzieren zu können, konnten in den parallel durchgeführten Experimenten der retroviralen Infektion von CTL keine verbesserten Ergebnisse durch Nukleofektion erzielt werden. Die Integration des Inserts und die Expression des „*T-Body*“-anti-CD22 wie auch des hTERT ergaben nach dem FACS-Scan daß hier auch der „*T-Body*“ (16,6%) erfolgreich auf der Zelloberfläche exprimiert wurde und die hTERT-Transformation (16,04%) erfolgreich war. Jedoch ist diese Methode, abgesehen von der zeitlichen Reduktion ihrer Stabilität wie auch Effizienz, mit einer drastisch hohen Anzahl an toten Zellen in Verbindung zu bringen. Aufgrund dessen ist die Durchführung von Experimenten begrenzt. Dies begründet sich in der geringen Zellzahl, die bei der Nukleofektion einzusetzenden CTL und anschließend in der drastischen Herrabsetzung der Überlebensrate. Es konnte aber eine Expression der beiden Konstrukte mittels, der zuvor durchgeführten Methoden, wie der anti-*c-myc*-Detektion per FACS-Analyse und der hTERT-spezifischen PCR, bestätigt werden. Es wurde bei der ersten Methode, im Vergleich zur GFP-FACS-Messung, höhere prozentuale Anteile gefunden („*T-Body*“-anti-CD22: 30,77%; „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT: 12,04%). Dies ist vermutlich darin begründet, daß, durch die erhöhte Anzahl an absterbenden Zellen und Zelltrümmern, eine Bindung des Antikörpers nicht mehr sterisch behindert wird.

Das zytotoxische Potential der Zellen, die *in vitro* die transformierten Gene exprimieren, ist u.a. gezeigt worden. Die „*T-Body*“-anti-CD22 positiven CTL, wiesen bei einem Verhältnis von 1:1 eine spezifische Zytotoxizität von 3,28% und bei 25:1 eine Lyse von 14,75% auf.

Im ELISPOT-Experiment konnte die höchste INF- γ -Ausschüttung bei der Transfektante „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT / PBL festgestellt werden. Im Falle der hTERT-positiven CTL und „*T-Body*“-anti-CD22 CTL, mit PBL inkubiert, wurde keine Produktion erkannt. Jedoch ist die Zytokinproduktion der CTL ohne PBL-Inkubation, welche mit dem „*T-Body*“-anti-CD22 ausgestattet sind, am geringsten. Dies trifft auch bei den hTERT-positiven CTL zu. Bei der Doppeltransfektante ist eine Zunahme des der INF- γ –S□□□e□□□□□□ erkennen. Jedoch ist hierbei ebenfalls zu erwähnen, daß durch die hohe Anzahl an toten Zellen, wie auch durch die transiente Transformation, das ELISPOT-Ergebnis beeinträchtigt werden konnte.

7.5 *Retrovirale Infektion von CTL-Klonen*

Die begrenzte Lebensspanne von humanen CTL („bulk“) behindert aus Gründen nicht ausreichend vorhandener Zellen eine adoptive Transfertherapie. Der Einsatz des Immortalisationskonstruktes wird parallel zu diesen auf seine Wirksamkeit und Funktionalität in Antigen-spezifischen CTL-Klonen untersucht. Die mögliche klinische Anwendbarkeit, so transduzierter Antigen-spezifischer CTL-Klone, hängt nicht nur von der Stabilität der Transfektion ab, sondern auch davon, ob die infizierten Zellen weiterhin ihre Funktion als Antitumor-Effektorzellen wahrnehmen können. Der Effekt der hTERT-Transfektion auf die Vitalität von humanen CTL wurde schon von drei unabhängigen Autoren beschrieben. Von Migliaccio und Kollegen konnte demonstriert werden, daß eine ectopische Expression des hTERT nicht ausreichend war, um CTL („bulk“-Kulturen zu immortalisieren (Migliaccio et al. 2000). Hooijberg und Mitarbeiter, wie auch Rufer mit ihrer Gruppe, konnten eine erhöhte Lebensspanne, in Bezug auf CTL-Klone, zeigen (Hooijberg et al. 2000; Rufer et al. 2001).

Bei dem Protokoll, zur erfolgreichen retroviralen Transduktion der humanen CTL-Klone erwies es sich als notwendig, den transfizierten Zellen optimale Kultivierungsbedingungen zu bieten. Hierzu zeigte sich eine permanente Gabe von geringen Mengen IL-2 (10 U/ml) als notwendig. Ebenfalls mußten die infizierten Zellen, genau wie der parentale Klon, alle sieben Tage mit peptidbeladenen sublethal bestrahlte autologen B-Zellen, welche als Ammenzellen fungieren, restimuliert werden.

Die erfolgte Transduktion konnte, sowohl durch Nachweis der hTERT-mRNA in den Transfektanten (spezifische PCR auf der cDNA der Zellen), als auch durch durchflußzytometrische Bestimmung des „*T-Body*’s“ (3,98%) auf der Zelloberfläche und dem „*T-Body*’s“ mit integrierten hTERT-DNA (3,66%), mit einer Senkung der erfolgten Expressionsrate von 10% gezeigt werden. Jedoch konnte eine gesteigerte Transfektionseffizienz der hTERT-positiven Klone (23,49%) bestätigt werden und der Effekt der Immortalisierung von CTL-Klonen ist eingetreten. Die zusätzliche Bestätigung der Transduktion des retroviralen „*T-Body*“-anti-CD22-Konstruktes durch den anti-*c-myc* Antikörper, konnte nur im Falle der einfach infizierten „*T-Body*“-anti-CD22-CTL-Klone (2,29%) erhalten werden. Aufgrund eines vermutlich veränderten Oberflächenstatus dieser Klone, im Vergleich zu CTL („bulk“), ist eine geringe Differenz von der GFP- und der *c-myc*-Detektion-FACS-Analyse, ersichtlich.

Das in dieser Arbeit angewandte hTERT-System konnte durch Immortalisierung und Proliferation der CTL-Klone experimentell bestimmt werden, jedoch nicht von primären CTL. Demnach entsprechen diese Ergebnisse den Erkenntnissen, der zuvor schon erwähnten Arbeiten (Hooijberg et al. 2000; June et al. 1994; Rufer et al. 2001).

Aufgrund dieser Bestätigung des hTERT-Konzeptes, spezifisch für CTL-Klone, kann das Miteinfließen von Immortalisationsfaktoren eine mögliche Erklärung für die Werte des erhaltenen JAM-Testes sein. Diese Faktoren sind, die erhöhte Vitalität und der damit verbundenen Proliferation (6.8.7.), wie auch der gesteigerten Transfektionseffizienz der hTERT-DNA in CTL-Klone (6.8.3.). Das bedeutet, daß für dieses erhaltene umgekehrte Verhältnis der spezifischen Lyse, der hTERT in der Lage ist eine unspezifische Aktivierung der CTL-Klone auszulösen. Aus diesem Grunde konnte eine Zytotoxizitätsrate, welche zwischen den Transfektanten „*T-Body*“-anti-CD22 und „*T-Body*“-anti-CD22/hTERT liegt, erhalten werden.

Bei CTL-„bulk“-Kulturen kann der „*T-Body*“-anti-CD22 durch seine Vitalität und Proliferation zu eine Stabilisierung der Zelle führen (siehe Abb.: 33). Dies ist womöglich bei Einsatz des „*T-Body*“-anti-CD22 bei CTL-Klonen ebenfalls zu erwarten. Somit konnte trotz der sehr geringen Infektionseffizienz (6.8.3.) noch eine spezifische Lyse demonstriert werden. Es liegt der Verdacht nahe, daß sich das zuvor eingesetzte Zellzahlverhältnis nur zugunsten der hTERT Transfektante nach oben verschoben hat. Durch die Kombination der Eigenschaften des „*T-Body*“-anti-CD22 und des hTERT bei der Doppeltransfektante, trotz der nicht allzu erhöhten Transfektionsrate, wurden Werte der spezifischen Lyse bis zu 100% erreicht.

Der JAM-Test ist sehr sensitiv und somit nur bei Einsatz der CTL-Klon bedingt interpretierbar. Da dieser die Plateauphase der maximalen Lyse erreicht hat, können diese Ergebnisse mögliche irrealer Werte darstellen (Cochlovius, persönliche Mitteilung). Diese Ergebnisse sind vermutlich auf Meßartefakte zurückzuführen.

Es wurde bei den, nur zu 3,98% positiv transfizierten „*T-Body*“-anti-CD22 CTL-Klonen, eine geringe Zytotoxizität erkannt. Dies wurde widererwartend bei der Bestimmung des zytotoxischen Potentials von infizierten CTL „bulk“ und im Vergleich des Gesamtbildes der anderen Transfektanten (CTL-Klone) bestätigt. Denn bei einem Verhältnis von 25:1 wurde eine spezifische Lyse von 52% und bei einer Relation von 10:1 von 1% festgestellt. Eine gering erhöhte spezifische Zytotoxizität wurde hingegen bei hTERT-positiven CTL-Klonen (23,49%) erhalten. Hier wurde bei einem prozentualen Verhältnis von 25:1 der Effektorzellen zu Zielzellen eine Lyse von 39% und bei 10:1 eine Zytotoxizität in Höhe von 57,6% erzielt. Während, wie im Falle bei einem Verhältnis von 1:1 der beiden Transfektanten „*T-Body*“-anti-CD22 und hTERT CTL-Klone, keine spezifische Lyse zu erfassen war. Die zytotoxische Bestimmung der Doppeltransfektante ist mit den vorherigen Ergebnissen nicht in Zusammenhang zu bringen, da bei dieser Doppeltransfektante bei einem Verhältnis von 1:1, 63% und bei 10:1 und 25:1 eine 100%-ige spezifische Lyse zu beobachten war.

Auch der Aktivierungsstatus (INF- γ –Sekretion) ist um ca. 10-15% vermindert und könnte auf die geringe Transfektionseffizienz der CTL-Klone beruhen.

Ein erfolgreiches präklinisches Tiermodell der zellulären adoptiven Therapie eines „*T-Body*’s“ wurde von der Gruppe um Eshhar durchgeführt (Pinthus et al. 2003). In dieser Studie konnte eine Antitumor-spezifische Potenz von transfizierten humanen Lymphozyten, welche auf der Expression eines gegen Prostata-Tumor gerichteten chimären Rezeptors beruht, getestet werden. Es wurde eine erhöhte therapeutische Effizienz dieser anti-*erb2*-positiven Lymphozyten, in Kombination einer systemischen Gabe von IL-2, in der Verzögerung des Tumorwachstums, der Prostata-spezifischen Antigensekretion und eine vollständige Tumoreliminierung in SCID-Mäusen gezeigt.

Im Zusammenhang zu dieser Studie und des Einsatzes des „*T-Body*“-anti-CD22-Konzeptes ist zu bemerken, daß in dieser Arbeit eine hohe Zellzahl, um Tierversuche durchzuführen, zwingend erforderlich ist. Desweiteren war es nicht möglich, im ausreichenden Maße autologe CTL-Spender zu gewinnen, da die Statuten zur Nutzung einer Leukapherese begrenzt sind. Aus diesem Grund wurden transfizierte CTL-Klone zur Therapie ausgewählt.

Es konnte aber kein signifikanter Therapieerfolg mit diesen gering exprimierenden Zellen erzielt werden.

7.6 Ausblick

Trotz aller Fortschritte befindet sich die zelluläre adoptive Immuntherapie immer noch in den Anfängen. Zu dieser Therapie von tumorspezifischen CTL sind Zellzahlen von letztendlich 10^9 - 10^{10} einzusetzen. Hierbei müssen Lösungsansätze zur Problematik der Expansion von „*T-Body*“-exprimierenden autologen T-Zellen, welche mittels des Immortalisations-konstruktes nicht verwirklicht werden konnten, gefunden werden. Dabei sollte beachtet werden, daß keine Veränderungen der Antigen-spezifität und Effektorfunktion miteinhergehen. Die, in der vorliegenden Arbeit gezeigten Nachweise des „*T-Body*'s“ auf CTL-Klonen wurden aufgrund der zu geringen Expressionsrate keine Therapieerfolge erzielt. Jedoch auch die Applikation von definierten Antigen-spezifischen CTL-Klonen ist begrenzt, durch eine relativ geringe Erfolgsrate an der Isolation von ausreichend spezifischen CTL des individuellen Patienten. Eine Perspektive ist in den Arbeiten der New Yorker Gruppe um Sadelain und Mitarbeitern zu finden. Sie demonstrierten eine Expansion von CTL, die gegen CD19 gerichtet waren, in Anwesenheit von CD80 und IL-15. Diese *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse unterstützen die klinische Durchführbarkeit (Brentjens et al. 2003).

Aufgrund der *in vitro* Erprobungen des „*T-Body*'s“ ist eine Kombination mit weiteren scFv, in dieser hier beschriebenen Arbeit, vorstellbar. Die Verwendung eines CD5- oder CEA (karzinoembryogenes Antigen) scFv könnte als ein interessanter Ansatzpunkt für Therapiemodelle bei chronisch-lymphatischer Leukämie bzw. bei Kolonkarzinom in Erwägung gezogen werden. Weitere attraktiv erscheinende Möglichkeiten könnten in der Kombinationstherapie liegen. Hierbei könnte die gleichzeitige Applikation von z.B. des „*T-Body*'s“ und von CD22, gekoppelt mit Immuntoxin, experimentell überprüft werden. Weitere Beispiele könnten den Einsatz des „*T-Body*'s“ in Verbindung mit bispezifischen Antikörpern einschließen.

VIII Literaturverzeichnis

- Abercrombie, M. (1979). "Contact inhibition and malignancy". *Nature* 281:259.
- AC, A. 1991. *Malignant Lymphoma: Biology, natural history, and treatment*. Lea & Febiger, Philadelphia, London.
- Alberts, B. 1994. *The cell*. Garland Publishing, Inc. New York & London.
- Alberts, D. J. E. 1887. *Das Carcinom in historischer und experimentell-pathologischer Beziehung*. Verlag von Gustav Fischer, Jena.
- Algarra, I., T. Cabrera and F. Garrido. (2000). "The HLA crossroad in tumor immunology". *Hum Immunol* 61:65.
- Andres, P., D. Cupissol, B. Guillotet al. (1998). "Subcutaneous interleukin-2 and interferon-alpha therapy associated with cisplatin monochemotherapy in the treatment of metastatic melanoma". *Eur J Dermatol* 8:235.
- Armitage, J. O., J. P. Greer, A. M. Levine et al. (1989). "Peripheral T-cell lymphoma". *Cancer* 63:158.
- Armitage, J. O. and D. D. Weisenburger. (1998). "New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project". *J Clin Oncol* 16:2780.
- Armstrong, T. D., B. A. Pulaski and S. Ostrand-Rosenberg. (1998). "Tumor antigen presentation: changing the rules". *Cancer Immunol Immunother* 46:70.
- Barth, R. J., Jr., M. A. Coppola and W. R. Green. (1996). "In vivo effects of locally secreted IL-10 on the murine antitumor immune response". *Ann Surg Oncol* 3:381.
- Behrens, A., K. Sabapathy, I. Graef et al. (2001). "Jun N-terminal kinase 2 modulates thymocyte apoptosis and T cell activation through c-Jun and nuclear factor of activated T cell (NF-AT)". *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1769.
- Bitton, N., G. Gorochov, P. Debreet al. (1999). "Gene therapy approaches to HIV-infection: immunological strategies: use of T bodies and universal receptors to redirect cytolytic T-cells". *Front Biosci* 4:D386.
- Bodey, B. (2002). "Cancer-testis antigens: promising targets for antigen directed antineoplastic immunotherapy". *Expert Opin Biol Ther* 2:577.
- Boon, T. and L. J. Old. (1997). "Cancer Tumor antigens". *Curr Opin Immunol* 9:681.
- Bosch, F., P. Jares, E. Campo et al. (1994). "PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma". *Blood* 84:2726.

- Brand, A. (1995). "GFP in Drosophila". *Trends Genet* 11:324.
- Brandl, M., L. Grosse-Hovest, E. Holleret al. (1999). "Bispecific antibody fragments with CD20 X CD28 specificity allow effective autologous and allogeneic T-cell activation against malignant cells in peripheral blood and bone marrow cultures from patients with B-cell lineage leukemia and lymphoma". *Exp Hematol* 27:1264.
- Bremers, A. J. and G. Parmiani. (2000). "Immunology and immunotherapy of human cancer: present concepts and clinical developments". *Crit Rev Oncol Hematol* 34:1.
- Brentjens, R. J., J. B. Latouche, E. Santoset al. (2003). "Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15". *Nat Med* 9:279.
- Bruland, O. S. (1995). "Cancer therapy with radiolabeled antibodies. An overview". *Acta Oncol* 34:1085.
- Buchschacher, G. L., Jr. and F. Wong-Staal. (2000). "Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases". *Blood* 95:2499.
- Buzyn, A., F. Petit, M. Ostankovitchet al. (1999). "Membrane-bound Fas (Apo-1/CD95) ligand on leukemic cells: A mechanism of tumor immune escape in leukemia patients". *Blood* 94:3135.
- Campbell, F. A., H. P. Redmond and D. Bouchier-Hayes. (1995). "The role of tumor rejection antigens in host antitumor defense mechanisms". *Cancer* 75:2649.
- Carbone, A., V. Canzonieri, A. Gloghiniet al. (2000). "Burkitt's lymphoma: historical background and recent insights into classification and pathogenesis". *Ann Otol Rhinol Laryngol* 109:693.
- Cardi, G., J. A. Heaney, A. R. Schnedet al. (1998). "Expression of Fas(APO-1/CD95) in tumor-infiltrating and peripheral blood lymphocytes in patients with renal cell carcinoma". *Cancer Res* 58:2078.
- Castelli, C., L. Rivoltini, G. Andreolaet al. (2000). "T-cell recognition of melanoma-associated antigens". *J Cell Physiol* 182:323.
- Chang, A. E., A. Aruga, M. J. Cameronet al. (1997). "Adoptive immunotherapy with vaccine-primed lymph node cells secondarily activated with anti-CD3 and interleukin-2". *J Clin Oncol* 15:796.
- Chang, A. E. and S. Shu. (1996). "Current status of adoptive immunotherapy of cancer". *Crit Rev Oncol Hematol* 22:213.
- Cheever, M. A., M. L. Disis, H. Bernhardt et al. (1995). "Immunity to oncogenic proteins". *Immunol Rev* 145:33.
- Chen, X., A. Woiciechowsky, S. Raffegerstet al. (2000). "Impaired expression of the CD3-zeta chain in peripheral blood T cells of patients with chronic myeloid leukaemia results in an increased susceptibility to apoptosis". *Br J Haematol* 111:817.

- Cochlovius, B., S. M. Kipriyanov, M. J. Stassaret al. (2000). "Treatment of human B cell lymphoma xenografts with a CD3 x CD19 diabody and T cells". *J Immunol* 165:888.
- Cochlovius, B., V. Zawadzki, A. Perschlet al. (1998). "Stable expression of a retrovirally transferred adhesion molecule in a human melanoma-specific cytotoxic T lymphocyte clone". *Cancer Immunol Immunother* 46:61.
- Coley, W. (1896). "Further observations upon the treatment of malignant tumors with the toxins of erysipelas and *Bacillus prodigiosus* with a report of 160 cases". *Bull Johns Hopkins Hospital* 7, p. 157.
- Colomo, L., A. Lopez-Guillermo, M. Perales et al. (2003). "Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma". *Blood* 101:78.
- Costello, R. T., J. A. Gastaut and D. Olive. (1999). "[Mechanisms of tumor escape from immunologic response]". *Rev Med Interne* 20:579.
- Coulie, P. G., V. Brichard, A. Van Pelet et al. (1994). "A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas". *J Exp Med* 180:35.
- Cragg, M. S., R. R. French and M. J. Glennie. (1999). "Signaling antibodies in cancer therapy". *Curr Opin Immunol* 11:541.
- Daly, T., R. E. Royal, M. H. Kershaw et al. (2000). "Recognition of human colon cancer by T cells transduced with a chimeric receptor gene". *Cancer Gene Ther* 7:284.
- Davis, T. A., D. G. Maloney, D. K. Czerwinski et al. (1998). "Anti-idiotypic antibodies can induce long-term complete remissions in non-Hodgkin's lymphoma without eradicating the malignant clone". *Blood* 92:1184.
- DeAngelis, L. M. (1999). "Primary CNS lymphoma: treatment with combined chemotherapy and radiotherapy". *J Neurooncol* 43:249.
- Debatin, K. M. and P. H. Krammer. (2004). "Death receptors in chemotherapy and cancer". *Oncogene* 23:2950.
- Delia, D., A. Aiello, D. Soligo et al. (1992). "bcl-2 proto-oncogene expression in normal and neoplastic human myeloid cells". *Blood* 79:1291.
- Delon, J., C. Gregoire, B. Malissen et al. (1998). "CD8 expression allows T cell signaling by monomeric peptide-MHC complexes". *Immunity* 9:467.
- Demjen, D., S. Klussmann, S. Kleber et al. (2004). "Neutralization of CD95 ligand promotes regeneration and functional recovery after spinal cord injury". *Nat Med* 10:389.

- Devesa, S. S. and T. Fears. (1992). "Non-Hodgkin's lymphoma time trends: United States and international data". *Cancer Res* 52:5432s.
- Dhaene, K., E. Van Marck and R. Parwaresch. (2000). "Telomeres, telomerase and cancer: an up-date". *Virchows Arch* 437:1.
- Diehl, V., R. K. Thomas and D. Re. (2004). "Part II: Hodgkin's lymphoma--diagnosis and treatment". *Lancet Oncol* 5:19.
- Dolcetti, R. and M. Boiocchi. (1996). "Cellular and molecular bases of B-cell clonal expansions". *Clin Exp Rheumatol* 14 Suppl 14:S3.
- Doorduijn, J. K., B. van der Holt, G. W. van Imhoff et al. (2003). "CHOP compared with CHOP plus granulocyte colony-stimulating factor in elderly patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma". *J Clin Oncol* 21:3041.
- Duke, R. C., J. J. Cohen and R. Chervenak. (1986). "Differences in target cell DNA fragmentation induced by mouse cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells". *J Immunol* 137:1442.
- Dupraz, P., C. Rinsch, W. F. Pralong et al. (1999). "Lentivirus-mediated Bcl-2 expression in betaTC-tet cells improves resistance to hypoxia and cytokine-induced apoptosis while preserving in vitro and in vivo control of insulin secretion". *Gene Ther* 6:1160.
- Dutoit, V., R. N. Taub, K. P. Papadopoulos et al. (2002). "Multiepitope CD8(+) T cell response to a NY-ESO-1 peptide vaccine results in imprecise tumor targeting". *J Clin Invest* 110:1813.
- Ehl, S., U. Hoffmann-Rohrer, S. Nagata et al. (1996). "Different susceptibility of cytotoxic T cells to CD95 (Fas/Apo-1) ligand-mediated cell death after activation in vitro versus in vivo". *J Immunol* 156:2357.
- Ehrlich, P. (1909). "Über den jetztigen Stand der Karzinomforschung". *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 1:273.
- Emami, B., C. A. Perez, J. Konefalet et al. (1988). "Thermoradiotherapy of malignant melanoma". *Int J Hyperthermia* 4:373.
- Engelmann, I. and G. Bauer. (2000). "How can tumor cells escape intercellular induction of apoptosis?" *Anticancer Res* 20:2297.
- Engin, K., L. Tupchong, F. M. Waterman et al. (1993). "Hyperthermia and radiation in advanced malignant melanoma". *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 25:87.
- Eshhar, Z. (1997). "Tumor-specific T-bodies: towards clinical application". *Cancer Immunol Immunother* 45:131.
- Eshhar, Z., N. Bach, C. J. Fitzer-Attas et al. (1996). "The T-body approach: potential for cancer immunotherapy". *Springer Semin Immunopathol* 18:199.

- Eshhar, Z. and C. J. Fitzer-Attas. (1998). "Tyrosine kinase chimeras for antigen-selective T-body therapy". *Adv Drug Deliv Rev* 31:171.
- Eshhar, Z., T. Waks, A. Bendavidet al. (2001). "Functional expression of chimeric receptor genes in human T cells". *J Immunol Methods* 248:67.
- Fishleder, A. J. (1990). "Oncogenes and cancer: clinical applications". *Cleve Clin J Med* 57:721.
- French, L. E. and J. Tschopp. (1999). "The TRAIL to selective tumor death". *Nat Med* 5:146.
- Friesen, C., I. Herr, P. H. Krameret al. (1996). "Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells". *Nat Med* 2:574.
- Frost, P. and B. Bonavida. (2000). "Circumvention of tumor cell escape following specific immunotherapy". *Cancer Biother Radiopharm* 15:141.
- Fulda, S., E. Meyer and K. M. Debatin. (2000). "Metabolic inhibitors sensitize for CD95 (APO-1/Fas)-induced apoptosis by down-regulating Fas-associated death domain-like interleukin 1-converting enzyme inhibitory protein expression". *Cancer Res* 60:3947.
- Greene, L. A., Sobeih, M.M. und Teng, K.K. 1991. *Culturing Nerve Cells*. Bancroft and Gorlin, MIT Press.
- Hahne, M., D. Rimoldi, M. Schroteret al. (1996). "Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape [see comments]". *Science* 274:1363.
- Hanson, H. L., D. L. Donermeyer, H. Ikedaet al. (2000). "Eradication of established tumors by CD8+ T cell adoptive immunotherapy [In Process Citation]". *Immunity* 13:265.
- Harris, N. L., E. S. Jaffe, H. Stein et al. (1994). "A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group". *Blood* 84:1361.
- Herrera, L., R. A. Farah, V. A. Pellegriniet al. (2000). "Immunotoxins against CD19 and CD22 are effective in killing precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells in vitro". *Leukemia* 14:853.
- Heslop, H. E., C. Y. Ng, C. Liet al. (1996). "Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes". *Nat Med* 2:551.
- Hicklin, D. J., Z. Wang, F. Arientiet al. (1998). "beta2-Microglobulin mutations, HLA class I antigen loss, and tumor progression in melanoma". *J Clin Invest* 101:2720.

- Hooijberg, E., J. J. Ruizendaal, P. J. Snijders et al. (2000). "Immortalization of human CD8(+) T cell clones by ectopic expression of telomerase reverse transcriptase [In Process Citation]". *J Immunol* 165:4239.
- Hu, J., W. Kindsvogel, S. Busby et al. (1993). "An evaluation of the potential to use tumor-associated antigens as targets for antitumor T cell therapy using transgenic mice expressing a retroviral tumor antigen in normal lymphoid tissues". *J Exp Med* 177:1681.
- Hwu, P. and S. A. Rosenberg. (1994). "The genetic modification of T cells for cancer therapy: an overview of laboratory and clinical trials". *Cancer Detect Prev* 18:43.
- Ibelgaufts, H. 1992. *Gentechnologie von A bis Z : Studienausgabe*. Weinheim, VHC, Weinheim.
- Igney, F. H., C. K. Behrens and P. H. Krammer. (2000). "Tumor counterattack--concept and reality". *Eur J Immunol* 30:725.
- Igney, F. H. and P. H. Krammer. (2002). "Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis". *Nat Rev Cancer* 2:277.
- Jaffe, E. S., N. L. Harris, J. Diebold et al. (1999). "World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. A progress report". *Am J Clin Pathol* 111:S8.
- Jaffee, E. M. (1999). "Immunotherapy of cancer". *Ann N Y Acad Sci* 886:67.
- Janeway, C. A. 1999. *Immunobiology : the immune system in health and disease*. London: Current Biology Publications; New York, NY, USA,: Garyland.
- Jantschkeff, P., R. Herrmann and C. Rochlitz. (1999). "Cancer gene and immunotherapy: recent developments". *Med Oncol* 16:78.
- June, C. H., J. A. Bluestone, L. M. Nadler et al. (1994). "The B7 and CD28 receptor families". *Immunol Today* 15:321.
- Kang, X., P. F. Robbins, E. B. Fitzgerald et al. (1997). "Induction of melanoma reactive T cells by stimulator cells expressing melanoma epitope-major histocompatibility complex class I fusion proteins". *Cancer Res* 57:202.
- Kast, W. M., R. Offringa, P. J. Peters et al. (1989). "Eradication of adenovirus E1-induced tumors by E1A-specific cytotoxic T lymphocytes". *Cell* 59:603.
- Kaufmann, S. H. and D. L. Vaux. (2003). "Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance". *Oncogene* 22:7414.
- Kinoshita, H., H. Yoshikawa, K. Shiiki et al. (2000). "Cisplatin (CDDP) sensitizes human osteosarcoma cell to Fas/CD95-mediated apoptosis by down-regulating FLIP-L expression". *Int J Cancer* 88:986.

- Kipriyanov, S. M., B. Cochlovius, H. J. Schaferet al. (2002). "Synergistic antitumor effect of bispecific CD19 x CD3 and CD19 x CD16 diabodies in a preclinical model of non-Hodgkin's lymphoma". *J Immunol* 169:137.
- Kirkin, A. F., K. Dzhandzhugazyan and J. Zeuthen. (1998). "Melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes". *Apmis* 106:665.
- Klas, C., K. M. Debatin, R. R. Jonkeret al. (1993). "Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells". *Int Immunol* 5:625.
- Knuth, A., B. Danowski, H. F. Oettgenet al. (1984). "T-cell-mediated cytotoxicity against autologous malignant melanoma: analysis with interleukin 2-dependent T-cell cultures". *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:3511.
- Kolb, H. J. and E. Holler. (1997). "Adoptive immunotherapy with donor lymphocyte transfusions". *Curr Opin Oncol* 9:139.
- Kolb, H. J., J. Mittermuller, C. Clemmet al. (1990). "Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients". *Blood* 76:2462.
- Kosits, C. and M. Callaghan. (2000). "Rituximab: a new monoclonal antibody therapy for non-Hodgkin's lymphoma". *Oncol Nurs Forum* 27:51.
- Krammer, P. H. (1999). "CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die". *Adv Immunol* 71:163.
- Labrecque, S., N. Naor, D. Thomsonet al. (1993). "Analysis of the anti-p53 antibody response in cancer patients". *Cancer Res* 53:3468.
- Lanzavecchia, A., G. Lezzi and A. Viola. (1999). "From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior". *Cell* 96:1.
- Laver, J., M. Amylon, S. Desaiet al. (1998). "Randomized trial of r-metHu granulocyte colony-stimulating factor in an intensive treatment for T-cell leukemia and advanced-stage lymphoblastic lymphoma of childhood: a Pediatric Oncology Group pilot study". *J Clin Oncol* 16:522.
- Levi, F., C. La Vecchia, F. Lucchiniet al. (1996). "Worldwide trends in cancer mortality in the elderly, 1955-1992". *Eur J Cancer* 32A:652.
- Maloney, D. G., A. J. Grillo-Lopez, D. J. Bodkinet al. (1997). "IDEC-C2B8: results of a phase I multiple-dose trial in patients with relapsed non-Hodgkin's lymphoma". *J Clin Oncol* 15:3266.
- Maniatis. 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons Inc.
- Marshall, E. (1999). "Gene therapy death prompts review of adenovirus vector". *Science* 286:2244.

- Matzinger, P. (1991). "The JAM test. A simple assay for DNA fragmentation and cell death". *J Immunol Methods* 145:185.
- Melnyk, A., A. Rodriguez, W. C. Pugh et al. (1997). "Evaluation of the Revised European-American Lymphoma classification confirms the clinical relevance of immunophenotype in 560 cases of aggressive non-Hodgkin's lymphoma". *Blood* 89:4514.
- Meyer, R. M., G. P. Browman, M. L. Samoshet et al. (1995). "Randomized phase II comparison of standard CHOP with weekly CHOP in elderly patients with non-Hodgkin's lymphoma". *J Clin Oncol* 13:2386.
- Meyerson, M. (2000). "Role of telomerase in normal and cancer cells". *J Clin Oncol* 18:2626.
- Mezzanzanica, D., S. Canevari, A. Mazzoni et al. (1998). "Transfer of chimeric receptor gene made of variable regions of tumor-specific antibody confers anticarbohydrate specificity on T cells". *Cancer Gene Ther* 5:401.
- Migliaccio, M., M. Amacker, T. Just et al. (2000). "Ectopic human telomerase catalytic subunit expression maintains telomere length but is not sufficient for CD8+ T lymphocyte immortalization". *J Immunol* 165:4978.
- Minev, B. R., F. L. Chavez and M. S. Mitchell. (1998). "New trends in the development of cancer vaccines". *In Vivo* 12:629.
- Morgan, D. A., F. W. Ruscetti and R. Gallo. (1976). "Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows". *Science* 193:1007.
- Mounier, N., J. Briere, C. Gisselbrecht et al. (2003). "Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2--associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)". *Blood* 101:4279.
- Mukherji, B. and T. J. MacAlister. (1983). "Clonal analysis of cytotoxic T cell response against human melanoma". *J Exp Med* 158:240.
- Muller, M. R., G. Tsakou, F. Grunebach et al. (2004). "Induction of chronic lymphocytic leukemia (CLL)-specific CD4- and CD8-mediated T-cell responses using RNA-transfected dendritic cells". *Blood* 103:1763.
- Munoz, N. and F. X. Bosch. (1997). "Biomarkers for biological agents". *IARC Sci Publ*:127.
- Munster, P. N. and L. Norton. (2001). "Predictive factor for the response to adjuvant therapy with emphasis in breast cancer". *Breast Cancer Res* 3:361.
- Naldini, L., U. Blomer, F. H. Gage et al. (1996). "Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector". *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11382.

- Neumann, E., A. Engelsberg, J. Decker et al. (1998). "Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens RAGE-1, PRAME, and glycoprotein 75 in human renal cell carcinoma: candidates for T-cell-based immunotherapies?" *Cancer Res* 58:4090.
- Old, L. J. (1981). "Cancer immunology: the search for specificity--G. H. A. Clowes Memorial lecture". *Cancer Res* 41:361.
- Parish, R. W., C. Schmidhauser, T. Schmidt et al. (1987). "Mechanisms of tumour cell metastasis". *J Cell Sci Suppl* 8:181.
- Pawelec, G., S. Heinzl, R. Kiessling et al. (2000). "Escape mechanisms in tumor immunity: a year 2000 update [In Process Citation]". *Crit Rev Oncog* 11:97.
- Pawson, R., M. J. Dyer, R. Barge et al. (1997). "Treatment of T-cell prolymphocytic leukemia with human CD52 antibody". *J Clin Oncol* 15:2667.
- Penna, C., P. A. Dean and H. Nelson. (1994). "Antitumor x anti-CD3 bifunctional antibodies redirect T-cells activated in vivo with staphylococcal enterotoxin B to neutralize pulmonary metastases". *Cancer Res* 54:2738.
- Peter, K., U. Weirich, T. K. Nordt et al. (1999). "Soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) as potential marker of atherosclerosis". *Thromb Haemost* 82 Suppl 1:38.
- Pinthus, J. H., T. Waks, K. Kaufman-Francis et al. (2003). "Immuno-gene therapy of established prostate tumors using chimeric receptor-redirected human lymphocytes". *Cancer Res* 63:2470.
- Plautz, G. E., G. H. Barnett, D. W. Miller et al. (1998). "Systemic T cell adoptive immunotherapy of malignant gliomas". *J Neurosurg* 89:42.
- Pollok, K. E., H. Hanenberg, T. W. Noblitt et al. (1998). "High-efficiency gene transfer into normal and adenosine deaminase-deficient T lymphocytes is mediated by transduction on recombinant fibronectin fragments". *J Virol* 72:4882.
- Pschyrembel, W. 1998. *Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Rassidakis, G. Z., L. J. Medeiros, T. P. Vassilakopoulos et al. (2002). "BCL-2 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease predicts a poorer prognosis in patients treated with ABVD or equivalent regimens". *Blood* 100:3935.
- Rickinson, A. B. (1995). "Immune intervention against virus-associated human cancers". *Ann Oncol* 6 Suppl 1:69.
- Riddell, S. R., K. S. Watanabe, J. M. Goodrich et al. (1992). "Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones". *Science* 257:238.

- Robbins, P. F., M. el-Gamil, Y. Kawakami et al. (1994). "Recognition of tyrosinase by tumor-infiltrating lymphocytes from a patient responding to immunotherapy". *Cancer Res* 54:3124.
- Rosenberg, S. A., M. T. Lotze, L. M. Muulet et al. (1985). "Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer". *N Engl J Med* 313:1485.
- Rosenberg, S. A., M. T. Lotze, J. C. Yanget et al. (1993). "Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer". *J Natl Cancer Inst* 85:622.
- Rosenberg, S. A., P. Spiess and R. Lafreniere. (1986). "A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes". *Science* 233:1318.
- Rosenberg, S. A., J. R. Yannelli, J. C. Yanget et al. (1994). "Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2 [see comments]". *J Natl Cancer Inst* 86:1159.
- Rufer, N., M. Migliaccio, J. Antonchuk et al. (2001). "Transfer of the human telomerase reverse transcriptase (TERT) gene into T lymphocytes results in extension of replicative potential". *Blood* 98:597.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffelet et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase". *Science* 239:487.
- Salgaller, M. L., F. M. Marincola, J. N. Cormier et al. (1996). "Immunization against epitopes in the human melanoma antigen gp100 following patient immunization with synthetic peptides". *Cancer Res* 56:4749.
- Sambrook, J. F., E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sant'Angelo, D. B., B. Lucas, P. G. Waterbury et al. (1998). "A molecular map of T cell development". *Immunity* 9:179.
- Scaffidi, C., S. Kirchhoff, P. H. Kramer et al. (1999). "Apoptosis signaling in lymphocytes". *Curr Opin Immunol* 11:277.
- Schmitz, I., H. Weyd, A. Krueger et al. (2004). "Resistance of short term activated T cells to CD95-mediated apoptosis correlates with de novo protein synthesis of c-FLIP(short)". *J Immunol* 172:2194.
- Schultze, J. L. (1997). "Vaccination as immunotherapy for B cell lymphoma". *Hematol Oncol* 15:129.
- Schultze, J. L., M. J. Seamon, S. Michalak et al. (1997). "Autologous tumor infiltrating T cells cytotoxic for follicular lymphoma cells can be expanded in vitro". *Blood* 89:3806.

- Siegert, W., C. Nerl, A. Agthe et al. (1995). "Angioimmunoblastic lymphadenopathy (AILD)-type T-cell lymphoma: prognostic impact of clinical observations and laboratory findings at presentation. The Kiel Lymphoma Study Group". *Ann Oncol* 6:659.
- Slamon, D. J., G. M. Clark, S. G. Wong et al. (1987). "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene". *Science* 235:177.
- Sonneveld, P., M. de Ridder, H. van der Lelie et al. (1995). "Comparison of doxorubicin and mitoxantrone in the treatment of elderly patients with advanced diffuse non-Hodgkin's lymphoma using CHOP versus CNOP chemotherapy". *J Clin Oncol* 13:2530.
- Speiser, D. E., R. Miranda, A. Zakarian et al. (1997). "Self antigens expressed by solid tumors Do not efficiently stimulate naive or activated T cells: implications for immunotherapy". *J Exp Med* 186:645.
- Spina, M., E. Vaccher, G. Nasti et al. (2000). "Human immunodeficiency virus-associated Hodgkin's disease". *Semin Oncol* 27:480.
- Staveley-O'Carroll, K., E. Sotomayor, J. Montgomery et al. (1998). "Induction of antigenspecific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression". *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1178.
- Steger, G. G., R. Kaboo, J. B. deKernion et al. (1995). "The effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on tumour-infiltrating lymphocytes from renal cell carcinoma". *Br J Cancer* 72:101.
- Steis, R. G., K. A. Foon and D. L. Longo. (1987). "Current and future uses of recombinant interferon alpha in the treatment of low-grade non-Hodgkin's lymphoma". *Cancer* 59:658.
- Stepp, S. E., P. A. Mathew, M. Bennett et al. (2000). "Perforin: more than just an effector molecule". *Immunol Today* 21:254.
- Stewart, B. W., H. Greim, D. Shuker et al. (2003). "Defence of IARC monographs". *Lancet* 361:1300.
- Strasser, A., L. O'Connor and V. M. Dixit. (2000). "Apoptosis signaling". *Annu Rev Biochem* 69:217.
- Straus, S. E., E. S. Jaffe, J. M. Puck et al. (2001). "The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis". *Blood* 98:194.
- Stull, R. A., W. C. Hyun and M. G. Pallavicini. (2000). "Simultaneous flow cytometric analyses of enhanced green and yellow fluorescent proteins and cell surface antigens in doubly transduced immature hematopoietic cell populations". *Cytometry* 40:126.

- Tirelli, U., D. Errante, M. Van Glabbeke et al. (1998). "CHOP is the standard regimen in patients ≥ 70 years of age with intermediate-grade and high-grade non-Hodgkin's lymphoma: results of a randomized study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Lymphoma Cooperative Study Group". *J Clin Oncol* 16:27.
- Torre-Amione, G., R. D. Beauchamp, H. Koeppen et al. (1990). "A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance". *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1486.
- Tosi, D., R. Valenti, A. Cova et al. (2004). "Role of cross-talk between IFN- α -induced monocyte-derived dendritic cells and NK cells in priming CD8 $^{+}$ T cell responses against human tumor antigens". *J Immunol* 172:5363.
- Trosko, J. E. and R. J. Ruch. (1998). "Cell-cell communication in carcinogenesis [In Process Citation]". *Front Biosci* 3:D208.
- van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez et al. (1991). "A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma". *Science* 254:1643.
- Vassallo, J., K. Metzger, F. Traina et al. (2003). "The prognostic relevance of apoptosis-related proteins in classical Hodgkin's lymphomas". *Leuk Lymphoma* 44:483.
- Viard, I., P. Wehrli, R. Bullani et al. (1998). "Inhibition of toxic epidermal necrolysis by blockade of CD95 with human intravenous immunoglobulin". *Science* 282:490.
- Vose, J. M. (1996). "Classification and clinical course of low-grade non-Hodgkin's lymphomas with overview of therapy". *Ann Oncol* 7:S13.
- Walczak, H., A. Bouchon, H. Stahel et al. (2000). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand retains its apoptosis-inducing capacity on Bcl-2- or Bcl-xL-overexpressing chemotherapy-resistant tumor cells". *Cancer Res* 60:3051.
- Walczak, H. and P. H. Krammer. (2000). "The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems". *Exp Cell Res* 256:58.
- Waldmann, T. A. (1986). "Immunodeficiency: immunoregulation and immunogenetics". *Clin Immunol Immunopathol* 40:25.
- Waldmann, T. A. (1991). "Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy". *Science* 252:1657.
- Wang, Z., B. Seliger, N. Mike et al. (1998). "Molecular analysis of the HLA-A2 antigen loss by melanoma cells SK-MEL-29.1.22 and SK-MEL-29.1.29". *Cancer Res* 58:2149.
- Waugh, S. M., J. L. Harris, R. Fletcher et al. (2000). "The structure of the pro-apoptotic protease granzyme B reveals the molecular determinants of its specificity". *Nat Struct Biol* 7:762.

- Wiley, J. (2000). "Alternate Protocol 1: Immunohistochemical staining of cultured cells". *Current Protocols in Immunology*.
- Wiley, S. R., K. Schooley, P. J. Smolaket al. (1995). "Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis". *Immunity* 3:673.
- Willemsen, R. A., M. E. Weijtens, C. Ronteltapet al. (2000). "Grafting primary human T lymphocytes with cancer-specific chimeric single chain and two chain TCR [In Process Citation]". *Gene Ther* 7:1369.
- Wingo, P. A., L. A. Ries, H. M. Rosenberget al. (1998). "Cancer incidence and mortality, 1973-1995: a report card for the U.S". *Cancer* 82:1197.
- Wolfel, T., M. Hauer, J. Schneideret al. (1995). "A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma". *Science* 269:1281.
- Wolfel, T., A. Van Pel, V. Brichardet al. (1994). "Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes". *Eur J Immunol* 24:759.
- Wyllie, A. H. (1992). "Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview". *Cancer Metastasis Rev* 11:95.
- Zawisza, E. (1994). "[Pathophysiology of chronic allergic rhinitis]". *Otolaryngol Pol* 48:24.
- Zewe-Welschhof, D. M. (1997). "Herstellung und Charakterisierung von Immuntoxinen: Fusionsproteine aus menschlichen Ribonukleasen und rekombinanten Antikörperfragmenten". In *Abt. Rekombinante Antikörper, DKFZ*. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Heidelberg, p. 98.
- Zinkernagel, R. M. and P. C. Doherty. (1979). "MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness". *Adv Immunol* 27:51.

IX Anhang

#476 pBullet-aCD22-CD28-g-IRES-GFP

Cut #315 RSV-aCD22-Ig-gamma with NcoI- BstEII and clone into #412 pBullet-yol-sNDF-CD28-g-IRES-GFP cut with BstEII- Sfil (2.8 kb) and Sfil-NcoI (4.5 kb). Check with XbaI-BstEII or PstI (fragments are 1456,770,559,176).

pRSV-scFv-anti-CD22-Ig-gamma

```

TACGTACCATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCA
651 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 710
      M D F Q V Q I F S F L L I S A S V I -
      |<+++++ leader ++++++
TAAATGTCTAGAGGTCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAG
711 -----+-----+-----+-----+-----+ 770
      M S R G Q V Q L Q Q S G G G L V K P G G -
      ++++++>|<-----Heavy-----
GGTCCCTGAAACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTTCAGTTTCAGTGAATACATGTTTT
771 -----+-----+-----+-----+-----+ 830
      S L K L S C A A S G F S F S D Y Y M F W -
      -----Heavy-----
GGGTTTCGCCAGACTCCGGAAAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGATGGTGGTA
831 -----+-----+-----+-----+-----+ 890
      V R Q T P E K R L E W V A T I S D G G T -
      -----Heavy-----
CTTACACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCA
891 -----+-----+-----+-----+-----+ 950
      Y T Y Y P D S V K G R F T I S R D N A R -
      -----Heavy-----
GGAACAACCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGATGACACAGCCATATATTACT
951 -----+-----+-----+-----+-----+ 1010
      N N L Y L Q M S S L K S D D T A I Y Y C -
      -----Heavy-----
GTGGAAGAGAGGGGGGAACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCA
1011 -----+-----+-----+-----+-----+ 1070
      G R E G G N Y W G Q G T T L T V S S A K -
      -----|<**
AAACGACACCCAAGCTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACGCGTAGATATCTTGCTGA
1071 -----+-----+-----+-----+-----+ 1130
      T T P K L E E G E F S E A R V D I L L T -
      ***** Linker *****>|^^^^^^^^^^^^

```

