

***In vitro*-Studien zur Generierung bi-spezifischer T-Zellen durch
T-Zell-Antigenrezeptor-Gentransfer**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Diana Knies

geb. am 5.10.1980 in Wiesbaden

Mainz, 2012

Dekan:

1. Berichterstatter:
2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	T-Zell-Immuntherapie	1
1.2	Risiken des TZR-Gentransfers durch „ <i>off target</i> “-zielungerichtete Reaktionen	5
1.3	Gestaltung von TZR-Konstrukten	8
1.4	Optimierungsprozesse zur Förderung der Expression und Funktionalität eines TZR.....	12
1.5	Klassifizierung von Tumor-assoziierten Antigenen (TAA)	13
1.6	pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -Virus-spezifische / Tumorantigen- und pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -bi-spezifische T-Zellen für den adoptiven TZR-Transfer	16
1.7	Ziele der Untersuchung	19
2	Materialien.....	20
2.1	Chemikalien	20
2.2	Substanzen und Medien für die Zellkultur	21
2.3	Zellkulturmedien	22
2.3.1	Komplettes RPMI zur Kultivierung von humanen Zelllinien (10 % RPMI)	22
2.3.2	Komplettes RPMI zur Kultivierung von humanen PBMZ und CMV-spezifischen T-Zellen (hu RPMI).....	23
2.3.3	Komplettes DMEM zur Kultivierung von Verpackungszelllinien/ Phoenix-Zelllinien (10 % DMEM)	23
2.3.4	Komplettes RPMI zur Kultivierung der murinen T-Zell-Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ	23
2.4	Medium zur Kryokonservierung von Zellen	24
2.5	Peptide	24
2.6	Substanzen für die Bakterienkultur	24

2.6.1	LB-Medium zur Kultivierung von Bakterienkulturen	25
2.6.2	LB-Platten zur Kultivierung von Bakterienkulturen.....	25
2.7	Kommerzielle Versuchssysteme	25
2.7.1	Punktmutagenese-PCR	25
2.7.2	Plasmid-Extraktion	25
2.7.3	DNS-Aufreinigung	26
2.7.4	DNS-Marker zur Gelelektrophorese.....	26
2.7.5	Transfektionsreagenzien.....	26
2.7.6	ELISA.....	26
2.7.7	Intrazelluläre Färbung und Intrazelluläre Zytokin-Färbung.....	26
2.7.8	Analyse der Subfamilienzugehörigkeit der TZR β -Ketten von humanen T-Zellen.....	27
2.7.9	CD8 positive magnetische Aufreinigung	27
2.8	Enzyme	27
2.9	Vektoren.....	27
2.9.1	Auflistung der verwendeten Doppelketten-TZR Konstrukte	29
2.10	Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	32
2.11	Agarosegele für die Gelelektrophorese	33
2.12	Zellen, Zelllinien und Transfektanten	33
2.12.1	Humane PBMZ	33
2.12.2	Etablierte Zelllinien im Labor.....	34
2.12.3	Selbstgenerierte oder neu etablierte Zellen	40
2.13	Chemokompetente Bakterienzellen	41
2.14	Geräte	42
2.15	Kunststoff- und Glasware	43
2.16	Computerprogramme	43

3	Methoden	44
3.1	Polymerase Ketten Reaktion.....	44
3.1.1	PCR für Klonierungsexperimente	44
3.1.2	PCR zur gezielten Punktmutagenese von TZR Ketten	45
3.2	Klonierung von DNS.....	46
3.2.1	DNS-Verdau mit Restriktionsendonukleasen.....	47
3.2.2	Dephosphorylierung.....	47
3.2.3	Ligation	48
3.2.4	Auffüllen der Enden („ <i>endfilling</i> “)	48
3.2.5	DNS-Aufreinigung	49
3.3	Herstellung von punktmutierter TZR-DNS mittels gezielter Mutagenese	49
3.4	Herstellung von chemokompetenden Zellen	49
3.5	Transformation	50
3.6	Plasmidpräparation aus Bakterien	51
3.6.1	QIAprep Miniprep.....	51
3.6.2	EndoFree-Maxi-Präparation.....	51
3.7	Konzentrationsbestimmung von DNS	52
3.8	Sequenzierung von Plasmid-DNS.....	52
3.9	PBMZ-Aufreinigung aus Blutproben („ <i>Buffy Coats</i> “).....	53
3.10	Generierung von CMV pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen humanen T-Zellen	53
3.11	CD8 positive magnetische Zellsortierung	54
3.12	Expansion der isolierten CMV- pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen humanen T-Zellen	55
3.13	Peptidspezifische Expansion von humanen T-Zellen (T2-Protokoll)	55
3.14	CD3/CD28 Beads Restimulierung von humanen PBMZ	56
3.15	Retrovirale Transduktion von humanen / murinen T-Zellen.....	56
3.15.1	Retrovirale Transduktion mit einem TZR	57

3.15.2	Simultane retrovirale Transduktion mit einem pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ - und einem p53 ₂₆₄₋₂₇₂ -Tumorantigen-spezifischen TZR	59
3.15.3	Analyse des Interaktionsverhaltens zwischen dem p53 ₂₆₄₋₂₇₂ -spezifischen Einzelketten-TZR und humanen und murinen TZR α Ketten	60
3.16	Elektroporation von humanen T-Zellen	60
3.17	Durchflusszytometrie.....	61
3.17.1	FACS-Analyse auf Oberflächenmoleküle.....	62
3.17.2	Tetramer-Färbung.....	62
3.17.3	Intrazelluläre Zytokinfärbung.....	62
3.17.4	Analyse des TZR β -Repertoires von humanen T Zellen	63
3.17.5	Scatchard-Analysen.....	64
3.18	Zellsortierung	64
3.19	Humaner Interferon- γ Elisa/ muriner IL-2 Elisa.....	65
3.20	⁵¹ Cr-Zytotoxizitätstest.....	66
3.21	⁵¹ Cr-Kompetitionstest	68
3.22	Kryokonservierung von Zellen.....	69
3.23	Auftauen von Zellen	69
4	Ergebnisse	70
4.1	Interaktionsverhalten der CMV-pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ - spezifischen TZR α und - β Kette mit TZR α und - β Ketten fremder Spezifitäten.....	70
4.2	Generierung und Optimierungen von pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen TZR Konstrukten	81
4.2.1	Generierung von neuartigen pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen TZR.....	81
4.2.2	Kodon-Optimierung des pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen TZR.....	91
4.2.3	Analyse eines pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen Einzelketten- und Doppelketten-TZR	94
4.3	Generierung von bi-spezifischen humanen T-Zellen.....	98

4.3.1	Generierung von Tyrosinase ₃₆₈₋₃₇₆ -Tumorantigen- sowie pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ oder MDM2 ₈₁₋₈₈ - bi-spezifischen humanen T-Zellen	99
4.3.2	Generierung von p53 ₂₆₄₋₂₇₂ -Tumorantigen und pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -bi-spezifischen T-Zellen mittels dem RNS-Transfer sowie retroviralem Gentransfer	102
4.3.2.1	Generierung von pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen-T-Zellen aus HCMV-seropositiven Donoren	102
4.3.2.2	Analyse der Subfamilien des TZR Repertoires der pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -peptidspezifischen T-Zellkultur	111
4.3.2.3	Umprogrammierung der pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen T-Zellen zu p53 ₂₆₄₋₂₇₂ -Tumorantigen- und pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -bi-spezifischen T-Effektorzellen mittels dem RNS-Transfer.....	113
4.3.2.4	Retrovirale Transduktion der pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen T-Zellen mit einem p53 ₂₆₄₋₂₇₂ -Tumorantigen-spezifischen TZR	116
4.3.2.5	Retrovirale Transduktion des pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen T21-T-Zellklons mit einem p53 ₂₆₄₋₂₇₂ -Tumorantigen-spezifischen TZR	121
4.3.2.6	Simultane retrovirale Transduktion eines pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ - und p53 ₂₆₄₋₂₇₂ -Tumorantigen-spezifischen TZR in HCMV-negative T-Zellen.....	123
4.3.2.7	Analyse der Expression von endogenen TZR der simultan transduzierten humanen T-Zellen	127
4.3.3	Analyse der Competition zwischen dem p53 ₂₆₄₋₂₇₂ -Tumorantigen- und dem pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen Peptid	129
4.4	Interaktionsverhalten eines p53 ₂₆₄₋₂₇₂ -Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR	131
4.4.1	Analyse des Interaktionsverhaltens eines p53 ₂₆₄₋₂₇₂ -Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR unter Verwendung eines 2-Plasmide-retroviralen Vektorsystems	132

4.4.2	Gezielte Punktmutagenese in der V α -Domäne zur detaillierten Analyse der Interaktion des p53 ₂₆₄₋₂₇₂ -Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR	138
4.4.3	Analyse des Interaktionsverhaltens eines p53 ₂₆₄₋₂₇₂ -Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR unter Verwendung eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems	143
4.4.4	Gezielte Punktmutagenese des p53 ₂₆₄₋₂₇₂ -Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems	153
4.4.5	Optimierungsverfahren des p53 ₂₆₄₋₂₇₂ -Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR zur Inhibition der Interaktion mit fremden TZR α Ketten	159
4.4.6	Analyse der TZR-MHC:Peptid-Affinität des modifizierten, optimierten p53 ₂₆₄₋₂₇₂ -Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR	166
4.4.7	Effiziente Tumorerkennung der humanen p53 ₂₆₄₋₂₇₂ -Tumorantigen-spezifischen T-Zellen <i>in vitro</i>	169
5	Diskussion	171
5.1	Optimierungen der TZR-Konstrukte	171
5.1.1	Hybride TZR und das Risiko einer „off“-zielungerichteten Autoreaktivität	171
5.1.2	Essentielle Faktoren der TZR-Avidität	175
5.2	Generierung von bi-spezifischen T-Zellen.....	180
5.2.1	HCMV-seropositiver Status von Donor und Rezipient	180
5.2.2	Unterschiedlicher HCMV-Status zwischen Donor und Rezipient.	186
5.3	Sicherheitsaspekt eines p53 ₂₆₄₋₂₇₂ -Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR	189
5.3.1	„On“-zielgerichtete Reaktionen sowie Immunogenität eines partiell murinisierten oder Vollängen-murinen-TZR	189
5.3.2	Interaktionsverhalten eines p53 ₂₆₄₋₂₇₂ -Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR	191

5.3.3	Ausblick	199
6	Zusammenfassung.....	203
7	Literaturverzeichnis	206
8	Anhang.....	219
9	Danksagung.....	223
10	Lebenslauf	224

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fremdinteraktion der exogenen und endogenen TZR α und - β Ketten ..	6
Abbildung 2: Einzelketten-TZR Konstrukte	8
Abbildung 3: Retrovirale Vektorkonstrukte am Beispiel eines p53 ₂₆₄₋₂₇₂ -Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR	9
Abbildung 4: Charakterisierung der humanen SupT1 Zelllinie	35
Abbildung 5: Bestimmung der G418- und Puromycin-Toleranz der humanen SupT1 Zelllinie	36
Abbildung 6 Charakterisierung der murinen T-Zell-Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ ...	37
Abbildung 7: Bestimmung der G418- und Puromycin-Toleranz der murinen Hybridomzellen 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ	38
Abbildung 8: Phänotypisierung des Tyrosinase ₃₆₈₋₃₇₆ -spezifischen T-Zellklons	39
Abbildung 9: Subfamilienspezifische V β -Analyse der transduzierten murinen Hybridomzellen 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ hinsichtlich der Fremdinteraktion der pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen TZR α und - β Ketten mit humanen TZR Ketten	72
Abbildung 10: Analyse der V β -Expression der transduzierten murinen Hybridomzellen 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ hinsichtlich dem Interaktionsverhalten des pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen TZR mit murinen TZR α und - β Ketten.....	73
Abbildung 11: FACS-Analyse zur Detektion der Expression eines hybriden TZR der retroviral transduzierten humanen SupT1 Zelllinie	77
Abbildung 12: Analyse des Interaktionsverhaltens der pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ - und murinen TZR α und - β Ketten in der humanen SupT1-Zelllinie	78
Abbildung 13: Retrovirale Transduktion der murinen Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ mit dem wildtypischen, mutierten sowie den hybriden pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen TZR	83
Abbildung 14: Analyse der Funktionalität der neu generierten pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen TZR der transduzierten Hybridomzellen 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ	84
Abbildung 15: FACS-Analyse der retroviral transduzierten humanen SupT1 Zellen mit den pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen TZR-Konstrukten.....	85

Abbildung 16: Expression der pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen TZR-Konstrukte der retroviral transduzierten Jurkat-76 Zellen	86
Abbildung 17: Interferon- γ Elisa der transduzierten humanen Jurkat-76 Zellen.....	88
Abbildung 18: Analyse der Expression der transduzierten humanen T-Zellen mittels pp65-spezifischer Tetramerfärbung	89
Abbildung 19: ⁵¹ Cr-Zytotoxizitätstest der retroviral transduzierten humanen T-Zellen	90
Abbildung 20: Expression des Kodon-optimierten pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen TZR.....	92
Abbildung 21: ⁵¹ Cr-Zytotoxizitätstest der transduzierten humanen Zellen mit dem Kodon-optimierten pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen TZR.....	93
Abbildung 22: Expression des pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen Einzelketten-TZR an der Zelloberfläche von humanen T-Zellen	95
Abbildung 23: ⁵¹ Cr-Zytotoxizitätstest der transduzierten humanen T-Zellen mit dem pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen Einzelketten-TZR	97
Abbildung 24: Retrovirale Transduktion des Tyrosinase ₃₆₈₋₃₇₆ -spezifischen T-Zellklons mit einem MDM2 ₈₁₋₈₈ -Tumorantigen- oder pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen TZR	100
Abbildung 25: Generierung von oligoklonalen pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen T-Zellen mittels dem LDA Verfahren.....	103
Abbildung 26: Spezifische Lyse von pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -peptidbeladenen T2-Zellen als Zielzellen durch die selbstgenerierten oligoklonalen pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen T-Zellen	104
Abbildung 27: Prozentualer Anteil an CD8 ⁺ pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -peptidspezifischen T-Zellen in HCMV-seropositiven Donoren	105
Abbildung 28: Effiziente Expansion von pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -peptidspezifischen T-Zellen nach einem Restimulationszyklus	106
Abbildung 29: Restimulierung und Zellsortierung der pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen T-Zellen	107
Abbildung 30: Expression des CMV-pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen TZR des T21 T-Zellklons sowie des HCMV ⁺ Donors 8106	108
Abbildung 31: ⁵¹ Cr-Zytotoxizitätstest der pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen T-Zellen.....	109

Abbildung 32: Spezifische Lyse der chromierten HCMV-infizierten humanen Fibroblasten durch die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen der Donoren 4227 und 5889 110

Abbildung 33: RNS Transfer eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR in pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T-Zellen..... 114

Abbildung 34: Analyse der dualen Spezifität der pp65₄₉₅₋₅₀₃- und p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen T-Zellen an Tag 6 nach dem RNS Transfer 115

Abbildung 35: Retroviraler TZR Gentransfer eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR in die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen des Donor 8106 117

Abbildung 36: Darlegung der Zellpopulationen und der Strategie für die Auswertung der intrazellulären IFN- γ Zytokinfärbung 119

Abbildung 37: Intrazelluläre IFN- γ Zytokinfärbung der pp65₄₉₅₋₅₀₃- und p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-bi-spezifischen T-Zellen 120

Abbildung 38: Retrovirale Transduktion des T21 T-Zellklons mit einem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR 122

Abbildung 39: Simultane retrovirale Transduktion eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten und eines pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten-TZR in humane HCMV-negative, HLA-A2-positive T-Zellen 124

Abbildung 40: Intrazelluläre IFN- γ Färbung zur Analyse der dualen Spezifität der simultan transduzierten T-Zellen 125

Abbildung 41: FACS-Analyse der simultan transduzierten HCMV-negativen T-Zellen 126

Abbildung 42: Analyse der Expression der endogenen TZR auf der Zelloberfläche der simultan transduzierten humanen T-Zellen 128

Abbildung 43: Analyse der Konkurrenz zwischen den Peptiden p53₂₆₄₋₂₇₂ und pp65₄₉₅₋₅₀₃..... 130

Abbildung 44: Analyse der V β 3-Expression hinsichtlich der Interaktion des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit humanen und murinen TZR α Ketten 133

Abbildung 45: Interaktion des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR mit fremden TZR α Ketten führte zum Spezifitätsverlust 135

Abbildung 46: Funktionalitätsanalyse des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR sowie dessen hybride TZR-Konstrukte in einem Interferon- γ Elisa 136

Abbildung 47: V β 3-Expression der transduzierten Zellen mit dem mutierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR..... 139

Abbildung 48: Interaktion des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit murinen TZR α Ketten resultierte in der Fremdinteraktion mit einer Volllängen-TZR α Kette 140

Abbildung 49: Rekonstitution der Funktionalität des mutierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR 142

Abbildung 50: V β 3-Expression der transduzierten T-Zellen mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR in Kombination mit humanen und murinen TZR α Ketten 145

Abbildung 51: Expression des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR unter Beeinflussung einer applizierten humanen oder murinen TZR α Kette .. 146

Abbildung 52: Analyse der Funktionalität des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit oder ohne die Applikation von humanen und murinen TZR α Ketten 149

Abbildung 53: V β 3-Expression der transduzierten Jurkat-76 Zellen und T-Zellen mit dem mutierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR sowie in kombinierter Transfektion mit humanen und murinen TZR α Ketten 155

Abbildung 54: Rekonstitution der p53-spezifischen Tetramerbindung des mutierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR 156

Abbildung 55: Rekonstitution der Funktionalität des mutierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR 158

Abbildung 56: Optimierung der V α /V β –Interaktion des Mu Wt sc coTZR p53 162

Abbildung 57: Inhibition der Rekonstitution der Funktionalität des mutierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mittels der Optimierung der V α / V β Interaktion..... 164

Abbildung 58: Konzentrationsabhängige p53-spezifische Tetramerfärbung..... 167

Abbildung 59: K_D-Bestimmung der TZR-Konstrukte Mu Wt sc coTZR p53 und Mu Wt sc coTZR p53_Q51C 168

Abbildung 60: Effiziente Tumorerkennung von p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-präsentierenden Tumorzellen mittels der retroviral generierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen T-Zellen 169

Abbildung 61: Interaktionsverhalten des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit fremden TZR α Ketten..... 192

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PCR für Klonierungsexperimente.....	44
Tabelle 2: PCR-Programm zur gezielten Punktmutagenese von TZR-DNS.....	46
Tabelle 3: Expressionsverhalten der Doppelketten-TZR im Vergleich zu den hybriden TZR in der murinen Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ	74
Tabelle 4: Expressionsverhalten der Doppelketten-TZR im Vergleich zu den hybriden TZR in der humanen SupT1 Zelllinie.....	79
Tabelle 5: Darlegung der Expressionsverhalten der hybriden TZR in der Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ im Vergleich zu der humanen SupT1 Zelllinie.....	80
Tabelle 6: Vergleich zwischen zwei pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ (NLVPMVATV)-spezifischen TZR Sequenzen.....	82
Tabelle 7: Analyse der V β Subfamilien Zugehörigkeit der isolierten pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ -spezifischen T-Zellen aus den HCMV ⁺ Donoren 8106, 8038 und 4227.....	112
Tabelle 8: Zusammenfassung der EC ₅₀ - und Bmax-Werte.....	152

Abkürzungsverzeichnis

A2	HLA-A2.1
A2K ^b	A2/K ^b , chimäres MHC Klasse-I Molekül, aus der humanen α_1 - und α_2 -Domäne von A2 und aus der α_3 -Domäne von H-2K ^b
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
ATCC	American Type Culture Collection
Bmax	maximale Rezeptoranzahl
Bp / bps	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CCL	chronische lymphatische Leukämie
CD	Differenzierungscluster
CD3	humaner CD3-Korezeptor
CD4	humaner CD4-Korezeptor
CD8	humaner CD8 α/β -Korezeptor
CD34	Marker für hämatopoetische Vorläuferzellen
CD40	Rezeptor für kostimulatorische Signale
CD40L	CD40 Ligand bindet an CD40 Rezeptor
CDR	komplementaritätsbestimmende Region
C-Domäne	konstante Domäne
CDK4	Zyclin-abhängige Kinase 4
Chim	chimerisiert
Ci	Curie
CIMT	<i>Cancer Immunotherapy Meeting</i>
CIP	Kälberdarm alkalische Phosphatase
co	<i>codon optimization</i> : Kodon-Optimierung
Con A	Concanavalin A
⁵¹ Cr	radioaktives Chrom-Isotop
C-terminal	Carboxyl-terminal
dc	<i>double chain</i> : Doppelkette
DLI	Donor-Lymphozyten-Infusion

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF 4/5	MART-1-Spezifität
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
CpG	Oligonukleotide als Aktivatoren des Immunsystems
CO ₂	Kohlendioxid
E:T	Effektor zu <i>Target</i> (=Zielzell)-Verhältnis
EB	<i>Elution Buffer</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EC ₅₀	Effektive Konzentration, um einen halbmaximalen Effekt zu erzeugen
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
env	Envelope = viralen Hüllproteine
ER	endoplasmatisches Retikulum
Fa	Firma
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung, Durchflusszytometrie
Fitc	Fluoreszein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FluM1	Influenza Virus-Matrixprotein M1
for / f	<i>forward</i> : vorwärts
g	Gramm
G-418	Geneticin (Neomycin-Antibiotikum)
gag	gruppenspezifisches Antigen
GAL	Galaktose
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
GaLV	Gibbon Affe Leukämie Virus
GD2	Disialoganlioside
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
gp100	Glycoprotein 100, Differenzierungsantigen

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

GvHD	<i>Graft-versus-Host-Disease</i> : Wirt-gegen-Empfänger-Erkrankung
GvL	<i>Graft-versus-Leukemia</i> : Wirt-gegen-Leukämie-Reaktion
h	<i>hour</i> : Stunde
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HA-2	Minorhistokompatibilitätsantigen
HCMV	humaner Zytomegalievirus
HER 2/neu	<i>Human Epidermal Growth Factor Rezeptor 2</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperizan-N'-ethansulfonsäure
HHVS	Humanes Herpesvirus
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus Typ 1
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HPV	humanes Papillomavirus
HRP	Horseradish-Peroxidase
Hu	human
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMGT	internationales ImMunoGeneTics Informationssystem
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
IU	internationale Einheiten (<i>Units</i>)
JGU	Johannes Gutenberg-Universität
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton
K _D	Dissoziationskonstante
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LCL	lymphoblastoide Zelllinie
LMO2	<i>Lim domain only 2 (rhombotin-like 1)</i>
LMP2	<i>Latent Membran Proteins 2</i>
LTR	<i>Long terminal Repeats</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

LUMC	<i>Leiden University Medical Center</i>
m	milli (10^{-3})
M	Molar
MACS	Magnet-Aktivierte-Zell-Sortierung
MAGE	Melanoma-assoziierte Antigene
MART-1	<i>melanoma antigen recognized by T cells 1</i>
MDM2	<i>mouse double minute 2</i>
Med.	Medizinische
Melan-A	Synonym für MART-1
mg	Miligramm
mHag	Minorhistokompatibilitätsantigene
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
Min	Minute(n)
ml	Mililiter
mm	Milimeter
MoMLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
mRNS	<i>messenger RNS</i> : Boten-RNS (Ribonukleinsäure)
ms	Milisekunde
Mt	mutiert
Mu	murin
MUC-1	Mucin-1
μ	mikro (10^{-6})
μ g	Mikrogramm
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar
n	nano (10^{-9})
NaCl	Natriumchlorid
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NEAA	nicht essentielle Aminosäuren
neo	Geneticin (G-418)-Resistenz
NGS	<i>next-generation sequencing</i>
ng	Nanogramm
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nM	Nanomolar

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

NSG	Nod Scid IL-2-Rezeptor gamma Kette <i>knockout</i> Mäuse
N-terminal	Amino-terminal
NY ESO-1	Tumor-Hoden-Antigen
OD	optische Dichte
OP 9	Stromazellen
OT-1	Spezifität für Ovalbumin
PBMZ	periphere Blutmonozyten
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
pBu	pBullet
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PECy7	Phycoerythrin/Cy7
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikrogramm
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PHA	Phytohämagglutinin
pM	Pikomolar
Pol	Polymerase
ψ	“Psi”, retrovirales Verpackungssignal
puro	Puromycin-Resistenz
rad	<i>radiation absorbed dose</i>
rev / r	<i>reverse</i> : rückwärts
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Real-time-PCR</i>
sc	<i>single chain</i> : Einzelkette
SCID	Schwere kombinierte Immundefizienz
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek	Sekunde(n)
SSX2	Tumor-Hoden-Antigen
TAA	tumorassoziierte(s) Antigen(e)
TAP	Transporter für Antigenprozessierung

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	Tris-buffered Saline
TE	Tris-EDTA
Tet	Tetramer
TIL(s)	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TZR	T-Zellrezeptor
U	internationale Einheiten (units)
UCL	<i>University College London</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
V-Domäne	variable Domäne
VSV-G	Vesikuläres Stomatitis-Virus Nukleoprotein
VSV-N	Vesikuläres Stomatitis-Virus Glykoprotein
Wt	Wildtyp
ZTL	zytotoxische T-Lymphozyten

Abkürzungen für Aminosäuren:

A	Alanin
C	Cystein
D	Aspartat
E	Glutamat
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

Publikationen:

X[§], X[§], Diana Knies, X:X....: Suppression of tumor antigen specific human T cells by arginine depletion. In: Cancer Immunology Immunotherapy in submission, [§]both authors contributed equally

X, X, Diana Knies, X:X...: Increasing safety and efficacy of TCR transfer by the use of an optimized human melanoma-specific single chain TCR. In Vorbereitung

Kongressbeiträge:

Cancer Immunotherapy Meeting in Mainz 2012

Analysis and optimization of a p53 (264-272)-tumor antigen-specific Single chain TCR in terms of TCR mispairing in human T-cells

Cancer Immunotherapy Meeting in Mainz 2012

Reprogramming T-cells with an optimized Melanoma-specific human single chain T-cell receptor results in substantial tumor cell recognition but also in mispairing with endogenous TCR chains

Cancer Immunotherapy Meeting in Mainz 2012

In vitro "on-target"-reactivity of affinity-modified p53 (264-272) tumor antigen-specific TCRs retrovirally transduced into human T-cells

DGHO in Basel 2011

A single chain T cell receptor framework reactive for tumorassociated antigens may allow for residual mispairing with endogenous TCRs in human T-cells and is minimized by the introduction of designed disulfide bridges in their V-domains

DGHO in Basel 2011

Die Optimierung eines humanen Melanom-spezifischen Einzelketten-T-Zellrezeptors für den adoptiven T-Zelltransfer

European Hematology Association Congress in London 2011

Achievement of efficiency and safety by the usage of a novel single chain TCR design in human Cytomegalovirus pp65 / p53 tumor antigen-bispecific T cells

Cancer Immunotherapy Meeting in Mainz 2011

Efficient generation of human Cytomegalovirus pp65 / p53 tumor antigen-bispecific T cells and analysis of their safety by the usage of a novel single chain TCR framework

Cancer Immunotherapy Meeting in Mainz 2011

The design of an optimised melanoma-specific human single chain T-cell Receptor

Cellular Therapy Symposium in Erlangen 2011

Efficiency and safety of human Cytomegalovirus pp65 / p53 tumor antigen-bispecific T cells using a novel single chain TCR design

Cancer Immunotherapy Meeting in Mainz 2010

Generation of HCMV-/TAA- bispecific human T cells by either the genetic equipment of HCMV+ T cells with tumorreactive TCRs or combined retroviral transduction of bulk human T cells with HCMV-/TAA-specific TCRs

European Society of Gene and Cell Therapy Meeting in Hannover 2009

Generation of bifunctional HCMV- and tumorantigen-specific T cells by T cell receptor transfer

Cancer Immunotherapy Meeting in Mainz 2009

Generation of bifunctional T cells using gene transfer of tumorantigen- and virus-specific TCR

Cancer Immunotherapy Meeting in Mainz 2009

A rapid protocol for the affinity maturation of T cell receptors specific for the p53.264-272 tumor antigen by site directed mutagenesis of the CD3alpha loop

Cancer Immunotherapy Meeting in Mainz 2008

Human T cells equipped with tumor-reactive TCR optimized *in vitro* elicit tumor growth control in NOD-SCID mice engrafted with a human melanoma

1 Einleitung

1.1 T-Zell-Immuntherapie

Im Laufe der Jahre gewann die T-Zell-Immuntherapie zunehmend an Relevanz. Es zeigte sich, dass eine allogene T-Zell-depletierte Transplantation zu einer zunehmenden Rate an Rezidiv-Fällen führte. Eine manifeste Tumorerkrankung konnte auf das Unvermögen des hauptsächlich T-lymphozytären Immunsystems, Tumorzellen in ausreichendem Maße erkennen und zerstören zu können, zurückgeführt werden. Die Beeinflussung der T-Zell-Immunität stellte somit eine effektive Möglichkeit zur Therapie von malignen Erkrankungen dar. Mit der Beobachtung, dass eine allogene Stammzelltransplantation inklusive einem nicht tolerablen T-Zell-Kompartiment eine Tumorerstörung im Patienten auslöste, signalisierte die erfolgversprechenden Aussichten einer potentiellen adoptiven T-Zelltherapie (Auszug aus Kolb et al. 2004). Die transplantierten T-Zellen des Donors sollten zu einer Unterstützung des GvL („*Graft-versus-Leukemia*“, Wirt-gegen-Leukämie)-Effektes im Patienten führen, indem residuelle Tumorzellen mittels einer alloreaktiven Reaktion gegen individualspezifische Minorhistokompatibilitätsantigene (mHAgs) oder tumorassoziierte Antigene (TAA) zerstört würden. Es zeigte sich, dass eine GvL oftmals eine gleichzeitige GvHD („*Graft-versus-Host-Disease*“, Wirt-gegen-Empfänger-Erkrankung) unterschiedlichen Ausmaßes bewirkte. Jedoch erschienen die Effekte unabhängig voneinander. Folglich entwickelten sich Strategien zur Prävention bzw. Kontrolle einer GvHD-assoziierten GvL (Kolb et al. 2004). Bei einer GvHD greifen die Spender-T-Zellen nicht-hämatopoetisches Gewebe, d.h. vorzugsweise die Haut, Schleimhäute und Leber sowie den Darm an. Diese Reaktionen führen zu einer erhöhten Mortalität und Morbidität des transplantierten Patienten. Anfangs wurde versucht, eine Tumorantigen-spezifische T-Zell-Antwort mittels einer Vakzination im Patienten zu bewirken. Jedoch gestaltete sich dies als insuffizient (Auszug aus Willemsen et al. 2003). Es erschien zum einen problematisch, dass es sich meist um einen immunsupprimierten Patienten und zum anderen um Selbstantigene, gegenüber diesen eine Selbsttoleranz und somit keine autoreaktiven T-Zellen bestanden, handelte. Es folgten Versuche mit der Isolation sowie *in vitro* Expansion einer quantitativen Menge an autologen tumorreaktiven T-Zellen. Beim malignen Melanom konnten tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL)

isoliert werden, welche, nach einer *in vitro* Expansion und sich anschließenden Reinfusion in den Patienten, zu einer effizienten Zerstörung der Tumorzellen führten (Dudley et al. 2002, 2008; Besser et al. 2010; Rosenberg 1992; Rosenberg et al. 1988). In einer Studie mit insgesamt 93 Patienten konnten in 56 % der Fälle eine objektive Ansprechrates der Patienten verzeichnet werden. In 22 % wurde eine vollständige Regression erzielt. Hinzukommend konnte die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit metastasierten Melanom von 5 auf 29 % gesteigert werden (Rosenberg et al. 2011). Jedoch kennzeichnet Melanome, sowie der Vollständigkeit halber Nierenzellkarzinome, eine stärkere immunogene Eigenschaft. Folglich konnte sich eine effiziente Expansion von autologen Tumorantigen-spezifischen T-Zellen nicht universell auf alle Tumore übertragen lassen. In einer ersten klinischen Studie konnten *in vitro* vorstimulierte T-Zellen gegen Leukämie-assoziierte Antigene oder hämatopoetische mHAg unter GMP-Bedingungen generiert werden. Diese führten nach dem adoptiven Transfer bei einzelnen Patienten zu einer Leukämieremission (Marijt et al. 2007; Warren et al. 2010). Jedoch wirkt einer effizienten klinischen Anwendung, die Generierung einer quantitativen Menge an tumorreaktiven T-Zellen sowie deren Identifikation und Isolation entgegen. Letztlich erschwert die bestehende Selbsttoleranz gegenüber Selbsttumorantigenen die Durchführung des Therapieansatzes (Schumacher 2002). Im Gegensatz hierzu bot sich eine effiziente Isolation und *in vitro* Expansion von Virus-spezifischen T-Zellen an, welche sich gegen ein EBV- oder HCMV-Virus-spezifisches Fremdanigen richteten. Es zeigte sich eine erfolgreiche Anwendbarkeit von EBV-Antigen-spezifischen T-Zellen für die adoptive T-Zelltherapie, welche vor allem zu einer partiellen oder vollständigen Tumorremission führte (Walter et al. 1995; Rooney et al. 1995; Bollard et al. 2004; Comoli et al. 2005). Im Folgenden stellte sich die Frage, wie eine effiziente Gewinnung von tumorreaktiven T-Zellen, auch in Hinblick auf Zeit- und Kostenaufwand, erfolgen könnte. Zum einen sollte eine zeitnahe, quantitativ und qualitativ effektive Generierung von TILs und zum anderen deren langes *in vivo* Überleben, mit einem möglichst entwickelten immunologischen Gedächtnis, gewährleistet sein. Im Jahr 1986 konnte erstmals gezeigt werden, dass T-Zellen mit TZR α und - β Genen ausgestattet werden konnten. Die modifizierten T-Zellen signalisierten die gleiche Spezifität, wie der für die TZR-Extraktion verwendete T-Zellklon (Dembic et al. 1986). Auch konnte zum ersten Mal dargelegt werden, dass T-Lymphozyten mittels dem retroviralen TZR-Gentransfer in Mart-1- oder HIV-1-

Antigen-spezifische T-Zellen reprogrammiert werden konnten (Clay et al. 1999; Cooper et al. 2000). Hinzukommend wurden gegen das humane MDM2₈₁₋₈₈-spezifische Tumorantigen, Maus-T-Zellen *in vivo* generiert. Die anschließende Isolation der TZR und retrovirale Transduktion in humane T-Zellen, führte zur effizienten tumorreaktiven p53₂₆₄₋₂₇₂⁻ bzw. MDM2₈₁₋₈₈-Tumorantigen-Spezifität (Theobald et al. 1995; Stanislawski et al. 2001). Für die Generierung von Tumorantigen-spezifischen T-Zellen *in vivo* ist die Umgehung der Selbsttoleranz essentiell. Da sich die murine und humane Aminosäuresequenz des MDM2- bzw. p53-Moleküls unterschied, konnten peptidspezifische Immunisierungen in humanen HLA-A2.1-Allel einzel-transgenen sowie für eine effizientere CD8 Korezeptor-Interaktion in humanen doppelt-transgenen CD8 x A2K^b-Mäusen durchgeführt werden (Sherman et al. 1998; Theobald et al. 1995, 1997). Des Weiteren konnte die Funktionalität der transduzierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen *in vivo* gezeigt werden (Kessels et al. 2001, 2006; Tahara et al. 2003; Chamoto et al. 2004; Morris et al. 2005). Von essentieller Bedeutung war die Beobachtung, dass die TZR-Gentherapie, ungeachtet der Selbsttoleranz, zu der Generierung eines tumorreaktiven T-Zell-Kompartments gegen ein Selbsttumorantigen *in vivo* führte (de Witte et al. 2006). Die Infusion von syngenen TZR-genmodifizierten T-Zellen bewirkte *in vivo* eine induzierte T-Zellantwort gegen Selbstantigene. Hingegen signalisierte das endogene TZR-Repertoire eine vollständige oder partielle Selbsttoleranz gegenüber diesen Antigenen (Abad et al. 2008; de Witte et al. 2008). Hinzukommend zeigte sich, dass die TZR-genmodifizierten T-Zellen eine lange Überlebensrate sowie Antigen-spezifische Aktivierung zumindest für 18 Monate nach der Infusion *in vivo* aufwiesen (Coccoris et al. 2008).

Die Herausforderung in der TZR-Gentherapie ist die Generierung einer ausreichenden Menge an tumorreaktiven T-Zellen. Hierbei besteht meist eine Limitierung in einer adäquaten Kulturbedingung zur Gewährleistung einer maximalen Expansion der T-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass mit der retroviralen Transduktion von TZR α und - β Genen in humane hämatopoetische Vorläuferzellen und der Kokultivierung mit OP9-DL1 Zellen, eine hinreichende Menge an antigenspezifischen (HA-2, pp65, MART-1) reifen T-Zellen *in vitro* erzielt werden konnte. Hinzukommend stellt dies eine attraktive Strategie dar, indem theoretisch die generierten T-Zellen kein spätes Differenzierungsmuster aufweisen sollten, welches mit einer eingeschränkten *in vivo* Funktion assoziiert ist (van Lent et al. 2007). Es

konnte gezeigt werden, dass die Selektion von T-Zellen für den adoptiven T-Zell-Transfer allein auf der Basis der Effizienz hinsichtlich IFN- γ Sekretion und Zytolyse nicht ausreichend ist. Meist charakterisierte diese T-Zellen einen höheren Differenzierungsstatus, der mit einer eingeschränkten Proliferation und Überlebenskapazität *in vivo* einherging. Es erschien als essentiell eine Phänotypisierung sowie Evaluierung der Länge der Telomere durchzuführen, um die T-Zellen mit einem weniger ausdifferenzierten Status zu selektieren (Gattinoni et al. 2006, 2005). Folglich kann der Ausgang einer Behandlung von dem Differenzierungsstatus der T-Zellen maßgeblich beeinflusst werden. Die TZR-Gentherapie gewann zunehmend an Bedeutung, so dass erste klinische Phase I-Studien angewandt wurden. Die ersten klinischen Studien wurden an Melanom-erkrankten Patienten durchgeführt, indem autologe T-Zellen mit einem DMF4-bezeichneten, MART-1-Melanozyten-Differenzierungsantigen-spezifischen TZR, ausgestattet wurden (Morgan et al. 2006; Johnson et al. 2009). Jedoch zeigte sich eine geringe Ansprechrate von gerade 17 % auf die Behandlung. Folglich wurde eine weitere klinische Studie mit einem höher affinen MART-1- (DMF-5) sowie einem gp100₁₅₄₋₁₆₂-Tumorantigen-spezifischen TZR durchgeführt (Johnson et al. 2009). Von den 20 Patienten, deren autologen T-Zellen mit dem MART-1-Tumorantigen-spezifischen TZR ausgestattet wurden, zeigten 6 Patienten (30 %) eine partielle Ansprechrate. Die 16 Patienten, welche autologe gp100₁₅₄₋₁₆₂-Tumorantigen-spezifische T-Zellen appliziert bekamen, zeigten in 19 % der Fälle eine Ansprechbarkeit. 1 Patient zeigte eine vollständige und 2 Patienten eine partielle Remission. Zusammenfassend zeichnete sich die klinische Anwendung und Realisierbarkeit der TZR-Gentherapie ab, wenn auch noch mit einem mäßigen Erfolg. Bislang betraf die klinische Anwendbarkeit des retroviralen TZR-Gentransfers autologe T-Zellen und sollte auch auf die Realisierbarkeit in der Anwendung von allogenen T-Zellen übertragbar sein. Auch könnten Optimierungen der TZR-Konstrukte, d.h. die Erzielung einer effizienteren Expression und Funktionalität sowie der Inhibition einer Fremdinteraktion der exogenen und endogenen TZR α und - β Ketten, zu einer gesteigerten klinischen Relevanz der TZR-Gentherapie führen. Die Anwendung der Tumorantigen- sowie Virus-spezifischen T-Zellen ist abhängig von den individuellen HLA-Allelen des Patienten, die durch HLA-Typisierung zu ermitteln sind. Die hier in der Arbeit verwendeten Tumor-assoziierten Antigene (TAA) werden über das HLA-A2-Allel präsentiert. Dieses stellt das höchst frequente Allel in der

kaukasischen ethnischen Gruppe dar, so dass eine breite Anwendbarkeit der TZR-Gentherapie gewährleistet ist.

1.2 Risiken des TZR-Gentransfers durch „*off target*“-zielunggerichtete Reaktionen

Beim retroviralen Gentransfer eines tumorreaktiven TZR in humane oder Maus-T-Zellen könnten theoretisch 4 verschiedene TZR-Kombinationen erzielt werden. Abhängig von der intrinsischen Qualität sollten der exogene und endogene TZR exprimiert werden (Sommermeyer et al. 2006; Heemskerk et al. 2007; Ahmadi et al. 2011). Die intrinsische Qualität bestimmt wie effizient der exogene TZR kompetitiv, um den CD3-Komplex, mit dem endogenen TZR agieren kann. Dies wird im Wesentlichen von der Interaktion beider Ketten zueinander bestimmt, wodurch deren Kinetik eines proteolytischen Abbaus bedingt wird (Call et al. 2002, 2004; Call und Wucherpfennig 2004). Im Falle dessen, dass es sich bei dem endogenen TZR um einen starken Kompetitor handelt, würde der exogene TZR geringfügiger an der Zelloberfläche exprimiert werden. Dies lässt sich *vice versa* übertragen. Eine Ko-Expression des endogenen und exogenen TZR konnte verzeichnet werden, indem beide TZR eine kompatible Konkurrenzfähigkeit aufwiesen (Sommermeyer et al. 2006). Auch konnte gezeigt werden, dass die Verwendung eines murinen TZR für den retroviralen TZR-Gentransfer zu einer effektiven Expression in humanen T-Zellen führte. Die murinen TZR wiesen eine stärkere kompetitive Eigenschaft auf und führten zur Verdrängung des humanen TZR an der Zelloberfläche (Sommermeyer et al. 2006; Voss et al. 2006, Cohen et al. 2006). Hinzukommend könnte die Expression des exogenen TZR durch Fremdinteraktionen beeinflusst werden. Hierbei würden die exogenen und endogenen TZR α und - β Ketten miteinander interagieren (Abbildung 1). Diese hybriden TZR beinhalten eine undefinierte Spezifität mit potentiell autoimmunem Charakter. Aufgrund dessen, dass das neu generierte TZR-Repertoire nicht gegenüber einer Selbstreaktivität *in vivo* analysiert wurde (Umgehung der zentralen Toleranz), könnten diese modifizierten T-Zellen zu einer Reaktivität gegenüber undefinierten Selbstantigenen führen. Erst kürzlich wurde eine ausgelöste Autoimmunität durch unerwünschte hybride TZR dargelegt. Es zeigte sich, dass die retrovirale Transduktion von humanen T-Zellen eine Neoreaktivität durch die Bildung von hybriden TZR *in vitro* gegen EBV-transformierte B-LCL unterschiedlichen HLA-

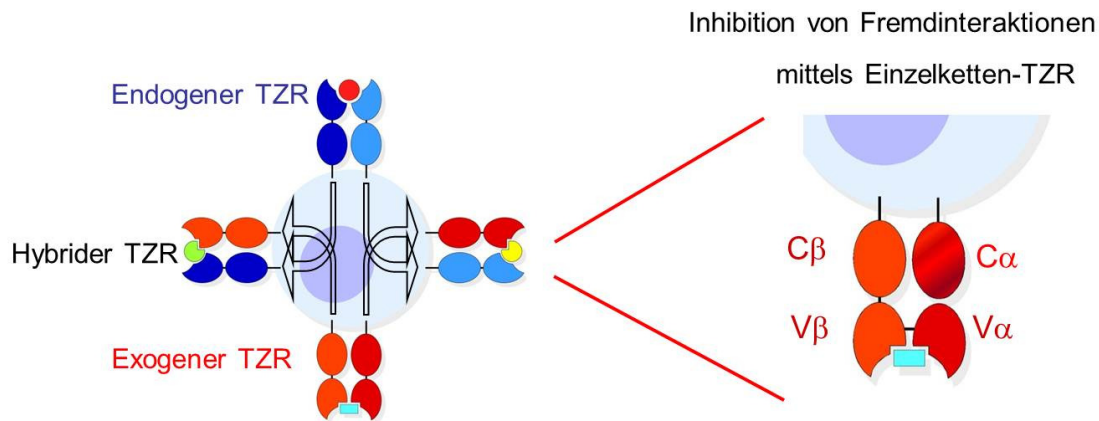


Abbildung 1: Fremdinteraktion der exogenen und endogenen TZR α und - β Ketten

Die exogenen und endogenen TZR α und - β Ketten können zu der Generierung von hybriden TZR mit potentiell autoreaktiven Charakter führen. Zur Inhibition einer solchen Fremdinteraktion wurden Einzelketten-TZR entwickelt, welche vorzugsweise mit ihrer definierten Spezifität exprimiert werden sollten.

Phänotyp auslösen konnte. Die Integration einer künstlichen Disulfidbrücke zwischen den konstanten Domänen (Kapitel 1.4) führte zu einer Inhibierung der gegen irrelevante Antigene, zielungerichteten („*off target*“)-Reaktionen (van Loenen et al. 2010). Hinzukommend konnte dargelegt werden, dass die Bildung von hybriden TZR auch *in vivo* zu einer unerwünschten Autoimmunität führen konnte. Es wurde gezeigt, dass transduzierte T-Zellen mit einem OT-1-spezifischen TZR im Gegensatz zu OT-1-spezifischen T-Zellen zu einer GvHD *in vivo* führten (Bendle et al. 2010). Hinzukommend konnte eine GvHD limitiert werden, indem die T-Zellen, welche einen hybriden TZR exprimierten, *in vivo* depletiert wurden. Auch zeigte sich eine mögliche Reduktion in der Entstehung einer GvHD, bei der Verwendung von optimierten TZR-Konstrukten, wie einer zusätzliche Disulfidbrücke in den konstanten Domänen (Kuball et al. 2007) oder dem 2A-Element (Szymczak et al 2004) anstelle einer IRES (interne ribosomale Eintrittsstelle) (Kapitel 1.3 und 1.4). Ebenso konnte eine letale, durch sezernierte Zytokine (beispielsweise Interferon- γ) verursachte Autoimmunität *in vivo* nach dem TZR-Genstransfer ausgelöst werden. Für die Versuchsdurchführung wurden klinisch nahe Bedingungen gewählt (Bendle et al. 2010). Ein weiterer Aspekt eines potentiellen autoreaktiven Charakters wurde in Schumacher (2002) beschrieben. Die retrovirale Modifikation einer T-Zelle mit einem hochreaktiven, exogenen TZR gegen ein pathologisches Antigen könnte die Nicht-Reaktivität eines

tolerierten, endogenen TZR gegen Selbstantigene brechen und zu dessen Stimulation führen. Durch die antigenspezifische Aktivierung des exogenen TZR und der sich anschließenden Expansion der T-Zelle, könnte der nun in seiner Affinität geförderte endogene TZR zu einer Autoreaktivität führen. Diese nicht zielgerichteten Reaktionen, die zum einen durch die Bildung von hybriden TZR infolge einer Fehlinteraktion der TZR α und - β Ketten und zum anderen durch die Erniedrigung der Aktivierung eines potentiell autoreaktiven, endogenen TZR durch den exogenen TZR entstehen können, werden als sogenannte „*off target*“-Reaktionen bezeichnet.

Hinzukommend wurde ein weiterer Aspekt der Limitierung des Risikos einer induzierten Autoimmunität durch den TZR-Gentransfer beschrieben. Hierbei war die Beschaffenheit der T-Zellpopulation, d.h. das bestehende endogene TZR-Repertoire, welche für die Genmodifizierung verwendet wurde, von essentieller Bedeutung. Es zeigte sich, dass CMV-Virus-spezifische-T-Zellen, ohne einen Verlust der endogenen Spezifität, mit antileukämischen Eigenschaften, ausgestattet werden konnten. Die Generierung von Tumorantigen- und CMV-bi-spezifischen T-Zellen wurde als eine attraktive Strategie beschrieben, indem durch die latente Persistenz des Virus *in vivo* ein längeres Überleben der transduzierten T-Zellen durch die Stimulation des endogenen Virus-spezifischen TZR als möglich erschien (Heemskerk et al. 2004). Ein weiterer Vorteil für den TZR-Gentransfer könnte ein limitierendes Virus-spezifisches TZR-Repertoire sein. Eine HCMV-spezifische T-Zellkultur könnte aus einer eingeschränkten, meist oligo- bis monoklonalen Population bestehen. Hierdurch würde die Bildung an heterogenen hybriden TZR, mit einer hohen Diversität an Fremd-Spezifitäten und somit einem potentiellen Risiko einer Autoreaktivität, eingeschränkt werden.

Eine weitere „*off target*“-Reaktion könnte infolge einer MHC-Fehlpaarung entstehen. Hierbei würde ein TZR-Gentransfer zwischen einem Donor und Rezipient erfolgen, welcher eine Inkompatibilität im MHC-Haplotyp aufweisen würde. Es ist bereits beschrieben, dass TZR unabhängig von der Peptidpräsentation von einem allogenen MHC aktiviert werden können (Schumacher 2002). Für einen MART-1 (1D3)-Melanom-spezifischen TZR konnte nach einer Inkubation mit insgesamt 21 verschiedenen HLA-A- oder -B-Allel-exprimierenden K562-Zellen eine Alloreaktivität ausgeschlossen werden (Jorritsma et al. 2007). Hinzukommend ließ sich in einer

klinischen Phase I Studie keine durch hybride TZR-verursachte Pathologie beobachten (Morgan et al. 2006). Jedoch sollte das Risiko einer Toxizität nicht unterschätzt und individuell für den betreffenden TZR in prä-/klinischen Studien untersucht werden.

1.3 Gestaltung von TZR-Konstrukten

Zur Inhibition einer unerwünschten Bildung von hybriden TZR wurden anstelle von Doppelketten-TZR, d.h. die Klonierung der TZR α und - β Kette auf 2 voneinander getrennten retroviralen pBullet-Vektoren, Einzelketten-TZR-Konstrukte entworfen (Abbildung 1). Zum einen gibt es sogenannte TZR:CD3 ζ -Konstrukte, die mit der zytosolischen CD3 ζ -Domäne fusioniert sind und damit die Signalkopplung des Einzelketten-TZR induzieren sollen (Abbildung 2). Es sei erwähnt, dass die CD3 ζ -Domäne essentiell für die Signaltransduktion des TZR ist (Sebestyén et al. 2008). Zum anderen wurde ein Einzelketten-TZR generiert, indem die V α -

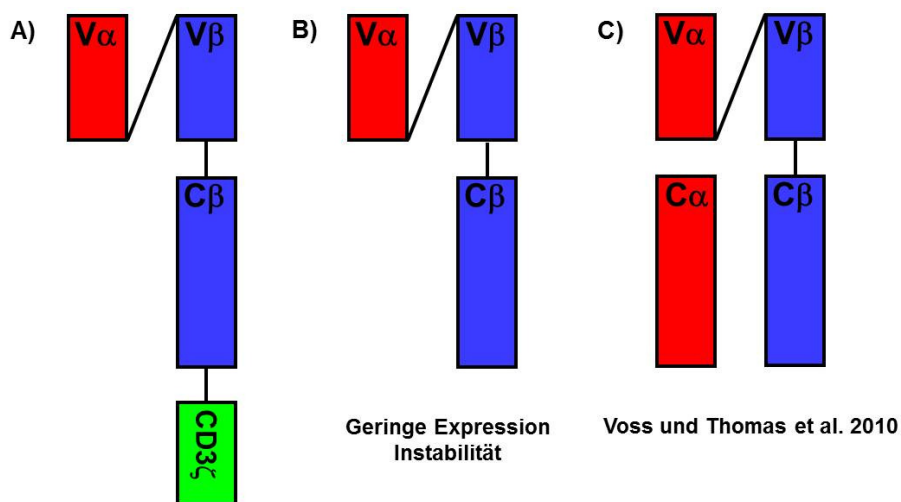


Abbildung 2: Einzelketten-TZR-Konstrukte

A) Einzelketten-TZR konnten mittels dem Fusionsprotein CD3 ζ an der Zelloberfläche exprimiert werden. B) Der Einzelketten-TZR ohne die Applikation der MuC α Domäne zeigte keine hinreichende Expression an der Zelloberfläche. Das Konstrukt erwies sich als instabil und insuffizient. C) Erst durch die Zugabe der essentiellen MuC α Domäne konnte der Einzelketten-TZR stabilisiert und effizient an der Zelloberfläche exprimiert werden.

Domäne über einen Glycin/Serin-reichen Peptidlinker „SL7“ mit der V β -Domäne der TZR β Kette verbunden wurde. Dieses Konstrukt konnte mittels der Ko-Expression, von einer als Membranprotein autonom exprimierten murinen C α -Domäne (MuC α), die auf einem 2. retroviralen Vektor kloniert vorlag, stabilisiert werden. Diese Stabilisierung gewährleistete die Expression des Einzelketten-TZR. Hinzukommend konnte eine Tumorreaktivität induziert werden (Voss und Thomas et al. 2010). In der hier vorgelegten Dissertation wurde zum einen ein p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischer Einzelketten-TZR verwendet, welcher mit MuC α ko-exprimiert und mittels einem IRES-Element kloniert wurde (Abbildung 3). Folglich wurden für die Expression dieses Einzelketten-TZR-Konstruktes 2-retrovirale Vektoren (2-Plasmide-retrovirales Vektorsystem) benötigt. Zum anderen fand ein p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischer Einzelketten-TZR Verwendung, welcher inklusive MuC α sowie einem

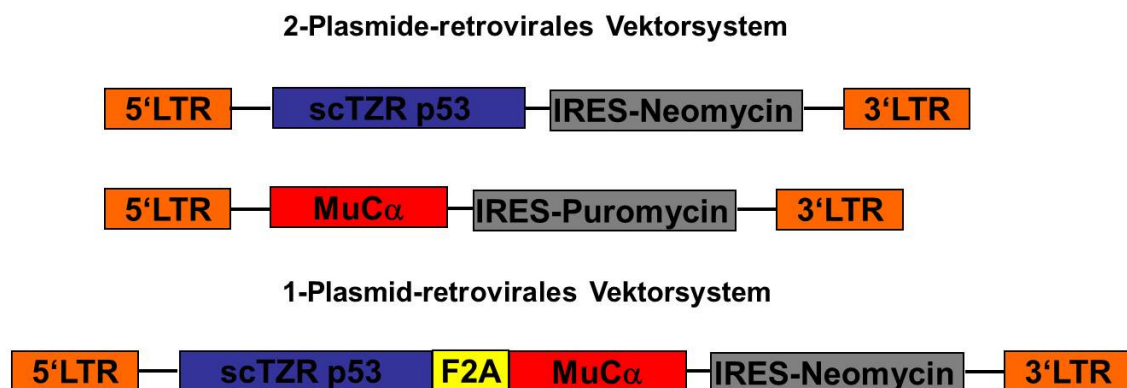


Abbildung 3: Retrovirale Vektorkonstrukte am Beispiel eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR

Das 2-Plasmide-retrovirale Vektorsystem benötigte für die Expression eines Einzelketten-TZR 2 retrovirale pBullet Vektoren. Hierfür wurde der Einzelketten-TZR auf den Neomycin-tragenden pBullet Vektor und die für die TZR-Expression stabilisierende MuC α Domäne auf den Puromycin-tragenden Vektor kloniert. Bei dem 1-Plasmid-retroviralen System waren alle essentiellen Komponenten für die Expression des TZR auf einem retroviralen Vektor kloniert (1-Plasmid-retrovirales Vektorsystem). Die Resistenzgene dienen der Normalisierung der TZR-Expression und wurden in Anlehnung an die Doppelketten-TZR verwendet.

F2A Element (Szymczak et al. 2004) auf einem retroviralen Vektor (1-Plasmid-retrovirales Vektorsystem) vorlag (unpubliziertes p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifisches Einzelketten-TZR Konstrukt) (Abbildung 3). Die Verwendung eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems könnte einen kinetischen Vorteil besitzen, indem sich alle essentiellen Komponenten schnellstmöglich an demselben Ribosom zu einem funktionsfähigen TZR-Komplex zusammenschließen könnten (Szymczak et al. 2004). Bei einem 2-Plasmide-retroviralen Vektorsystem könnte die MuC α -Domäne an einer anderen Stelle im ER (endoplasmatisches Retikulum) als der Einzelketten-TZR synthetisiert werden. Folglich bräuchten die Komponenten kinetisch gesehen länger, um einen funktionsfähigen TZR zu bilden. Eine Expression des Einzelketten-TZR an der Zelloberfläche ohne die Applikation der stabilisierenden Komponente MuC α konnte nicht nachgewiesen werden. Die TZR:CD3 ζ -Einzelketten-Konstrukte wurden in dem hier aufgeführten Forschungsprojekt nicht berücksichtigt. Unserer Meinung nach enthalten diese ein potentiell Sicherheitsrisiko, da die Überexpression des signalgebenden Moleküls CD3 ζ zu einer artifiziellen Aktivierung der T-Zelle führen könnte. Ein weiterer Unterschied der Einzelketten-TZR-Konstrukte bezog sich auf die Verwendung eines IRES- oder F2A-Elementes, welches einen quantitativen Aspekt beinhaltet. Es zeigte sich, dass das Gen hinter dem IRES-Element, d.h. an der 3' Position, eine niedrigere TZR-Ketten-Expression aufwies als an der 5' Position (Yin et al. 2011). Folglich würde eine nicht-stoichiometrische TZR-Ketten-Expression vorliegen. Dieses Ungleichgewicht konnte durch die Verwendung von F2A-Elementen optimiert werden. Bei dem F2A-Element handelte es sich um ein extrahiertes Selbstspaltungspeptid aus der Picornaviridae-Virusfamilie, detaillierter um den Equine Virus Rhinitis. Die Selbstspaltungsaktivität befindet sich stets zwischen dem 2A Glycin und dem 2B Prolin (Szymczak et al. 2004). Es zeigte sich, dass das F2A-Element die äquivalente TZR-Ketten-Expression gewährleistete und somit zu einer Steigerung der Produktionseffizienz führte (Wargo et al. 2009). Zusammenfassend diente die Anwendung von 1-Plasmid- oder 2-Plasmide-retroviralen Einzelketten-TZR-Konstrukten der Inhibition von Fehlinteraktionen der endogenen TZR α und - β Ketten, d. h. der Verhinderung an hybriden TZR mit potentiell autoreaktiven Charakter.

Ein weiteres potentiell Risiko des retroviralen Gentransfers ist die Insertionsmutagenese, welche aus einer zufälligen retroviralen Integration in das

Genom resultiert. Das Resultat könnte sich in der Aktivierung von Protoonkogenen über eine längere Distanz oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen widerspiegeln. In einer klinischen Studie mit 10 SCID-Patienten wurden autologe CD34⁺ Knochenmarkszellen *ex vivo* mittels dem retroviralen Gentransfer mit der γ -Kette des IL-2 Rezeptors ausgestattet. In den 2 jüngsten Patienten zeigte sich eine klonale Expansion von reifen $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen. In beiden Fällen zeigte sich die Integration des retroviralen Vektors nahe des Promotors für das Protoonkogen *LMO2*. Es ließ sich eine aberrante Transkription und Expression des *LMO2*-Gens detektieren. Die Überexpression von *LMO2* in humanen Zellen führte zur Blockade der frühen T-Zellentwicklung (Hacein-Bay-Abina et al. 2003). Dieses Ergebnis war konsistent mit Beobachtungen in *LMO2*-transgenen Mäusen (Pike-Overzet et al. 2007). Hinzukommend konnten 2 weitere Fälle beschrieben werden, die aus der ersten klinischen Studie mit den SCID-Patienten stammten (Hacein-Bay-Abina et al. 2008). Es zeigte sich, dass weitere Integrationen der retroviralen Vektor-DNS in der Nähe von Promotoren von Protoonkogenen, zu deren Überexpression und insertionalen Onkogenese führen konnten. Die gammaretroviralen Vektoren integrieren vorzugsweise in der Nähe von Promotoren (Start der Transkription von Genen) sowie assoziierten CpG-Inseln und DNase I-hypersensitiven Seiten. Der pBullet-Vektor gehört auch zur Klasse der gammaretroviralen Vektoren. Zwar zeigte sich ein erhöhtes Risiko einer Insertionsmutagenese bei der retroviralen Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen, jedoch konnte dies bislang nicht in reifen T-Zellen nachgewiesen werden (Newrzela et al. 2008). Auch in klinischen Studien der Rosenberg Gruppe („*National Cancer Institute (NCI)*“, Bethesda, USA) konnten bis dato keine Indizien auf eine insertionale Onkogenese festgestellt werden. Folglich scheint ein eingeschränktes Risiko beim retroviralen TZR-Gentransfer in reife T-Zellen zu bestehen. Das 1-Plasmid-retrovirale Vektorsystem könnte unter diesem Gesichtspunkt im Vergleich zum 2-Plasmide-retroviralen Vektorsystem eine Verbesserung der Sicherheit darstellen, indem lediglich eine retrovirale Integration in das Genom pro Zelle erfolgt. Hinzukommend wurde für chimäre TZR (CARs) der RNS-Transfer beschrieben, welcher zu einer transienten Expression führte. An Tag 9 konnte die Expression der CARs nicht mehr nachgewiesen werden (Birkholz et al. 2009). In der hier aufgeführten Dissertation wurde der RNS-Transfer nicht als Sicherheitsaspekt, sondern zur zeitnahen Analyse herangezogen.

1.4 Optimierungsprozesse zur Förderung der Expression und Funktionalität eines TZR

Die Förderung der TZR-Expression sowie Funktionalität kann zum einen wie unter 1.3 beschrieben mittels Einzelketten-TZR und zum anderen durch Optimierungsprozesse der TZR-Nukleotidsequenz erfolgen. Die Prozesse beinhalten Murinisierungen der konstanten (C) Domänen von humanen TZR (Voss et al. 2006; Cohen et al. 2006), Eliminationen von N-glykosidischen Motiven und die Integration einer zusätzlichen Disulfidbrücke in die C-Domänen (Kuball et al. 2009, 2007). Die partiellen Murinisierungen der humanen C-Domänen dienten der Förderung der Qualität des TZR, indem eine präzisere Interaktion der exogenen TZR α und - β Ketten erzielt werden konnte. Hinzukommend ließ sich die Assoziation mit dem CD3 Komplex stabilisieren (Sommermeyer und Uckert et al. 2010; Bialer et al. 2010). Die Effizienz des TZR-Genstransfers wird von der spezifischen Expression des exogenen TZR bestimmt. Hierbei ist es von essentieller Bedeutung, dass zwischen dem exogenen und dem endogenen TZR eine Konkurrenz, um die TZR-Expression an der Oberfläche besteht. Faktoren, welche die Expression beeinflussen können, sind zum einen die unerwünschte Bildung von hybriden TZR und zum anderen die Konkurrenzfähigkeit um den CD3 Komplex. Die CD3-Komponente stellt den limitierenden Faktor der TZR-Expression dar (Heemskerk et al. 2007; Sommermeyer et al. 2006). Die Expression eines hybriden TZR führt zum Verlust der Spezifität des TZR. Folglich würde eine MHC-Tetramerfärbung negativ ausfallen und der Nachweis der Expression des hybriden TZR müsste über die subfamilienspezifische V β -Färbung erfolgen. Die Einbringung einer zusätzlichen Disulfidbrücke in die C-Domänen diene ebenso der gezielten Interaktion der exogenen TZR α und - β Ketten (Kuball et al. 2007; Cohen et al. 2007). Da die endogenen TZR-Ketten diese künstliche Disulfidbrücke in den C-Domänen nativ nicht enthielten, sollte eine Fremdinteraktion mit den exogenen TZR α und - β Ketten limitiert werden. Eine vollständige Reduktion an einer partiellen Fehlinteraktion konnte jedoch nicht erzielt werden. Die Kodonoptimierung der TZR-Nukleotidsequenz sowie die Entfernung der N-glykosidischen Motive (Scholten et al. 2006; Kuball et al. 2009) dienten vorzugsweise der funktionalen Förderung der Avidität und spezifischen Erkennung von Tumorzellen. Das Resultat der Kodonoptimierung war zum einen die Erzielung einer höheren Frequenz an TZR-modifizierten T-Zellen *in vivo* und zum anderen

einer effizienteren Tumorerkenkung. Dies zeigte sich auch bei Kodon-optimierten TZR, welche in *in vitro* Analysen lediglich einen geringen Effekt aufzeigten (de Witte et al. 2008; Jorritsma et al. 2007). Durch die Kombination von unterschiedlichen Optimierungsstrategien konnte die Qualität eines TZR effizient gesteigert werden. Dies bedeutete, dass das Expressionsverhalten eines TZR gezielt beeinflusst werden konnte, indem ein schwach exprimierter TZR, in einen stark exprimierten modifiziert wurde. Für einen LMP2-spezifischen TZR zeigte sich, dass dieser mittels der Murinisierung der konstanten humanen Domänen, Integration der 2A-Sequenz zur äquimolaren TZR Ketten-Expression sowie Kodonoptimierung der Nukleotidsequenz in einen stark exprimierten und funktionalen TZR verwandelt werden konnte (Hart et al. 2008). Eine Steigerung der Expression des exogenen TZR förderte die antitumorale Effizienz der TZR-modifizierten T-Zellen (de Witte et al. 2008). Auch konnte eine längere *in vivo* Persistenz der T-Zellen, welche mit einem Kodon-optimierten, Melanom-spezifischen-TZR retroviral transduziert waren, detektiert werden. Des Weiteren zeigte sich eine prozentuale Zunahme der exogenen TZR-positiven T-Zellen in einer transduzierten PBMZ-Population (Jorritsma et al. 2007). Die klinische Anwendbarkeit des TZR-Gentransfers ist von der stabilen und spezifischen Expression des exogenen TZR abhängig. Hinzukommend ist eine lange Persistenz der adoptiv transferierten T-Zellen für einen klinischen antitumoralen Erfolg essentiell (Robbins et al. 2004). Auch zeigte sich, eine Funktionalität der TZR, die unabhängig der ko-stimulatorischen Wirkung des CD8 Korezeptors war (Riddell et al. 1992; Morgan et al. 2003; Kuball et al. 2005). Hierdurch konnten zum einen höher affine TZR generiert werden, welche bereits nach MHC:Peptid-Interaktion aktiviert wurden. Zum anderen ließ sich eine TZR-Expression in CD4⁺ T-Zellen erzielen, die in einer MHC I-restringierten T-Zellantwort in Form von CD4⁺ T-Zell-Hilfe (Kostimulation CD40/CD40L, Zytokin-Sekretion) resultierte.

1.5 Klassifizierung von Tumor-assoziierten Antigenen (TAA)

Die Entwicklung einer Zelle zu einer entarteten Tumorzelle geht mit einer Akkumulation von Mutationen einher. Hierbei können Mutationen von Tumorsuppressorgenen, Apoptosegenen, Onkogenen, Telomerasegenen und / oder DNS-Reparaturgenen relevant sein. Die entarteten Zellen nutzen diese zu ihrem eigenen Vorteil, wie die Fähigkeit zum autonomen Wachstum und zur Angiogenese.

Die Prozessierung von endogenen Peptiden erfolgt über den proteasomalen Abbau. Anschließend werden diese, in einer Länge von 8 bis 10 Aminosäuren über den MHC I-Komplex in erhöhter Konzentration oder alterierter Form, auf der Zelloberfläche präsentiert. Es ließen sich eine Vielzahl von Tumor-assoziierten Antigenen (TAA) identifizieren. Diese können in 5 Kategorien unterteilt werden: **1)** Die Keimzell- / Cancer Testis-Antigene stellen attraktive Zielantigene dar. Diese werden normalerweise in der männlichen Zelllinie exprimiert und kommen nicht auf normalen, gesunden Körperzellen vor. Folglich kann einer GvHD eine untergeordnete Rolle zugesprochen werden. Zu dieser Klasse von TAAs gehören beispielsweise SSX2, NYESO-1 und Antigene, welche von den MAGE-Genen kodiert werden (Boon und van der Bruggen 1996). **2)** Bei den gewebespezifischen Differenzierungsantigenen handelt es sich um Antigene, die vorzugsweise auf dem Tumor- und auf dem Ursprungsgewebe exprimiert werden. Hierzu zählen beispielsweise die Antigene MART-1 / Melan-A, gp100 und Tyrosinase (Brichard et al. 1993; Coulie et al. 1994; Kawakami et al. 1995), welche auf den Melanozyten sowie Melanomzellen exprimiert werden. Jedoch wurden in diesem Fall bereits „*on-target*“-Reaktionen beschrieben (Johnson et al 2009). **3)** Eine weitere Klasse beinhaltet Selbstantigene, welche auf Tumorzellen überexprimiert und in einem geringen Maße auch auf normalen, gesunden Körperzellen exprimiert werden. Zu diesen mutierten Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen zählen beispielsweise p53 (Labrecque et al. 1993; Theobald et al. 1995, 1997, 1998; Vierboom et al. 1997), MDM2 (Stanislawski et al., 2001), HER2/neu (Disis et al. 1994; Cheever et al. 1995) sowie Cyclin-D (Sadovnikova et al. 1998). In der Dissertation wurde sich vorzugsweise mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Peptid beschäftigt. Zusammen mit dem MDM2-spezifischen Peptid zählt dieses zu den universellen Tumorantigenen. Im Folgenden wird sich lediglich auf das p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Peptid bezogen. Der Verlust der p53-Funktion basiert oftmals auf eine homozygote Punktmutation des p53-Gens (Levine et al. 1991) und geht mit einer Akkumulation des defekten Genproduktes einher. Die Bezeichnung des p53-spezifischen Peptids als universelles Antigen ist darauf zurückzuführen, dass das p53-Genprodukt in ca. 50 % aller maligner humaner Tumore, wie beispielsweise dem Mammakarzinom, Kolonkarzinom oder Osteosarkom, überexprimiert wird (Hollstein et al., 1991; Levine et al., 1991). Von essentieller Bedeutung war die Definition von fünf definierten „*hotspot*“ Mutationen des p53-Gens in ca. 40 % der p53-alterierten

Neoplasien (Levine et al. 1991). Die Realisierbarkeit der TZR-Gentherapie ist eine universelle Anwendbarkeit eines Tumor-reaktiven TZR auf den Patienten. Es zeigte sich, dass das p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Epitop keiner „hotspot“ Mutation unterlag und folglich ein attraktives Ziel für den TZR-Genstransfer darstellte (Gnjatic et al. 1998; Hoffmann et al. 2000; Houbiers et al. 1993; Theobald et al. 1995). **4)** Eine weitere Kategorie beinhaltet Selbstantigene, die einer Mutation unterlaufen. Bei der Cyclin-abhängigen Kinase 4 (CDK4) resultiert die Mutation in der Entwicklung eines neuartigen HLA-A2-restringierten T-Zell-Epitops (Wölfel et al., 1995). Auch wurden posttranslationale Modifikationen, wie beispielsweise die Unterglykosylierung von MUC-1, beschrieben (Vlad et al. 2004). **5)** Die letzte Klasse von TAAs beschäftigt sich mit den Tumor-assoziierten Viren. Hierzu zählen HPV und EBV (Lennette et al. 1995; Tindle 1996).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Tumorzellen anhand ihrer Antigenexpression von gesunden Körperzellen differenziert werden können. Jedoch darf nicht vernachlässigt werden, dass neben den Tumorzellen auch gesunde Körperzellen, wenn auch in einem geringeren Maße, die TAAs exprimieren können. Das p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumor-spezifische Antigen kann in einer geringen Konzentration auch auf normalen Körperzellen detektiert werden. In einer *in vitro* Untersuchung zeigten retroviral generierte p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische humane T- Zellen eine p53-spezifische Erkennung von gesunden Körperzellen (Theoret et al. 2008). Folglich kann von den Tumor-reaktiven T-Zellen eine unerwünschte, zielgerichtete Erkennung gegen gesunde Zellen erfolgen. Diese Autoimmunreaktion wird auch als „on target“-Reaktion bezeichnet und kann zu schwerwiegenden Entzündungen führen. In einer klinischen Studie wurden 10 Melanom-Patienten mit *in vitro* expandierten TILs der Spezifitäten MART-1 oder gp100 behandelt (Dudley et al., 2002). Bei vier Patienten zeigte sich eine Vitiligo und bei einem Patienten konnte eine Uveitis als Folge einer Autoimmunreaktion beobachtet werden. Jedoch sind solche Autoimmunreaktionen meist sehr gut therapierbar, so dass abgewogen werden muss, welche Nebeneffekte mit einer erfolgversprechenden Behandlung von metastasierten Tumoren vertretbar sind.

Die Problematik in der Erkennung von Tumorzellen durch die zytotoxischen T-Lymphozyten liegt meist in der bestehenden Selbsttoleranz gegenüber körpereigenen Antigenen. Während der Entwicklung der T-Lymphozyten spielt die

zentrale Toleranz eine essentielle Rolle. Im Thymus erfolgt eine negative Selektion der potentiellen autoreaktiven T-Zellen gegen Selbstantigene, indem diese über das thymidale Stroma sowie Dendritische Zellen präsentiert werden. Eine zu starke Affinität einer sich entwickelnden T-Zelle gegenüber einem Selbstantigen:MHC bzw. eine Affinität, welche unabhängig vom MHC oder Selbstantigen ist, führt zu deren Ausschluss aus dem T-Zellkompartiment. Die Mechanismen der zentralen und auch peripheren Selbsttoleranz sind die Grundlage einer meist nicht hinreichenden effizienten Tumorabwehr. Im Falle dessen, dass es sich bei den TAAs um mutierte Selbstantigene handelt, hängt die T-Zell-vermittelte-Immunantwort von dessen immunogenen Charakter und der quantitativen exprimierten Menge ab. Hinzukommend zeigten sich in Tumorzellen sogenannte „Immune-Escape“-Mechanismen, welche beispielsweise zu einer gezielten Runterregulation von MHC I-Molekülen führten. Das Ziel einer Tumorzelle ist es, vom Immunsystem nicht als eine fremde und entartete Zelle identifiziert zu werden. Die adoptive T-Zell-Therapie stellt sich der Herausforderung die Selbsttoleranz zu umgehen, indem Tumorantigen-spezifische T-Zellen mittels dem retroviralen Gentransfer generiert und in den Patienten reinfusioniert werden.

1.6 pp65₄₉₅₋₅₀₃-Virus-spezifische / Tumorantigen- und pp65₄₉₅₋₅₀₃-bi-spezifische T-Zellen für den adoptiven TZR-Transfer

Das humane Zytomegalievirus (HCMV, Synonym Humanes Herpes-Virus-5 (HHV5)) gehört zu den DNS-Viren der β -Herpesviren-Familie (Reddehase 2002). Das Virus ist ubiquitär in der gesamten Population verbreitet, so dass in den Industrieländern 50 bis 80 % und nahezu 100 % der Erwachsenen in den Entwicklungsländern, einschließlich China, betroffen sind (Gratama et al. 2001; Reddehase 2002). In einem immunkompetenten HCMV⁺ gesunden Wirt persistiert nach einer Erstinfektion das Virus lebenslang in einem latenten (ruhenden) Stadium in den Zellen der myeloiden Zelllinie (Taylor-Wiedeman et al. 1991; Kondo et al. 1996). Die Kontrollierung und Verhinderung der viralen Replikation sowie die Eliminierung von Virus-infizierten Zellen erfolgt durch die HCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Weekes et al. 1999; Wills et al 1999; Reddehase 2000). Auch konnte in gesunden HCMV-seropositiven Donoren eine hohe Frequenz an HCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen detektiert werden, welche das pp65₄₉₅₋₅₀₃(NLVPMVATV)-spezifische Epitop

erkannten (Wills et al. 1996; Gillespie et al. 2000). Folglich handelt es sich bei dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-Peptid um ein immundominantes Epitop. Dieses ist lediglich in den Zellen präsent, die von der Ruhephase in den Vermehrungszyklus des HCMV übergehen. Hierbei dient es als aktivierendes Steuerungsprotein. Vor der Stammzelltransplantation bestehen anfangs in einem immunsupprimierten HCMV⁺ Patienten keine immunologischen Kontrollmechanismen. Somit kann eine unkontrollierte Virusreplikation und Infektion von Zellen erfolgen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass nach einer allogenen Knochenmarktransplantation in die Rezipienten eine CMV-verursachte Pneumonie beobachtet wurde, welche keine nachweisbaren CMV-spezifischen cytotoxischen T-Lymphozyten rekonstituierte. Nach Tag 40 der Transplantation zeigte sich bei 65 % der Patienten, die defizient an CD8⁺ HCMV-spezifischen T-Zellen waren, ein hohes Risiko einer fatalen Pneumonie (Reusser et al. 1991). Die unkontrollierte HCMV-Reaktivierung oder Neuinfektion kann die Erkrankung der Leber, Lunge, Retina und des Gastrointestinaltrakts betreffen (Reddehase 2002). In einer klinischen Studie mit HCMV-seropositiven Risikopatienten konnte mittels einer intensiven Behandlung durch die Applikation der Medikamente Ganciclovir vor und Acyclovir nach der Knochenmarktransplantation eine Abnahme der HCMV-Reaktivierung und Erkrankung erzielt werden (Milano et al. 2011). Die Medikamente Ganciclovir und Acyclovir sind Analoga der Nukleinbase Guanin und inhibieren die virale DNS-Replikation. Hinzukommend zeigte sich, dass die Isolation, *in vitro* Expansion von HCMV-spezifischen T-Zellen aus einem MHC-identischen Donor und deren anschließende Reinfusion in einen immunkompromittierten Patienten, zu einer rekonstituierten, protektiven Immunität führen konnte (Riddell et al. 1990, 1991). Für die Immuntherapie ist es von besonderem Interesse, dass die HCMV-spezifischen T-Zellen mittels dem retroviralen TZR-Genstransfer eine bi-Spezifität erhalten können. Hierbei wurden HCMV-spezifische T-Zellen mit einer zusätzlichen Spezifität gegen ein mHag HA-2-Tumorantigen ausgestattet, ohne die endogene Spezifität zu verlieren (Heemskerk et al. 2004). Auch kam man kürzlich zu der Erkenntnis, dass EBV-spezifische T-Zellen, die mit einem chimären GD2-Rezeptor ausgestattet waren, in EBV-seropositiven Neuroblastompatienten ein längeres *in vivo* Überleben aufwiesen. Es zeigte sich, dass die Grundlage des längeren Überlebens auf die antigenabhängige Stimulation des endogenen EBV-spezifischen TZR der T-Zellen zurückzuführen war. Die retroviral transduzierten EBV-spezifischen T-Zellen, welche mit dem CD3-

spezifischen Antikörper OKT3 aktiviert wurden, verloren die Virusspezifität, was sich in einer verkürzten Lebensdauer widerspiegelte. Essentiell erschien es, dass die genetisch modifizierten T-Zellen in 50 % der Fälle zu einer Tumorregression oder Nekrose führten (Pule et al. 2008). Die Generierung von bi-spezifischen humanen T-Zellen stellt eine attraktive Strategie dar, um eine simultane Virus- und Tumorabwehr zu erzielen.

1.7 Ziele der Untersuchung

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimental-Untersuchungen hatten die folgenden spezifischen Ziele zum Gegenstand:

Die Analyse eines pp65₄₉₅₋₅₀₃-(NLVPMVATV)-spezifischen Doppelketten-TZR im Hinblick auf das Interaktionsverhalten mit humanen und murinen TZR α und - β Ketten

Die Generierung und Optimierung von verschieden-affinen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR-Konstrukten

Die Generierung und Analyse von pp65₄₉₅₋₅₀₃ / Tyrosinase₃₆₈₋₃₇₆ bzw. pp65₄₉₅₋₅₀₃ / p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-bi-spezifischen humanen T-Zellen

Die Analyse des Interaktionsverhaltens des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit humanen und murinen TZR α Ketten unterschiedlicher Antigenspezifität und Subfamilien-Zugehörigkeit

Die Optimierung des Sicherheitsaspektes eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR im Hinblick auf dessen residuelles Interaktionsverhalten

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Agarose	Biomol, Hamburg, Deutschland
Borsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Chromium-51 ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$)	Perkin Elmer, Boston, USA
Concanavalin A (ConA)	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Dimethylformamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
EDTA	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ficoll	Biochrom, Berlin, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Chemie, Deisenhofen Deutschland
Schwefelsäure (H_2SO_4)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure rauchend (HCl)	Fluka, Buchs, Schweiz
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Base	Sigma, Deisenhofen Deutschland
Tryptophanblau	Sigma, Deisenhofen Deutschland
Tween20	Sigma, Deisenhofen Deutschland

Triton-X-100	Sigma, Deisenhofen Deutschland
--------------	-----------------------------------

2.2 Substanzen und Medien für die Zellkultur

Anti-CD8-Magnetpartikel	Miltenyi-Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen Deutschland
CD3/CD28 Magnetpartikel	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
DMEM	BioWhittaker, Verviers, Belgien
Dyna Dynabeads	Dyna, Hamburg, Deutschland
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA, Linz, Österreich
Gentamycin	BioWhittaker, Verviers, Belgien
Geneticin (G418)	Gibco, Eggenheim, Deutschland
HEPES-Puffer	BioWhittaker, Verviers, Belgien
Histidinol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Humanes AB-Serum	Transfusionszentrale der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg- Universität Mainz, Deutschland
Humanes rekombinantes Interleukin 2 (IL-2)	Chiron, Tuttlingen, Deutschland
Humanes Interleukin 2	Roche, Mannheim, Deutschland
Humanes rekombinantes Interleukin-7	R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt, Deutschland
Humanes rekombinantes Interleukin-15	Biosource, Solingen, Deutschland
L-Glutamin	BioWhittaker, Verviers, Belgien

Natriumbikarbonat (NaHCO_3^-)	BioWhittaker, Verviers, Belgien
Na-Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein, Deutschland
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	BioWhittaker, Verviers, Belgien
Polybren	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Puromycin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
RPMI 1640	BioWhittaker, Köln, Deutschland
RPMI 1640 (farblos)	BioWhittaker, Köln, Deutschland
Opti-MEM	Gibco, Eggenstein, Deutschland
PBS (Phosphat-gepufferte Saline)	Biochrom, Berlin, Deutschland
1x PBS (steril)	Gibco, Eggenstein, Deutschland
Phytohämagglutinin, PHA	Gibco, Eggenstein, Deutschland
Trypsin-EDTA	Gibco, Eggenstein, Deutschland

2.3 Zellkulturmedien

2.3.1 Komplettes RPMI zur Kultivierung von humanen Zelllinien (10 % RPMI)

500 ml RPMI 1640

56 ml hitzeinaktiviertes FKS

entspr. 10 %

5,6 ml L-Glutamin

entspr. 2 mM

560 µl Geneticin

entspr. 50 µM

2.3.2 Komplettes RPMI zur Kultivierung von humanen PBMZ und CMV-spezifischen T-Zellen (hu RPMI)

500 ml RPMI 1640

60 ml hitzeinaktiviertes humanes AB-Serum	entspr. 10 %
6 ml L-Glutamin	entspr. 2 mM
15 ml HEPES-Puffer	entspr. 25 mM
6 ml Na-Penicillin/Streptomycin	entspr. 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin

2.3.3 Komplettes DMEM zur Kultivierung von Verpackungszelllinien/Phoenix-Zelllinien (10 % DMEM)

500 ml DMEM

60 ml hitzeinaktiviertes FKS	entspr. 10 %
6 ml L-Glutamin	entspr. 2 mM
6 ml NEAA (nicht-essentielle Aminosäuren)	entspr. 1 x
15 ml HEPES-Puffer	entspr. 25 mM
6 ml Na-Penicillin/Streptomycin	entspr 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin

2.3.4 Komplettes RPMI zur Kultivierung der murinen T-Zell-Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta^+CD3\zeta$

500 ml RPMI 1640

59 ml hitzeinaktiviertes FKS	entspr. 10 %
5,9 ml L-Glutamin	entspr. 2 mM
8,6 ml Na-Bikarbonat 7,5 %	
5,9 ml HEPES-Puffer	entspr. 10 mM
5,9 ml Na-Penicillin/Streptomycin	entspr. 100 IU/ml Penicillin

30 µl β-Mercaptoethanol 100 µg/ml Streptomycin
entspr. 50 µM

2.4 Medium zur Kryokonservierung von Zellen

27 ml hitzeinaktiviertes FKS

3 ml DMSO entspr. 10 %

2.5 Peptide

Die folgenden Peptide wurden benutzt:

pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ : NLVPMVATV	Biosynthan, Berlin, Deutschland
MDM2 ₈₁₋₈₈ : LLGDLFGV	Biosynthan, Berlin, Deutschland
p53 ₂₆₄₋₂₇₂ : LLGRNSFEV	Biosynthan, Berlin, Deutschland
gp100 ₂₈₀₋₂₈₈ : YLEPGPVTA	Biosynthan, Berlin, Deutschland
AML ₁₄₋₂₂ : RLLRVALLL	Biosynthan, Berlin, Deutschland
FluM1 ₅₈₋₆₆ : GILGFVFTL	Biosynthan, Berlin, Deutschland
VSV-N ₅₂₋₅₉ : RGYVYQGL	Biosynthan, Berlin, Deutschland

Die Peptide wurden entsprechend ihres Löslichkeitsverhaltens in mit DMSO-versetztem oder reinem destilliertem Wasser in einer Konzentration von 5 oder 10 mg/ml gelöst.

2.6 Substanzen für die Bakterienkultur

Ampicillin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bactotrypton	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tetrazyklin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
-------------	------------------------------------

2.6.1 LB-Medium zur Kultivierung von Bakterienkulturen

10 g NaCl	
10 g Bactotrypton	
5 g Hefeextrakt	
1 l destilliertes oder deionisiertes Wasser	pH 7,0

2.6.2 LB-Platten zur Kultivierung von Bakterienkulturen

10 g NaCl	
10 g Bactotrypton	
5 g Hefeextrakt	
15 g Agar	
1 l destilliertes oder deionisiertes Wasser	pH 7,0

Die Nährmedien wurden autoklaviert und anschließend im Wasserbad auf 55°C temperiert. Nach Bedarf erfolgte die Zugabe der Antibiotika Ampicillin oder Amipicillin/Tetrazyklin in einer Konzentration von 5 µg/ml. Zur Herstellung der Kulturplatten wurde der noch flüssige Agar in Petrischalen gegossen.

2.7 Kommerzielle Versuchssysteme

2.7.1 Punktmutagenese-PCR

QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
---	---------------------------

2.7.2 Plasmid-Extraktion

QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
---------------------------	-----------------------------

EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
---------------------------	-----------------------------

2.7.3 DNS-Aufreinigung

QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
-------------------------------	-----------------------------

2.7.4 DNS-Marker zur Gelelektrophorese

1 kb und 100 Bp DNS-Marker („ <i>Ladder</i> “)	NEB, Frankfurt/Main, Deutschland
--	-------------------------------------

2.7.5 Transfektionsreagenzien

Fugene 6	Roche, Mannheim, Deutschland
Mirus	Mirus Bio LLC, Madison, USA

2.7.6 ELISA

Mouse IL-2 BD OptEIA ELISA Set	BD, San Diego, USA
Human IFN- γ OptEIA ELISA Set	BD, San Diego, USA
Human IFN- γ ELISA Ready-SET-Go	eBioscience, San Diego, USA

2.7.7 Intrazelluläre Färbung und Intrazelluläre Zytokin-Färbung

Der Antikörper Interferon- γ -APC, die BD GolgiStop-Lösung (Protein Transport Inhibitor) sowie der „*Perm/Wash Puffer I*“ (enthält Saponin) wurden von der Firma BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland, bezogen.

2.7.8 Analyse der Subfamilienzugehörigkeit der TZR β Ketten von humanen T-Zellen

IOTest Beta Mark TCR V Kit
Beckman Coulter, Krefeld,
Deutschland

2.7.9 CD8 positive magnetische Aufreinigung

LS-Säulen
Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach,
Deutschland

MACS-Puffer:
1x PBS (500 ml)
0,5 % FKS
2 mM EDTA
pH 7,2

2.8 Enzyme

Die Restriktionsendonukleasen (BamHI, NcoI, KpnI, PstI, CIP, DpnI, Sac I, Sac II, Hind III) sowie die T4 DNS-Ligase und T4 DNS-Polymerase wurden von der Firma NEB, Frankfurt/Main, Deutschland, bezogen. Hinzukommend wurde die Pfu DNS-Polymerase (Agilent, Böblingen, Deutschland) und Pfx50-Polymerase (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

2.9 Vektoren

Die retroviralen pBullet Vektoren mit den Resistenzgenen für Geneticin bzw. Neomycin (pBullet_neo) oder Puromycin (pBullet_puro) waren bereits im Labor etabliert (Voss et al. 2005). Die Vektoren enthielten das Gen für die Ampicillin-Resistenz, welches essentiell für die Durchführung von Klonierungsverfahren zur Selektion positiver bakterieller Klone war. In diese retroviralen Vektoren waren bereits die Gene für die TZR α und TZR β Kette der Spezifitäten für pp65₄₉₅₋₅₀₃, p53₂₆₄₋₂₇₂, MDM2₈₁₋₈₈, gp100₂₄₀₋₂₈₈ und AML₁₄₋₂₂ kloniert. Die Gene für die TZR α

Kette waren auf dem retroviralen pBullet Vektor mit der Puromycin-tragenden Resistenz und die, der TZR β Kette auf dem retroviralen pBullet Vektor mit dem Geneticin-Resistenzgen lokalisiert. Des Weiteren erfolgte die Klonierung der Gene für die TZR α und - β Kette nach Möglichkeit über eine NcoI- und BamHI-Schnittstelle. Für die Expression des TZR wurden zwei retrovirale Vektorsysteme benötigt (2-Plasmide-retrovirales Vektorsystem). Des Weiteren wurden Einzelketten- oder Doppelketten-TZR Konstrukte verwendet. Die Sequenz des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Doppelketten- und Einzelketten-TZR war bereits Kodon-optimiert und mit einer zusätzlichen Disulfidbrücke zwischen den C-Domänen ausgestattet (Kuball et al. 2007). Die Klonierung erfolgte in den retroviralen pBullet Vektor mit dem Geneticin-Resistenzgen (pBullet_neo). Bei dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Doppelketten- oder Einzelketten-TZR waren alle Komponenten für die Expression des TZR auf einem retroviralen Vektorkonstrukt kloniert (1-Plasmid-retrovirales Vektorsystem). Hinzukommend wurde ein neuartiger p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischer Einzelketten-TZR (Voss et al., 2010) verwendet, welcher für die Expression 2 retrovirale Vektorsysteme benötigte (2-Plasmide-retrovirales Vektorsystem). Der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR war auf dem retroviralen pBullet Vektor mit der Puromycin-tragenden Resistenz lokalisiert (pBullet_puro). Die stabilisierende und für die Expression des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR essentielle Komponente MuC α war auf einem weiteren retroviralen pBullet Vektor mit der Geneticin-Resistenz kloniert (pBullet_neo). Der CMV-pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Doppelketten- TZR wurde freundlicherweise von Herrn Prof. X zur Verfügung gestellt. Die Klonierung erfolgte in den retroviralen pBullet Vektor mit der Puromycin-tragenden Resistenz. Der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Einzelketten-TZR beruhte auf der Ausgangssequenz des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten-TZR. Die Generierung des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Einzelketten-TZR erfolgte von Herrn Dr. X. Hierbei wurden die Gene für den pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Einzelketten-TZR auf den retroviralen pBullet Vektor mit der Puromycin-tragenden Resistenz kloniert. Die Klonierung der stabilisierenden und für die Expression des Einzelketten-TZR essentielle Komponente MuC α erfolgte auf den retroviralen pBullet Vektor mit dem Resistenzgen für Geneticin. Während für die Expression des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Einzelketten-TZR zwei retrovirale Vektorsysteme benötigt wurden, lag der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Doppelketten-TZR auf einem retroviralen System vor. Der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Doppelketten- sowie

der Einzelketten-TZR waren Kodon-optimiert sowie in den C-Domänen murinisiert (i.e. chimärisiert).

Die pHIT60, pCOLT-GaLV (Soneoka et al. 1995) und VSV-G (Cooray et al. 2012) getragenden pBullet Vektoren waren ebenfalls im Labor etabliert und kodierten für essentielle retrovirale Virusbestandteile. Das Gen pHIT60 kodiert für gag („gruppenspezifische“ Antigene) und pol (reverse Transkriptase und Integrase als „Polymerase“-Genkomplex), pCOLT-GaLV und VSV-G entsprechen den env („*envelope*“, virale Hüllproteine). Während mit dem GaLV-Hüllprotein ausgestattete rekombinante Retroviren humane Zellen infizierten, fanden mit dem VSV-G Hüllprotein pseudotypisierte Retroviren bei den murinen Zellen, wie der murinen Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ , Verwendung.

2.9.1 Auflistung der verwendeten TZR Konstrukte

Die TZR α Kette war auf dem retroviralen pBullet Vektor mit der Puromycin-tragenden Resistenz und die TZR β Kette auf dem Geneticin-tragenden retroviralen pBullet Vektor kloniert. Demnach handelte es sich um ein 2-Plasmide-retrovirales Vektorsystem. Die TZR Konstrukte waren im Labor etabliert. Im Anhang werden die Sequenzen nicht aufgeführt:

- a) Hu Wt TZR gp100₂₈₀₋₂₈₈: YLEPGPVTA (Schaft et al. 2003)
- b) Hu Wt TZR AML₁₄₋₂₂: RLLRVALLL (Isolation des ZTL Klons 1C6: Distler et al. 2008, Isolation und Charakterisierung der TZR Ketten: unpublizierte Daten von Herrn Dr. X, Frau Dr. X und Frau Dr. X.
- c) Mu Wt TZR p53₂₆₄₋₂₇₂: LLGRNSFEV (Kuball et al. 2005)
- d) Mu Wt TZR MDM2₈₁₋₈₈: LLGDLFGV (Stanislawski et al. 2001)
- e) CMV-pp65₄₉₅₋₅₀₃- spezifische TZR Konstrukte:

- 1) Doppelketten-TZR eines 2-Plasmide-retroviralen Vektorsystems:
Hu Wt TZR CMV

Die TZR α Kette war auf dem retroviralen pBullet Vektor mit der Puromycin- und die TZR β Kette auf dem retroviralen pBullet Vektor mit der Geneticin-Resistenz kloniert. Die TZR α und - β Ketten wurden freundlicherweise von

Frau Dr. X zur Verfügung gestellt. Die Klonierung der Sequenzen in die retroviralen pBullet Vektoren erfolgte von Frau Dr. X.

2) Gezielte Punktmutagenese des Hu Wt TZR CMV zu Hu Mt TZR CMV

Die Sequenz des Hu Wt TZR CMV wurde für die gezielte Punktmutagenese zur Generierung von neuartigen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR verwendet. Hierbei wurde der Hu Mt TZR CMV, Hu Mt α TZR CMV / Hu Wt β TZR CMV und Hu Wt α TZR CMV / Hu Mt β TZR CMV selbst generiert. Bei den Konstrukten handelte es sich, wie bei dem Hu Wt TZR CMV, um ein 2-Plasmide-retrovirales Vektorsystem

3) Kodonoptimierung des Hu Wt TZR CMV: Hu Wt coTZR CMV

Die Firma Life Technologies (Regensburg, Deutschland) wurde mit der Kodonoptimierung beauftragt. Die Klonierung in die retroviralen pBullet Vektoren erfolgte im Rahmen meiner Dissertation.

4) CMV-pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischer Einzelketten-TZR: Chim Hu sc TZR CMV/MuC α T84C (Nomenklatur ImMunoGeneTics (IMGT))

Die Ausgangssequenz (Hu Wt dc coTZR CMV) zur Generierung des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Einzelketten-TZR wurde von Herrn Prof. X zur Verfügung gestellt. Ebenso war eine zusätzliche Disulfidbrücke zwischen den konstanten Domänen integriert. Hierbei wurde die Aminosäure Threonin gegen ein Cystein auf der MuC α Domäne (T84C) gezielt ausgetauscht. Des Weiteren waren die konstanten Domänen murinisiert. Der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Einzelketten-TZR wurde von Herrn Dr. X generiert. Hierbei wurde der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Einzelketten-TZR auf den retroviralen pBullet Vektor mit der Puromycin-Resistenz kloniert. Exklusiv befand sich die MuC α Domäne auf dem retroviralen pBullet Vektor mit dem Geneticin-tragenden Resistenzgen. Für die Expression des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Einzelketten-TZR wurden 2-Plasmide-retrovirale Vektoren benötigt. Die Identifikation sowie DNS Isolierung und Aufreinigung positiver Klone für das Einzelketten-TZR Konstrukt erfolgten im Rahmen meiner Dissertation.

5) CMV-pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischer Doppelketten-TZR eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems: Hu Wt dc coTZR CMV

Der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Doppelketten-TZR wurde freundlicherweise von Herrn Prof. X zur Verfügung gestellt (siehe Beschreibung unter 4). Die

Klonierung des Hu Wt dc coTZR CMV in den retroviralen pBullet Vektor mit der Puromycin-Resistenz wurde im Rahmen meiner Dissertation durchgeführt.

f) p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische TZR Konstrukte:

1) Doppelketten-TZR Konstrukt eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems:

Der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Doppelketten-TZR war Kodon-optimiert sowie mit dem F2A-Element (Szymczak et al. 2004) ausgestattet. Auch befand sich eine zusätzliche Disulfidbrücke zwischen den C-Domänen (Kuball et al. 2007). Die essentiellen Komponenten für die Expression des Doppelketten-TZR fanden sich alle auf einem Vektor kloniert vor. Die Klonierung des Einzelketten-TZR in den retroviralen pBullet Vektor mit dem Geneticin-Resistenzgen wurde von dem medizinischen Doktoranden Herrn X. Die Bezeichnung der Ursprungssequenz lautete 0808089_GAP_TCR α CysFMDV2ATCR β Cys (Life Technologies, Regensburg, Deutschland) und wurde im Folgenden zur Vereinfachung als Mu Wt dc coTZR p53 aufgeführt.

2) Einzelketten-TZR Konstrukt eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems:

Der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR war ebenfalls Kodon-optimiert und mit dem F2A-Element ausgestattet. Die beschriebene Disulfidbrücke zwischen den C-Domänen war integriert (Kuball et al. 2007). Die Klonierung des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Doppelketten-TZR erfolgte im Rahmen meiner Dissertation in den retroviralen pBullet Vektor mit der Geneticin-Resistenz. Die Ursprungssequenz lautete 0808093_scp53TCR_CYSFMDV2AC α (Life Technologies, Regensburg, Deutschland) und wurde im Folgenden als Mu Wt sc coTZR p53 bezeichnet.

Die Sequenzen sowie verwendeten Primer für die Klonierungsverfahren werden im Anhang bzw. auf dem Datenträger aufgeführt.

2.10 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Die folgenden Antikörper zur Detektion von Oberflächenrezeptoren wurden von der Fa. Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland) bzw. BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland) bezogen:

Human CD8	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Human CD4	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Human CD3	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Human V β 13.1	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Human V β 17	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Human V β 14	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Hu PanTZR $\alpha\beta$ -PC5	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
IOTest Beta Mark TCR V Kit	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
IgG2b	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Maus V β 3	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Maus V β 6	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Mu TZR β	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland

Die p53₂₆₄₋₂₇₂⁻, pp65₄₉₅₋₅₀₃⁻ und MDM2₈₁₋₈₈⁻-spezifischen Tetramere wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. X zur Verfügung gestellt: Die p53₂₆₄₋₂₇₂⁻-spezifischen Tetramere waren mit dem Fluorochrom PE (Phycoerythrin) bzw. PECy7 (Tandemkonjugat: Phycoerythrin/Cy7) und die pp65₄₉₅₋₅₀₃⁻-spezifischen Tetramere mit PE bzw. APC (Allophycocyanin) markiert.

FACS Puffer	500 ml PBS (1x)
	0,5 ml Paraformaldehyd entspr. 0,1 %

2.11 Agarosegele für die Gelelektrophorese

Vorzugsweise wurden 1 % Agarosegele verwendet. 5 g Agarose wurden in 500 ml 1:10 verdünntem 5x TBE gelöst. Hierfür wurde die Lösung in einer handelsüblichen Mikrowelle erhitzt. Niedrig prozentige Agarosegele führen zu einer besseren Auftrennung von großen DNS-Fragmenten und höher prozentige verbessern die Auftrennung von kleinen Fragmenten. Folglich sei darauf hingewiesen, dass je nach erwarteten DNS-Fragmenten der Prozentgehalt der Agaroselösung adaptiert wurde. Zur Erhöhung der Dichte der DNS wurde diese in einem 1:5 Verhältnis mit dem glyzerinhaltigen Ladepuffer Bromphenolblau (5x) versetzt.

5x TBE Puffer	54 g Tris-Base
	20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
	27,5 g Borsäure
	mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen
5x Ladepuffer	125 mg Bromphenolblau
	entspr.. 0,25 %
(Bromphenolblau)	15,0 ml Glycerin entspr.. 30 %
	mit destilliertem Wasser auf 50 ml auffüllen

2.12 Zellen, Zelllinien und Transfektanten

2.12.1 Humane PBMZ

Die Blutproben („*Buffy Coats*“) wurden von der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz (Deutschland) bezogen. Für die Bestellung wurden sowohl der HLA-A2- als auch der HCMV-Status der gesunden Spender berücksichtigt. Die humanen PBMZ wurden nach Angaben des Herstellers präpariert und kryokonserviert. Die Kultivierung erfolgte in hu RPMI

unter Applikation des Zytokins IL-2 sowie in besonderen Fällen zusätzlich mit IL-7. Die Aktivierung der Zellen für die retrovirale Transduktion wurde wie unter 3.15 beschrieben durchgeführt. Nach der retroviralen Transduktion wurden die humanen PBMZ entsprechend der verwendeten retroviralen Vektorsysteme mit Antibiotika behandelt. Bei der Verwendung des pBullet_neo-Vektors wurde für 7 Tage mit 800 µg/ml Geneticin (G418) behandelt. Der pBullet_puro-Vektor konnte mittels der Applikation von 5 µg/ml Puromycin für 2 Tage selektiert werden. Die Expansion der humanen T-Zellen erfolgte mittels der CD3/CD28 Beads-Stimulierung oder peptidspezifisch unter Anwendung des T2-Protokolls. Besondere Stimulationsverfahren wurden im Methodenteil aufgeführt.

2.12.2 Etablierte Zelllinien im Labor

- 1) **T2:** Herkunft aus dem Labor von Linda Sherman, USA, B- und T-lymphoblastoides Hybrid, HLA-A2.1 positiv, Antigenpeptid-Transporter- („*transporter associated with antigen processing (TAP)*“)-Defizienz
- 2) **SupT1:** Herkunft ATCC, USA, humanes T-Zell-lymphoblastisches Lymphoma
Die SupT1 Zelllinie wurde im Detail auf die Expression von Oberflächenrezeptoren sowie endogenen TZR analysiert (Abbildung 4). Die Expression des exogenen TZR nach der retroviralen Transduktion führt zur proportionalen Hochregulation des CD3 Rezeptors. Des Weiteren wurde für die Selektion nach der retroviralen Transduktion die benötigte Konzentration an G418 und Puromycin bestimmt (Abbildung 5).
- 3) **K562:** Herkunft Prof. X, CML, A2.1 negativ.
- 4) **K562-A2:** A2.1-Allel transfizierte Zelllinie K562. Die Selektion der A2.1-positiven Transfektanten erfolgte mit der Zugabe von Geneticin (G418) in einer Konzentration von 800 µg/ml zu dem Kulturmedium.

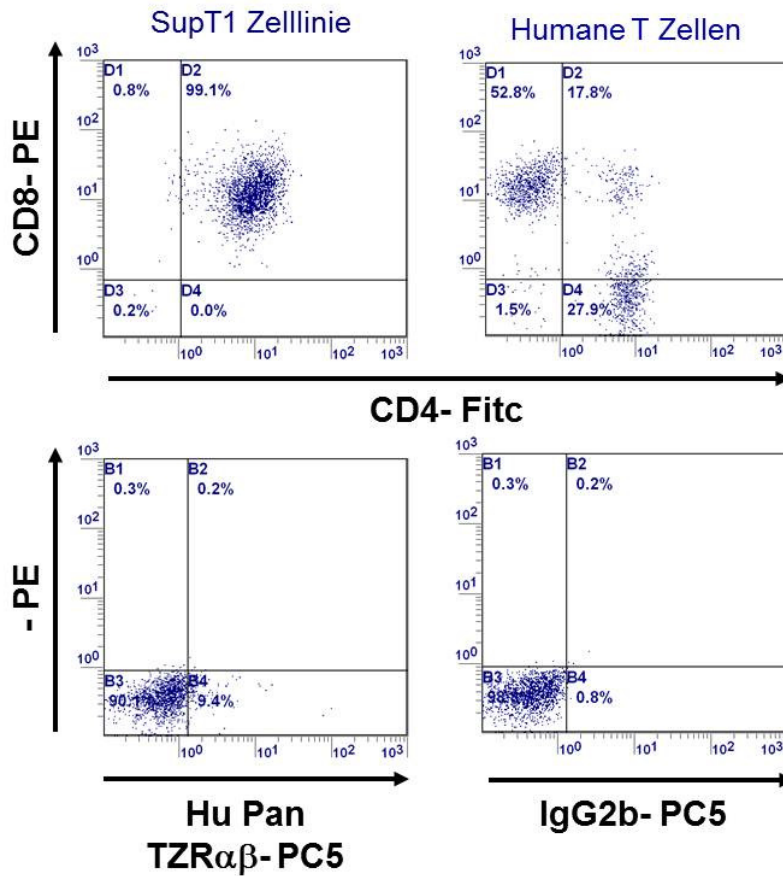


Abbildung 4: Charakterisierung der humanen SupT1 Zelllinie

Die humane SupT1 Zelllinie exprimiert an der Zelloberfläche sowohl den CD4 als auch den CD8 Ko-Rezeptor. Als Kontrolle für die kombinierte Färbung gegen CD4 und CD8 wurden humane T-Zellen verwendet. Hinzukommend konnte kein Doppelketten-TZR an der Zelloberfläche detektiert werden (Hu Pan TZR $\alpha\beta$ negativ).

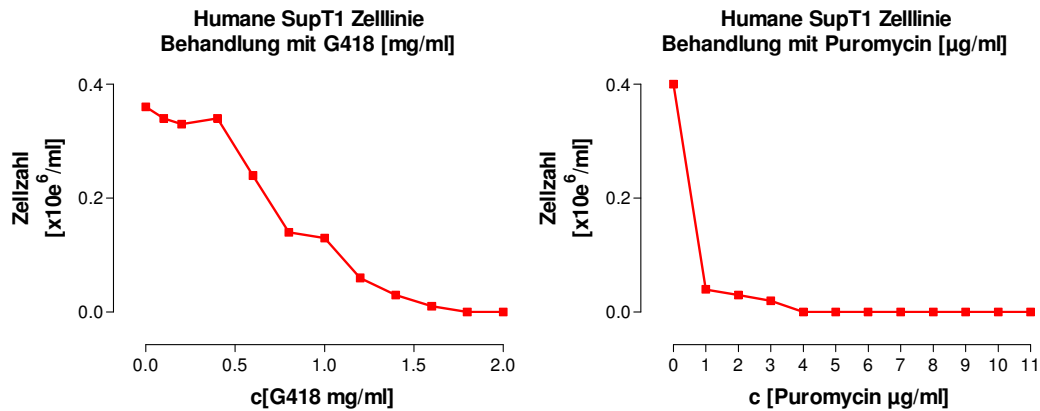


Abbildung 5: Bestimmung der G418- und Puromycin-Toleranz der humanen SupT1 Zelllinie

Es ließ sich eine konzentrationsabhängige Toleranz gegenüber der Antibiotika G418 und Puromycin feststellen. Nach der retroviralen Transduktion wurde die SupT1 Zelllinie für 7 Tage mit 1,6 mg/ml G418 und 2 Tage lang mit 5 µg/ml Puromycin behandelt.

- 5) **Saos-2:** Herkunft Sherman Labor / ATCC, humanes Osteosarkom, adhärenzte Zelllinie
- 6) **Saos 2/143:** Saos-2 Zellen wurden mit dem humanen *p53*-Gen transfiziert. Das humane *p53*-Gen trägt eine Mutation, welches nach der Translation den Aminosäurerest 143 (V zu A) betrifft (Dittmer et al. 1993; Theobald et al. 1995). Zur Selektion auf die *p53* Expression wurde das Kulturmedium mit G418 in einer Konzentration von 400 µg/ml versetzt.

Die Zellen wurden in 10 % RPMI, bei 37°C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre in T25- oder T75-Zellkulturflaschen kultiviert.

7) Murine T-Zell-Hybridomzellen 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ :

Die murine Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ exprimiert den CD4 Oberflächenrezeptor. Es konnte kein Doppelketten-TZR an der Zelloberfläche detektiert werden (Abbildung 6). Die Zelllinie stammte aus der murinen Thymom-Linie BW5147. Zur Kultivierung der Zellen wurde ein spezielles RPMI-Medium verwendet. Zweimal pro Woche

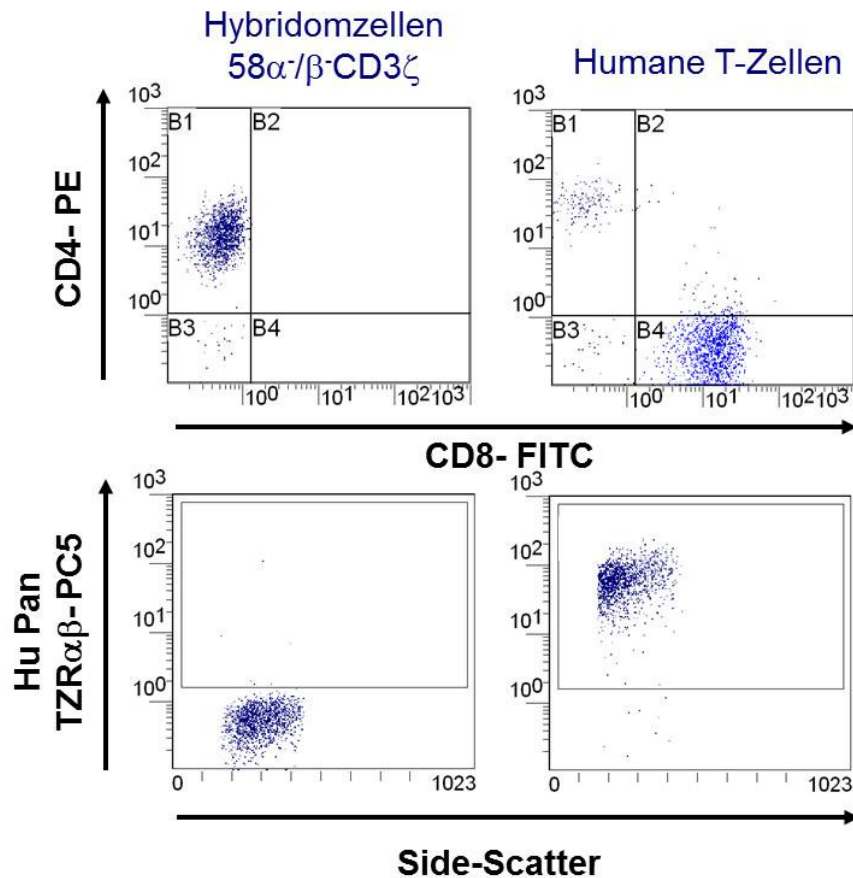


Abbildung 6 Charakterisierung der murinen T-Zell-Hybridomzelllinie $58\alpha\beta\text{-CD3}\zeta$

Die murine T-Zell-Hybridomzelllinie $58\alpha\beta\text{-CD3}\zeta$ zeigte im Vergleich zu den humanen T-Zellen lediglich die Expression des CD4 Oberflächenrezeptors. Es konnte kein Doppelketten-TZR an der Zelloberfläche detektiert werden (Hu Pan TZR $\alpha\beta$ negativ).

wurden die Zellen auf $0,25 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Zur Selektion der CD3 ζ Expression wurde Histidinol in einer Konzentration von 2 mg/ml zum Kulturmedium hinzugegeben. Die Zellen wurden nach der retroviralen Transduktion mit 2 mg/ml Geneticin (G418) und 5 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin selektiert (Abbildung 7).

8) Tyrosinase-Klon (IVS-B): Herkunft Prof. X.

Der Tyrosinase₃₆₈₋₃₇₆-spezifische T-Zellklon (IVS-B T-Zellklon) wurde freundlicherweise von Herrn Prof. X (Wölfel et al. 1994) zur Verfügung gestellt. Die Zellen exprimieren einen Tyrosinase₃₆₉₋₃₇₆-spezifischen TZR, welcher der V β 14

Subfamilie angehört (Abbildung 8). Die Antigenkategorie gehört zur Klasse der Melanozyten-Differenzierungsantigene, die auch in Melanomen überexprimiert werden. Des Weiteren exprimieren die Zellen an der Zelloberfläche den CD8 Ko-Rezeptor. Für den CD4 Rezeptor erschienen die Tyrosinase₃₆₈₋₃₇₆-spezifischen T-Zellen negativ. Die Stimulierung erfolgte mit einer EBV-transfizierten B-Zelllinie, den sogenannten Alex-B Zellen, sowie einer Melanom-Zelllinie, den Sk-Mel 29 Zellen. Beide Zellarten wurden vor der Zugabe zu den IVS-B T-Zellen mit 10000 rad bestrahlt. In einer 24-Kavitäten-Platte wurden 0,5 bis 1×10^6 IVS-B T-Zellen, $0,1 \times 10^6$ bestrahlte Sk-Mel 29 und $0,2 \times 10^6$ bestrahlte Alex-B Zellen in hu RPMI ausgesät. Anschließend wurden 250 U/ ml Proleukin 2 zugegeben. Nach 7 Tagen der Stimulierung erfolgte ein Mediumwechsel, indem die Hälfte des alten Kulturmediums durch neues ersetzt wurde. Ebenso wurde entsprechend des frischen Kulturmediums 250 U/ml Proleukin 2 appliziert. Die Stimulierung mit neuen SK- Mel 29 und Alex-B-Zellen erfolgte im Zyklus von 10 Tagen. Zur Selektion der Zellen nach der retroviralen Transduktion wurden die gleichen Bedingungen wie bei den humanen T-Zellen gewählt.

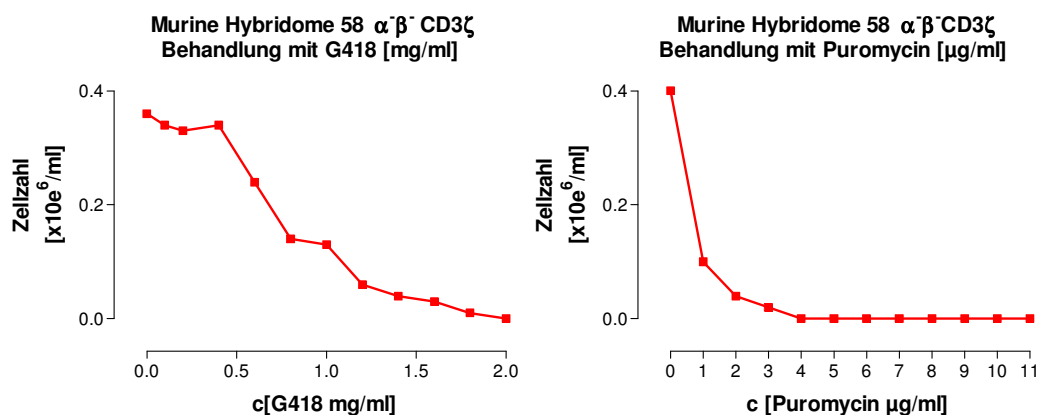


Abbildung 7: Bestimmung der G418- und Puromycin-Toleranz der murinen Hybridomzellen 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ

Es konnte eine hohe Toleranz gegenüber G418 festgestellt werden. Gegenüber Puromycin war diese wesentlich geringer. Die murine Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ wurde mit 2 mg/ml G418 und 5 μ g/ml Puromycin nach der retroviralen Transduktion behandelt.

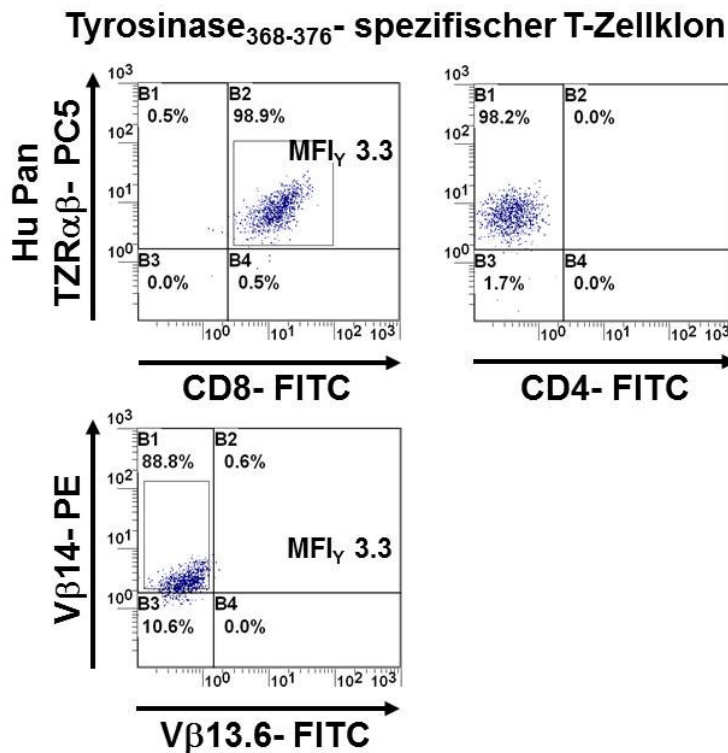


Abbildung 8: Phänotypisierung des Tyrosinase₃₆₈₋₃₇₆-spezifischen T-Zellklons

Zur Detektion der Expression des endogenen Tyrosinase₃₆₈₋₃₇₆-spezifischen TZR wurden die Zellen mit dem Hu PanTZRαβ-Antikörper angefärbt. Der Tyrosinase₃₆₈₋₃₇₆-spezifische TZR gehört der Vβ14 Subfamilie an (FACS-Analyse sowie persönliches Gespräch mit Herrn Dr. X.

9) Verpackungszelllinien zur Herstellung retroviraler Überstände für die Transduktion von humanen und murinen Zellen:

Die humanen Verpackungszelllinien Phoenix Ampho und Phoenix Eco (Nolan Labor, Stanford Universität, USA) wurden in kompletten 10 % DMEM kultiviert. Aufgrund des semi-adhärenten Verhaltens der Zellen wurden diese vor Gebrauch sowie Propagation mit 5 ml PBS gewaschen und mit 2,5 ml Trypsin-EDTA vom Kulturflaschenboden gelöst. Ein weiterer Waschschrift zur Entfernung des Trypsin-EDTAs erfolgte in 10 % DMEM. Die Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen in einer Zelldichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/Zellkulturflasche aufgenommen.

2.12.3 Selbstgenerierte oder neu etablierte Zellen

1) CMV-pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische humane T-Zellen

Es wurden HLA-A2- sowie HCMV-seropositive Blutproben von der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz (Deutschland) bezogen. Die Aufreinigung der PBMZ erfolgte laut Hersteller (Gebrauchsanleitung Leucosep, Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland). Darauffolgend erfolgte eine positive CD8 magnetische Zellsortierung. Die isolierten CD8⁺ T-Zellen wurden mit dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-NLVPMVATV-spezifischen Peptid stimuliert. Das Restimulationsverfahren resultierte in der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Akkumulation und Expansion von pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen T-Zellen. Die detaillierte Beschreibung des Verfahrens wurde unter 3.10 und 3.12 aufgeführt. Die Selektion der pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen T-Zellen nach der retroviralen Transduktion erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie bei den humanen T-Zellen. Die Zellen wurden in hu RPMI in einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ /ml kultiviert.

2) CMV₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischer T21 T-Zellklon

Der CMV-pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T21 T-Zellklon wurde freundlicherweise von Frau Prof. X zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte wie beschrieben (Neudorfer et al. 2007). Die Selektion der Zellen nach der retroviralen Transduktion wurde wie bei den humanen T-Zellen durchgeführt.

3) CMV-pp65₄₉₅₋₅₀₃- und p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-bi-spezifische humane T-Zellen

Die selbstgenerierten und expandierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen humanen T-Zellen wurden mittels einer retroviralen Transduktion oder eines RNS Gentransfers mit einem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR ausgestattet. Die anschließende Selektion erfolgte laut Vorschrift wie bei den humanen T-Zellen. Die Expansion der bi-spezifischen T-Zellen erfolgte über eine pp65₄₉₅₋₅₀₃- sowie p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidspezifische Stimulation mit peptidbeladenen T2-Zellen (3.13). Als Kulturmedium wurde hu RPMI verwendet.

Hinzukommend wurden der Tyrosinase₃₆₈₋₃₇₆-spezifische sowie der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T21 T-Zellklon mit einem zweiten TZR ausgestattet. Des Weiteren

erfolgte die simultane retrovirale Transduktion von HCMV-negativen humanen T-Zellen mit einem pp65₄₉₅₋₅₀₃- und einem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR.

Die verwendeten pp65₄₉₅₋₅₀₃- sowie p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidspezifischen TZR-Konstrukte wurden unter 2.9.1 aufgelistet und detailliert beschrieben. Die Sequenzen sowie die verwendeten Primer wurden im Anhang bzw. auf dem Datenträger beigefügt.

4) Humane Jurkat-76 Zelllinie

Die Jurkat-76 Zelllinie wurde aus einer humanen klonalen T-Zell-Leukämie generiert. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Herrn Dr. X aus dem Labor von Herrn Prof. X zur Verfügung gestellt. Kennzeichnend für die Jurkat-76 Zellen ist der Verlust an endogenen TZR α und - β Ketten. Normalerweise exprimieren die Zellen keinen CD3 Rezeptor an der Zelloberfläche. Jedoch erfolgt nach der retroviralen Transduktion mit der Expression eines TZR die proportionale Hochregulation des CD3 Rezeptors. Die Zellen wurden in 10 % RPMI kultiviert und zweimal pro Woche auf eine Zellzahl von $0,3 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Die Selektion nach der retroviralen Transduktion wurde mit 1,6 mg/ml Geneticin (G418) und 5 μ g/ml Puromycin durchgeführt.

2.13 Chemokompetente Bakterienzellen

Die chemokompetenten Bakterienzellen des Escherichia Coli Stammes XL-1 Blue und JM 109 waren bereits im Labor etabliert und sind vorbeschrieben (Bullock et al. 1987). Die XL-1 Blue Bakterienzellen besitzen ein Tetrazyklin-Resistenz-kodierendes F-Plasmid.

Benötigte Lösungen zur Herstellung der chemokompetenten Zellen:

Tfb I	30 mM Kobaltacetat
	50 mM MnCl ₂
	100 mM CaCl ₂
	15 % Glyzerin
	pH 5,8 mit Essigsäure einstellen
	steril filtrieren

Tfb II	10 mM Mops-Na pH 7,0
	75 mM CaCl ₂
	10 mM KCl
	15 % Glycerin
	steril filtrieren

2.14 Geräte

Brutschränke (Inkubatoren)	Heraeus, Hanau, Deutschland
ELISA-Reader (Dynex Relevation)	MTX Lab Systems, Inc. Vienna, USA
Elektroporationsgerät „GenePulser XCell“	Bio-Rad, München, Deutschland
FACS-Gerät Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg Deutschland
BD FACSVantage SE (Floureszenz-aktivierter Zell-Sorter)	Becton Dickinson, Heidelberg Deutschland
γ-Plattenzähler	Perkin Elmer, Boston, USA
Inkubationsschüttler	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
MasterCycler personal	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Netzgeräte	Amersham Pharmacia Biotech München, Deutschland
MasterCycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	Knick pH-Meter 766 Calimatic Zweibrücken, Deutschland
Photometer (Ultraspec 1000)	Amersham Pharmacia Biotech München, Deutschland
Schüttler (KS 250)	IKA Labortechnik, Staufen Deutschland
Sterilbank	Heraeus, Hanau, Deutschland

Thermomixer / Thermozykler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland / Heraeus, Hanau Deutschland
Zellbestrahlungsanlage (Gammacell 2000)	Mølsgaard Medical, Horsholm, Dänemark

2.15 Kunststoff- und Glasware

Zellkulturflaschen (T25 / T75), Reagenzröhrchen (15 ml und 50 ml) und Pipetten (50 ml, 25 ml, 10 ml und 5 ml) wurden von der Fa. Greiner (Frickenhausen, Deutschland) bezogen. Zellkulturplatten wurden von der Fa. Costar Corning (Bodenheim, Deutschland) verwendet. Reagenzgefäße (2,0 ml, 1,5 ml, 0,5 ml und 0,2 ml) sowie Pipettenspitzen (1000 µl, 200 µl und 10 µl) wurden ausschließlich von der Fa. Eppendorf (Hamburg, Deutschland) bezogen. Die Lumaplaten zur Durchführung des ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstest wurden von der Fa. Perkin Elmer (Boston, USA) verwendet.

2.16 Computerprogramme

Mit dem Programm Clone Manager für Windows95 wurden DNS-Klonierungen, Primer Design und DNS-Sequenzvergleiche geplant bzw. durchgeführt. Zur Auswertung von DNS-Sequenzen wurde zusätzlich das Programm Chromas 2.22 verwendet. Die Auswertung der Daten von der Durchflusszytometrie erfolgte mittels des Programmes Expo 32 1.0. Die Daten von ELISAs und Zytotoxizitätstests wurden mit dem Programm GraphPad Prism 3.02 bzw. 5.0 ausgewertet.

3 Methoden

3.1 Polymerase Ketten Reaktion

Die Polymerase Ketten Reaktion (Polymerase Chain Reaction, kurz PCR) dient der Amplifikation einer Ausgangs-DNS-Matrize. Dazu wird in einem ersten Schritt die Doppelstrang-DNS denaturiert, d.h. in zwei DNS-Einzelstränge aufgetrennt. In einem zweiten Schritt erfolgt die Hybridisierung der Oligonukleotide an den jeweiligen komplementären DNS-Einzelstrang. Dieser Schritt wird auch als „Annealing“ bezeichnet. Bei den Primern handelt es sich um chemisch, synthetisierte Oligonukleotide, welche komplementär zu einem spezifischen Sequenzabschnitt auf dem DNS-Einzelstrang sind, und den Ausgangspunkt für die DNS-Replikation der DNS-Polymerase darstellen. Es schließt sich der Schritt der Elongation im Temperaturoptimum der DNS-Polymerase an. Hierbei erfolgt mittels der Anlagerung von dNTPs (Desoxymononukleotidtriphosphate) die Verlängerung des Primers und folglich die Synthese des DNS-Doppelstranges. Je nach Zykluszahl des Denaturierungs-, Annealings- und Elongationsschrittes wird eine exponentielle Amplifikation der DNS erreicht.

3.1.1 PCR für Klonierungsexperimente

Schritt	Temperatur	Dauer	Zykluszahl
Denaturierung	95°C	30 Sek	1x
Denaturierung	95°C	30 Sek	35x
Annealing	55°C Gradient ±10°C	30 Sek	
Elongation	68°C	60 Sek / 1 kb	
	4°C	∞	

Tabelle 1: PCR für Klonierungsexperimente

Zusammenfassung des PCR-Programmes für die spezifische Amplifikation von TZR-DNS. Der Annealingschritt beinhaltet einen Temperaturgradienten von 10°C. Hierdurch wurden die individuellen Temperaturoptima der verwendeten Primerpaare berücksichtigt.

Der PCR-Ansatz enthielt in einer finalen Konzentration 100 ng Plasmid-DNS, 1x Pfx Polymerase-Puffer, 10 mM dNTPs (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland), 10 pM von jedem Primer, sowie 5 U Pfx₅₀ Polymerase. Mit destilliertem Wasser wurde auf das Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt. Das verwendete PCR-Programm ist in der Tabelle 1 dargelegt. Zur Berücksichtigung der individuellen Temperaturoptima des Primer-Paares wurde während des Annealing-Schrittes ein Temperaturgradient von 10°C eingestellt. Die Primer wurden in einer Größe von 18 bis 25 Bp sowie ausgehend vom 5' Ende mit insgesamt 1/3 unspezifischen Nukleotidsequenzen und der gewünschten Restriktionsschnittstelle versehen. Der restliche 2/3 Anteil des Primers wurde mit der komplementären Nukleotidabfolge zur DNS-Matrize entworfen. Die Modifikation des Primers mit einer Restriktionsschnittstelle ermöglichte das anschließende Klonieren des PCR-Produktes. Hierbei wies der vorwärts (for)- „Primer“ die NcoI- und der rückwärts (rev)- Primer die BamHI-Restriktionsschnittstelle auf. Bei TZR-DNS Konstrukten, welche bereits endogene NcoI-Schnittstellen besaßen, erfolgte die Synthese eines for-Primers ohne die NcoI-Restriktionsschnittstelle („*blunt end*“ (glatte Enden)-Ligation). Hierbei lag das 5' Ende des for-Primers direkt hinter dem Startcodon (ATG) und wies die vollständige komplementäre Nukleotidsequenz zur DNS-Matrize auf. Zusätzlich wurde der Primer am 5' Ende phosphoryliert, um eine anschließende Ligation mit dem vorbereiteten, retroviralen Vektor zu ermöglichen.

3.1.2 PCR zur gezielten Punktmutagenese von TZR Ketten

Bei dieser PCR-Methode werden Primer mit einer Länge zwischen 30 und 45 Bp verwendet. Die Abfolge der Nukleotide des Primers ist nicht vollständig komplementär zur DNS-Matrize. Es werden gezielte Basenaustausche vorgenommen, die zu einem neuen Basentriplett führen. Es erfolgt eine gezielte Mutagenese der DNS-Matrize, die an den Ribosomen in eine veränderte Aminosäuresequenz translatiert wird. Aufgrund der Länge der Primerpaare sind ausreichende komplementäre Basenabfolgen vorhanden, so dass die Primer spezifisch binden können. Der PCR-Ansatz wird analog zum Versuchsprotokoll „*QuikChange II XL-Site-Directed Mutagenesis*“ durchgeführt. Es wurden final 20 bis 40 ng Plasmid-DNS, 1x Pfu Reaktionspuffer, 25 mM dNTPs (Sigma-Aldrich,

Schritt	Temperatur	Dauer	Zykluszahl
Denaturierung	95°C	30 Sek.	1x
Denaturierung	95°C	30 Sek.	19x
Annealing	55°C Gradient 10°C	60 Sek	
Elongation	68°C	60 Sek / 1 kb	
	4°C	∞	

Tabelle 2: PCR-Programm zur gezielten Punktmutagenese von TZR-DNS

Die geringe Zykluszahl ist essentiell für die Effizienz der Reaktion. Hierdurch werden zufällige, unerwünschte Mutationen verhindert. Der Annealing-Schritt enthielt einen Temperaturgradienten von 10°C.

Hamburg, Deutschland), 125 ng des jeweiligen Primers, 3 µl QuikSolution eingesetzt und mit destilliertem Wasser auf 49 µl aufgefüllt. Zum Schluss wurden 2,5 U Pfu Polymerase zugegeben. Das PCR-Programm wurde in der Tabelle 2 aufgeführt. Wie bei der PCR für Klonierungsschritte wurde ein Temperaturgradient von 10°C eingestellt. Das PCR-Produkt stand für die weitere Bearbeitung zur Verfügung (siehe 3.3).

3.2 Klonierung von DNS

Die Klonierung von TZR-DNS in einen retroviralen pBullet_neo bzw. pBullet_puro Plasmid-Vektor erfolgte mittels PCR-Techniken. Hierbei wurden die Primer mit Restriktionsschnittstellen (meistens NcoI und BamHI) versehen, welche während der PCR an das PCR-Produkt angefügt wurden. Nach der Amplifikation erfolgte die Aufreinigung des PCR-Produkts. Anschließend wurde das aufgereinigte PCR-Produkt sowie die retrovirale Vektor-DNS mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und BamHI restringiert. Zur Entfernung der Enzyme schloss sich eine weitere Aufreinigung an.

Im Falle dessen, dass das „Insert“ endogene NcoI-Schnittstellen aufwies, wurde der retrovirale Vektor zunächst nur mit NcoI restringiert. Nach der Aufreinigung wurde das Auffüllen der Enden („endfilling“) durchgeführt. Darauf folgend wurde der

retrovirale Vektor sowie das „Insert“ mit dem BamHI Enzym restringiert und aufgereinigt. Ggf. wurde eine Dephosphorylierung durchgeführt, um eine Religation des geschnittenen retroviralen Vektors zu verhindern.

Die geschnittene TZR- und Vektor-DNS wurden ligiert und anschließend in die chemokompetenten JM 109 Bakterien transformiert. Aus den gewachsenen Klonen wurde mittels „QIAprep Miniprep“ die DNS extrahiert und im Restriktionsverdau auf ihre Richtigkeit hin überprüft. Zur Gewinnung einer höheren DNS-Konzentration und eines verbesserten Reinheitsgrades wurden die positiven Klone in der Maxi-Präparation unter endotoxinfreien Bedingungen aufgearbeitet.

3.2.1 DNS-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme von Bakterien, die spezifische DNS-Basensequenzen erkennen und schneiden können. Für einen Restriktionsverdau von 0,1 µg bis 0,5 µg Plasmid-DNS wurden 10 U des betreffenden Enzyms sowie 1x Reaktionspuffer und ggf. 1x BSA für 1-2h in einem finalen Volumen von 20 µl bei 37°C im Wasserbad oder Thermozykler inkubiert. Bei Ansätzen mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen wurden kompatible Puffersysteme laut Hersteller verwendet. Wenn dies aufgrund der Pufferkomponenten nicht möglich war, erfolgte nach dem ersten Restriktionsverdau eine Aufreinigung der DNS und anschließend der zweite Restriktionsverdau. Die Klonierung erfolgte über NcoI / BamHI–Restriktionsschnittstellen. Somit konnte mittels eines NcoI / BamHI-Doppel-Restriktionsverdaus die Insert- sowie Vektorgröße auf die Richtigkeit hin überprüft werden. Der Restriktionsverdau mit dem Enzym KpnI diente der Analyse des retroviralen Plasmid-Vektors, da die Vektor-DNS in mehrere definierte DNS-Fragmente geschnitten wurde. Mittels der Restriktionsendonuklease PstI konnten die retroviralen Vektoren pBullet_neo und pBullet_puro voneinander unterschieden werden. Bei dem pBullet_neo Vektor wurde eine definierte DNS-Bande von 197 Bp im Agarosegel sichtbar.

3.2.2 Dephosphorylierung

Vor der Ligation eines DNS-Fragments (*Insert*) mit dem retroviralen Plasmid-Vektor wurde dieser mittels des Enzyms der Kälberdarm Alkalischen Phosphatase (CIP)

dephosphoyliert. Hierdurch wurde die Religation eines linearisierten pBullet_neo bzw. pBullet_puro - Vektors verhindert. Die aufgereinigte Vektor-DNS war in 50 µl EB Puffer gelöst und wurde mit 1x CIP-Puffer und CIP Enzym (40 U) versetzt. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37°C im Thermozykler erfolgte die Hitzeinaktivierung des Enzyms CIP für 30 Minuten bei 55°C. Die dephosphorylierte Vektor-DNS wurde aufgereinigt und stand für die Ligation zur Verfügung.

3.2.3 Ligation

Die Ligation diente der Integration einer DNS in einen Plasmid-Vektor. Hierbei wurden 1 µl der retroviralen Vektor-DNS und zwischen 5 und 16 µl an Insert-DNS eingesetzt. Die Insert-DNS wurde im Überschuss, d.h. ca. die dreifache molare Menge der Vektor-DNS, zugegeben. Zusätzlich wurde dieser Ansatz mit 1 x Ligase Puffer und 40 U Ligase versetzt. Das finale Volumen betrug 20 µl. Zur Überprüfung der Religation des Vektors, wurde als Kontrolle ein Ansatz, welcher anstelle von der Insert-DNS destilliertes Wasser enthielt, mitgeführt. Die Ligation erfolgte für ≥ 16 h bei 16°C.

3.2.4 Auffüllen der Enden („*endfilling*“)

Wie unter 3.1.1 beschrieben, wurden PCR-Produkte synthetisiert, welche am Anfang (5' Ende) der TZR-Sequenz keine Restriktionsschnittstelle („*blunt end*“) aufwiesen. Im Folgenden wird die Ligation mit dem retroviralen Vektor beschrieben. Hierfür musste das entsprechende Ende des Vektors (NcoI restringiert) nach der Linearisierung aufgefüllt werden („*endfilling*“). In einer finalen Konzentration wurden ca. 40 ng an aufgereinigtem, linearisiertem Vektor, 1x T4 DNS-Polymerase-Puffer, 0,8 mM dNTPs, 3 U T4 DNS-Polymerase und entsprechende Menge an destilliertem Wasser in einem Gesamtvolumen von 40 µl aufgenommen. Im Thermozykler wurde für 15 Min bei 12°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzymes wurden die Proben sofort auf Eis überführt und aufgereinigt. Es sei darauf hingewiesen, dass auch die Möglichkeit bestanden hätte, die Enzyminaktivierung mittels Hitzeinaktivierung bei 75°C für 20 Min durchzuführen.

3.2.5 DNS-Aufreinigung

Die Aufreinigung von DNS wurde mittels dem „QIAquick PCR Purification“-Versuchssystem laut Angaben des Herstellers durchgeführt. Die mitgelieferten Säulen wurden mit der aufzureinigenden DNS beladen. Es folgten Waschschriffe, welche Restbestände an Enzymen entfernten. Die DNS wurde in 20 bis 50 µl EB-Puffer eluiert und stand der weiteren Verwendung zur Verfügung.

3.3 Herstellung von punktmutierter TZR-DNS mittels gezielter Mutagenese

Die PCR-Strategie wurde in Abschnitt 3.1.2 erläutert. Im Anschluss an die PCR erfolgte die direkte Zugabe von 20 U DpnI. Der Ansatz wurde im „Mastercycler personal“ bei 37°C für 1 h inkubiert. Die Restriktionsendonuklease DpnI erkennt nur methylierte DNS, wodurch die parentale DNS im Restriktionsverdau zerstört wird. Das mutierte, nicht-methylierte PCR-Produkt bleibt erhalten. Die Quantität des PCR-Produkts wurde mit einem 1 % TBE Agarosegel überprüft. Anschließend wurden 100 µl chemokompetente XL-1 Blue Zellen mit 10 µl PCR-Produkt transformiert. Es wurde bewusst anstelle des JM 109 der XL-1 Blue Bakterienstamm gewählt, da dieser eine höhere Transformationskompetenz aufwies. Die DNS der gewachsenen Klone wurde durch die „QIAprep Miniprep“ extrahiert, mit spezifischen Restriktionsendonukleasen restringiert und mögliche positive Proben mittels Sequenzierung detailliert analysiert. Zur Gewinnung einer größeren und reineren Menge, sowie unter endotoxinfreien Bedingungen, wurden die positiv bewerteten Proben mittels „EndoFree Plasmid Maxiprep“ aufgearbeitet. Anschließend wurde die DNS für die Transfektion der Verpackungszelllinien eingesetzt.

3.4 Herstellung von chemokompetenden Zellen

Mit Hilfe einer Impföse wurde eine Übernacht-Kultur von der Stock-Lösung XL-1 Blue bzw. JM 109 in 25 ml LB-Medium angeimpft. Bei dem XL-1 Blue Bakterienstamm wurde das LB-Medium zusätzlich mit dem Antibiotikum Tetrazyklin versetzt. Am nächsten Tag wurde das bakterielle Wachstum mittels der Bestimmung der Optischen Dichte (OD) bei 550 nm überprüft. Die Zellen wurden in SOB-Medium bei

einer OD₅₅₀ von 0,05 angeimpft und im Schüttelinkubator bei 37°C und 280 UpM bebrütet. Die OD₅₅₀ wurde zwischenzeitlich überprüft, so dass bei einer OD₅₅₀ von 0,5 die Inkubation im Schüttelinkubator beendet wurde. Die Bakterienkultur wurde auf zwei 50 ml Reaktionsgefäße verteilt und für 8 Min bei 2500 Upm und 4°C zentrifugiert. Das „Zellpellet“ pro Reaktionsgefäß wurde in 30 ml Tfbll suspendiert und 30 bis 60 Min auf Eis inkubiert. Diese Inkubationszeit sollte für jeden Bakterienstamm optimiert werden. Bei den XL-1 Blue sowie JM 109 betrug die optimale Inkubationszeit 30 Min. Anschließend wurden die Zellen für 6 Min bei 2000 Upm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet pro Reaktionsgefäß wurde in 2 ml Tfbll suspendiert und zu je 200 µl aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Die Kompetenz der hergestellten Bakterien konnte bestimmt werden, indem 1 ng DNS für eine Transformation mit 50 µl chemokompetenten Zellen eingesetzt wurde. Die Zellen wurden in 1 ml resistenzfreiem LB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Es wurden 100 µl ausplattiert. Die Errechnung der Kompetenz der Zellen ergab sich aus der Formel: Anzahl der Kolonien x Verdünnungsfaktor. Für 100 gezählte Kolonien entsprach dies einer Kompetenz von 1×10^6 .

3.5 Transformation

Für die Transformation wurden 100 µl chemokompetente Zellen des Bakterienstamms E. coli XL1-Blue oder JM 109 mit 10 µl eines Ligationsansatzes bzw. mit 0,1–1 µg gelöster Plasmid-DNS versetzt und für 30 Min auf Eis inkubiert. Es folgte ein „Hitzeschock“ bei 42°C für 25 Sek, der die Permeabilität der Bakterienmembran erhöhte und folglich zu einer Aufnahme der DNS führte. Anschließend wurde eine zweiminütige Inkubation auf Eis durchgeführt. Um den transformierten Zellen die Expression des Proteins der Plasmidresistenz (Ampicillin) zu ermöglichen, wurden zu den Zellen 500 µl antibiotikumfreies, angewärmtes LB-Medium zugegeben. Es schloss sich eine Inkubation im Schüttelinkubator für 45 Min, 280 Upm bei 37°C an. Anschließend wurden von dieser Bakterienkultur 50 µl, 200 µl oder 500 µl auf antibiotikumversetzte LB-Platten ausgestrichen. Diese wurden für 12 - 16 h bei 37°C im Inkubator bebrütet und nachfolgend zur Auswertung betrachtet. Die Wahl der Antibiotika für die Selektion von positiven Klonen richtete sich nach dem verwendeten Stamm und transformiertem Plasmid. Während die XL1-Blue

Bakterien ein Tetrazyklin-Resistenz kodierendes F-Plasmid enthielten, besaßen die JM 109 Bakterien kein Antibiotikumresistenzgen. Die hier verwendeten pBullet-Vektoren enthielten ein Ampicillin-Resistenz kodierendes Gen. Das Antibiotikum Ampicillin wurde mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml eingesetzt. Bei dem Antibiotikum Tetrazyklin fand eine Endkonzentration von 5 µg/ml Verwendung.

3.6 Plasmidpräparation aus Bakterien

Zur Präparation, der in den Bakterien amplifizierte zirkuläre DNS, wurden die „QIAprep Spin Miniprep“- und „EndoFree Plasmid Maxi“-Versuchssysteme genutzt. Die Wahl des Versuchsprotokolls erfolgte nach dem gewünschten Präparationsmaßstab und der benötigten Reinheit der DNS.

3.6.1 QIAprep Miniprep

Es wurden 5 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium mit einem Einzelklon beimpft. Bei Verwendung des XL-1 Blue Stammes konnte das Medium zusätzlich mit Tetrazyklin versetzt werden. Die Kultur wurde über Nacht für 12 - 16 h bei 37°C und 280 Upm im Inkubationsschüttler inkubiert. Diese Übernacht-Kultur wurde mittels Zentrifugation bei 4000 Upm, 4°C und 15 Min pelletiert. Das Pellet wurde möglichst quantitativ von residuellem Medium befreit. Es folgte die Präparation der Plasmid-DNS nach Angaben des Herstellers. Bei dieser Art der Aufbereitung wurden die Bakterien in alkalischem Milieu lysiert und in Puffern mit hoher Salzkonzentration gelöst. Diese Bedingung erlaubte der DNS an die Silika-Membranen der mitgelieferten Säulen zu binden. Die RNS, Proteine und Metabolite wurden indessen ausgewaschen. Die Elution konnte in Puffern niedriger Salzkonzentration erfolgen (50 µl EB). Mittels dieser Plasmid-Präparation ließ sich eine durchschnittliche DNS-Menge von 10 bis 20 µg gewinnen, welche für Klonierungen und Sequenzierungen ausreichend war.

3.6.2 EndoFree-Maxi-Präparation

Zur Gewinnung von größeren Mengen an DNS, wie beispielsweise für die Transfektion von eukaryotischen Zellen, erfolgte die Präparation in endotoxinfreien Medien. Es wurde nach dem „EndoFree Plasmid“-Protokoll verfahren. Laut Herstellerangaben waren Ausbeuten von 500 µg endotoxinfreier DNS möglich.

Zunächst wurde eine Bakterien-Vorkultur bestehend aus 3 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium und einem Bakterinklon angesetzt. Die Inkubation erfolgte für 8 h bei 37°C und 280 Upm. Je nach Dichte der Vorkultur wurden von dieser 200 bis 400 µl in eine Hauptkultur, bestehend aus 100 ml LB-Medium mit enthaltenem Antibiotikum, überführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht für 12 - 16 h bei 37°C und 280 Upm. Darauffolgend wurde die Bakterienkultur bei 4000 Upm, 4°C und 15 Min pelletiert. Die Aufarbeitung der Plasmid-DNS erfolgte laut Herstellerangaben. Nach der alkalischen Lyse der Bakterien und der Aufbereitung mit Puffern hoher Salzkonzentration, wurde die DNS durch Zentrifugation und Filtration von Verunreinigungen befreit. Nach einer Inkubation mit einem „Endotoxin-Entfernungspuffer“ folgte die Bindung der DNS an die Silika-Membranen spezieller Säulen. Durch mehrere Waschschrte wurden residuelle Rückstände entfernt. Anschließend konnte die DNS mit Puffern niedriger Salzkonzentration eluiert werden. Durch einen Waschschrte mit Isopropanol sowie einem darauffolgenden mit Ethanol wurde die DNS präzipitiert und von Salzen befreit. Die Plasmid-DNS wurde in 400 µl mit 1:10 endotoxinfreien Wasser verdünnten TE-Puffer gelöst. Zur weiteren Verwendung wurde die DNS auf 0,5 µg/ml eingestellt.

3.7 Konzentrationsbestimmung von DNS

Die Konzentration und der Reinheitsgrad der DNS wurden photometrisch bei 260 nm bestimmt.

3.8 Sequenzierung von Plasmid-DNS

Sequenzierungen wurden von der Firma Genterprise (Mainz, Deutschland) durchgeführt. Zur Analyse der klonierten DNS wurden die Sequenzierungsprimer for_pBu_IRES und rev_pBu_IRES verwendet (siehe 3.8.1). Diese lagerten sich zwischen 70 Bp vor dem Start- bzw. 100 Bp revers hinter dem Stoppkodon der DNS-Sequenz auf dem retroviralen Plasmid-Vektor an. Individuell erstellte Primer für Klonierungsexperimente sowie zur Generierung von Punktmutationen wurden im Anhang aufgeführt.

3.8.1 Sequenzierungsprimer

for_pBu_IRES 5' GACGGCATCGCAGCTTGGATA 3'
rev_pBu_IRES 5' GAGGGAGTACTCACCCCAACA 3'

3.9 PBMZ-Aufreinigung aus Blutproben („*Buffy Coats*“)

Es wurden „*Buffy Coats*“ von der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Deutschland) bestellt. Bei Bedarf konnte der HLA- sowie CMV-Status typisiert und der gewünschte Status bei der Bestellung berücksichtigt werden. Die Aufreinigung der PBMZ aus humanem Blut erfolgte mittels der Dichtegradienten-Zentrifugation. Hierbei wurden die Lymphozyten und peripheren mononukleären Zellen (PBMZ) aufgrund ihrer Dichte von unerwünschten Erythrozyten und Granulozyten separiert. In einer Interphase zwischen der Plasmafraktion und dem Separationsmedium reichert sich die PBMZ an. Es wurde ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 15 ml Separationsmedium befüllt. Vorsichtig wurde die Separationsschicht mit 30 ml der 1:2 mit sterilem PBS verdünnten Blutprobe beschichtet. Die Proben wurden für 10 Min bei 2400 Upm, ohne Bremse, bei 21 °C zentrifugiert. Anschließend ließen sich die Separationsschichten erkennen. Mit einer sterilen Pasteurpipette wurden die PBMZ aus der Interphase gewonnen. Zur Entfernung von residuellem Separationsmedium wurden die Zellen 4-malig mit 25 ml sterilem 1x PBS gewaschen. Darauffolgend wurden die Zellen auf 50×10^6 Zellen/ml in Kyromedium eingestellt und kyrokonserviert.

3.10 Generierung von CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen humanen T-Zellen

Es wurden HLA-A*0201⁺/HCMV-seropositive Blutproben nach der Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt. Zur Gewinnung einer reinen CD8⁺ T-Zellkultur durchliefen die PBMZ eine CD8 positive, magnetische Zellsortierung. Der Durchlauf an Zellen, d.h. die CD8 negativen Zellen, wurde mit 1µg/ml pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Peptid für 8 h bei 37 °C, 5% CO₂ beladen. Anschließend wurden die Zellen bei 3500 rad in einer Zellbestrahlungsanlage behandelt. Die CD8⁺ T-Zellen wurden mit den bestrahlten, pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidbeladenen Zellen in einem 1:2 Verhältnis in hu RPMI für zunächst 2

Tage stimuliert. An Tag 3 erfolgte die Applikation der humanen Zytokine IL-2 (20 IE/ml, Fa. Roche, Mannheim, Deutschland) und IL-7 (5 ng/ml, Fa. R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland). Die zeitversetzte Zugabe der Zytokine ermöglichte zu Beginn eine pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifische Stimulation der CD8⁺ T-Zellen. Nach 2 oder 3 pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen Stimulationszyklen, sowie ggf. einer zusätzlichen CMV-pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Tetramer-Zellsortierung, konnte eine > 95% reine pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifische CD8⁺ T-Zellkultur generiert werden. Ein Stimulationszyklus dauerte 10 Tage.

3.11 CD8 positive magnetische Zellsortierung

Die aufgereinigten humanen HLA-A*0201⁺/HCMV⁺-PBMZ wurden gezählt und auf bis zu 1×10^8 Zellen pro LS-Säule eingesetzt. Die Zellen wurden mit 1 x PBS gewaschen und in 90 µl MACS-Puffer aufgenommen. Es wurden 23 µl anti-CD8 Microbeads zugegeben und für 15 Min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde mit 2 ml MACS-Puffer für 10 Min bei 1500 Upm gewaschen. Die Zellen wurden in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten. Zunächst wurde die LS-Säule in einem Magneten befestigt und mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert. Nachdem der MACS-Puffer durchgelaufen war, wurde die Säule mit der 500 µl CD8-markierten Zellsuspension beladen. Zum Auffangen des Durchlaufs wurde ein 50 ml Reaktionsgefäß unter die Säule gestellt. Anschließend folgten 3 Waschschrte mit je 3 ml MACS-Puffer. Der Durchlauf mit den CD8 negativen Zellen wurde bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gestellt. Die Säule mit den gebundenen CD8 positiven T-Zellen wurde aus dem Magneten entnommen und auf ein 15 ml Reaktionsgefäß gestellt. Auf die Säule wurden 5 ml MACS-Puffer gegeben und mit einem Stempel wurden die magnetisch gebundenen CD8-markierten Zellen aus der Säule gedrückt. Die aufgereinigten Zellen wurden für 5 Min, bei 21°C und 1500 Upm zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Kryokonservierung oder die Weiterverarbeitung der Zellen zur Generierung von pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen T-Zellen.

3.12 Expansion der isolierten CMV-pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen humanen T-Zellen

Die > 95% reine pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen wurden entweder autolog mit pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidbeladenen CD8 negativen Zellen (3.10) oder allogen über das T2-Protokoll (3.13) restimuliert. Als Zytokine wurden stets IL-2 (20 IE/ml) und IL-7 (5 ng/ml) verwendet.

3.13 Peptidspezifische Expansion von humanen T-Zellen (T2-Protokoll)

Zur Expansion von humanen T-Zellen wurden T2-Zellen mit einer definierten Konzentration eines Peptides, entsprechend der TZR-Spezifität der T-Zellen, beladen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einer 24-Kavitäten Platte in hu RPMI. Es wurden $0,2 \times 10^6$ T2 Zellen / Kavität mit 0,1 µg/ml des betreffenden Peptides in einem möglichst geringen Volumen ($0,2 \times 10^6$ T2-Zellen/100 µl 10 % RPMI), für 90 Min) im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ beladen. Zur Entfernung von nicht aufgenommenem Peptid wurden die Zellen mit 10 % RPMI gewaschen. Anschließend wurden die Zellen bei 7000 rad bestrahlt. Hinzukommend wurden 2×10^6 PBMZ / Kavität (bei den pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen wurden vorzugsweise CMV-negative PBMZ verwendet) aufgetaut. Die Zellen wurden zur Entfernung des im Kyromedium enthaltenen DMSO gewaschen und bei 3500 rad bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen wiederum gewaschen und in hu RPMI entsprechend der benötigten Zellzahl / 0,5 ml aufgenommen. Es wurden pro Kavität 1 ml an 1×10^6 humanen transduzierten oder CMV⁺ T-Zellen, 0,5 ml an $0,2 \times 10^6$ peptidbeladenen T2 Zellen und 0,5 ml an 2×10^6 „Feeder“-PBMZ ausgesät. Folglich betrug das Gesamtvolumen pro Kavität einer 24-Kavitäten Platte 2 ml. Zeitgleich erfolgte die Zugabe des Zytokins IL-2 (20 IE/ml, Fa. Roche, Mannheim, Deutschland) sowie bei den CMV-pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen die zusätzliche Applikation von IL-7 (5 ng/ml, Fa. R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland).

Bei den pp65₄₉₅₋₅₀₃⁻ und p53₂₆₄₋₂₇₂⁻-Tumorantigen-bi-spezifischen T-Zellen wurde das peptidspezifische T2-Expansionsprotokoll geringfügig abgeändert. Hierbei wurden die T2-Zellen entweder mit dem pp65₄₉₅₋₅₀₃⁻ oder mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂⁻-spezifischen Peptid beladen. Die weitere Behandlung sowie Bestrahlung der beladenen T2-Zellen

erfolgte wie beschrieben. Anschließend wurden pro Kavität 1×10^6 humane pp65₄₉₅₋₅₀₃- und p53₂₆₄₋₂₇₂-bi-spezifische T-Zellen, 0,25 ml an $0,1 \times 10^6$ pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidbeladenen T2-Zellen, 0,25 ml an $0,1 \times 10^6$ p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidbeladenen T2-Zellen und 0,5 ml an 2×10^6 „Feeder“-PBMZ ausgesät. Hinzukommend wurde das Zytokin IL-2 (20 IE/ml, Fa. Roche, Mannheim, Deutschland) und ggf IL-7 verabreicht.

3.14 CD3/CD28 Beads-Restimulierung von humanen PBMZ

Bei der CD3/CD28 Magnetpartikel-Stimulierung erfolgte die Expansion der humanen T-Zellen unabhängig von der TZR-Spezifität (unspezifische Stimulation) durch die Kreuzvernetzung von CD3. Die humanen T-Zellen wurden zu $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml mit 10 U/ml IL-2 sowie CD3/CD28 Beads (2 μ l/ 1×10^6 Zellen) in hu RPMI kultiviert. Vor Gebrauch der CD3/CD28 Beads wurde die benötigte Menge entnommen und in 1 x PBS gewaschen. Hierfür wurden 5 ml PBS in einem 15 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, welches in einem Magneten befestigt war. Die CD3/CD28 Beads wurden zugegeben und magnetisch an die Wand des Reaktionsgefäßes gezogen. Anschließend wurde das 1 x PBS entfernt, das Reaktionsgefäß aus dem Magneten genommen und die Beads in das Kulturmedium überführt. Nach 3 bis 4 Tagen wurden die Zellen mit frischem hu RPMI, IL-2 und CD3/CD28 Beads auf $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Ggf. erfolgte lediglich ein Mediumwechsel. Hierbei wurde teilweise das alte Medium entfernt und durch frisches mit 10 U/ml IL-2 enthaltenem Medium ersetzt. Im Falle dessen, dass die kultivierten T-Zellen in komplett frisch angesetztes Medium überführt oder für Funktionalitätsanalysen verwendet wurden, erfolgte die Überführung der T-Zellen in ein Reaktionsgefäß, welches in einem Magneten befestigt wurde. Hierdurch wurden die CD3/CD28 Beads vollständig entfernt, da diese magnetisch an der Wand des Reaktionsgefäßes hängen blieben. Die CD3/CD28 Beads-depletierten T-Zellen standen für die weitere Verwendung zur Verfügung. Die T-Zellen konnten abhängig vom CD8/CD4-Verhältnis sowie vom jeweiligen Donor für ca. 2 Monate in Kultur gehalten und expandiert werden.

3.15 Retrovirale Transduktion von humanen / murinen T-Zellen

Zur Herstellung von Retroviren wurden für die humanen T-Zellen die Verpackungszelllinie Phoenix-ampho und für die murinen T-Zellen die Phoenix-eco

Zelllinie verwendet (Nolan Labor, Stanford Universität, USA). Die Verpackungszelllinien wurden mit Hilfe des Transfektionsreagenz Fugene6 oder Mirus sowie den TZR-Gen-kodierenden retroviralen pBullet-Vektoren, den Vektoren, die die viralen Verpackungselemente pHIT60 und pCOLT-GaLV (human) (Soneoka et al. 1995) bzw. VSV-G (murin) (Cooray et al. 2012) trugen, transfiziert. Die Transfektionsreagenzien Fugene6 und Mirus benutzen die Methode der Lipofektion. Hierbei bilden die enthaltenen Lipide einen liposomalen Komplex mit der DNS, wodurch diese von den Zielzellen, den Verpackungszelllinien, aufgenommen werden können. Dadurch erfolgt die Expression der jeweiligen Gene und durch die Verpackungselemente der Phoenix-Zellen die Zusammensetzung der TZR-kodierenden-, RNS-haltigen-Retroviren. Diese werden in das Zellkulturmedium abgegeben. Die freigesetzten Retroviren infizieren weitere Verpackungszelllinien, was zu einer Produktion von weiteren Viren und somit einem Anstieg des Virustiters im Zellkulturmedium führt. Mit diesem virushaltigen Überstand können humane und murine T-Zellen transduziert werden. Hierfür werden die Zellen mit Polybren behandelt, welches die Permeabilität der Zellmembran erhöht und, nach Zugabe des Virustiters auf die Zellen, zur Aufnahme der Retroviren führt. Der Retrovirus wird in den transduzierten T-Zellen entpackt, die RNS durch die virale reverse Transkriptase in DNS transkribiert und in das zelluläre Genom integriert. Im Folgenden wird detailliert der Ablauf der Transfektion und Transduktion beschrieben.

3.15.1 Retrovirale Transduktion mit einem TZR

An Tag 1 wurden die Verpackungszelllinien Phoenix-ampho bzw. Phoenix-eco zu einer Zelldichte von $1,6 - 1,8 \times 10^6$ Zellen pro T75-Zellkulturflasche in 15 ml 10 % DMEM ausgesät. Am nächsten Tag wurde das alte Medium verworfen und durch 10 ml frisches 10 % DMEM ersetzt. Vier Stunden später erfolgte die Transfektion der Verpackungszellen. Der Transfektionsansatz beinhaltete 900 μ l DMEM (ohne Zusätze), 60 μ l des Transfektionsreagenz, 6,5 μ g pHIT60, 2 μ g pCOLT-GALV, 5,75 μ g der TZR α (kloniert auf pBullet_puro) und - β (kloniert auf pBullet_neo) Kette. Es sei darauf hingewiesen, dass bei der simultanen retroviralen Transduktion die beiden TZR-Konstrukte, welche jeweils auf einem Plasmid-Vektor kloniert waren, ebenfalls zu je 5,75 μ g eingesetzt wurden. Bei der Transfektion mit einem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR (kloniert auf pBullet_neo) wurde dieser

zusammen mit dem pBullet_puro Leervektor transfiziert. Auch hier wurden jeweils 5,75 µg eingesetzt. Die 60 µl des Transfektionsreagenz wurden aufgrund der lipophilen Eigenschaft mittig in die 900 µl DMEM Medium getropft und anschließend invertiert. Die weiteren Komponenten wurden zugegeben und nach kurzem Invertieren erfolgte die Inkubation des Transfektionsansatzes für 20 Min bei RT. Unter Schwenken der Zellkulturflasche wurde der Transfektionsansatz in das Zellkulturmedium der Verpackungszellen zugegeben. Als Negativ-Kontrolle wurde Mock mitgeführt, d.h. anstelle der TZR Ketten-Gene wurde sowohl der leere pBullet_neo- als auch pBullet_puro-Vektor transfiziert, um später auch diese doppel-selektieren zu können. Die transfizierten Verpackungszellen wurden über Nacht zur Produktion des retroviralen Überstandes im Brutschrank inkubiert. Zusätzlich erfolgte an Tag 2 die Aktivierung der PBMZ. Hierfür wurden PBMZ zu 2×10^6 Zellen/ml in einer 24-Kavitäten Platte (2 ml pro Kavität) in hu RPMI ausgesät. Die Aktivierung erfolgte mit 20 ng/ml anti-CD3-Antikörper (OKT3). Die murine Hybridomzelllinie 58 α β CD3 ζ sowie die humanen Zelllinien SupT1 und Jurkat-76 mussten nicht aktiviert werden. Diese Zellen wurden auf $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Am dritten Tag wurde der Überstand von den Verpackungszellen verworfen und durch 8 ml frisches Zellkulturmedium entsprechend der zu transduzierenden Zellart ersetzt. An Tag 4 wurde die Transduktion durchgeführt. Hierfür wurde der retrovirushaltige Überstand der Verpackungszellen entnommen und durch 7 ml frisches Medium entsprechend der Zellart ersetzt. Zur Entfernung von zellulären Bestandteilen wurde der entnommene Überstand 3 Min bei 1000 Upm und 21 °C zentrifugiert. Die aktivierten humanen T-Zellen bzw. die murinen / humanen Zelllinien wurden geerntet und jeweils zu 4×10^6 Zellen in 4 ml retrovirushaltigen Überstand aufgenommen (1×10^6 Zellen/ml Überstand), mit 4 µg/ml Polybren und 300 U/ml Proleukin-2 (bei humanen PBMZ) versetzt. Zum Aussäen wurde eine 12-Kavitäten Platte verwendet. Anschließend wurde der virushaltige Überstand für 60 Min bei 2000 Upm und 30 °C (ohne Bremse) auf die Zellen zentrifugiert, um die Viruspartikeldichte im „Monolayer“ der zu infizierenden Zellen zu erhöhen. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am 5. Tag wurde der Überstand weitgehend von den Zellen abgenommen. Es wurde erneut der vorbehandelte, retrovirushaltige Überstand (3 ml) zugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3 µg/ml Polybren und 300 U/ml Proleukin-2 (bei humanen PBMZ) entsprechend der Menge an neu zugegebenen Überstand. Die Zentrifugation wurde wie an Tag 4 beschrieben durchgeführt. Danach wurden die

Zellen für 4 h oder über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 Min, 1500 Upm, 21 °C) vom Überstand isoliert und entsprechend der Kulturbedingungen der Zellen in frisches Medium, ggf. mit Zytokinen und CD3/CD28 Beads (2 µl Beads/1 x 10⁶ T-Zellen) versetzt, aufgenommen. Zur Normalisierung der TZR-Expression erfolgte eine Antibiotika-Selektion der Zellen. Bei den humanen PBMZ wurde hierfür mit 0,8 mg/ml Geneticin (G 418) für 7 Tage auf den im pBullet-neo klonierten TZR selektiert. Zur zusätzlichen Selektion auf den im pBullet-puro klonierten TZR wurde von Tag 6 auf Tag 7 mit 5 µg/ml Puromycin selektiert. Die CD3/CD28 Beads wurden durch magnetische Depletion von den humanen T-Zellen abgetrennt. Zur Entfernung des Selektionsmediums wurden die Beads-depletierten T-Zellen für 5 Min bei 1500 Upm und 21 °C zentrifugiert. Die humanen T-Zellen wurden auf eine Zellzahl von 0,5x10⁶ Zellen/ml eingestellt und entsprechend ihrer Kulturbedingungen aufgenommen. Die murinen und humanen Zelllinien wurden ebenfalls für 7 Tage mit Geneticin (G418) und für einen Tag mit Puromycin behandelt. Die eingesetzten Konzentrationen waren abhängig von der Toleranz der Zellen gegenüber der Antibiotika. Die Zellen wurden mittels einer 5-minütigen Zentrifugation bei 1500 Upm und 21 °C vom Selektionsmedium befreit und entsprechend ihrer Zellkulturbedingungen in Medium aufgenommen. Zur Überprüfung der erfolgreichen Selektion und der TZR-Expression wurden diese durchflusszytometrisch analysiert.

3.15.2 Simultane retrovirale Transduktion mit einem pp65₄₉₅₋₅₀₃- und einem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR

Die retrovirale Transduktion erfolgte wie unter 3.15.1 beschrieben. Jedoch wurde in diesem Fall nicht nur ein TZR, sondern zwei TZR Konstrukte unterschiedlicher Spezifität transduziert. Die Antibiotika-Selektion der transduzierten humanen T-Zellen erfolgte für beide TZR Konstrukte. Der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR war in den pBullet_puro und der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische TZR in den pBullet_neo Vektor kloniert. Zur Analyse der Konkurrenz zweier TZR wurde der pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifische Doppelketten-TZR in Kombination mit einem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten- oder Doppelketten-TZR retroviral transduziert. Bei der simultanen retroviralen Transduktion fanden HCMV-negative Donoren Verwendung.

3.15.3 Analyse des Interaktionsverhaltens zwischen dem p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen Einzelketten-TZR und humanen und murinen TZR α Ketten

Für die Analyse des Interaktionsverhaltens eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR wurde im Rahmen meiner Dissertation der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR eines 2-Plasmide--retroviralen Vektorsystems vom retroviralen pBullet_puro in den pBullet_neo Vektor kloniert. Hinzukommend wurde die essentielle MuC α Domäne, welche für die Stabilisierung des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR verantwortlich ist, vom retroviralen pBullet_neo in den pBullet_puro Vektor kloniert. Die Klonierung des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems erfolgte ebenfalls im Rahmen meiner Promotion in den retroviralen pBullet_neo Vektor. Die TZR α Ketten sind in den pBullet_puro Vektor kloniert, so dass eine kombinierte retrovirale Transduktion mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR (subkloniert in pBullet-neo), sowie die sich anschließende Selektion möglich war. Es wurden die humanen TZR α Ketten der Spezifitäten gp100₂₈₀₋₂₈₈, pp65₄₉₅₋₅₀₃ und AML₁₄₋₂₂ sowie die murinen TZR α Ketten spezifisch für p53₂₆₄₋₂₇₂ und MDM2₈₁₋₈₈ verwendet. Die Durchführung der Transfektion und Transduktion (3.15) sowie die CD3/CD28 Beads Stimulierung (3.14) erfolgte wie bereits beschrieben. Zur Gewährleistung gleicher Selektionsbedingungen wurde der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR, wenn nicht in Kombination mit einer TZR α Kette, mit dem pBullet_puro Leervektor transfiziert. Hierdurch wurden gleiche Selektionsbedingungen auf Geneticin (G 418) und Puromycin erlaubt.

3.16 Elektroporation von humanen T-Zellen

Der RNS-Transfer wurde mittels der Elektroporation von humanen T-Zellen erzielt. Hierbei konnte die TZR-Expression der humanen T-Zellen über 6 bis 7 Tage nachverfolgt werden. Mit Beginn des 3. Tages ließ sich bereits eine Abnahme der TZR-Expression beobachten. Die p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische TZR-RNS wurde von der medizinischen Doktorandin Eva-Maria Strasser (III. Med. Klinik der Universitätsmedizin der JGU in Mainz, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Zunächst wurden die benötigten Medien RPMI sowie Opti-MEM ohne Zusätze auf RT temperiert. Je nach Zellzahl wurde eine 6- bzw. 12-Kavitäten Platte mit hu RPMI sowie 10 U/ml IL-2 vorbereitet und bei 37°C im Brutschrank vorgewärmt. Die humanen T-Zellen wurden geerntet und für 10 Min bei 1000 Upm und 21°C zentrifugiert. Der Überstand wurde weitgehend abgenommen und die T-Zellen wurden in 10 bis 50 ml vorgewärmten RPMI ohne Zusätze aufgenommen. Nachdem die T-Zellen gezählt wurden, folgte eine erneute Zentrifugation für 10 Min bei 1000 Upm und 21°C. Durch die Waschschrte in RPMI ohne Zusätze wurden die Zellen von dem normalerweise im Medium enthaltenen humanen Serum befreit. Zur Entfernung des im Medium enthaltenen Phenolrots, wurden die Zellen einmalig in Opti-MEM bei 1000 Upm und 21°C für 10 Min gewaschen. Pro Elektroportationsansatz wurden 10×10^6 Zellen in 100 µl Opti-MEM aufgenommen. Es wurden 15 µg pro TZR Kette in einer 4 mm Küvette vorgelegt und direkt, ohne mischen, erfolgte die Zugabe, der in 100 µl aufgenommenen Zellen. Schnellstmöglich wurde die Küvette in das Elektroportationsgerät „GenePulser XCell“ gestellt. Die Elektroportation wurde bei 500 V und 5 ms durchgeführt. Nach Beendigung wurden die Zellen in die bereits mit Medium vorbereitete 6- bzw. 12-Kavitäten-Platte überführt. Nachdem die Zellen 4 h im Brutschrank inkubiert wurden, konnten die Zellen hinsichtlich der TZR-Expression analysiert werden.

3.17 Durchflusszytometrie

Zum antikörpervermittelten Nachweis membranständiger oder intrazytoplasmatischer Zytokine wurde die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS, Durchflusszytometrie) angewandt. Hierzu werden für ein Merkmal-spezifische Antikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, mit Zellen inkubiert und anschließend mittels des Durchflusszytometers gemessen. Die „FACS and Array Core Facility“ der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Deutschland) unter Leitung von Frau X stellte freundlicherweise das FacsCalibur Gerät sowie die Expertise und Durchführung der Zellsortierung zur Verfügung.

3.17.1 FACS-Analyse auf Oberflächenmoleküle

Im Falle der Detektion von Oberflächenantigenen wurde eine definierte Zellzahl von $0,2 \times 10^6$ Zellen, nach einem Waschschrift mit 2 ml PBS (0,1% BSA), für 30 Min bei 4°C mit der gewünschten Antikörperkombination lichtgeschützt inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit 2 ml PBS (0,1 % BSA) gewaschen und in 300 µl PBS (1% Paraformaldehyd) fixiert.

3.17.2 Tetramer-Färbung

Der Nachweis einer Peptid-MHC-Spezifität erfolgte mittels der Tetramer-Färbung. Ein Tetramer besteht aus 4 peptidbeladenen biotinylierten MHC-Klasse-I Molekülen, welche über ein Streptavidin-Molekül untereinander verbunden sind (Robert et al. 2000). Das Streptavidin-Molekül ist gleichzeitig mit einem Fluoreszenzfarbstoff, z.B. Phycoerythrin (PE), verknüpft. T-Zellen, die mittels ihres α - β -Ketten-TZR mit dem Tetramer interagieren, werden so mit diesem Fluoreszenzfarbstoff markiert und können mit Hilfe der Durchflusszytometrie identifiziert werden. Es wurden $0,1 \times 10^6$ Zellen in PBS (0,1 % BSA) gewaschen und mit 0,5 µl Tetramer, welches mit pp65₄₉₅₋₅₀₃⁻, p53₂₆₄₋₂₇₂⁻, oder MDM2₈₁₋₈₈⁻ Peptid beladen war, für 45 Min bei 4°C unter Lichtschutz inkubiert. Bei der Verwendung von 2 Tetrameren, wie dem pp65- und p53-spezifischen Tetramer, wurden diese simultan zu $0,1 \times 10^6$ Zellen gegeben und für 45 Min bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 2 ml PBS (0,1 % BSA) erfolgte die Aufnahme der Zellen in 300 µl PBS. Es schloss sich die durchflusszytometrische Messung an. Ferner konnte die Affinität eines TZR für ein MHC-gebundenes Antigen mittels Tetramer-dosisabhängiger Bindungskurven bzw. sogenannter „Scatchard“-Analysen gemessen werden (siehe 3.17.5).

3.17.3 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Es wurden $0,4 \times 10^6$ K562-A2 Zellen mit 1×10^6 M des zu untersuchenden Peptides beladen und im Brutschrank für 30 Min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und bei 7000 rad bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen erneut gewaschen und pro Kavität einer 96-Kavitäten Platte zu je $0,4 \times 10^6$ Zellen/100 µl hu RPMI ausgesät. Die peptidspezifischen humanen T-Zellen wurden in einem 1:2 Verhältnis, d.h. $0,4 \times 10^6$ T-Zellen/100µl pro Kavität, dazugegeben.

Folglich betrug das Gesamtvolumen pro Kavität 200 µl. Zu 6 ml Zellmedium wurden 4 µl der GolgiStopTM-Lösung (~10x⁶ Zellen/ml) appliziert, die intrazelluläre Transportprozesse der Zytokine und damit deren Sekretion inhibiert. Die benötigte Menge der GolgiStop-Lösung wurde entsprechend der Volumina adaptiert. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ für 5 h. Als Kontrolle diente die peptidunspezifische Stimulation mit Concanavalin A (Con A). Nach der Inkubation wurden die Zellen geerntet und mit PBS gewaschen. Zuerst erfolgte die Färbung der Oberflächenmarker. Hierfür wurden die Antikörper in einer 1:50 Verdünnung eingesetzt. Der Ansatz wurde lichtgeschützt für 30 Min bei 4°C inkubiert. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Proben mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl einer 4-prozentigen Paraformaldehyd-Lösung (pH 7,4) aufgenommen und lichtgeschützt für 12 Min bei RT inkubiert. Es schloss sich ein zweimaliger Waschschrift mit 2 ml FACS-Puffer an. Jedoch war zu beachten, dass diese nicht wie üblich bei 1500 Upm durchgeführt wurden, sondern bei 1000 Upm für 5 Min. Im Anschluss wurden die Zellen in 200 µl 1x „*Perm/Wash Puffer I*“ aufgenommen. Dieser Puffer enthält Saponin und ermöglicht die Permeabilisierung der Zellmembran der Zellen, so dass eine intrazelluläre Färbung ermöglicht wird. Bei der Permeabilisierung handelt es sich um einen reversiblen Prozess. Folglich müssen die Zellen während der Färbung kontinuierlich unter Saponin-Präsenz gehalten werden. Es erfolgte die Zugabe des intrazellulären Antikörpers, welcher in diesem Fall anti-Interferon-γ-APC war. Es wurde lichtgeschützt für 45 Min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimalig mit 2 ml „*Perm/Wash Puffer I*“ bei 1000 Upm für 5 Min gewaschen und in 400 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Proben standen für die Auswertung mittels Durchflusszytometrie zur Verfügung.

3.17.4 Analyse des TZRβ-Repertoires von humanen T Zellen

Die Subfamilien-Zugehörigkeit der TZRβ Ketten einer T-Zellkultur wurde mit dem „*IOtest Beta Mark TCR V^α*“-Versuchssystem von der Fa Beckman Coulter untersucht. Die Durchführung erfolgte laut Herstellerangaben. Hierbei wurde eine T-Zellpopulation mit Antikörpern gegen die unterschiedlichsten TZRβ Ketten markiert und mit der Durchflusszytometrie ausgewertet. Die Analyse ließ einen Rückschluss auf die Poly-, Oligo- oder Klonalität einer T-Zellkultur zu.

3.17.5 Scatchard-Analysen

Die Analysen erfolgten mit dem p53-spezifischen Tetramer. Es wurden 20 µl des p53-spezifischen Tetramers auf 200 µl PBS (0,1 % BSA) eingesetzt (1:10 Verdünnung des p53-spezifischen Tetramers). Anschließend wurden 12 Reaktionsgefäße vorbereitet, um das p53-spezifische Tetramer zu verdünnen. In das erste Röhrchen wurde die Tetramer-Verdünnung (1:10) überführt und von dieser ausgehend auf die anderen 11 FACS-Röhrchen 1:2-Verdünnungen angesetzt. Darauffolgend wurden $0,1 \times 10^6$ Zellen pro Ansatz mit 2 ml PBS (0,1 % BSA) bei 1500 Upm für 5 Min gewaschen. Das Zellpellet wurde weitestgehend von der Waschlösung befreit und anschließend in genau 50 µl Waschlösung aufgenommen. Zu den Zellsuspensionen wurden in einem 1:2-Verhältnis 50 µl der verdünnten p53-spezifischen Tetramerlösung zugegeben. Es folgte ein lichtgeschützter Inkubationsschritt bei RT für 45 Min. Zur Entfernung von nicht-gebundenem p53-spezifischen Tetramer, wurden die Proben mit 2 ml PBS (0,1 % BSA) gewaschen und anschließend in 300 µl PBS (0,1 % BSA, 1% Paraformaldehyd) aufgenommen. Die Proben wurden bis zur weiteren Auswertung mittels der Durchflusszytometrie bei 4°C gelagert und spätestens am Folgetag gemessen.

3.18 Zellsortierung

Es erfolgte die Zellsortierung von pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen humanen T-Zellen. Hierfür wurden je nach prozentualer Akkumulation der pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen T-Zellen 5 bis 15×10^6 Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen mit dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Tetramer-PE sowie mit dem CD8-Fitc Antikörper für 45 Min bei 4°C inkubiert. Hierfür wurde eine 5-fach niedrigere Menge an Tetramer eingesetzt als bei Standardfärbungen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und in 400 µl MACS-Puffer aufgenommen. Zur Entfernung von möglichen Zellaggregaten und Gewährleistung eines optimalen Probenflusses, wurde die Zellsuspension durch ein Zellsieb mit einer Maschenweite von 100 µm filtriert. Die Zellen wurden steril sortiert und direkt in vorbereitete Auffangröhrchen, die mit 5 ml hu RPMI befüllt waren, überführt. Nach der Zellsortierung wurden die Zellen entsprechend ihrer Kulturbedingungen weiterverarbeitet.

3.19 Humaner Interferon- γ Elisa/ muriner IL-2 Elisa

Die Elisa („*Enzyme-linked immunosorbent assay*“) Auswertung dient der Bestimmung der quantitativen Zytokinmenge, die von einer T-Zell-Population nach einer Stimulation mit peptidbeladenen Zielzellen sezerniert wurde. Die Böden der Kavitäten einer 96-Kavitäten-Mikrotiter Platte werden mit einem Primär-Antikörper („*capture antibody*“) gekoppelt, welcher an einer definierten Stelle an das von der Zelle sezernierte Zytokin bindet. Ein biotinylierter Sekundär-Antikörper („*detection antibody*“) erkennt im Vergleich zum fixierten Primär-Antikörper ein anderes spezifisches Epitop des Zytokins. Somit erfolgen die Bindungen der Antikörper an das sezernierte Zytokin nach dem sogenannten Sandwich-Prinzip. Mittels der Zugabe des Avidin-HRP (Horseradish Peroxidase)-Komplexes und des enzymatischen Umsetzens des Substrates kann die gebundene Zytokinmenge quantifiziert werden. Im Folgenden wurden bei der detaillierten Beschreibung die nachzuweisenden Zytokine (IL-2 oder IFN- γ) nicht berücksichtigt, da die Versuchsdurchführung gleichbleibend blieb. Zunächst wurde die 96-Kavitäten-Mikrotiter Platte mit 100 μ l/Kavität mit dem 1:250 in „*Coating*“-Puffer“ verdünnten Primär-Antikörper (anti-mouse IL-2 bzw. anti-human IFN- γ) beladen. Die Platte wurde lichtgeschützt bei 4°C über Nacht inkubiert. Als Zielzellen wurden T2- oder K562-A2-Zellen benutzt, die auf $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt wurden. Am nächsten Tag wurden die Flüssigkeiten aus den Platten aspiriert und dreimal mit 200 μ l/Kavität PBS gewaschen. Die Platten wurden auf Papier getrocknet, um die Rückstände an Flüssigkeit aus den Kavitäten quantitativ zu entfernen. Anschließend wurde die Platte mit 100 μ l/Kavität 10 % FKS enthaltenem Medium für eine Stunde bei RT geblockt. Zur Entfernung des Mediums wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurden in jede Kavität 150.000 (E:T = 3:1) bzw. 50.000 (E:T = 1:1) T-Zellen in 50 μ l 10 % RPMI Medium ausgesät. Die Zielzellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des zu untersuchenden Peptides in einer Peptid-Titration beladen. Anschließend wurden diese auf 50.000 Zellen pro 50 μ l 10 % RPMI-Medium/Kavität eingestellt und zu den bereits ausgesäten T-Zellen gegeben (1:2 Verdünnung). Von allen Ansätzen wurden Duplikate angefertigt, um bei der Auswertung einen Mittelwert errechnen zu können. Zur Berechnung der sezernierten Zytokinmenge der stimulierten T-Zellen, wurde eine Standardverdünnungsreihe der betreffenden Zytokine angefertigt, die einem linearen Bereich in der photometrischen Vermessung folgte. Bei dem IL-2 Zytokin betraf dies den pg-Bereich von 200 pg/ml bis 3,1 pg/ml

und bei dem IFN- γ Zytokin von 500 pg/ml bis 7,8 pg/ml. Die Verdünnungsreihe wurde ebenfalls mit Duplikatansätzen zu je 100 μ l/Kavität durchgeführt. Als Referenz wurde als letzter Duplikatansatz der Standardverdünnungsreihe ein Leerwert, d.h. nur 100 μ l 10 % RPMI Medium/Kavität, gewählt. Die Platte wurde über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte 5-mal mit 0,05% Tween20-haltigen PBS gewaschen, um Restbestände an Medium und Zellen zu entfernen. Folglich blieb in den Kavitäten der Platte nur noch der Primär-Antikörper mit gebundenem Zytokin zurück. Es folgte die Zugabe des biotinylierten Sekundär-Antikörpers sowie des Avidin-HRP (Horseradish Peroxidase)-Komplexes, welche 1:250 in „Assay diluent“-Puffer (BD OptEIA, Fa. BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) verdünnt und zu 100 μ l pro Kavität gegeben wurde. Nach einer Stunde Inkubation bei RT wurde die Platte 5-mal mit 0,05% versetztem PBS gewaschen und mit 100 μ l/Kavität Substrat-Lösung versehen. Die Lösung enthielt Tetramethylbenzidin (TMB) und H₂O₂, welches als Substrat der Peroxidase zu einem Radikal gespalten wird. Konzentrationsabhängig erfolgt die Umsetzung des TMB zu einem blauen Farbstoff-Radikal-Kation. Die Platte wurde für 15 Min lichtgeschützt inkubiert und anschließend wurde die Peroxidase-Reaktion mit 50 μ l Stopp-Lösung bzw. 2 N H₂SO₄ beendet, wodurch eine Protonierung des Zwischenproduktes erzielt wird. Hierbei wurde ein Farbumschlag des blauen Farbstoffes in einen gelben erzielt. Die Platten wurden innerhalb der nächsten 30 Min bei 450 nm in einem ELISA-Reader ausgewertet. Dabei wurde aus der Standardverdünnungsreihe eine Eichgerade erstellt und anhand dieser die sezernierte Zytokin-Konzentration in pg/ml der Proben berechnet.

3.20 ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstest

Der ⁵¹Cr-Freisetzungstest dient der Analyse der lytischen Reaktivität von T-Effektorzellen gegenüber peptidbeladenen Zielzellen (Theobald et al. 1995, 1997). Die Zielzellen werden mit definierten Peptidkonzentrationen beladen und mit dem Radionuklid eines Natriumchromat-Salzes (Na₂⁵¹CrO₄) markiert. Die spezifische Erkennung und Lyse der Zielzellen durch die zytotoxischen T-Zellen führt zur Freisetzung des aufgenommenen Radionuklides in den Überstand. Anschließend kann diese Freisetzung gemessen werden. Als Zielzellen wurden T2- oder K562-A2-Zellen verwendet. Optional erfolgte die Verwendung von K562-Zellen, welche keine MHC-Moleküle aufweisen und folglich nur von NK-Zellen lysiert werden können. Dadurch kann eine Überprüfung auf NK-Zell-Aktivität erfolgen. Im Folgenden wurde die

Versuchsdurchführung detailliert beschrieben. Am Vortag wurden die Zielzellen auf $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Am nächsten Tag wurden pro Peptidverdünnung $0,5 \times 10^6$ Zielzellen eingesetzt, in 10 μ l FKS aufgenommen und mit 2 μ l einer definierten Peptidkonzentration von 100 nM bis 0,001 nM beladen. Anschließend wurde zu den peptidbeladenen Zielzellen 100 μ l $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (1 mCi/ml) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 90 Min bei 37°C und 5 % CO_2 , wurden die Zellen dreimal mit 10 % kompletten RPMI gewaschen. Dies diente der Entfernung von nicht aufgenommenem Peptidmengen und ^{51}Cr . Zum Einstellen der Zielzellen auf 50.000 Zellen/ml wurden diese in 10 ml 10 % FKS enthaltenem farblosen Medium aufgenommen. Das Phenolrot kann die Lichtquanten-Ausbeute des β -Counters quenchen. Die benötigte Zellzahl an T-Effektorzellen wurde nach der folgenden Formel berechnet:

Anzahl der Zielzell-Platten (Peptidverdünnungen im 96-Kavitäten-Format) \times 0,3 (Verdünnungsfaktor) \times [(E:T) / 10] = Anzahl der Effektorzellen / 2.

Die Anzahl an Effektoren wird halbiert, um T-Zellen zu sparen.

Die Berechnung der benötigten Menge an 10 % farblosen RPMI unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors, zum Aussäen der T-Effektorzellen wurde wie folgt berechnet:

Anzahl der Zielzellen (Peptidverdünnungen) \times 0,3 (Verdünnungsfaktor) = Volumen in ml an Medium zur Aufnahme der T-Zellen

Es wurden Duplikatansätze angefertigt, um in der Auswertung einen Mittelwert errechnen zu können. Für das erste E:T Verhältnis wurden von den T-Effektorzellen pro Kavität einer 96-Kavitäten-Mikrotiter Platte 100 μ l ausgesät. Der restliche Anteil an T-Zellen wurde 1:3 mit 10 % FKS enthaltenem farblosen RPMI verdünnt (0,3 Verdünnungsfaktor) und für das nächste E:T ausgesät. Diese 1:3 Verdünnungen wurden bis zum zuletzt gewählten E:T ausgeführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 μ l/ Kavität der Zielzellen zu den T-Effektorzellen. Des Weiteren erfolgte die Analyse der Spontanlysen, d.h. die spontane Freisetzung an ^{51}Cr in den Überstand der ^{51}Cr beladenen Zielzellen. Hierfür wurden in 8 bis 12 Kavitäten der 96-Kavitäten-Mikrotiter Platte 100 μ l Zielzellen mit 100 μ l 10 % FKS enthaltenem farblosen Medium ausgesät. Die Maximallyse, d.h. die maximale Freisetzung an ^{51}Cr in den

Überstand der ^{51}Cr -beladenen Zielzellen, wurde ebenfalls in 8 bis 12 Kavitäten der 96-Kavitäten-Mikrotiter Platte angesetzt. Zu den 100 μl an ausgesäten Zielzellen wurden 100 μl 10 % FKS enthaltene farbloses Medium, das mit 2 % Triton-X100 versetzt war, zugegeben (1:2 Verdünnung, d.h. die Zielzellen wurden mit 1 % Triton-X100 final behandelt). Die Platten wurden für 4 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Anschließend wurden die Platten 9 Min bei 1300 Upm, 5°C und ohne Bremse zentrifugiert. Es wurden 80 μl Überstand auf die Lumaplaten überführt, welche anschließend über Nacht bei RT unter einem Abzug getrocknet wurden. Am nächsten Tag erfolgte die Messung der Platten in einem γ -Plattenzähler. Die prozentuale spezifische Lyse wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\left((\text{experimentelle } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}) / (\text{maximale } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}) \right) \times 100 = \% \text{ spezifische Lyse}$$

Bei der Verwendung von HCMV-infizierten humanen Fibroblasten sowie den Saos 2/143 ($\text{p53}_{264-272}^+$) und Saos 2 ($\text{p53}_{264-272}^-$) Zellen wurde der ^{51}Cr -Zytotoxizitätstest wie beschrieben durchgeführt. Jedoch mussten die Zellen nicht zusätzlich mit einer definierten Peptidkonzentration beladen werden, da eine endogene Peptidpräsentation vorlag. Die Inkubationszeit der Ziel- und T-Effektorzellen betrug in diesem Fall 6 Stunden.

3.21 ^{51}Cr -Kompetitionstest

Der ^{51}Cr -Kompetitionstest dient der Analyse der effizienten MHC-HLA-A2.1-Bindung von Peptiden. Bei den aufgeführten Stimulationsprotokollen wurden Zielzellen mit einer definierten Konzentration an Peptid beladen. Es wurde der Unterschied der HLA-A2.1-Bindungseigenschaft der Peptide $\text{pp65}_{495-503}$ und $\text{p53}_{264-272}$ untersucht. Die Durchführung des ^{51}Cr -Kompetitionstest wurde wie unter 3.20 beschrieben durchgeführt. Im Folgenden wurden lediglich die Ergänzungen aufgeführt. Es wurden T2-Zellen als Zielzellen verwendet und mit 0,01 μg des HLA-A2.1-bindenden $\text{p53}_{264-272}$ -Tumorantigen-spezifischen Peptides sowie mit 3 μg des zu testenden Peptides (Testpeptid) beladen. Hierbei wurde das $\text{pp65}_{495-503}$ -spezifische Peptid hinsichtlich der HLA-A2.1-Bindungseigenschaft untersucht. Als Positivkontrolle diente das FluM1_{58-66} -spezifische Peptid, welches einen hohen HLA-A2.1 Bindungscharakter aufwies und folglich zu einer Inhibition der $\text{p53}_{264-272}$ -spezifischen Lyse führen sollte.

Die Negativkontrolle mit dem VSV-N₅₂₋₅₉-spezifischen Peptid zeigte keine starke HLA-A2.1 Bindung und somit sollte keine Einwirkung auf die spezifische Lyse ersichtlich werden. Als Effektorzellen wurden Maus-T-Zellen, welche mit einem p53₂₆₄₋₂₇₂-Doppelketten-TZR eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems retroviral transduziert waren, verwendet (freundlicherweise von Frau X zur Verfügung gestellt). Die Zellen wurden entsprechend dem gewählten E:T Verhältnis in einer 96-Kavitäten-Mikrotiter Platte ausgesät und für 4 h inkubiert. Neben den Kontrollen der Spontan- und Maximallysen wurden p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidbeladene Zielzellen ohne zusätzliche Beladung, mit dem zu untersuchenden Peptid (Testpeptid), verwendet.

3.22 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden auf $3 - 100 \times 10^6$ in 1-2 ml Kyromedium (10 % DMSO enthaltenes FKS) eingestellt und für 24 Stunden bei -80°C gelagert. Anschließend wurden die Zellen zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

3.23 Auftauen von Zellen

Das entsprechende Medium der aufzutauenden Zellen wurde im Wasserbad bei 37°C vorwärmt. Zum Auftauen der Zellen wurden diese vorsichtig mit 0,5 bis 1 ml des vorgewärmten Mediums resuspendiert. Hierdurch erfolgte eine direkte Verdünnung des im Kyromedium enthaltenen 10 % DMSO. Anschließend wurde die Zellsuspension tropfenweise in 5 bis 10 ml Medium überführt. Die Zellen wurden für 5 Min bei 1500 Upm und 21°C gewaschen. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen entsprechend ihrer Kulturbedingungen auf die Zellzahl eingestellt und in Kulturmedium aufgenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Interaktionsverhalten der CMV-pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR α und - β Kette mit TZR α und - β Ketten fremder Spezifitäten

Bei der retroviralen Transduktion wird eine TZR α und - β Kette in das Genom von eukaryotischen Zellen integriert. Es stellte sich hierbei die Frage, ob die Ketten gleicher Spezifität bevorzugt miteinander interagieren und zu einem funktionsfähigen TZR führen oder ob infolge von Fremdpaarungen mit Ketten anderer Spezifitäten, durch sogenannte "off-target"-zielungerichtete Reaktivitäten gegen irrelevante Antigene, eine Empfänger-gegen-Wirt-Reaktion („*Graft-versus-Host-Disease*“ (GvHD)) entstehen könnte. Des Weiteren im Hinblick auf die Generierung von Tumorantigen- und CMV-bi-spezifischen humanen T-Zellen war es essentiell zu untersuchen, wie sich theoretisch ein CMV-pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischer TZR mit humanen und murinen Tumorantigen-spezifischen TZR Ketten hinsichtlich des Potentials einer Fremdinteraktion verhalten würde. Der für diese Analysen verwendete wildtypische CMV-pp65₄₉₅₋₅₀₃(NLVPMVATV)-spezifische TZR (Hu Wt TZR CMV) wurde freundlicherweise von X zur Verfügung gestellt. Die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR α und - β Kette wurde mit der entsprechenden humanen gp100₂₈₀₋₂₈₈ und AML₁₄₋₂₂- sowie murinen MDM2₈₁₋₈₈- und p53₂₆₄₋₂₇₂- Tumorantigen-spezifischen TZR α oder - β Kette kombiniert. Im Folgenden wurden Expressionsanalysen durchgeführt, ob die Interaktion der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR α Kette mit einer Tumorantigen-spezifischen TZR β Kette zur Expression eines hybriden TZR, d.h. ein TZR bestehend aus zwei Ketten unterschiedlicher Herkunft mit unbekannter Spezifität und autoreaktivem Potential, führt. Die Untersuchungen wurden *vice versa* mit der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR β Kette durchgeführt. Es wurden nicht-kompetitive Bedingungen, d.h. in Abwesenheit endogener T-Zell Rezeptoren, mittels der Verwendung der murinen Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ (Blank et al. 1993) und der humanen SupT1 Zelllinie (β^-) (Morgan et al. 2003) gewählt. Beide Zelllinien kennzeichnete der Verlust eines endogenen TZR, wodurch von der Zelle selber keine TZR Ketten angeboten wurden. Folglich bestand keine Konkurrenz um die TZR-Expression an der Zelloberfläche zwischen einem endogenen und exogenen TZR. Hinzukommend waren an der Bildung eines hybriden TZR lediglich die

exogenen TZR α und - β Ketten beteiligt. Somit wurde von der nicht-kompetitiven Bedingung ein direkter Rückschluss auf das Interaktionsverhalten der exogenen TZR α und - β Kette sowie eines definierten exprimierten hybriden TZR gewährleistet. Es sei darauf hingewiesen, dass aufgrund einer vorhandenen endogenen TZR α Kette bei der humanen SupT1 Zelllinie, in einem geringen Umfang Konkurrenz, um die exogenen TZR β Kette vorliegen könnte. Die murine Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ -CD3 ζ , wurde mit den TZR Hu Wt TZR gp100 (Schaft et al. 2003), Hu Wt TZR AML (Isolation des ZTL Klons 1C6: Distler et al. 2008, Isolation und Charakterisierung der TZR Ketten: unpublizierte Daten von Dr. X, Dr. Xt und Dr. X, Hu Wt TZR CMV (Heemskerk et al. 2007), Mu Wt TZR MDM2 (Stanislawski et al. 2001) und Mu Wt TZR p53 (Kuball et al. 2005) sowie mit den Kombinationen der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR α oder - β Ketten mit den TZR Ketten der aufgeführten Tumorantigen-spezifischen TZR retroviral transduziert. Zur Untersuchung des Expressionsverhaltens wurden FACS-Färbungen gegen die TZR β Kette, sogenannte subfamilienspezifische V β -Analysen, durchgeführt. Die TZR gehörten zu den folgenden β -Subfamilien: Hu Wt TZR gp100 zu V β 14, Hu Wt TZR AML zu V β 17, Hu Wt TZR CMV zu V β 13.1, Mu Wt TZR MDM2 zu V β 6 und Mu Wt TZR p53 zu V β 3. Eine antigenspezifische Tetramerfärbung konnte aufgrund des Verlustes der Spezifität bei der Bildung eines hybriden TZR, mit unbekannter Definition, nicht durchgeführt werden. In der Abbildung 9 wird die FACS-Auswertung der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR Ketten mit den humanen gp100₂₈₀₋₂₈₈- und AML₁₄₋₂₂-Tumorantigen-spezifischen TZR α und - β Ketten aufgeführt. Es zeigte sich, dass die TZR α sowie - β Kette des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR in einem hohen Maße mit den fremden TZR Ketten interagieren konnte. Bei Vergleich der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI $_{\gamma}$ Werte) des hybriden TZR mit denen des wildtypischen TZR konnte keine hinreichende Beeinträchtigung der Expression des hybriden TZR beobachtet werden. Folglich führte die unerwünschte Fremdinteraktion der TZR α und - β Ketten des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR mit den humanen TZR α und - β Ketten fremder Spezifität zu einem expressionsbefähigten hybriden TZR. Als Negativkontrolle wurden die jeweiligen TZR β Ketten ausschließlich

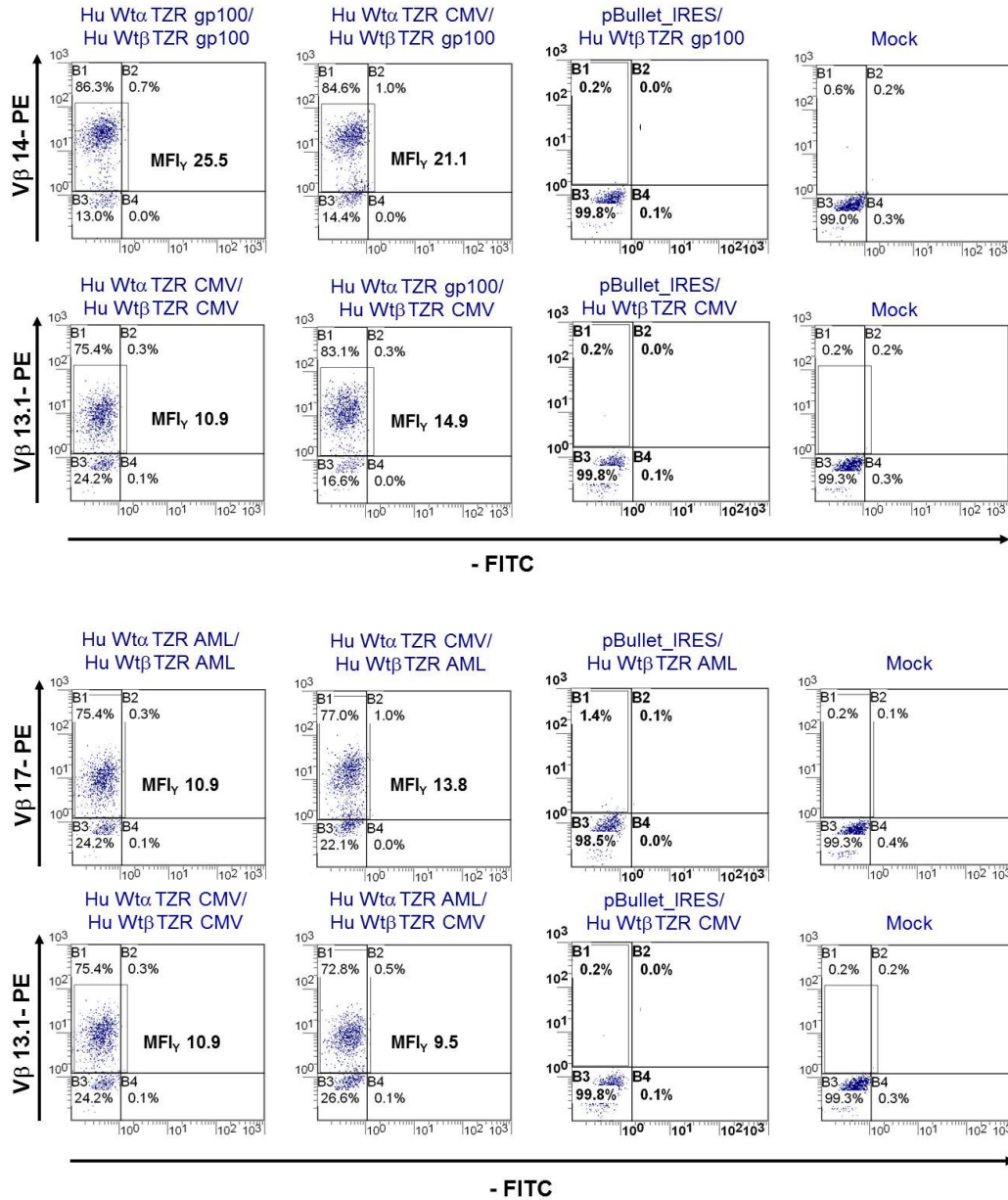


Abbildung 9: Subfamilienspezifische Vβ-Analyse der transduzierten murinen Hybridomzellen 58αβCD3ζ hinsichtlich der Fremdinteraktion der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZRα und -β Ketten mit humanen TZR Ketten

Die CMV-pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZRα und -β Ketten zeigten hohes Interaktionsverhalten mit fremden humanen TZR Ketten. Die Expression des hybriden TZR wurde nicht beeinträchtigt, so dass dieser vergleichbar (MFI_γ Werte) an der Zelloberfläche exprimiert wurde.

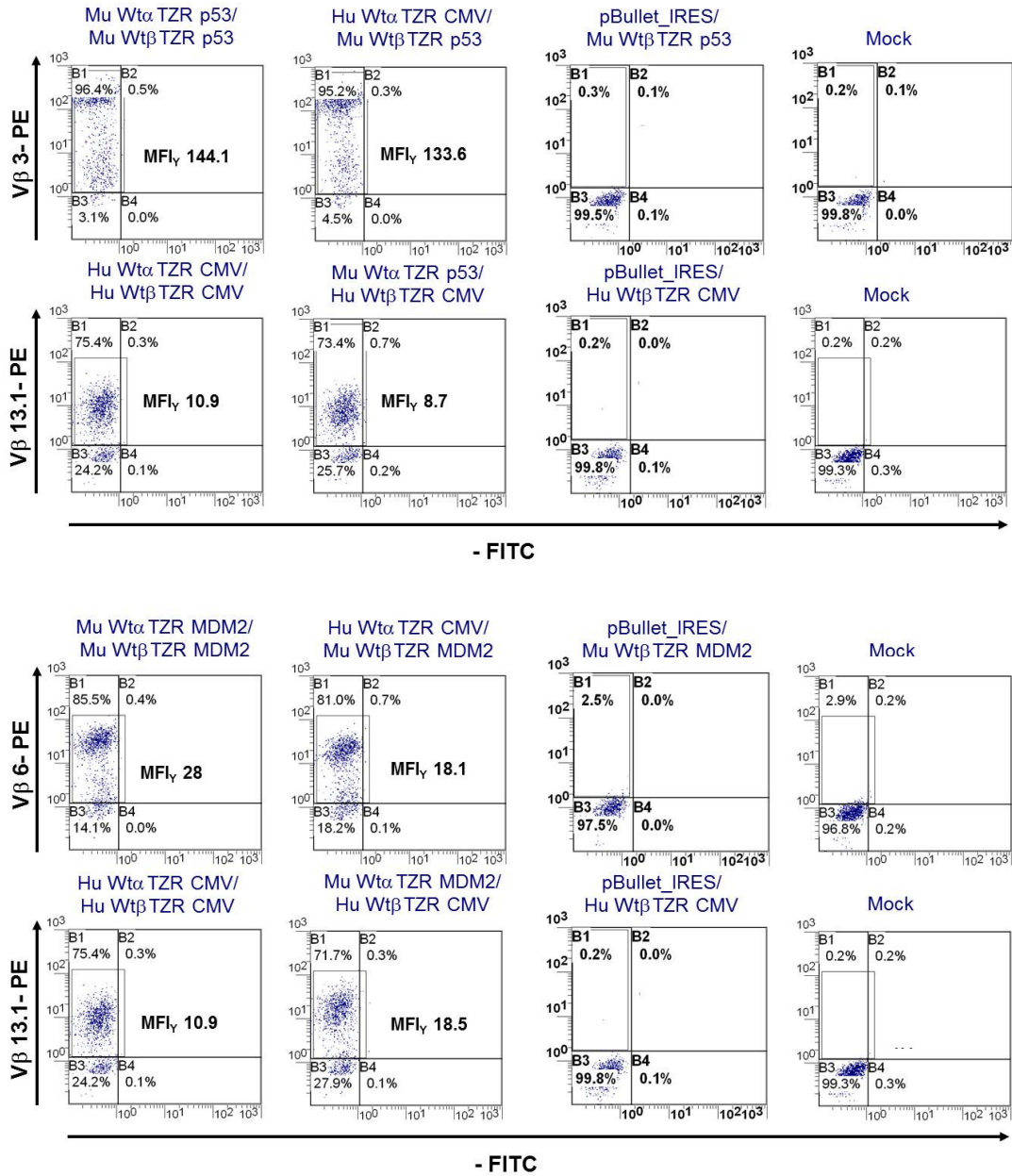


Abbildung 10: Analyse der Vβ-Expression der transduzierten murinen Hybridomzellen 58 αβ⁺ CD3ζ hinsichtlich dem Interaktionsverhalten des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR mit murinen TZRα und -β Ketten

Es zeigte sich, dass die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZRα und -β Kette mit murinen p53₂₆₄₋₂₇₂⁻ und MDM2₈₁₋₈₈⁻-spezifischen TZR Ketten interagiert und zu hybriden TZR führte. Hinzukommend konnte die TZRβ Kette des MDM2₈₁₋₈₈⁻, p53₂₆₄₋₂₇₂⁻ und pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR nicht ohne eine TZRα Kette an der Zelloberfläche exprimiert werden. Die Negativ-Wolke für PE und FITC ist auf eine nicht quantitative Selektion zurückzuführen.

mit dem pBullet_puro Leervektor, auf welchem die TZR α -Kette kloniert wurde, transfiziert. Es zeigte sich, dass die TZR β Kette ohne Bindung und Stabilisierung mit einer TZR α Kette nicht befähigt war, an der Zelloberfläche exprimiert zu werden. Folglich konnte die subfamilienspezifische V β -Analyse für den Nachweis der Expression eines hybriden TZR angewandt werden. Im Weiteren erfolgte die Analyse

Murine Hybridomzellen 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ

	Hu Wt α TZR gp100/ Hu Wt β TZR CMV	Hu Wt α TZR AML/ Hu Wt β TZR CMV	Mu Wt α TZR MDM2/ Hu Wt β TZR CMV	Mu Wt α TZR p53/ Hu Wt β TZR CMV
Hu Wt TZR CMV MFI $_{\gamma}$ 10,9	Expression erhöht MFI $_{\gamma}$ 14,9	Expression erniedrigt MFI $_{\gamma}$ 9,5	Expression erhöht MFI $_{\gamma}$ 18,5	Expression erniedrigt MFI $_{\gamma}$ 8,7
	Hu Wt α TZR CMV/ Hu Wt β TZR gp100	Hu Wt α TZR CMV/ Hu Wt β TZR AML	Hu Wt α TZR CMV/ Mu Wt β TZR MDM2	Hu Wt α TZR CMV/ Mu Wt β TZR p53
Hu Wt TZR gp100 MFI $_{\gamma}$ 25,5	Expression erniedrigt MFI $_{\gamma}$ 21,1			
Hu Wt TZR AML MFI $_{\gamma}$ 10,9		Expression erhöht MFI $_{\gamma}$ 13,8		
Mu Wt TZR MDM2 MFI $_{\gamma}$ 28,0			Expression erniedrigt MFI $_{\gamma}$ 18,1	
Mu Wt TZR p53 MFI $_{\gamma}$ 144,1				Expression erniedrigt MFI $_{\gamma}$ 133,6

Tabelle 3: Expressionsverhalten der Doppelketten-TZR im Vergleich zu den hybriden TZR in der murinen Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ

Die Interaktion der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR β Kette mit den humanen (gp100₂₈₀₋₂₈₈⁻, AML₁₄₋₂₂⁻) und murinen (MDM2₈₁₋₈₈⁻, p53₂₆₄₋₂₇₂⁻) TZR α Ketten zeigte ein variables Expressionsverhalten des hybriden TZR. Die Expression eines hybriden TZR bestehend aus der humanen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR α Kette und humanen oder murinen TZR β -Kette führte vorzugsweise zu einer Erniedrigung der Expression des hybriden TZR.

des Interaktionsverhaltens der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR α und - β Ketten mit den murinen MDM2₈₁₋₈₈- und p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR Ketten (Abbildung 10). Das Ergebnis der hybriden TZR-Bildung mit humanen TZR α und - β Ketten konnte mit den murinen TZR α und - β Ketten reproduziert werden. Die Kontrolle zeigte keine Expression der TZR β Kette ohne Stabilisierung durch eine TZR α Kette. Die Ergebnisse sind zusammenfassend in der Tabelle 3 aufgeführt. Die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR β Kette führte nach der Fremdinteraktion mit einer humanen oder murinen TZR α Kette zu einer Erhöhung (Hu Wt α TZR gp100/ Hu Wt β TZR CMV: MFI $_{\gamma}$ 14,9 bzw. Mu Wt α TZR MDM2/ Hu Wt β TZR CMV: MFI $_{\gamma}$ 18,5 *versus* Hu Wt TZR CMV: MFI $_{\gamma}$ 10,9) oder Erniedrigung (Hu Wt α TZR AML/ Hu Wt β TZR CMV: MFI $_{\gamma}$ 9,5 bzw. Mu Wt α TZR p53/ Hu Wt β TZR CMV: MFI $_{\gamma}$ 8,7) der hybriden TZR-Expression. Im Vergleich zum parentalen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR (MFI $_{\gamma}$ 10,9) wurde die Expression des hybriden TZR durch die Interaktion mit der gp100₂₈₀₋₂₈₈-spezifischen TZR α Kette um 68 % und mit der MDM2₈₁₋₈₈-spezifischen TZR α Kette um sogar 85 % erhöht. Die Bildung eines hybriden TZR mittels der AML₁₄₋₁₈-spezifischen TZR α Kette führte zu einer Abnahme der Expression von 13 % sowie durch die p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifische TZR α Kette um 20 % im Vergleich zum parentalen TZR. Interessanterweise zeigten die hybriden TZR, bestehend aus der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR α Kette und humanen oder murinen TZR β Kette, vorzugsweise eine Abnahme der hybriden TZR-Expression. Im Vergleich zum jeweiligen parentalen TZR zeigte der hybride TZR bestehend aus der gp100₂₈₀₋₂₈₈-spezifischen TZR β Kette eine Abnahme der Expression von 17 %, bei der MDM2₈₁₋₈₈-spezifischen TZR β Kette von 35 % und bei der p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen TZR β Kette von 7 %. Mit Ausnahme der Kombination der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR α Kette mit der TZR β Kette des AML₁₄₋₂₂-spezifischen TZR, konnte eine Erhöhung der Expression des hybriden TZR von 63 % verzeichnet werden.

Darauffolgend wurden die Analysen in der humanen SupT1 Zelllinie reproduziert. Der Versuchsansatz war gleichgestaltet mit der Verwendung des pp65₄₉₅₋₅₀₃- sowie der Tumorantigen-spezifischen TZR. In der Abbildung 11 wurde das Interaktionsverhalten des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR mit spezifitätsfremden, humanen TZR α und - β Ketten dargelegt. Die TZR α und - β Ketten des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR konnten im hohen Maße mit humanen gp100₂₈₀₋₂₈₈- und AML₁₄₋₂₂-spezifischen TZR Ketten interagieren. Dies führte zur Expression eines hybriden

TZR. Die humane SupT1 Zelllinie besaß zwar keinen endogenen TZR, aber eine endogene TZR α Kette, welche um die exogene TZR α Kette kompetitiv wirken könnte (persönliches Gespräch mit Herrn Dr. X. Folglich wurde als Kontrolle die Transfektion der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR β Kette zusammen mit dem pBullet_puro Leervektor, dieser die TZR α Kette präsentierte, durchgeführt. Es konnte keine Expression der TZR β Kette festgestellt werden, so dass die exogene pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR β Kette nicht mit der endogenen TZR α Kette zu interagieren schien. Im Folgenden wurden die Analysen mit den murinen MDM2₈₁₋₈₈- und p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen TZR Ketten durchgeführt (Abbildung 12). Auch hier implizierten die FACS-Ergebnisse der subfamilienspezifischen TZR β Ketten Expression die Bildung eines hybriden TZR, bestehend aus einer TZR Kette des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR und einer murinen Tumorantigen-spezifischen TZR Kette. Als Kontrolle wurde die TZR α Kette des p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen TZR mit dem pBullet_puro Leervektor, dieser die TZR α Kette präsentierte, transfiziert. In diesem Fall konnte die exogene p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifische TZR β Kette an der Zelloberfläche detektiert werden. Folglich fand eine Interaktion mit der endogenen TZR α Kette der SupT1 Zelllinie statt. Jedoch bei Vergleich mit der Expression der p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen TZR β Kette zusammen mit der exogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR α Kette zeigte sich eine Zunahme der Expression. Folglich ist die Expression der TZR β Kette nicht nur auf die Präsenz der endogenen TZR α Kette zurückzuführen, sondern unter Mitwirkung der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR α Kette zu betrachten. In der Tabelle 4 sind die Ergebnisse des Expressionsverhalten der hybriden TZR im Vergleich zu den wildtypischen TZR aufgeführt. Bei Vergleich der MFI_Y-Werte der hybriden TZR zu dem parentalen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR zeigte sich, dass die Interaktion der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR β Kette mit der AML₁₄₋₂₂-spezifischen TZR α Kette zu einer Erhöhung der Expression von 63 % sowie mit der MDM2₈₁₋₈₈-spezifischen TZR α Kette von 59 % und mit der p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen TZR α Kette von 67 % führte. Lediglich der hybride TZR bestehend aus der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR β und der gp100₂₈₀₋₂₈₈-spezifischen TZR α Kette führte zu einer Erniedrigung der Expression des hybriden TZR von 27 %. Insgesamt zeigte die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR β Kette vorzugsweise eine Erhöhung der Expression des hybriden TZR. Im Gegensatz

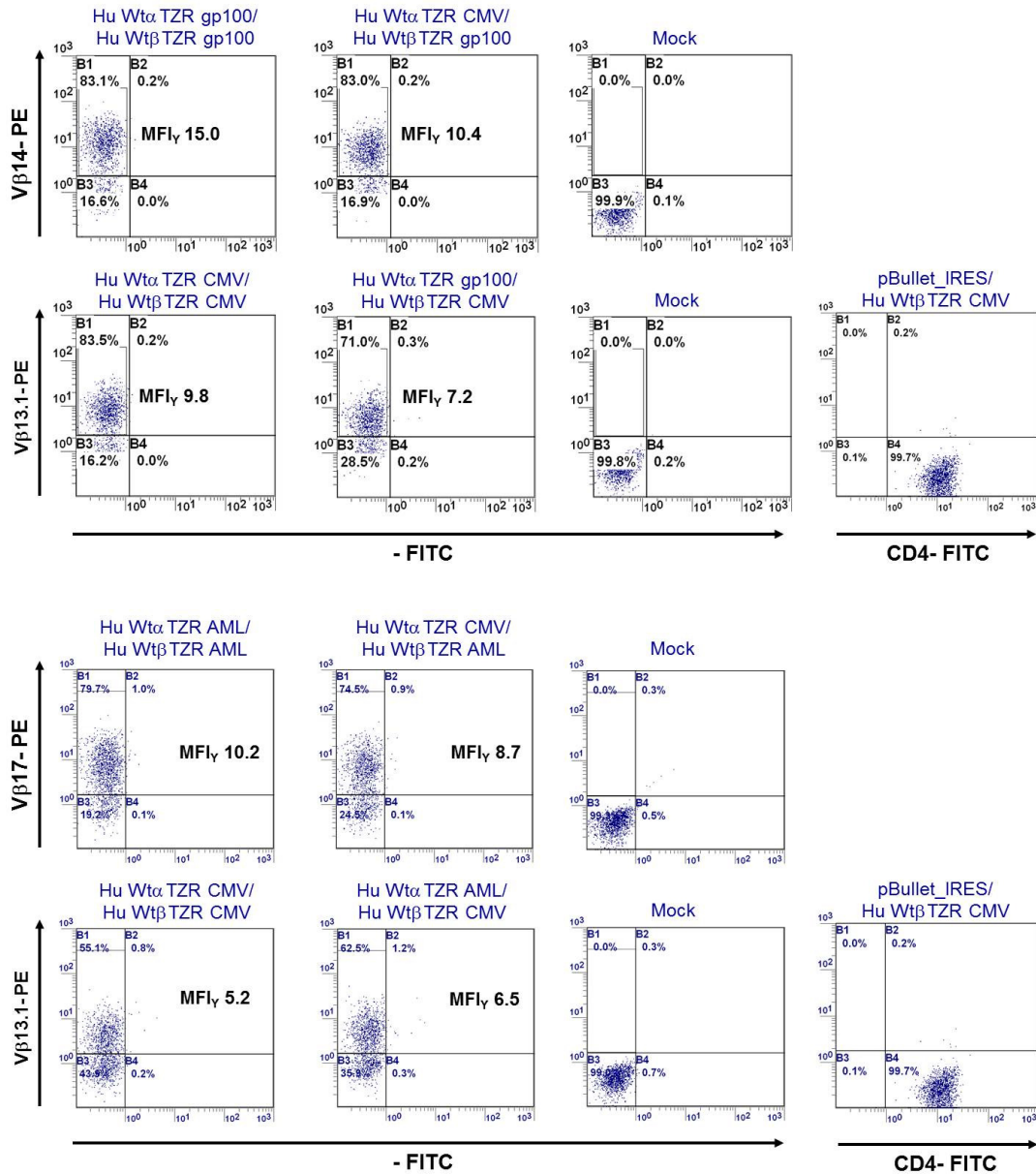


Abbildung 11: FACS-Analyse zur Detektion der Expression eines hybriden TZR der retroviral transduzierten humanen SupT1 Zelllinie

Die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR α und - β Kette interagiert mit den humanen gp100₂₈₀₋₂₈₈- sowie AML₁₄₋₂₂-Tumorantigen-spezifischen TZR Ketten. Die Expression des hybriden TZR war vergleichbar mit der wildtypischen TZR-Expression.

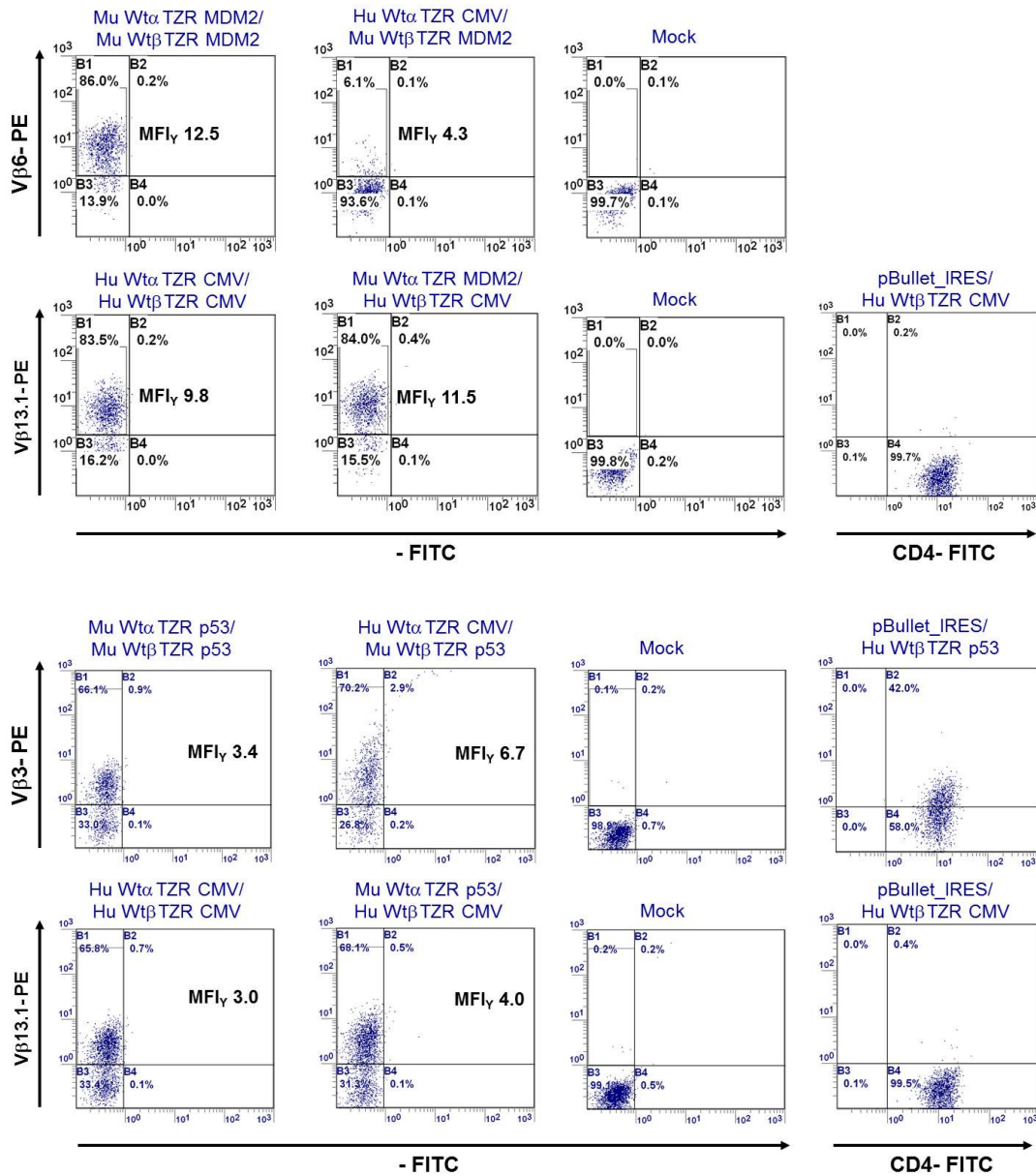


Abbildung 12: Analyse des Interaktionsverhaltens der pp65₄₉₅₋₅₀₃- und murinen TZR α und - β Ketten in der humanen SupT1-Zelllinie

Die TZR β Kette des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR bildete mit den murinen MDM2₈₁₋₈₈- und p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR α Ketten einen hybriden TZR. Mit der TZR α Kette des MDM2₈₁₋₈₈-spezifischen TZR erfolgte lediglich eine geringfügige Interaktion. Als Kontrolle, zur Analyse des Einflusses der endogenen TZR α Kette auf das Expressionsverhalten eines hybriden TZR, wurde die p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifische TZR β Kette mit dem pBullet_IRES-Leervektor retroviral transduziert. Es konnte eine schwache Detektion der p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen TZR β Kette an der Zelloberfläche beobachtet werden.

dazu zeigte die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR α Kette einen supprimierenden Einfluss auf die Expression des hybriden TZR. Im Vergleich zu den jeweiligen parentalen TZR zeigte sich, dass durch die Interaktion der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR α Kette mit der gp100₂₈₀₋₂₈₈-spezifischen TZR β Kette eine Erniedrigung der Expression des hybriden TZR von 31 % und mit der AML₁₄₋₂₂-spezifischen TZR β Kette von 15 % bewirkt wurde. Der hybride TZR bestehend aus der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR α und MDM2₈₁₋₈₈-spezifischen TZR β Kette zeigte eine 66 % niedrigere Expression als der wildtypische MDM2₈₁₋₈₈-spezifische TZR, so dass lediglich 6,1 % der Zellen positiv in der V β 6 Expression erschienen (Abbildung 12).

Humane SupT1 Zelllinie

	Hu Wt α TZR gp100/ Hu Wt β TZR CMV	Hu Wt α TZR AML/ Hu Wt β TZR CMV	Mu Wt α TZR MDM2/ Hu Wt β TZR CMV	Mu Wt α TZR p53/ Hu Wt β TZR CMV
Hu Wt TZR CMV	Expression erniedrigt	Expression erhöht	Expression erhöht	Expression erhöht
	Hu Wt α TZR CMV/ Hu Wt β TZR gp100	Hu Wt α TZR CMV/ Hu Wt β TZR AML	Hu Wt α TZR CMV/ Mu Wt β TZR MDM2	Hu Wt α TZR CMV/ Mu Wt β TZR p53
Hu Wt TZR gp100	Expression erniedrigt			
Hu Wt TZR AML		Expression erniedrigt		
Mu Wt TZR MDM2			Expression erniedrigt	
Mu Wt TZR p53				Expression erhöht

Tabelle 4: Expressionsverhalten der Doppelketten-TZR im Vergleich zu den hybriden TZR in der humanen SupT1 Zelllinie

Die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR β Kette führte nach der Interaktion mit einer humanen gp100₂₈₀₋₂₈₈-spezifischen TZR α Kette zu einer Erniedrigung der Expression des hybriden TZR. Im Falle der humanen AML₁₄₋₂₂- und murinen MDM2₈₁₋₈₈- sowie p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen TZR α Ketten konnte eine Erhöhung der Expression des hybriden TZR detektiert werden. Die Interaktion der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR α Kette führte vorzugsweise zu einer Erniedrigung der Expression des hybriden TZR.

Hybride TZR	Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ	SupT1 Zelllinie
Hu Wt α TZR CMV/ Hu Wt β TZR gp100	17 % Erniedrigung	31 % Erniedrigung
Hu Wt α TZR CMV/ Hu Wt β TZR AML	63 % Erhöhung	15 % Erniedrigung
Hu Wt α TZR CMV/ Mu Wt β TZR MDM2	35 % Erniedrigung	66 % Erniedrigung
Hu Wt α TZR CMV/ Mu Wt β TZR p53	7 % Erniedrigung	99 % Erhöhung
Hu Wt α TZR gp100/ Hu Wt β TZR CMV	68 % Erhöhung	27 % Erniedrigung
Hu Wt α TZR AML/ Hu Wt β TZR CMV	13 % Erniedrigung	63 % Erhöhung
Hu Wt α TZR MDM2/ Hu Wt β TZR CMV	85 % Erhöhung	59 % Erhöhung
Hu Wt α TZR p53/ Hu Wt β TZR CMV	20 % Erniedrigung	67 % Erhöhung

Tabelle 5: Darlegung der Expressionsverhalten der hybriden TZR in der Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ im Vergleich zu der humanen SupT1 Zelllinie

Es zeigte sich, dass sowohl in der Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ und in der SupT1 Zelllinie der hybride TZR bestehend aus der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR α Kette und einer spezifitätsfremden TZR β Kette vorzugsweise zu einer Erniedrigung der Expression des hybriden TZR führte. Der hybride TZR mit der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR β Kette zeigte in der Hybridomzelllinie ein variables Expressionsverhalten, während sich in der SupT1 Zelllinie eher eine Erhöhung der Expression des hybriden TZR widerspiegelte.

Zusammenfassend beinhaltete der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Doppelketten-TZR das Potential an einer Fremdinteraktion mit Ketten fremder Spezifität und bekräftigte das hypothetische Risiko der Induktion einer GvHD durch „*off-target*“-Reaktivität im Menschen. Bei Vergleich mit der murinen Hybridomzelle 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ erschien es auch hier, als würde die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR α Kette eher zu einer Erniedrigung der Expression des hybriden TZR führen (Tabelle 5). Die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR β Kette indizierte eher eine Erhöhung der Expression des hybriden TZR im Vergleich mit der humanen SupT1 Zelllinie. Jedoch wurde diese Beobachtung unter Vorbehalt betrachtet, aufgrund des möglichen, wenn auch geringen, kompetitiven Einflusses durch die endogene TZR α Kette der humanen SupT1 Zellen. Es kann auch nicht restlos ausgeschlossen werden, dass die Affinität der V β -spezifischen Antikörper von den jeweilig gegenwärtigen V α -Ketten beeinflusst wird.

4.2 Generierung und Optimierungen von pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR-Konstrukten

4.2.1 Generierung von neuartigen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR

Von besonderem Interesse war es, neben dem wildtypischen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR (Hu Wt TZR CMV) weitere pp65-spezifische TZR mit einer möglichst höheren Affinität zu dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-Peptid zu generieren. Der Hu Wt TZR CMV wurde freundlicherweise von Frau Dr. X zur Verfügung gestellt. In einer Publikation von Day et al. (2007) wurde ein pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischer TZR beschrieben, welcher zur gleichen Subfamilie des Hu Wt TZR CMV gehörte, aber eine höhere TZR Affinität für das pp65₄₉₅₋₅₀₃(NLVPMVATV)-Peptid versprach. Die Unterschiede zwischen den TZR Sequenzen wurden in der Tabelle 6 aufgeführt. Kurz vor der CDR3 α Schleife befand sich anstelle einer CAR- eine CAS-Sequenz, was den Austausch eines basischen Arginins zu einem polaren Serin bedeutete. Hinzukommend handelte es sich bei der Aminosäure Arginin um eine weitaus größere Aminosäure als bei Serin. Innerhalb der CDR3 β Schleife konnten 2 Unterschiede festgestellt werden, die an der zweiten Position anstelle eines kleinen, polaren Serins zu einem größeren und unpolaren Prolin sowie an der achten

Publikation	AV	Ende AV	CDR3 α	BV	Ende BV	CDR3 β
Heemskerk et al. Blood 2007	18S1	CAR	NTGNQFY	13S1	CAS	SSVTGTGNYGY
Day et al. J Immunol 2007	18.1	CAS	NTGNQFY	13.1	CAS	SPVTGTGHYGY

Tabelle 6: Vergleich zwischen zwei pp65₄₉₅₋₅₀₃(NLVPMVATV)-spezifischen TZR Sequenzen

Zwei publizierte pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR wurden hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenzen verglichen. Interessanterweise gehörten die beiden TZR den gleichen Subfamilien an, versprachen aber unterschiedliche TZR Affinitäten zu dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-Peptid. Die Nomenklaturen bezogen sich auf Arden et al..

Position anstelle der kleineren, polaren Aminosäure Asparagin zu einem größeren und basischen Histidin führten. Zur Generierung des neuartigen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR wurde die gezielte Punktmutagenese angewendet (Anhang). Der Vergleich zwischen den neuartig generierten TZR α und - β Ketten zu der TZR Ausgangssequenz der TZR α Kette (CMV-TCR_A18) und TZR β Kette (CMV-TCR_BV13), legte die Modifikationen der Nukleotidsequenz sowie Positionen dar. Des Weiteren wurde die Integration der Kozaksequenz aufgeführt, welche den Konsens aus den am häufigsten vorkommenden Nukleinbasen in unmittelbarer Nähe des Startcodons AUG auf der mRNS darstellt. Die Kozaksequenz (CCATGG) wurde als Optimierungsprozess eingeführt, um die Erkennung der Sequenz durch die Ribosomen und damit die Effizienz der Translation im Rahmen der Proteinbiosynthese zu erhöhen. Im Folgenden wurde der neuartige pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR, welcher eigentlich einer wildtypischen Sequenz entsprach, aber durch eine gezielte Punktmutagenese generiert wurde, zur Unterscheidung zu der Ausgangssequenz (Hu Wt TZR CMV) als Hu Mt TZR CMV bezeichnet. Anschließend wurde der neuartige pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR zum einen unter nicht-kompetitiven (murine Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ , humane SupT1 und Jurkat-76 Zelllinie) und zum anderen unter kompetitiven Bedingungen (humane T-Zellen) hinsichtlich

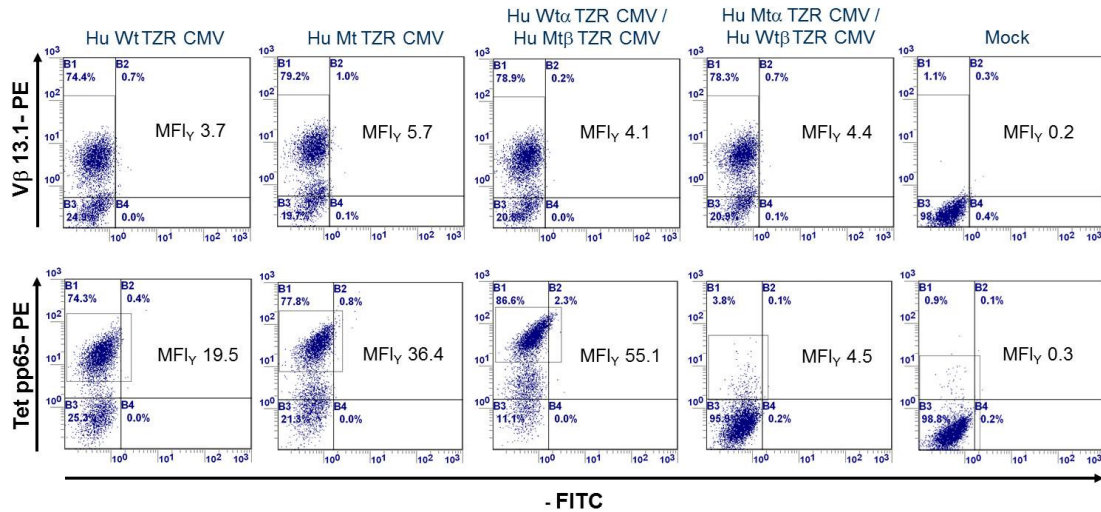


Abbildung 13: Retrovirale Transduktion der murinen Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ mit dem wildtypischen, mutierten sowie den hybriden pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR

Die V β 13.1 Färbung zeigte eine äquivalente Selektion der murinen Zellen nach der retroviralen Transduktion. Des Weiteren zeigte sich in der pp65-spezifischen Tetramerfärbung eine gesteigerte Expression des mutierten (Hu Mt TCR CMV) sowie des hybriden (Hu Wt α TCR CMV / Hu Mt β TCR CMV) pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR.

dem Expressionsverhalten und der Funktionalität analysiert. Die murine Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ wurde mit dem wildtypischen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR (Hu Wt TZR CMV), dem mutierten neuartigen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR (Hu Mt TZR CMV) sowie mit den hybriden TZR, Hu Wt α TZR CMV / Hu Mt β TZR CMV und Hu Mt α TZR CMV / Hu Wt β TZR CMV, retroviral transduziert. Zur Normalisierung der TZR-Expression wurde nach der retroviralen Transduktion eine Selektion mit den entsprechenden Antibiotika, der auf den retroviralen Vektoren klonierten Resistenzgenen, durchgeführt. Die FACS-Analyse mittels der subfamilienspezifischen V β 13.1 Färbung der transduzierten Hybridomzellen 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ wurden in der Abbildung 13 aufgeführt. Es zeigte sich ein 1,54-facher Unterschied hinsichtlich der Expression des Hu Wt TZR CMV (MFI_γ 3,7) und Hu Mt TZR CMV (MFI_γ 5,7). Während der hybride TZR bestehend aus der wildtypischen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR α und der mutierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR β Kette (MFI_γ 4,1) im Vergleich zum Hu Mt TZR CMV (MFI_γ 5,7) eine 1,39-fache

Erniedrigung der TZR-Expression zeigte, konnte im Vergleich der Expression des Hu Wt TZR CMV (MFI_γ 3,7) und des hybriden TZR bestehend aus der mutierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR α und der wildtypischen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR β Kette (MFI_γ 4,4) eine 1,2-fache Erhöhung der hybriden TZR-Expression beobachtet werden. Die einzelnen MFI_γ-Werte der V β 13.1 Expression zeigten keine entscheidende Differenz voneinander. Zur Analyse der Expression des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR wurden Tetramerfärbungen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die gezielte Mutation des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR (Hu Mt TZR CMV) zu einer Verbesserung der Expression an der Zelloberfläche führte. Die MFI_γ-Werte des Hu Wt TZR CMV entsprachen 19,5 und die, des Hu Mt TZR CMV zeigten eine Erhöhung auf 36,4. Interessanterweise konnte mit dem hybriden TZR

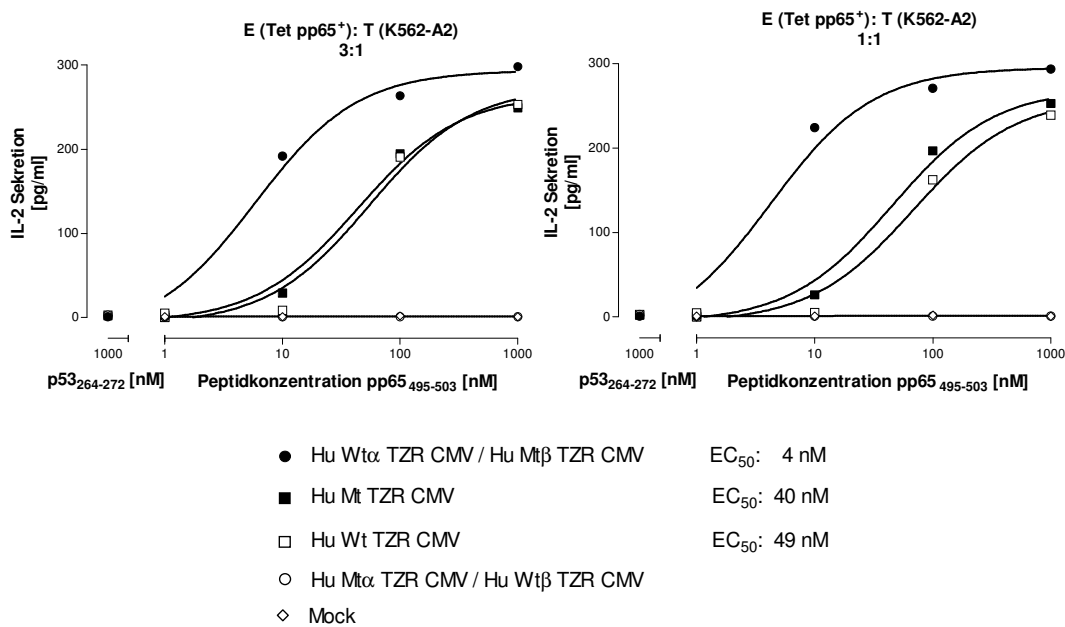


Abbildung 14: Analyse der Funktionalität der neu generierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR der transduzierten Hybridomzellen 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ

Die EC₅₀-Werte signifizieren die Generierung von neuen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR mit gesteigerter Funktionalität im Hinblick auf eine IL-2 Sekretion in einem Elisa. Der hybride TZR bestehend aus der wildtypischen TZR α und der mutierten TZR β Kette des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR zeigte eine höhere IL-2 Freisetzung für die jeweiligen Peptid-Dosen. Der mutierte pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR zeigte nur eine geringfügige Verbesserung der Funktionalität.

Hu Wt α TZR CMV / Hu Mt β TZR CMV eine weitere Steigerung der Expression (MFI_Y 55,1) erzielt werden. Während *vice versa* der hybride TZR (Hu Mt α TZR CMV / Hu Wt β TZR CMV) nur in einer geringen Masse (MFI_Y 4,5) exprimiert wurde. Im Folgenden wurde in einem murinen Interleukin-2 ELISA untersucht, ob sich die verbesserte TZR-Expression auch in einer effizienteren Funktionalität widerspiegelte (Abbildung 14). Die Bestimmung der EC₅₀-Werte erfolgte durch die nicht-lineare Regression mittels einer sigmoidalen Dosis-Antwort-Gleichung, wodurch die halbmaximale IL-2 Freisetzung und Effizienz eines TZR bestimmt werden konnte. Die mit dem wildtypischen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR (Hu Wt TZR CMV) transduzierten Zellen zeigten eine vergleichbare IL-2 Sekretion (EC₅₀ 49 nM) wie die Zellen, welche mit dem Hu Mt TZR CMV (EC₅₀ 40 nM) transduziert waren. Demnach führten die Modifikationen lediglich zu einer geringen funktionalen Steigerung des TZR. Interessanterweise sekretierten die transduzierten Zellen mit dem hybriden TZR Hu Wt α TZR CMV / Hu Mt β TZR CMV entsprechend seiner effizienteren TZR-Expression auch eine erhöhte Konzentration an IL-2 (EC₅₀ 4 nM). Die Zellen, welche mit dem hybriden TZR Hu Mt α TZR CMV / Hu Wt β TZR CMV retroviral ausgestattet

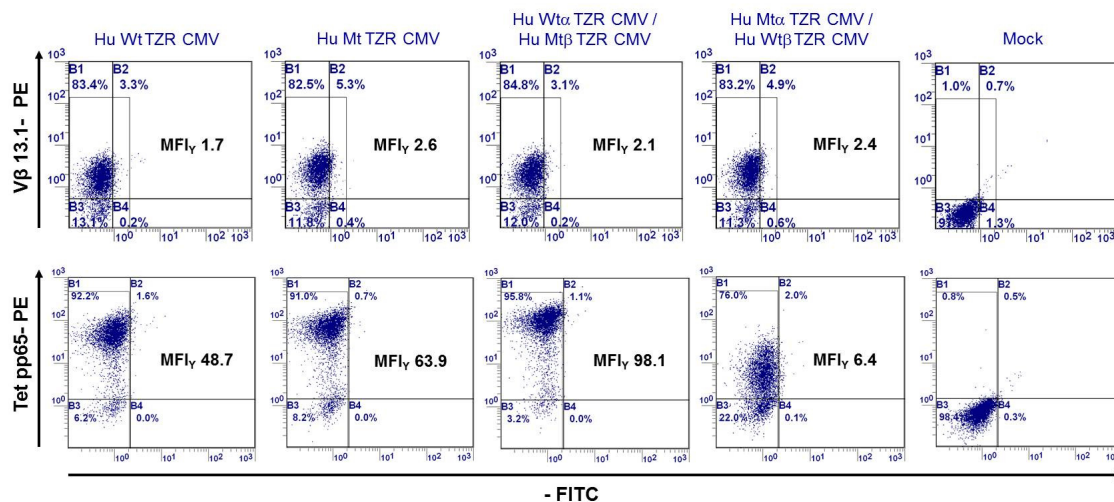


Abbildung 15: FACS-Analyse der retroviral transduzierten humanen SupT1 Zellen mit den pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR-Konstrukten

Die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR-Konstrukte Hu Mt TZR CMV und Hu Wt α TZR CMV / Hu Mt β TZR CMV wurden im Vergleich zum Hu Wt TZR CMV am effizientesten exprimiert. Der hybride TZR, Hu Mt α TZR CMV / Hu Wt β TZR CMV, zeigte die schlechteste Expression.

waren, zeigten entsprechend ihrer geringen Tetramer-Positivität keine detektierbare IL-2 Freisetzung. Eine unspezifische IL-2 Sekretion nach einer p53₂₆₄₋₂₇₂-irrelevanten Peptidstimulation konnte nicht beobachtet werden. Anschließend wurden die Analysen unter nicht-kompetitiven und humanen Bedingungen durchgeführt. Hierfür wurden die SupT1 und Jurkat-76 Zelllinie verwendet. In den transduzierten humanen SupT1 Zellen konnten die Ergebnisse der Hybridomzellen 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ reproduziert werden (Abbildung 15). Auch hier zeigte sich, im Vergleich zum wildtypischen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR (MFI $_{\gamma}$ 48,7), eine verbesserte Expression des gezielt mutierten TZR, Hu Mt TZR CMV, mit einem MFI $_{\gamma}$ Wert von 63,9, sowie des hybriden TZR, Hu Wt α TZR CMV / Hu Mt β TZR CMV (MFI $_{\gamma}$ 98,1). Funktionalitätsanalysen

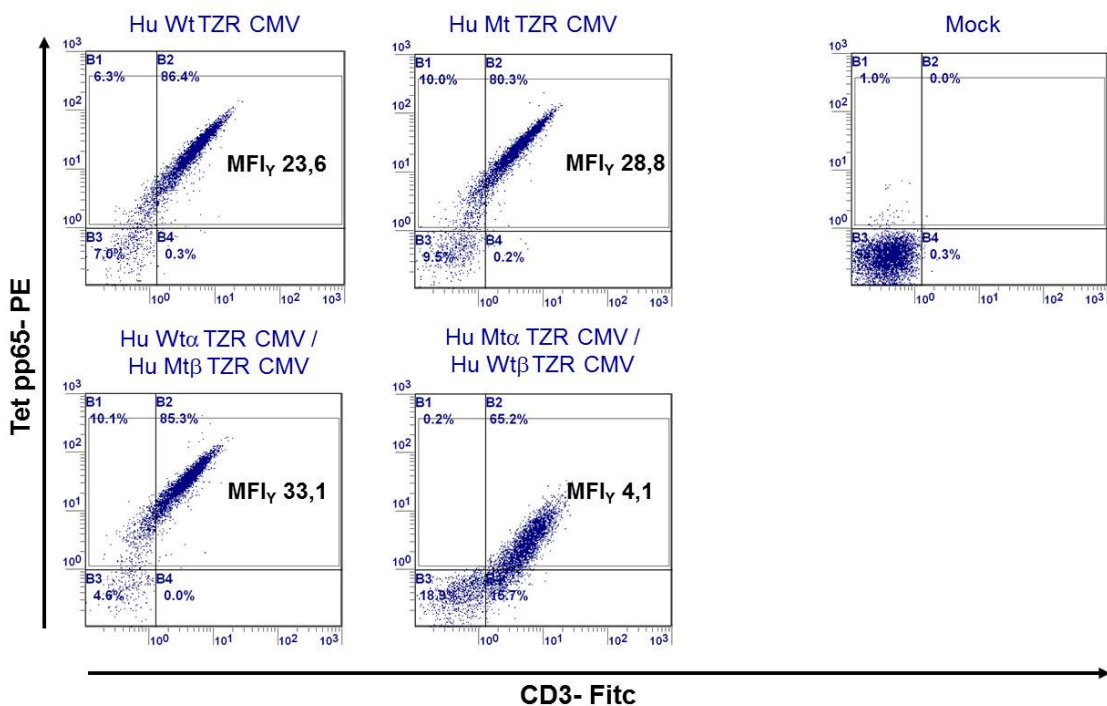


Abbildung 16: Expression der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR-Konstrukte der retroviral transduzierten Jurkat-76 Zellen

Mit der Expression des TZR wird der CD3 Rezeptor hochreguliert, was an deren Koexpression abzulesen ist. Die TZR Hu Mt TZR CMV und Hu Wt α TZR CMV / Hu Mt β TZR CMV wurden im Vergleich zu Hu Wt TZR CMV verbessert exprimiert. Der hybride TZR, Hu Mt α TZR CMV / Hu Wt β TZR CMV, zeigte wiederum die schlechteste Expression an der Zelloberfläche.

konnten nicht durchgeführt werden, da die humanen SupT1 Zellen keine Zytokine sekretierten. Aus diesem Grund wurde die humane Jurkat-76 Zelllinie mit den pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR-Konstrukten retroviral transduziert und hinsichtlich der TZR-Expression und Funktionalität in einem Interferon- γ Elisa analysiert. Es zeigte sich, dass mit der Expression eines TZR an der Zelloberfläche der CD3 Rezeptor exprimiert wurde. Zellbiochemisch liegt dies an dem streng vorgegebenen Assemblierungsmodus von TZR und CD3, die nur im Komplex das ER und den Golgi passieren können (Abbildung 16; Call et al., 2002). Die TZR-Expression konnte in der humanen Jurkat-76 Zelllinie reproduziert werden, so dass der hybride TZR (Hu Wt α TZR CMV / Hu Mt β TZR CMV: MFI γ 33,1) sowie der Hu Mt TZR CMV (MFI γ 28,8) im Vergleich zum wildtypischen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR (MFI γ 23,6) eine verbesserte Expression an der Zelloberfläche aufwiesen. Der hybride TZR Hu Mt α TZR CMV / Hu Wt β TZR CMV (MFI γ 4,1) zeigte reproduzierbar eine geringe TZR-Expression. Zusammenfassend zeigte sich bei den Zelllinien Hybridom 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ , SupT1 und Jurkat-76, dass der hybride TZR bestehend aus der mutierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR β Kette mit den MFI γ -Werten von 55,1 (Hybridom), 98,1 (SupT1) und 33,1 (Jurkat-76) zu einer erhöhten TZR-Expression, in Bezug auf den mutierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR, führte. In der Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ und in der SupT1 Zelllinie konnten mit dem hybriden TZR eine 1,5-fache Erhöhung der Expression im Vergleich zum mutierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR erzielt werden. Bei der Jurkat-76 Zelllinie lag die Erhöhung im 1,14-fachen Bereich. Der mutierte pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR führte in der murinen Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ zu einer 1,9-fachen, in der SupT1 Zelllinie zu einer 1,3- und in der Jurkat-76 Zelllinie zu einer 1,2-fachen TZR-Expression im Vergleich zum wildtypischen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR. Im Folgenden wurden die Funktionalitäten der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR-Konstrukte in einem Interferon- γ Elisa untersucht (Abbildung 17). Die funktionellen Unterschiede waren nicht in dem Maße zu beobachten wie im Fall der IL-2-Sekretion im Hybridom 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ (Abbildung 14). Die Modifikationen des Wildtypen (Hu Mt TZR CMV) führten aber wiederum zu einer effizienteren Interferon- γ Sekretion nach einer pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen Stimulation. Folglich spiegelte sich die verbesserte Expression auch in einer verbesserten Funktionalität wider. Dieses Ergebnis war kompatibel mit dem der transduzierten murinen Hybridomzellen 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ . Jedoch ließ sich eine Diskrepanz zwischen der

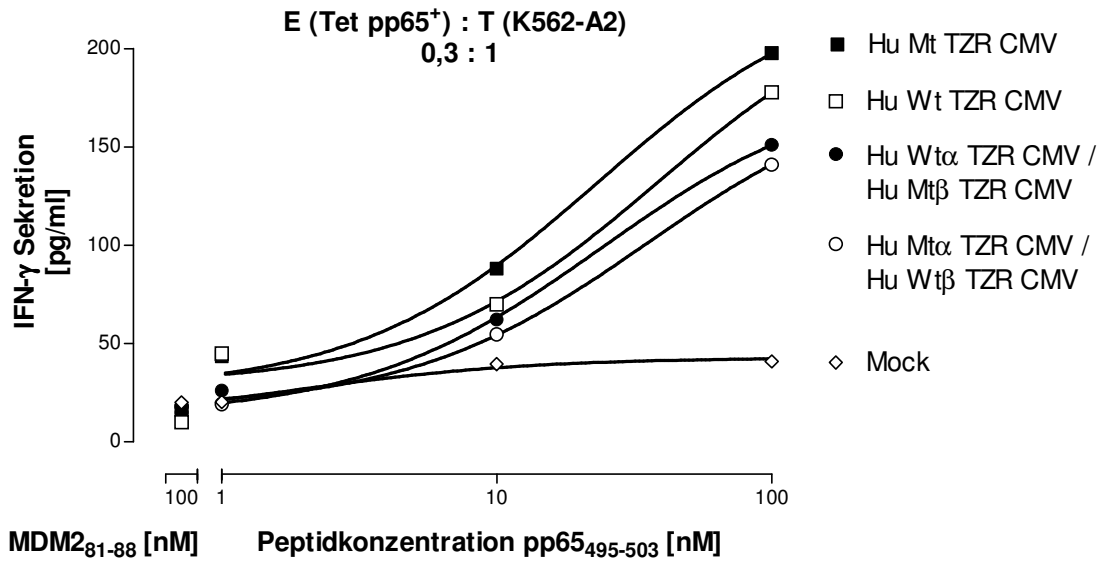


Abbildung 17: Interferon- γ Elisa der transduzierten humanen Jurkat-76 Zellen

Der neuartige mutierte pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR führte zu einer effizienteren IFN- γ Sekretion. Die hybriden TZR zeigten im Vergleich zum Wildtypen keine Verbesserung. Jedoch konnte diesmal eine Funktionalität des hybriden TZR Hu Mt α TZR CMV / Hu Wt β TZR CMV beobachtet werden.

Expression des hybriden TZR, Hu Wt α TZR CMV/Hu Mt β TZR CMV, und der Funktionalität in einem IFN- γ Elisa feststellen. In einem humanen System sowie Interferon- γ Elisa konnte nicht reproduziert werden, dass der hybride TZR (Hu Wt α TZR CMV / Hu Mt β TZR CMV) eine höhere Effektivität als der mutierte oder wildtypische TZR aufwies. Folglich entspricht hier die bessere TZR-Expression nicht einer gesteigerten Funktionalität. Auch zeigte der hybride TZR (Hu Mt α TZR CMV / Hu Wt β TZR CMV) im Vergleich zu den murinen Hybridomzellen 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ (IL-2 Elisa) eine Funktionalität hinsichtlich IFN- γ Sekretion nach einer pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen Stimulation. Daraufaufgehend wurden die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR-Konstrukte unter kompetitiven Bedingungen in den humanen T-Zellen analysiert. Insgesamt wurden 4 HLA-A2⁺ / HCMV-Donoren mit den pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR-Konstrukten retroviral transduziert und hinsichtlich der TZR-Expression und Funktionalität in einem ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstest analysiert. Die Analyse der TZR-Expression erfolgte in einer Kofärbung gegen die Expression des CD4

Korezeptors sowie des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR (Abbildung 18). Die CD4 negativen T-Zellen konnten den CD8⁺ T-Zellen zugewiesen werden. Es zeigte sich für die CD8⁺ T-Zellen der humanen Primärzellen tendenziell vergleichbare Ergebnisse der TZR-Expression wie zu den Zelllinien unter nicht-kompetitiven Bedingungen. Während der mutierte (MFI_Y 20,3) und hybride TZR Hu Wt α TZR CMV/Hu Mt β TZR CMV (MFI_Y 19,8) am stärksten exprimiert wurde, zeigten der wildtypische (MFI_Y 4,5) und hybride TZR Hu Mt α TZR CMV/Hu Wt β TZR CMV (MFI_Y 3,6) eine schwächere Expression. Die CD4⁺ T-Zellen zeigten kein einheitliches Bild, weil die CD4⁺ T-Zellen vermutlich im Klasse I-restringierten Peptid-Restimulationsprotokoll nicht entsprechend antworten. Der TZR Hu Mt TZR CMV (MFI_X 20,3) sowie der hybride TZR Hu Wt α TZR CMV/Hu Mt β TZR CMV (MFI_X 19,8) zeigten eine vergleichbare TZR-Expression zueinander sowie eine verbesserte zu dem wildtypischen TZR Hu Wt TZR CMV (MFI_X 4,5). Wobei hier darauf hingewiesen wird, dass bei den humanen T-Zellen, die mit dem Hu Wt TZR CMV transduziert wurden, wenige CD8 positive T-Zellen vorhanden waren. Trotz allem entsprachen die FACS-Ergebnisse den Erwartungen. Der hybride TZR Hu Mt α TZR CMV/Hu Wt β TZR CMV zeigte wiederum eine verschlechterte Expression (MFI_X 3,6). Hinzukommend konnte festgestellt werden, dass die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR von den Korezeptoren CD8 und CD4 unabhängig erschienen, da sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ humane T-Zellen Tetramer-positiv waren. Auch bei Betrachtung der CD4⁺

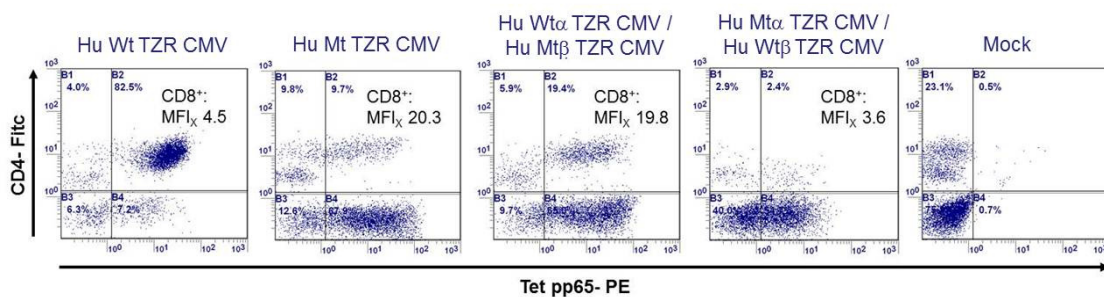


Abbildung 18: Analyse der Expression der transduzierten humanen T-Zellen mittels pp65-spezifischer Tetramerfärbung

Der mutierte pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische sowie der hybride TZR bestehend aus der wildtypischen TZR α und der mutierten TZR β Kette zeigten nach MFI_X-Analyse (CD8⁺ Subpopulation) die effektivste Expression an der Zelloberfläche.

Subpopulation konnte eine verbesserte Expression des hybriden TZR bestehend aus der wildtypischen TZR α und der mutierten TZR β Kette (Hu Wt α TZR CMV/Hu Mt β TZR CMV) sowie des mutierten TZR (Hu Mt TZR CMV) beobachtet werden (MFI $_x$ -Werte wurden nicht bestimmt). Im Folgenden wurde die Funktionalität bezüglich der spezifischen Lyse von, mit definierten Konzentrationen an pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidbeladenen K562-A2 Zielzellen in einem ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstest analysiert (Abbildung 19). Es zeigte sich, dass von den EC₅₀-Werten ausgehend der wildtypische TZR (Hu Wt TZR CMV) sowie der neugenerierte (Hu Mt TZR CMV) pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR eine vergleichbare Lyseeffizienz aufwiesen. Der hybride TZR bestehend aus der wildtypischen TZR α Kette und der mutierten TZR β Kette wies eine verbesserte Effektivität gegenüber dem *vice versa* hybriden TZR (Hu Mt α TZR CMV / Hu Wt β TZR CMV) auf, aber nicht gegenüber dem Ausgangs-TZR.

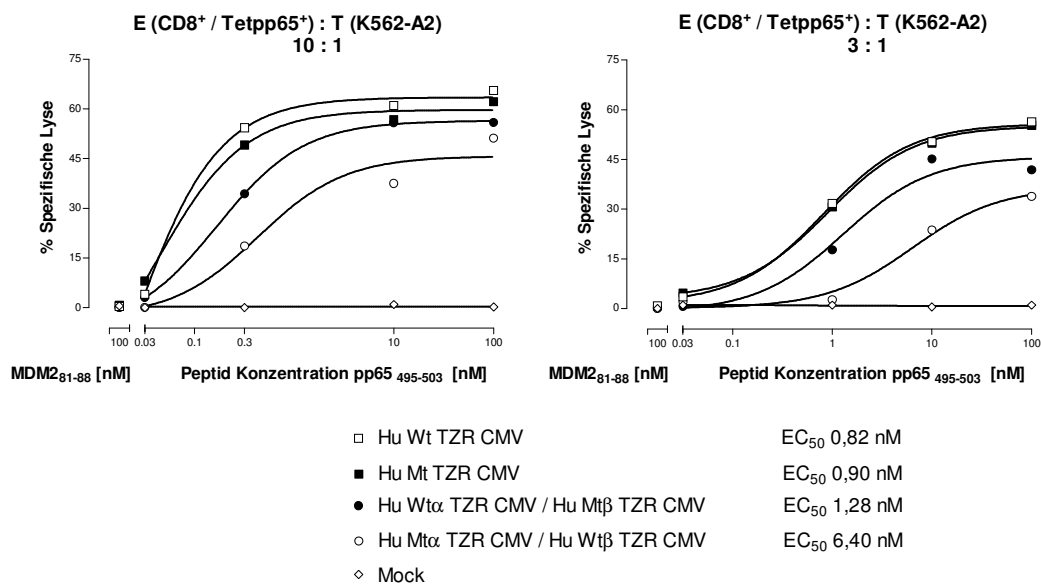


Abbildung 19: ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstest der retroviral transduzierten humanen T-Zellen

Die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR Hu Wt TZR CMV sowie Hu Mt TZR CMV zeigten eine vergleichbare Lyse der, mit definierten Konzentrationen an pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidbeladenen K562-A2 Zielzellen. Der hybride TZR Hu Wt α TZR CMV / Hu Mt β TZR CMV wies eine weitaus höhere Effektivität auf als der *vice versa* hybride TZR. Die EC₅₀-Werte wurden für das E:T Verhältnis von 3:1 bestimmt.

Letztlich wurde anhand der EC_{50} -Werte ersichtlich, dass die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR, Hu Wt TZR CMV, Hu Mt TZR CMV sowie der hybride TZR Hu Wt α TZR CMV/Hu Mt β TZR CMV, hinsichtlich ihrer spezifischen Lyse nahe beieinander lagen und geringe Effizienzunterschiede aufwiesen.

Die gezielte Punktmutagenese sowie die Bildung von hybriden TZR resultierten in der Generierung von neuartigen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR. Der Hu Mt TZR CMV zeigte sowohl unter nicht-kompetitiven als auch unter kompetitiven Bedingungen eine verbesserte TZR-Expression sowie eine vergleichbare Funktionalität zum wildtypischen TZR. Mittels der Generierung eines hybriden TZR Hu Wt α TZR CMV / Hu Mt β TZR CMV konnte die Expression des TZR gesteigert werden. Da der hybride pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR (Hu Wt α CMV/Hu Mt β CMV) sowohl unter nicht-kompetitiven (Jurkat-76) als auch unter kompetitiven (T-Zellen) Bedingungen im humanen System in seiner Funktion beeinträchtigt war, konnte dies nicht an der Gegenwart anderer, sprich endogener TZR liegen. Es kann gemutmaßt werden, dass die Punktmutationen in den CDR3-Schleifen die Interaktionskraft der TZR $\alpha\beta$ Ketten beeinflussen und damit das Ausmaß der Interaktion mit dem humanen CD3 Rezeptor in diesem Fall also schwächen.

4.2.2 Kodonoptimierung des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR

Die Firma Life Technologies (Regensburg, Deutschland) wurde mit der Kodonoptimierung des wildtypischen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR (Hu Wt TZR CMV) beauftragt. Hierbei erfolgte die Überprüfung der Nukleotidsequenz des TZR hinsichtlich des GC-Gehaltes, der kryptischen Spleiß-Stellen sowie destabilisierenden RNS-Motiven. Die Optimierung der Nukleotidsequenz bzw. der Kodons soll zu einer stabileren Expressionsrate des TZR führen. Der Kodon-optimierte pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR (Hu Wt coTZR CMV) wurde mit dem nicht-Kodon-optimierten TZR (Hu Wt TZR CMV), dem mutierten TZR (Hu Mt TZR CMV) sowie dem hybriden TZR, bestehend aus der mutierten TZR β Kette (Hu Wt α coTZR CMV/Hu Mt β TZR CMV), verglichen. Es zeigte sich, dass mit der Kodonoptimierung des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR eine Verbesserung der Expression des TZR erzielt werden konnte (Abbildung 20). Die Expression des wildtypischen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR (MFI $_X$ -Wert 4.5) in humanen CD8⁺ T-Zellen konnte durch den

Optimierungsprozess der Nukleotidsequenz (Hu Wt coTZR CMV) auf einen MFI_x-Wert von 5.7 erhöht werden. Interessanterweise führte wiederum die Generierung eines hybriden TZR bestehend aus der Kodon-optimierten TZR α und der mutierten TZR β Kette zu einer Erhöhung der TZR-Expression. Im Vergleich zum Kodon-optimierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR erhöhten sich die MFI_x-Werte der CD8⁺ Subpopulation von 5.7 auf 7.2. Das Ergebnis wurde in 2 unterschiedlichen Donoren reproduziert. Das unterschiedliche Verhältnis an humanen CD4⁺ T-Zellen konnte vermutlich auf das peptidspezifische, MHC I-restringierte Stimulationsverfahren zurückgeführt werden. Folglich erscheint der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR zwar unabhängig vom CD8 Korezeptor, jedoch ist dies wahrscheinlich nicht quantitativ. Im Folgenden wurde die Funktionalität der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR analysiert, um festzustellen, ob mit der Kodonoptimierung auch eine Steigerung der Funktionalität erzielt werden konnte. Es wurden K562-A2 Zellen als Zielzellen mit einer definierten Konzentration an relevantem pp65₄₉₅₋₅₀₃-, sowie als Kontrolle mit der höchsten Konzentration an einem irrelevanten p53₂₆₄₋₂₇₂-Peptid beladen. Es zeigte sich die spezifische Lyse der pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidbeladenen Zielzellen bis in den pM-Bereich hinein (Abbildung 21). Die Kodonoptimierung führte zu einer Steigerung der Funktionalität, so dass der Kodon-optimierte TZR (Hu Wt coTZR CMV) einen EC₅₀-

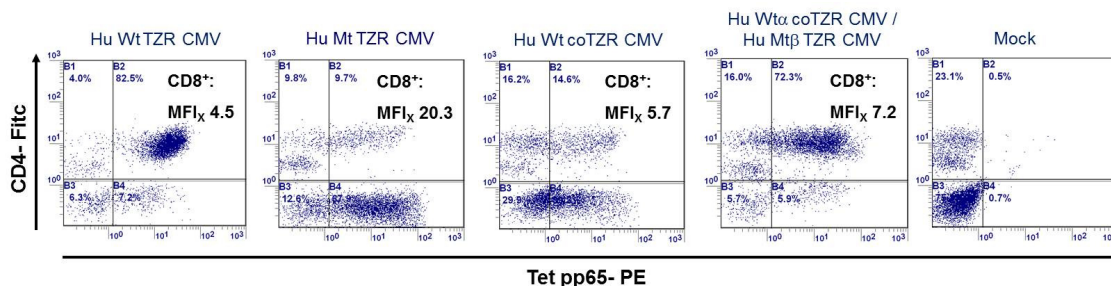


Abbildung 20: Expression des Kodon-optimierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR

Die Kodonoptimierung führte zu einer verbesserten Expression des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR in humanen CD8⁺ T-Zellen. Die MFI_x-Werte erhöhten sich von 4,5 des nicht-Kodon-optimierten Ausgangsproduktes auf 5,7 des Kodon-optimierten TZR. Vergleichsweise zum mutierten TZR sowie des hybriden TZR (Hu Wt α coTZR CMV/Hu Mt β TZR CMV) zeigte sich eine geringere TZR-Expression.

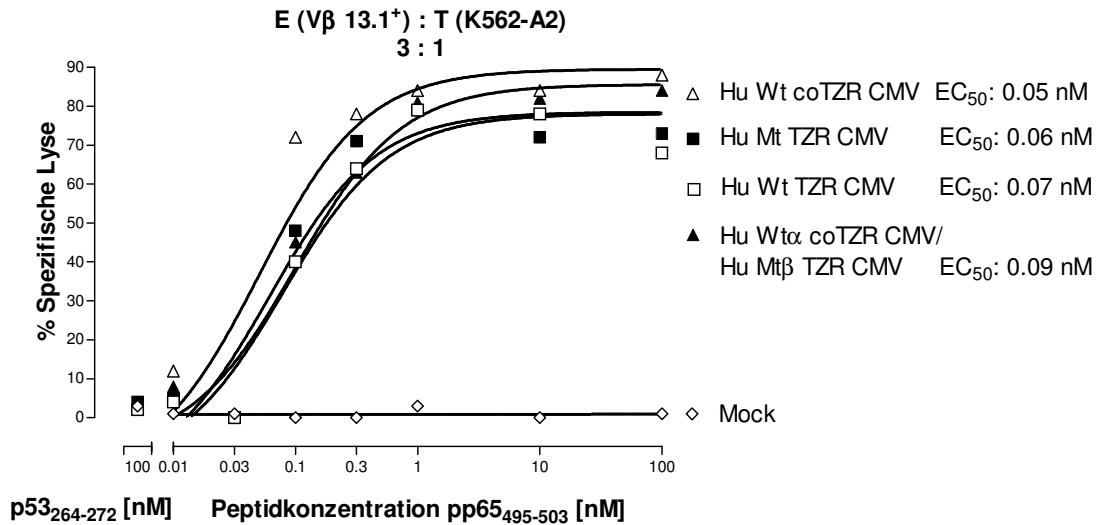


Abbildung 21: ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstest der transduzierten humanen Zellen mit dem Kodon-optimierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR

Es zeigte sich eine gesteigerte Funktionalität hinsichtlich der Lyse der pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidbeladenen Zielzellen (K562-A2) des Kodon-optimierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR. Der hybride TZR bestehend aus der Kodon-optimierten TZRα und der mutierten TZRβ Kette wies eine prozentual höhere Lyse im μM Bereich, aber nicht in der halbmaximalen Lyse, auf.

Wert von 0.05 nM, im Vergleich zu 0.07 nM des nicht-Kodon-optimierten TZR (Hu Wt TZR CMV), aufwies. Es wird darauf hingewiesen, dass für den ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstest eine neue pp65₄₉₅₋₅₀₃-Peptidstammlösung verwendet wurde, was die unterschiedliche Ansprechbarkeit der transduzierten humanen T-Zellen erklären lässt (Vergleich der Abbildungen 17 und 19). Hinzukommend zeigte sich eine insgesamt höhere Eigenschaft der Lyse der Zielzellen. Trotz geringerer Expression des Kodon-optimierten TZR an der Zelloberfläche (MFI_X-Wert der CD8⁺ T Zellen 5.7) zeigte dieser im Vergleich zum höher exprimierten Hu Mt TZR CMV (MFI_X-Wert der CD8⁺ T-Zellen 20.3) eine effizientere Lyse der Zielzellen. Die Oberflächenexpression eines TZR ließ keine unmittelbare Aussage auf die Funktionalität zu. Der hybride TZR (Hu Wtα coTZR CMV/Hu Mtβ coTZR CMV) führte trotz Förderung der Expression des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR zu keiner funktionellen Steigerung. Insgesamt konnte mittels der Kodonoptimierung ein weiterer pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischer TZR generiert werden, welcher hinsichtlich der Expression und Funktionalität zum nicht-Kodon-

optimierten (Hu Wt TZR CMV) sowie mutierten TZR (Hu Mt TZR CMV) zu einer Effizienzsteigerung führte.

4.2.3 Analyse eines pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Einzelketten- und Doppelketten-TZR

Der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Doppelketten-TZR wurde freundlicherweise von Herrn Prof. X zur Verfügung gestellt. Es erfolgte die Klonierung der TZR-Nukleotidsequenz in den retroviralen pBullet Vektor mit dem Puromycin-tragenden Resistenzgen. Das Besondere des Doppelketten-TZR war, dass beide TZR-Leserahmen für die Expression des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR auf einem retroviralen Vektor kloniert waren. Der Vorteil eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems besteht zum einen darin, dass, aufgrund nur einer Integrationsstelle in das Genom, mögliche Risiken einer Insertionsmutagenese minimiert werden. Zum anderen entsteht bei der Transkription eine einzige mRNA, die am Ribosom in eine Aminosäuresequenz translatiert wird. Des Weiteren sind auf dem Vektorkonstrukt die TZR-Leserahmen über ein sogenanntes F2A-selbstpleißendes-Element (Szymczak et al. 2004) verknüpft, welches die Synthese gleicher prozentualer Anteile der TZR α und - β Kette gewährleisten soll. Hinzukommend liegen nach der Translation die TZR α und - β Peptidketten räumlich nah beieinander, so dass sich diese kinetisch gesehen schnellstmöglich finden und einen funktionsfähigen TZR im endoplasmatischen Retikulum (ER) ausbilden sollten. Diese enthaltenen Sicherheitsfaktoren sollten zu einer Minimierung an Fehlpaarungen mit endogenen TZR Ketten führen. Der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Doppelketten-TZR wurde für die Generierung von bi-spezifischen humanen T-Zellen mittels der simultanen retroviralen Transduktion eines p53₂₆₄₋₂₇₂- und pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR verwendet (Kapitel 4.3.2.6). Im Weiteren wird sich lediglich auf den pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Einzelketten-TZR bezogen, welcher von Herrn Dr. X generiert und von mir hinsichtlich Expression und Funktionalität analysiert wurde. Als Ausgangsmaterial wurde der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Doppelketten-TZR, welcher ebenfalls zu der V β 13.1 Subfamilie gehörte, verwendet. Die V α -Domäne wurde über den SL7 Linker mit der V β -Domäne verbunden und zusammen mit der C β -Domäne in den retroviralen Neomycin Resistenzgen-tragenden pBullet Vektor (Chim Hu sc TZR CMV) kloniert. Für die Stabilisierung und Gewährleistung der Expression des Einzelketten-TZR wurde die C α -Domäne (Mu

C α T84C) in den retroviralen Puromycin Resistenzgen-tragenden pBullet Vektor kloniert. Die Position T84C entsprach einer synthetisch eingebauten Disulfidbrücke zwischen der C α - und C β -Domäne. Die Bezeichnung Chim steht für Chimerisierung und bedeutet, dass der humane pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR in den konstanten Domänen (C α und C β) murinisiert wurde. Diese Murinisierungen stärken die Wechselwirkungen der beiden TZR $\alpha\beta$ Ketten (Bialer und Sommermeyer, 2010), und verbessern somit die TZR-Expression. Der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Einzelketten-TZR unterschied sich von dem Doppelketten-TZR dahingehend, dass für die retrovirale Transduktion anstelle von

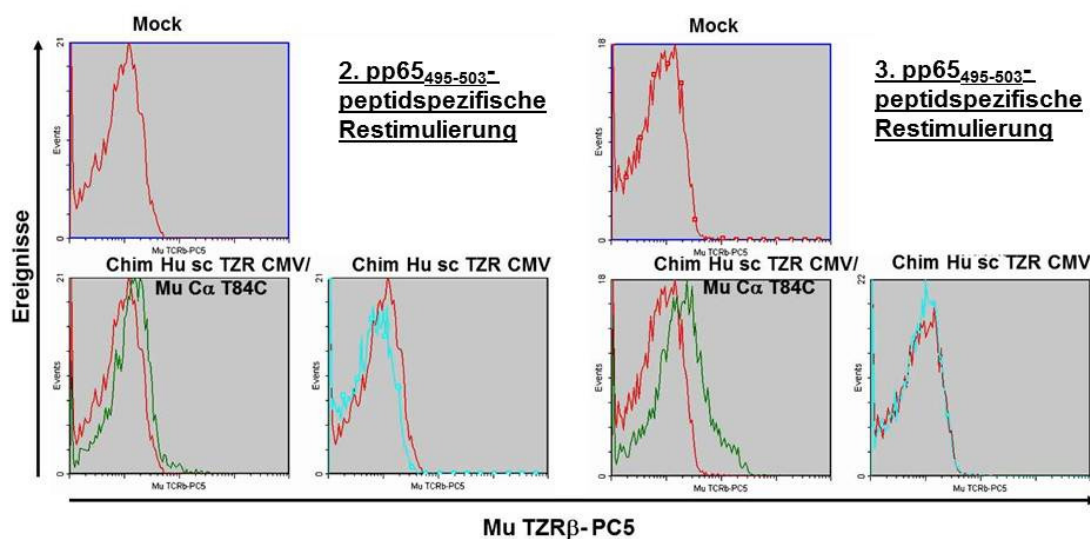


Abbildung 22: Expression des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Einzelketten-TZR an der Zelloberfläche von humanen T-Zellen

Es zeigte sich, dass durch die pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifische Stimulierung die Expression des Einzelketten-TZR (Chim Hu sc TZR CMV / Mu C α T84C) in den humanen T-Zellen gefördert wurde. Eine Expression des Chim Hu sc TZR CMV ohne die Koexpression von Mu C α T84C als stabilisierende Komponente war nicht möglich.

einem 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystem, zwei retrovirale Vektoren (Chim Hu sc TZR CMV/Mu C α T84C) für die Expression des Einzelketten-TZR benötigt wurden.

Im Folgenden wurden humane T-Zellen mit dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Einzelketten-TZR retroviral transduziert. Die Zellen wurden mit den entsprechenden Antibiotika (Geneticin / Puromycin) behandelt und hinsichtlich der TZR-Expression im FACS untersucht. Jedoch konnte keine quantitative Expression nachgewiesen werden. Die Durchführung von pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Tetramerfärbungen fielen stets negativ aus (Daten nicht gezeigt). Da die Zellen die Selektion mit den Antibiotika überlebten, konnte davon ausgegangen werden, dass die retrovirale Transduktion erfolgreich war. Es schlossen sich pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifische Stimulierungen an, um den exogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR anzusprechen und eine Hochregulation zu erzielen. Nach der 2. und 3. pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen Stimulierung wurden FACS-Analysen durchgeführt. Hierfür wurde der Mu TZR β Antikörper verwendet, welcher aufgrund der Murinisierungen in den konstanten Domänen des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Einzelketten-TZR binden konnte. Folglich war die Bindung des Mu TZR β Antikörpers unabhängig von der Subfamilien-Zugehörigkeit der TZR β Kette. Es zeigte sich, dass mit den pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen Stimulierungen, der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Einzelketten-TZR zunehmend an der Zelloberfläche exprimiert wurde (Abbildung 22). Als Kontrolle wurde Mock (roter Kurvenverlauf) verwendet und gegen die Mu TZR β Expression des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Einzelketten-TZR aufgetragen (grüner Kurvenverlauf). Der Zuwachs der Expression spiegelte sich in der Verschiebung des Kurvenverlaufs nach rechts wider. Bei Vergleich der pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen Stimulierung 2 und 3, ließ sich ein Zuwachs an der Mu TZR β - Anfärbbarkeit (grüner Kurvenverlauf) feststellen. Folglich führte die Stimulation des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR mit dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-Peptid zu dessen Stimulierung und resultierte in der Zunahme der Expression des TZR an der Zelloberfläche. Des Weiteren zeigte sich, dass die Expression des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Einzelketten-TZR abhängig von der Mu α T84C Koexpression (hellblauer Kurvenverlauf) war. Ohne diese essentielle Stabilisierung des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Einzelketten-TZR konnte keine Expression an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Der Kurvenverlauf (hellblau) entsprach dem der Mock Kontrolle (rot), so dass keine Verschiebung ersichtlich war, was auf eine Expression zurückzuführen wäre. Im Weiteren wurden die pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen humanen T-Zellen hinsichtlich ihrer Funktionalität

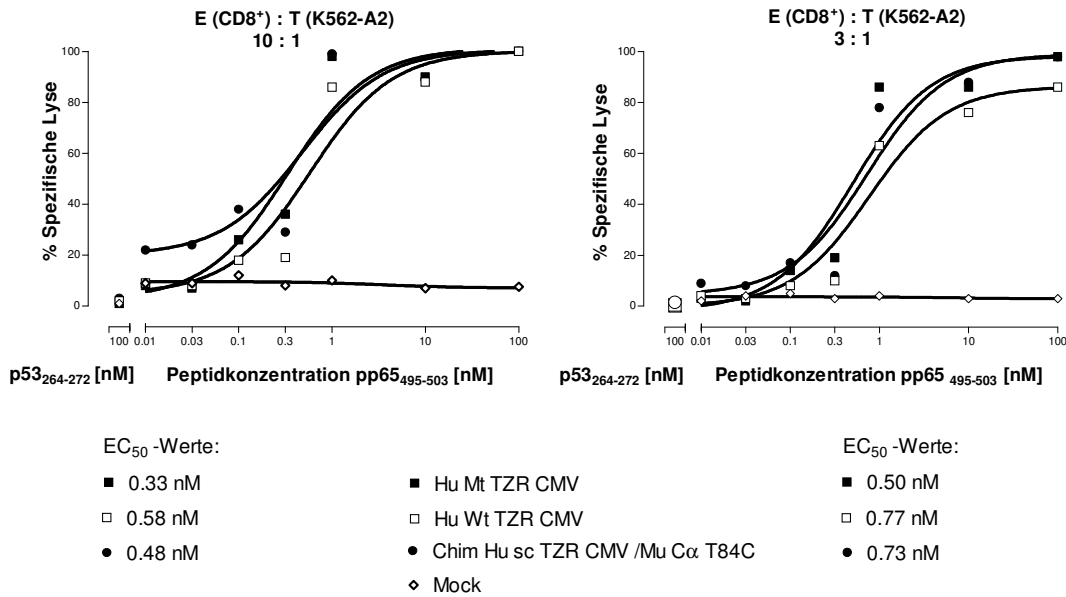


Abbildung 23: ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstest der transduzierten humanen T-Zellen mit dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Einzelketten-TZR

Die T-Zellen, welche mit dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Einzelketten-TZR transduziert waren, zeigten eine vergleichbare Funktionalität wie die transduzierten T-Zellen mit den Doppelketten-TZR. Bei den Doppelketten-TZR waren die TZRα und -β Kette getrennt voneinander auf zwei retroviralen Vektoren kloniert. Als Zielzellen wurden K562-A2 Zellen mit einer definierten Konzentration an pp65₄₉₅₋₅₀₃- bzw. irrelevantem p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen Peptid verwendet.

analysiert. Hierfür wurden im Vergleich der wildtypische (Hu Wt TZR CMV, freundliche zur Verfügungsstellung von X sowie der neugenerierte und mutierte Hu Mt TZR CMV verwendet. Bei diesen retroviralen Vektorkonstrukten waren die TZRα und -β Ketten getrennt voneinander auf zwei retroviralen Vektoren kloniert und nicht, wie beim pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Einzelketten-TZR auf einem retroviralen Vektor. Es wurde ein ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstest durchgeführt, der als E:T auf die CD8⁺ T-Zellen zu den K562-A2 als Zielzellen eingestellt wurde (Abbildung 23). Da die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR Hu Wt TZR CMV und Hu Mt TZR CMV nicht chimerisiert waren, konnte das E:T Verhältnis nicht auf Mu TZRβ-Expression eingestellt werden. Es zeigte sich wiederum, dass der mutierte pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR (Hu Mt TZR CMV) am effizientesten zur spezifischen Lyse der pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidbeladenen Zielzellen führte. Bei einem E (CD8⁺ T-Zellen) 10:1 T (K562-A2) konnte ein EC₅₀-

Wert von 0,33 nM detektiert werden. Der Einzelketten-TZR (Chim Hu sc TZR CMV / Mu C α T84C) zeigte bei gleichem E (CD8⁺ T-Zellen) 10:1 T (K562-A2) einen EC₅₀-Wert von 0,48 nM. Folglich lag dessen Funktionalität zwischen dem Hu Mt TZR CMV und dem Hu Wt TZR CMV, mit einem EC₅₀-Wert von 0,58 nM. Insgesamt erschien es, dass der mutierte pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR eine etwas gesteigerte Funktionalität als der wildtypische pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR aufwies (Abbildungen 21 und 23). Bei Vergleich der ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstests lassen sich die teils abweichenden EC₅₀-Werte auf unterschiedliche Peptidstammlösungen zurückführen (Abbildungen 19, 21 und 23). Der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Doppelketten-TZR wies einen EC₅₀-Wert von 0,91 nM im ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstest auf (Daten nicht gezeigt). Es konnte erfolgreich ein pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischer Einzelketten- und Doppelketten-TZR (Kapitel 4.3.2.6) generiert werden. Trotz einer schwachen Expression des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Einzelketten-TZR, insbesondere in frühen Restimulierungen, zeigte sich eine effiziente Funktionalität bis in den Nanomolaren-Bereich.

Zusammenfassend konnte in dem Kapitel 4.2 dargelegt werden, dass effizient neuartige pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR generiert werden konnten. Diese zeigten eine bis in den Nanomolaren-Bereich reichende spezifische Lyse von pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidbeladenen Zielzellen. Des Weiteren konnte mittels der Kodonoptimierung die Steigerung der Funktionalität des wildtypischen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten-TZR (Hu Wt TZR CMV) erzielt werden. Ebenso wurde in Kooperation mit Herrn Dr. X ein Einzelketten-TZR generiert, welcher trotz ausbleibender Tetramer-Anfärbbarkeit eine hohe Effizienz in der spezifischen Lyse von pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidbeladenen Zielzellen in einem ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstest aufwies.

4.3 Generierung von bi-spezifischen humanen T-Zellen

Zur Generierung von Tumorantigen- und pp65₄₉₅₋₅₀₃-bi-spezifischen humanen T-Zellen wurden 3 Strategien verfolgt. Hierbei wurden sowohl der RNS Transfer sowie retrovirale Gentransfer angewendet. Zuerst erfolgte die Verwendung eines Tyrosinase₃₆₈₋₃₇₆-Tumorantigen-spezifischen T-Zellklons, welcher einen definierten TZR an der Zelloberfläche exprimiert. Dieser wurde retroviral mit einem zweiten pp65₄₉₅₋₅₀₃- oder als Kontrolle mit einem MDM2₈₁₋₈₈-spezifischen Doppelketten-TZR ausgestattet. Das Ziel dieser Analyse bestand darin, zu untersuchen, wie sich der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR (Hu Wt TZR CMV) hinsichtlich Konkurrenz um die

Expression mit einem definierten, endogenen TZR verhalten würde. Der endogene TZR konnte aufgrund seiner bekannten Subfamilien-Zugehörigkeit an der Zelloberfläche detektiert werden.

Die zweite Strategie beschäftigte sich mit der Generierung von pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen aus Blutproben von HCMV-seropositiven Spendern und der anschließenden Modifikation der Zellen mit einem zweiten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR. Hierfür wurde sowohl der RNS Transfer sowie der retrovirale Gentransfer angewendet. Die pp65₄₉₅₋₅₀₃- sowie p53₂₆₄₋₂₇₂-bi-spezifischen T-Zellen wurden hinsichtlich der Expression des endogenen und exogenen TZR sowie der bi-Funktionalität untersucht. Bei diesem Verfahren würde davon ausgegangen werden, dass der Spender und Empfänger einen HCMV-seropositiven Status aufweisen würden.

Die letzte Strategie beschäftigte sich mit der Situation eines HCMV-seropositiven Empfängers, aber eines HCMV-seronegativen Spenders. Folglich wäre kein Schutz gegenüber einer HCMV-Reaktivierung im immunsupprimierten Empfänger gewährleistet. Aus diesem Grund erfolgte die Analyse der Effektivität einer simultanen retroviralen Transduktion von HCMV-negativen T-Zellen mit einem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen und einem CMV-pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR.

4.3.1 Generierung von Tyrosinase₃₆₈₋₃₇₆-Tumorantigen- sowie pp65₄₉₅₋₅₀₃ oder MDM2₈₁₋₈₈-bi-spezifischen humanen T-Zellen

Die humanen T-Zellen mit der TZR Spezifität gegen das Tumorantigen Tyrosinase₃₆₈₋₃₇₆ wurden freundlicherweise von Herrn Prof. X zur Verfügung gestellt (Wölfel et al. 1994). Bei den Tumor-spezifischen T-Zellen handelte es sich um CD8⁺ T-Zellklone, deren endogener Tyrosinase₃₆₈₋₃₇₆-spezifischer TZR der V β 14 Subfamilie angehörte. Die humanen T-Zellen wurden mit einem CMV-pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR sowie als Kontrolle mit einem murinen MDM2₈₁₋₈₈-Tumorantigen-spezifischen TZR modifiziert. Hierbei handelte es sich um ein 2-Plasmide-retrovirales Vektorsystem, d.h. V α /C α sowie V β /C β lagen jeweils auf einem retroviralen Vektor kloniert vor, so dass für die retrovirale Transduktion und Expression des TZR zwei Vektoren benötigt wurden. Im Folgenden wurden die transduzierten T-Zellen hinsichtlich der Expression des endogenen (Tyrosinase₃₆₈₋₃₇₆-spezifischer TZR) und exogenen TZR

(pp65₄₉₅₋₅₀₃- oder MDM2₈₁₋₈₈-spezifischer TZR) untersucht. Der MDM2₈₁₋₈₈-Tumorantigen-spezifische Doppelketten-TZR (Mu Wt TZR MDM2) gehörte der Vβ6 und der der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Doppelketten-TZR

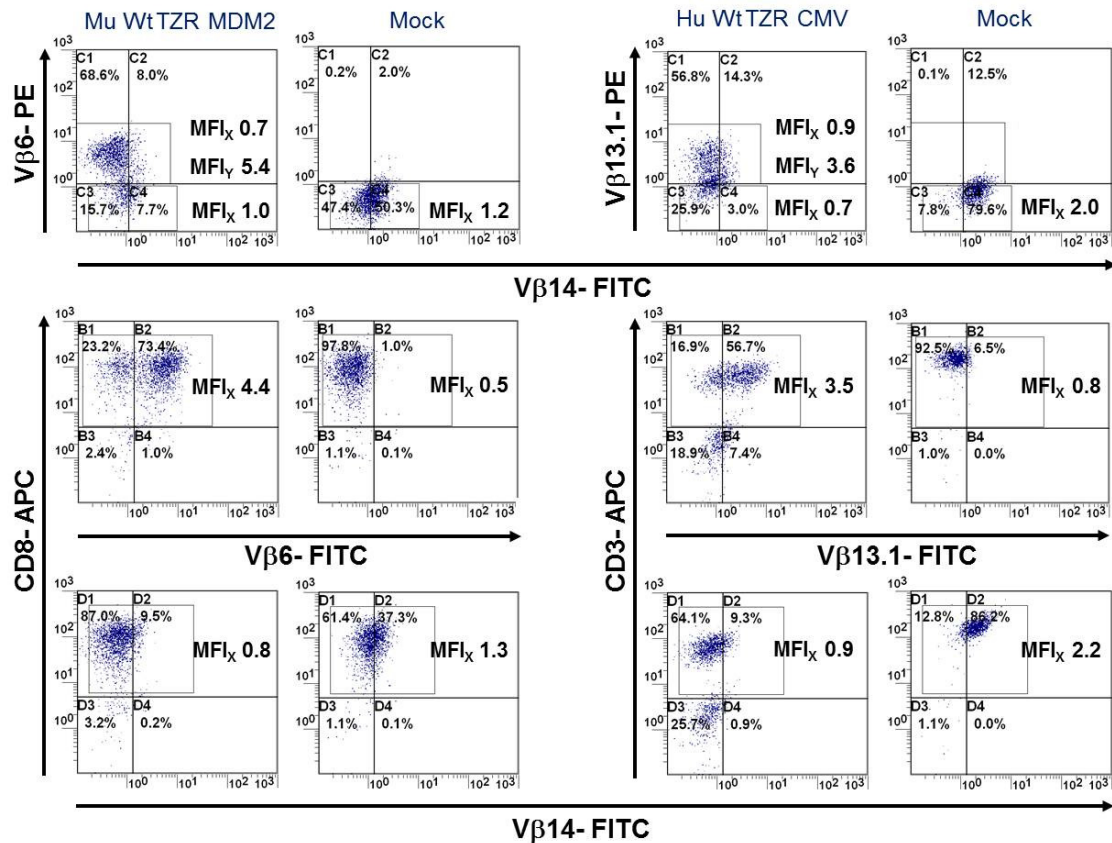


Abbildung 24: Retrovirale Transduktion des Tyrosinase₃₆₈₋₃₇₆-spezifischen T-Zellklons mit einem MDM2₈₁₋₈₈-Tumorantigen- oder pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR

FACS-Analyse der retroviral transduzierten Tyrosinase₃₆₈₋₃₇₆-spezifischen T-Zellklone im Hinblick auf die Expression der endogenen (Vβ14) und exogenen (Mu Wt TZR MDM2: Vβ6; Hu Wt TZR CMV: Vβ13.1) TZRβ Ketten. Es zeigten sich in einem sehr geringen Maße Zellen mit der Expression beider TZRβ Ketten (Vβ14/Vβ6- bzw. Vβ14/Vβ13.1-doppelpositiv). Insgesamt schien die endogene TZRβ Kette weniger kompetitiv zu sein und wurde von der Zelloberfläche durch die exogene TZRβ Kette verdrängt.

(Hu Wt TZR CMV) der V β 13.1 Subfamilie an. Es wurden sowohl auf die endogene (V β 14) als auch auf die exogenen (V β 6 oder V β 13.1) TZR β Ketten Ko-Färbungen sowie Färbungen auf die endogene oder exogene TZR β Kette zusammen mit der CD8 / CD3 Expression durchgeführt (Abbildung 24). An der Zelloberfläche der transduzierten humanen T-Zellen konnten vorzugsweise die exogenen TZR β Ketten detektiert werden. Im Vergleich zu der Mock Kontrolle war die Expression der endogenen TZR β -V β 14-Kette nur noch schwach nachweisbar. Folglich löste die retrovirale Transduktion eines zweiten TZR eine kompetitive Bedingung zwischen den endogenen und exogenen TZR α und - β Ketten der T-Zellen aus. Die exogenen TZR β Ketten waren konkurrenzfähiger und konnten sich gegenüber den endogenen TZR β Ketten in der Expression durchsetzen. Dies führte zu der Verdrängung der endogenen TZR β Kette von der Zelloberfläche. Die Analysen basierten auf subfamilienspezifische V β -Nachweismethoden, so dass kein direkter Rückschluss auf die Spezifität des exprimierten TZR möglich war. Somit konnte nicht festgestellt werden, ob der exogene MDM2₈₁₋₈₈ / pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR oder ein hybrider TZR bestehend aus der endogenen TZR α und der exogenen TZR β Kette an der Zelloberfläche exprimiert wurde. In der Ko-Färbung mit den Antikörpern gegen die Expression der endogenen (V β 14) und exogenen (V β 6 / V β 13.1) TZR β Kette, konnten geringfügige doppelpositive Zellen detektiert werden. Der endogene TZR erschien als ein relativ schwacher Kompetitor, da unabhängig der TZR Spezifität des exogenen TZR eine Verdrängung erfolgte und das Resultat zwischen Mu Wt TZR MDM2 und Hu Wt TZR CMV vergleichbar war. Die Verwendung des Tyrosinase₃₆₈₋₃₇₆-spezifischen T-Zellklons führte zu keiner erfolgreichen Generierung von bi-spezifischen humanen T-Zellen. Jedoch zeigte sich, dass in Folge der Modifikation der Zellen durch die Ausstattung mit einem zweiten TZR, Kompetitionen zwischen den endogenen und exogenen TZR α und - β Ketten entstanden. Es konnten keine Funktionsanalysen durchgeführt werden, da die transduzierten Zellen rasch apoptotisch wurden und nicht genügend expandiert werden konnten. Möglicherweise, könnte dies mit der Runterregulation des endogenen TZR zusammenhängen, da die Tyrosinase₃₆₈₋₃₇₆-spezifischen T-Zellen über Feederzellen stimuliert werden, welche den endogenen TZR ansprechen.

4.3.2 Generierung von p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen und pp65₄₉₅₋₅₀₃-bi-spezifischen T-Zellen mittels dem RNS-Transfer sowie retroviralem Gentransfer

Die hier aufgeführten Ergebnisse repräsentierten die Verwendung von isolierten CMV-pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen für den TZR Transfer. Es wurden pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T-Zellen aus HCMV-seropositiven Donoren gewonnen und auf eine möglichst 100-prozentige Reinheit expandiert. Anschließend erfolgte der TZR Transfer mit einem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR. Für die T-Zell-/Immuntherapie war es von essentieller Bedeutung, ob pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T-Zellen in p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen und CMV-pp65₄₉₅₋₅₀₃-bi-spezifische T-Effektorzellen umprogrammiert werden können. Die Grundlage war hierbei, dass der Knochenmarkspender sowie der Empfänger einen HCMV positiven Status besitzen.

4.3.2.1 Generierung von pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen aus HCMV-seropositiven Donoren

Es wurden PBMZ aus HCMV-seropositiven Blutproben gewonnen. Anschließend erfolgte die Isolation der CD8⁺ T-Zellen aus der Gesamtpopulation mittels der CD8 positiven, magnetischen Aufreinigung. Zur Generierung von pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen aus der polyspezifischen Kultur, wurden die Zellen entweder im LDA („*Limiting Dilution Assay*“) Verfahren oder als polyklonale Kultur mit pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidbeladenen Zellen stimuliert. Unter dem LDA Verfahren versteht man das verdünnte Aussäen einer polyklonalen Kultur in mehrere 96-Kavitäten Platten. Das Ziel ist, aus einer polyklonalen Kultur eine Oligoklonalität sowie Monoklonalität zu erreichen. Das Verfahren ist im Vergleich zur pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen Restimulation (3.10, 3.13) zeitaufwändiger, da zum einen über 2 Wochen das LDA Verfahren durchgeführt wird und zum anderen sich daran die Expansion einer ausreichenden Menge an pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen anschließt. Das pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Restimulationsverfahren hat das Ziel in kürzester Zeit eine effiziente Expansion an pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen zu erreichen, unabhängig des klonalen Status. Mittels dem LDA Verfahren konnten nach 10 bis 14 Tagen, eine 99 % reine CD8⁺ pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T-Zellkultur gewonnen werden (Abbildung 25). Die dargestellten Zellen stammten aus der 125 Zellen / Kavität–Verdünnung einer

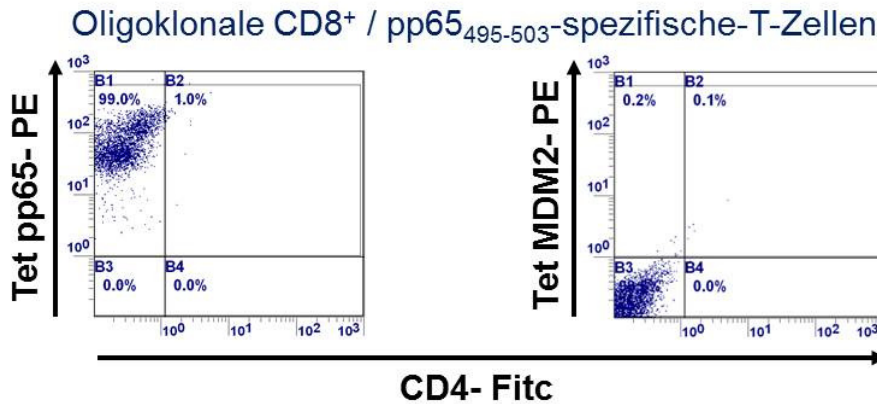


Abbildung 25: Generierung von oligoklonalen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen mittels dem LDA Verfahren

Die pp65-spezifische Tetramerfärbung zeigte eine 99,0-prozentige CD8⁺ / pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T-Zellkultur. Es wurden die Zellen, welche zu 125 Zellen pro Kavität einer 96-Kavitäten Platte ausgesät waren, dargestellt.

96-Kavitäten Platte. Aufgrund der Verdünnungsschritte wurde von einer oligoklonalen Kultur ausgegangen. Im Folgenden wurden die selbstgenerierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen im ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstest auf ihre pp65₄₉₅₋₅₀₃-Spezifität untersucht. Das E (CD8⁺ / Tet pp65⁺): T (T2 Zellen) Verhältnis wurde auf 2:1 eingestellt. Es zeigte sich eine hohe TZR Spezifität gegenüber dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-Peptid mit einem EC₅₀-Wert von 0,5 nM (Abbildung 26). Gegenüber dem irrelevanten MDM2₈₁₋₈₈-spezifischen Peptid konnte keine unspezifische Lyse der Zielzellen verzeichnet werden. Der Vorteil eines LDA Verfahrens bestand in der gezielten Generierung von oligoklonalen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen. Durch die Verdünnungsschritte beim Aussäen der CD8⁺ T-Zellen in eine 96-Kavitäten Platte sollte die Limitierung des TZR-Repertoires erfolgen. Ein weiteres Verfahren zur Generierung von pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen bestand in der pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen Stimulierung einer polyspezifischen sowie polyklonalen CD8⁺ T-Zellkultur. Zuerst wurde analysiert, welcher prozentuale Anteil sich an pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen T-Zellen aus den isolierten PBMZ der HCMV⁺ Donoren detektieren ließ. Es wurden Ko-Färbungen auf die CD8 und pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR-Expression durchgeführt (Abbildung 27). Die Donoren 4227 und 4106 wurden

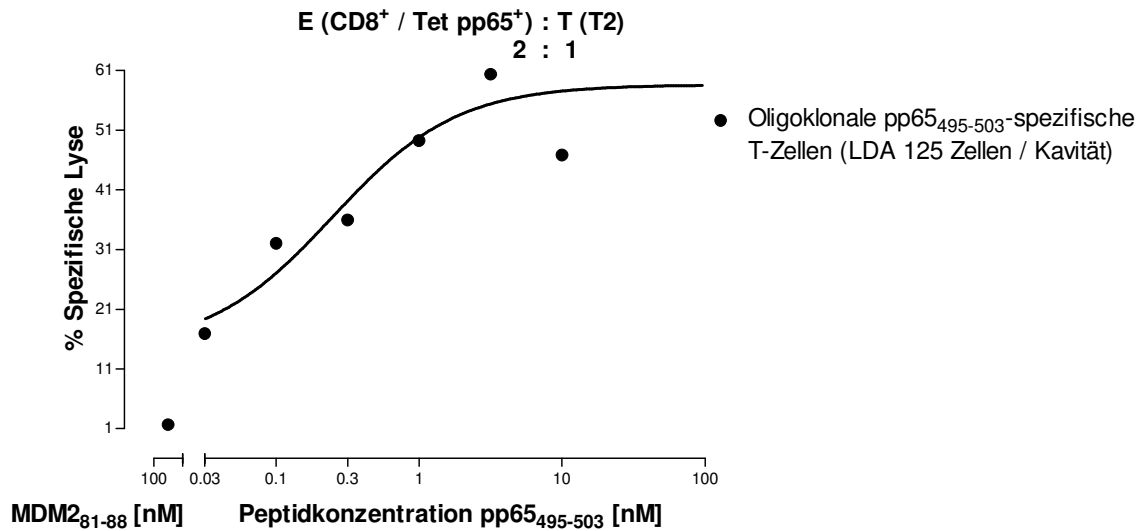


Abbildung 26: Spezifische Lyse von pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidbeladenen T2-Zellen als Zielzellen durch die selbstgenerierten oligoklonalen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen

Der ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstest zeigte die effiziente Lyse von pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidbeladenen T2-Zellen durch die selbstgenerierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen (LDA 125 Zellen / Kavität einer 96-Kavitäten Platte). Es konnte ein EC₅₀-Wert von 0,5 nM bestimmt werden.

vor der CD8 magnetischen Aufreinigung analysiert. Es ließen sich keine pp65-Tetramer-positiven Zellen detektieren. Die Donoren 8089, 8038 und 8106 wurden nach der CD8 Isolation getestet. Es konnten zwischen 3 und 5 % an pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Der Reinheitsgrad der CD8 positiven Aufreinigung lag zwischen 94 und 98,6 Prozent. Die Nachweisgrenze an pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen CD8⁺ T-Zellen im Blut von HCMV-seropositiven Spendern war sehr gering. Interessanterweise konnte bereits nach einer pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen Stimulierung eine erfolgreiche Akkumulation von pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen erreicht werden (Abbildung 28). Bei dem Donor 4227 konnte bereits nach Ende der 1. Stimulierung, d.h. Tag 10 nach Zugabe der pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidbeladenen autologen CD8⁺ Zellen, eine Expansion von 76,3 % an pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen erzielt werden. Auch der Donor 4165 zeigte eine effiziente Akkumulation von 55,2 % an pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen. Folglich führte die pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifische Stimulation zu einer effizienten Expansion an

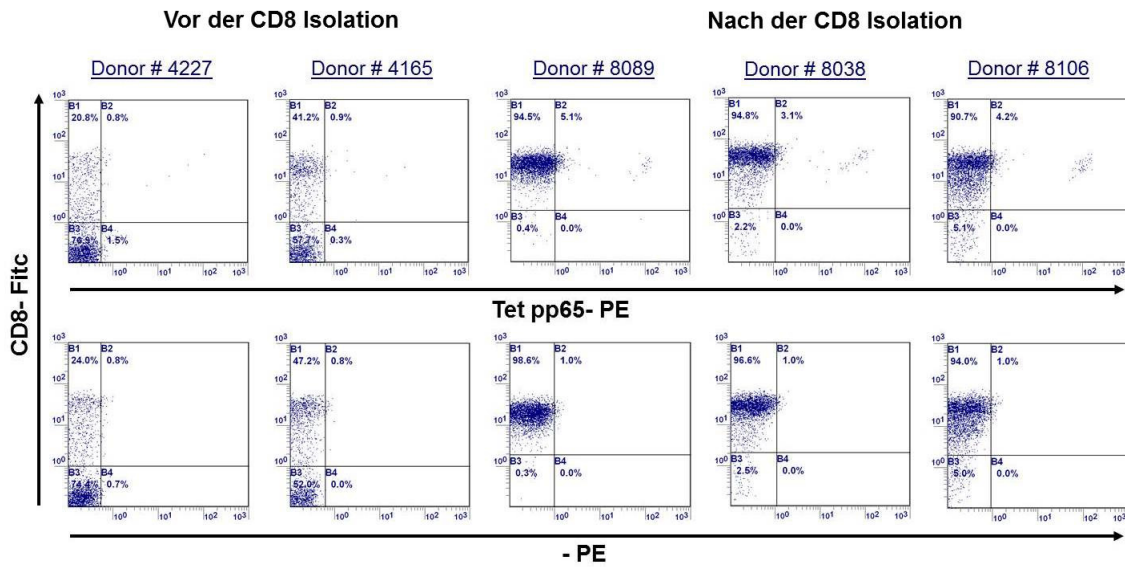


Abbildung 27: Prozentualer Anteil an CD8⁺ pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen T-Zellen in HCMV-seropositiven Donoren

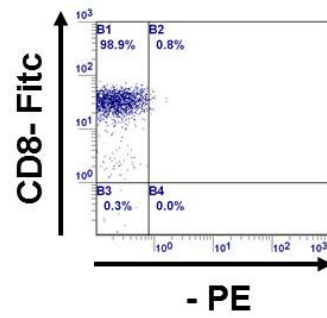
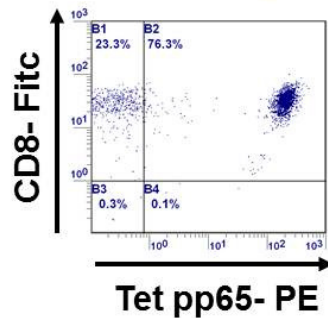
Die Nachweisgrenze zur Detektion von pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen der isolierten Zellsuspension von HCMV⁺ Donoren lag bei den nicht CD8 angereicherten T-Zellen unter 1 Prozent. Ein prozentualer Anteil zwischen 3 und 5 % ließ sich bei den magnetisch aufgereinigten CD8⁺ T-Zellen detektieren. Die Effizienz der CD8 positiven Aufreinigung lag zwischen 94 und 98,6 Prozent.

pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen. Zum Erreichen eines höheren Reinheitsgrades wurde zusätzlich eine Zellsortierung durchgeführt (Abbildung 29). Zuerst durchliefen die T-Zellen einen pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen Stimulationszyklus, so dass eine ausreichende Ausgangsmenge an pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen für die Zellsortierung vorhanden war. Die Zellen wurden mit dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Tetramer sowie mit einem CD8 Antikörper angefärbt und nach Doppelpositivität sortiert. Für die Zellsortierung wurden zwischen 25 und 69,9 Prozent an pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen T-Zellen eingesetzt. Der Erfolg der Generierung von pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen, nach bereits einem pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen Stimulationszyklus, war vom jeweiligen Donor abhängig. Die Effizienz der Zellsortierung lag zwischen 91,3 und 97,7 Prozent. Anschließend wurden die Zellen auf ein Maximum expandiert. Von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. X (Neudorfer et al. 2007) wurde freundlicherweise ein CMV-pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischer T-

Donor # 4227

1. Restimulationszyklus mit pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidbeladenen autologen CD8⁻ Zellen

Kontrollfärbung



Donor # 4165

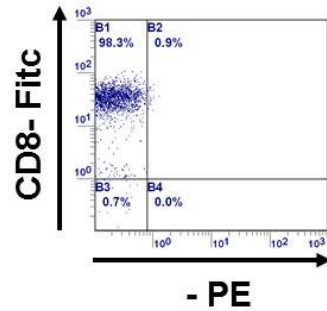
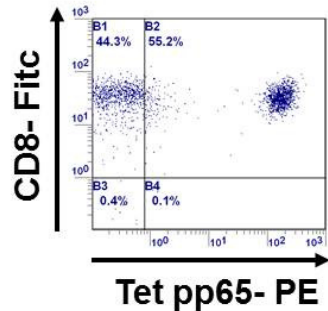


Abbildung 28: Effiziente Expansion von pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen T-Zellen nach einem Restimulationszyklus

Exemplarisch wurden die HCMV⁺ Donoren 4227 und 4165 aufgeführt. Es zeigte sich die effiziente Expansion von CMV-pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen nach bereits einer pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen Stimulierung mit autologen CD8⁻ Zellen.

Zellklon zur Verfügung gestellt (Abbildung 30). Die Zellen exprimierten zu 100 % den endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR sowie den Korezeptor CD8. Der Donor 8106 zeigte eine hohe Ansprechbarkeit auf das pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifische Restimulationverfahren, so dass eine nahezu 100 prozentige Reinheit gewonnen werden konnte. Folglich konnte auf eine Zellsortierung verzichtet werden. Die Durchführung der peptidspezifischen Stimulierung sowie der ggf. zusätzlichen Zellsortierung resultierte in der effizienten Generierung von pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen T-Zellen. Die selbstgenerierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen wurden in einem ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstest hinsichtlich ihrer pp65₄₉₅₋₅₀₃-Spezifität analysiert. Exemplarisch wurden die Donoren 5889, 6021 sowie der T21 T-Zellklon aufgeführt (Abbildung 31). Es wurden K562-A2 als Zielzellen mit definierten

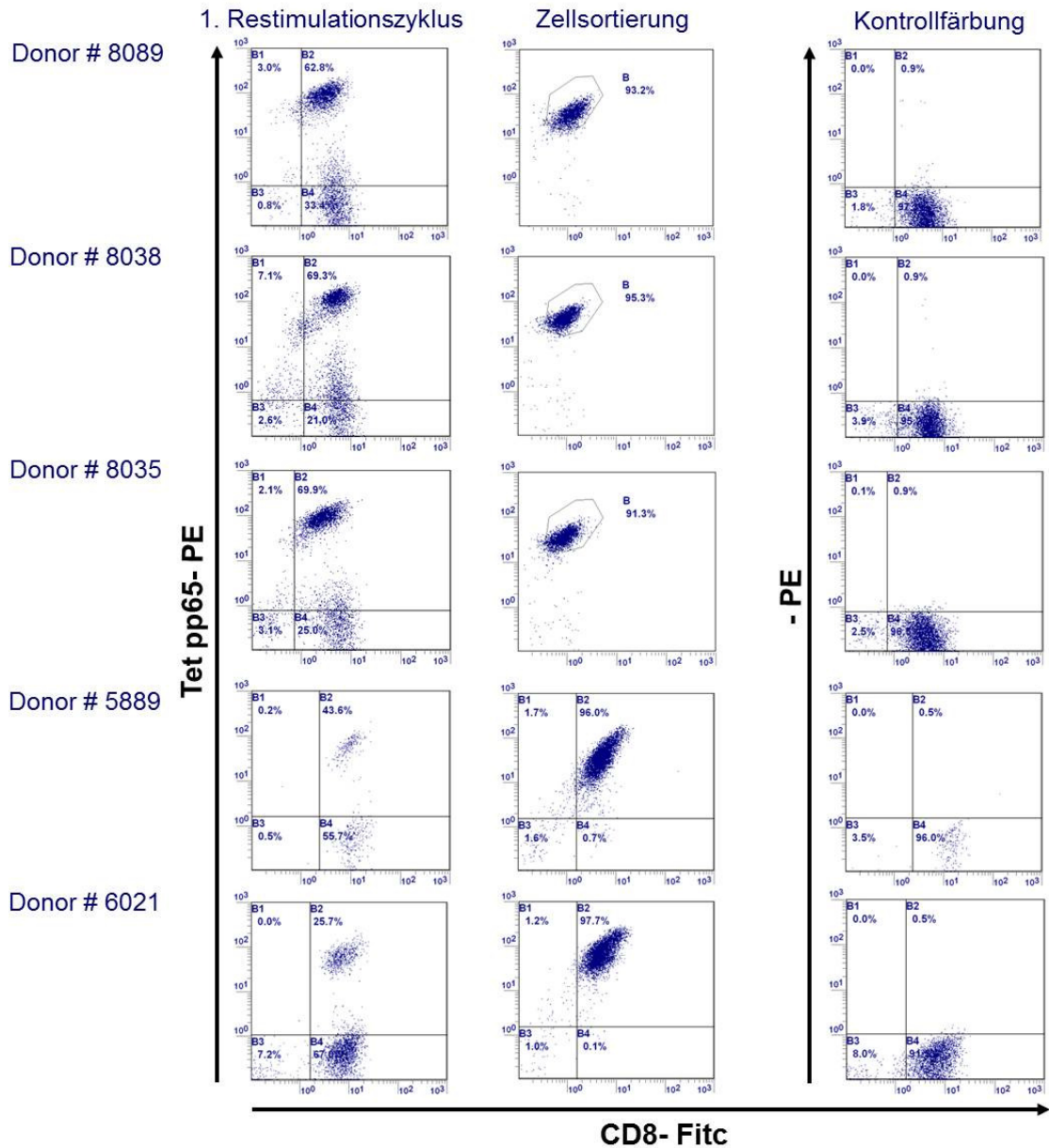


Abbildung 29: Restimulierung und Zellsortierung der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen

Nach einem Restimulationszyklus konnten zwischen 25 bis 69,9 % an pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen aus einer anfangs polyspezifischen T-Zellkultur gewonnen werden. Zur Erhöhung des Reinheitsgrades erfolgte eine Zellsortierung auf CD8 / Tet pp65 doppelpositive T-Zellen. Hierdurch wurde eine Reinheit zwischen 91,3 und 97,7 % erzielt.

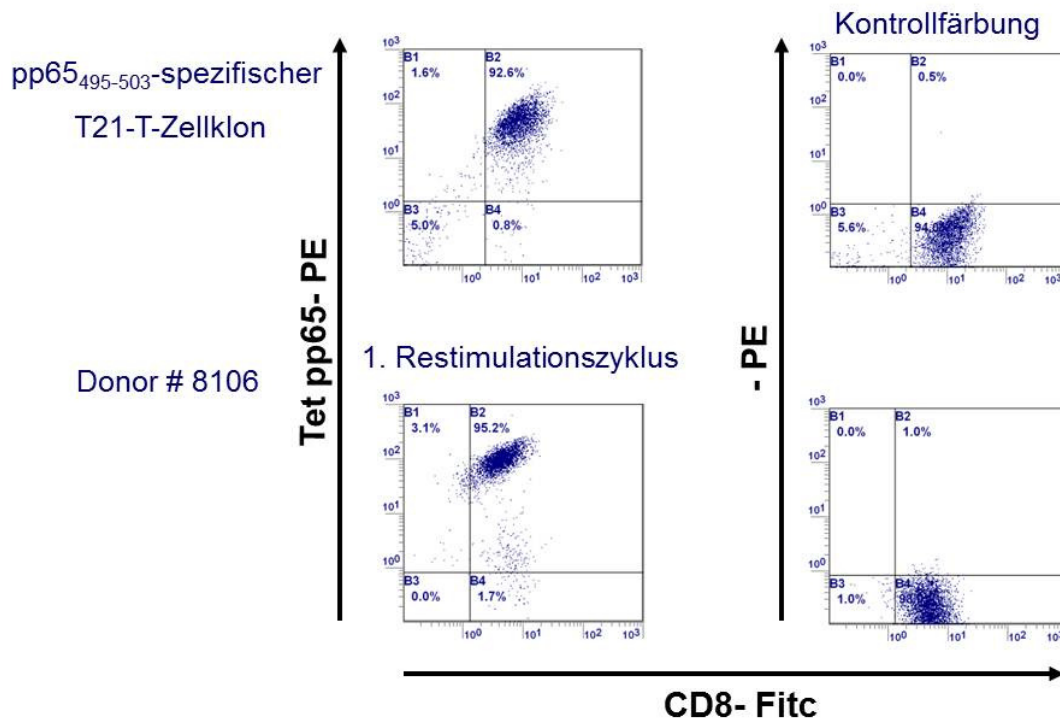


Abbildung 30: Expression des CMV-pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR des T21 T-Zellklons sowie des HCMV⁺ Donors 8106

Der pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifische T21 T-Zellklon zeigte die Expression des TZR sowie des CD8 Korezeptors. Der Donor 8106 wies eine hohe Ansprechbarkeit auf das pp65₄₉₅₋₅₀₃-Peptid auf, so dass bereits nach einer Restimulierung mit dem entsprechenden pp65₄₉₅₋₅₀₃-Peptid eine Generierung von 95,2 % pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischer T-Zellen erfolgen konnte.

Konzentrationen von 10^{-7} bis 10^{-10} M an pp65₄₉₅₋₅₀₃-Peptid beladen. Die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen zeigten im Nanomolaren-Bereich eine hohe Spezifität gegenüber dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-Peptid. Das irrelevante MDM2₈₁₋₈₈-spezifische Peptid wurde nicht erkannt. Folglich konnten pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifische T-Zellen mit einer hohen TZR-Avidität für das entsprechende pp65₄₉₅₋₅₀₃-Peptid generiert werden. Der T21 T-Zellklon wies bis in den Nanomolaren-Bereich und vor allem bei sehr geringen E:T Verhältnissen (2:1, 0,7:1) die höchste Lyseeigenschaft auf. Der Donor 5889 zeigte ebenfalls eine hohe Spezifität gegenüber dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-Peptid. Bei niedrigen E:T Verhältnissen, d.h. ab einem E:T von 2:1, nahm der Kurvenverlauf ab. Folglich war die Erkennung der pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidbeladenen Zielzellen und deren spezifische Lyse im Vergleich zum T21 T-Zellklon geringer. Der Donor 6021 zeigte

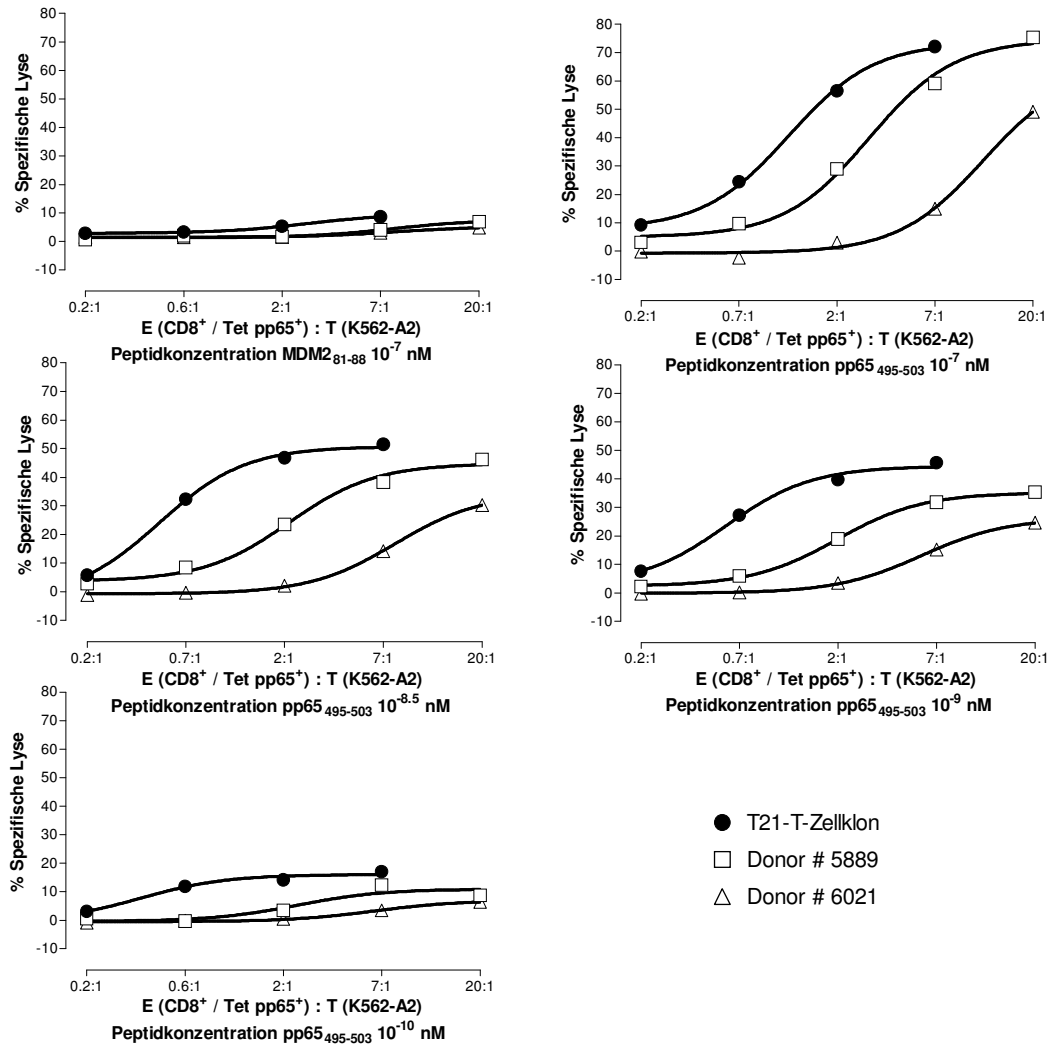


Abbildung 31: ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstest der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen

Die selbstgenerierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen zeigten eine hohe Spezifität gegenüber dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-Peptid. Der T21 T-Zellklon lysierte mit der höchsten Spezifität, die mit definierten Konzentrationen an pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidbeladenen K562-A2 Zielzellen. Die HCMV Donoren 5889 und 6021 wiesen ebenfalls effiziente Lyseeigenschaften auf, wenn auch geringer bei niedrig gewählten E:T Verhältnissen.

zwar im Vergleich zum Donor 5889 und T21 T-Zellklon die schwächste Lyseeigenschaft, jedoch konnte in hohen E:T Verhältnissen (20:1, 7:1) eine spezifische Erkennung und Lyse der Zielzellen beobachtet werden. Bei einem E:T Verhältnis von 7:1 konnte gerade noch eine spezifische Lyse von 10 % verzeichnet werden. Die Zielzellen, welche das irrelevante MDM2₈₁₋₈₈-spezifische Peptid an der Zelloberfläche präsentierten, wurden durch die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen nicht erkannt und nicht unspezifisch lysiert. Es ließen sich effizient pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T-Zellen generieren, die höchste Spezifität gegenüber dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-Peptid aufwiesen. Im Folgenden wurde die Erkennung von endogenem prozessiertem pp65₄₉₅₋₅₀₃-Peptid untersucht. Bei einer exogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-Peptidbeladung von Zielzellen mit definierten Konzentrationen wird keine reale Situation, wie es sich mit einer

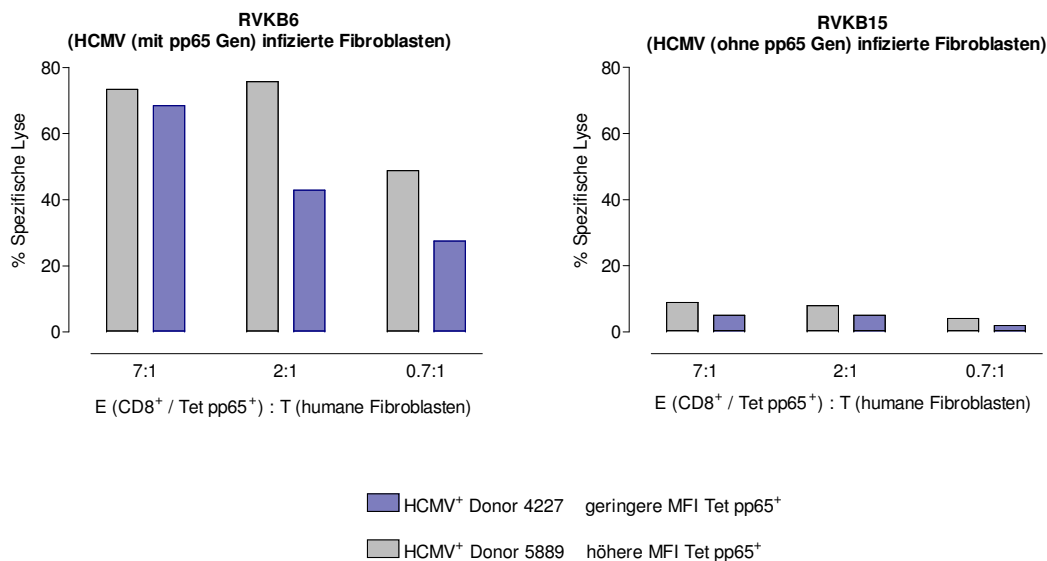


Abbildung 32: Spezifische Lyse der chromierten HCMV-infizierten humanen Fibroblasten durch die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen der Donoren 4227 und 5889

Die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen der HCMV⁺ Donoren 4227 und 5889 zeigten eine effektive pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Erkennung der HCMV-infizierten Fibroblasten. Die TZR-Expression (MFI) des Donors 5889 war geringfügig höher als die des Donors 4227. Diese Differenz spiegelte sich in der unterschiedlichen Effektivität der Lyse der Fibroblasten wider. Eine Alloreaktivität gegenüber HCMV (ohne pp65-Gen)-infizierten Fibroblasten konnte nicht detektiert werden.

endogenen Prozessierung eines Peptides und dessen Präsentation über den MHC I-Komplex an der Zelloberfläche verhalten würde, widergespiegelt. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. X wurden aus humanen Vorhautzellen generierte Fibroblasten mit dem Zytomegalievirus infiziert. Es fanden zwei Virusformen Verwendung, zum einen wurde ein Virus verwendet, welches das *pp65*-Gen enthielt, und zum anderen ein Kontroll-Virus, in welchem das Gen deletiert war. Es zeigte sich eine effektive *pp65*₄₉₅₋₅₀₃-abhängige Erkennung und Lyse der humanen Fibroblasten, welche mit dem *pp65*-Gen-tragenden Zytomegalievirus infiziert wurden (Abbildung 32). Eine Alloreaktivität gegenüber Fibroblasten, die ohne das *pp65*-Gen mit dem Virus infiziert waren, konnte nicht detektiert werden. Die HCMV⁺ Donoren unterschieden sich geringfügig hinsichtlich ihrer spezifischen Erkennung und Lyse der HCMV (mit *pp65*-Gen)-infizierten Fibroblasten. Jedoch konnte dieser Unterschied auf die abweichenden MFI Tet *pp65*⁺-Werte zurückgeführt werden. Von besonderer Bedeutung war es, dass die selbstgenerierten *pp65*₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen T-Zellen nicht nur in der Lage waren *pp65*₄₉₅₋₅₀₃-peptidbeladene Zielzellen zu erkennen, sondern vor allem Spezifität gegenüber endogen prozessiertem *pp65*₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Peptid aufwiesen und effektiv die HCMV (mit *pp65*-Gen)-infizierten Fibroblasten lysierten.

4.3.2.2 Analyse der Subfamilien des TZR-Repertoires der *pp65*₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen T-Zellkultur

Es wurde die Subfamilien Zugehörigkeit des TZR-Repertoires der HCMV⁺ Donoren 8106, 8038 und 4227 nach 4 bis 5 *pp65*₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen Stimulationen (polyklonales Restimulationsverfahren) überprüft. Hierbei wurde analysiert, ob sich bestimmte Subfamilien vorzugsweise akkumulierten. Auch erfolgte die Analyse im Hinblick auf Poly-, Oligo- und Monoklonalität. Die Ergebnisse der FACS-Analyse wurden tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 7). Bei dem HCMV⁺ Donor 8106 konnten die dominanten Subfamilien V β 13.1 und V β 12 nachgewiesen werden. In einem geringeren Anteil akkumulierten sich die Subfamilien V β 5.1 und V β 2. Das TZR-Repertoire des Donors 8038 setzte sich aus den drei Subfamilien V β 8, V β 13.1 und V β 13.2, mit dem höchsten prozentualen Anteil von 46,2 %, zusammen. Während die HCMV⁺ Donoren 8106 und 8038 eine Oligoklonalität aufwiesen, handelte es sich

HCMV ⁺ Donor	TZR V β -Repertoire	
8106	Vβ 13.1	42,7%
	V β 12	40,7%
	V β 5.1	11,3%
	Vβ 2	5,3%
8038	V β 8	30,2%
	Vβ 13.1	23,6%
	Vβ 13.2	46,2%
4227	Vβ 13.1	92,9%
	Vβ 13.2	1,7%
	V β 1	3,5%
	Vβ 2	1,9%

Tabelle 7: Analyse der V β Subfamilien Zugehörigkeit der isolierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen aus den HCMV⁺ Donoren 8106, 8038 und 4227

Die Donoren 8106 und 8038 zeigten eine Oligoklonalität, mit der V β 13.1 als dominante Subfamilie. Der HCMV⁺ Donor 4227 entwickelte sich zunehmend in Richtung einer V β 13.1 Monoklonalität. Die V β Subfamilien, welche in allen Donoren vorkamen, wurden hervorgehoben dargestellt.

bei dem HCMV⁺ Donor 4227 um eine nahezu bestehende Monoklonalität. Mit einem prozentualen Anteil von 92,9 % der Subfamilie V β 13.1 erschienen lediglich mit einem gesamten Anteil von 7,1 % die Subfamilien V β 13.2, V β 1 und V β 2, welche nach großer Wahrscheinlichkeit im Laufe weiterer pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischer Restimulierungen nicht mehr nachweisbar gewesen wären. Bei Vergleich der Donoren zeigte sich im TZR-Repertoire stets die Subfamilie V β 13.1, welche eine dominante Rolle signifierte. Spekulativ könnte die Frage aufgeworfen werden, ob im Zuge der Restimulierung mit dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-Peptid bestimmte T-Zellen mit einer

entsprechenden V β -Familie effizienter auf das pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Peptid ansprechen, möglicherweise eine höhere Affinität aufweisen und aus einer polyklonalen Kultur dominant herauswachsen.

4.3.2.3 Umprogrammierung der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen zu p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen- und pp65₄₉₅₋₅₀₃-bi-spezifischen T-Effektorzellen mittels dem RNS Transfer

Die selbstgenerierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen wurden unter Verwendung des RNS Transfers mit einem zweiten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR ausgestattet. Hierbei wurde ein p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidspezifischer Doppelketten-TZR eines 2-Plasmide-retroviralen Vektorsystems verwendet. Die aus dem LDA generierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen vom Format 125 Zellen / Kavität einer 96-Kavitäten Platte wurden expandiert und mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Doppelketten-TZR elektroporiert. An den Tagen 2, 5 und 6 nach RNS Transfer, wurden die Zellen mit dem pp65-spezifischen Tetramer sowie mit einem V β 3 Antikörper gegen die exogene TZR β Subfamilie gefärbt. Hinzukommend erfolgte an den Tagen 5 und 6 zur Detektion des exogenen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Doppelketten-TZR eine p53-spezifische Tetramerfärbung (Abbildung 33). In einem geringen Maße konnten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T-Zellen generiert werden, welche sowohl den endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR als auch die exogene TZR β Kette (V β 3 Detektion) an der Zelloberfläche exprimierten. Von Tag 2 bis 6 zeigte sich die Abnahme der V β 3 Expression, was auf die Zellteilung der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen und der damit einhergehenden Verdünnung und Degradation der RNS in den Zellen zurückzuführen war (persönliches Gespräch mit Frau Dr. X. Interessanterweise zeigte sich mit der Abnahme der V β 3 Expression die Hochregulation des endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR. Der Nachweis der exogenen TZR β Kette (V β 3) an der Zelloberfläche der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen könnte zum einen auf der Expression des exogenen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR oder zum anderen auf einen hybriden TZR bestehend aus der endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen TZR α Kette und der exogenen TZR β Kette basieren. Aus diesem Grund wurde an den Tagen 5 und 6 eine p53-spezifische Tetramerfärbung durchgeführt. Sogar nach einer bereits

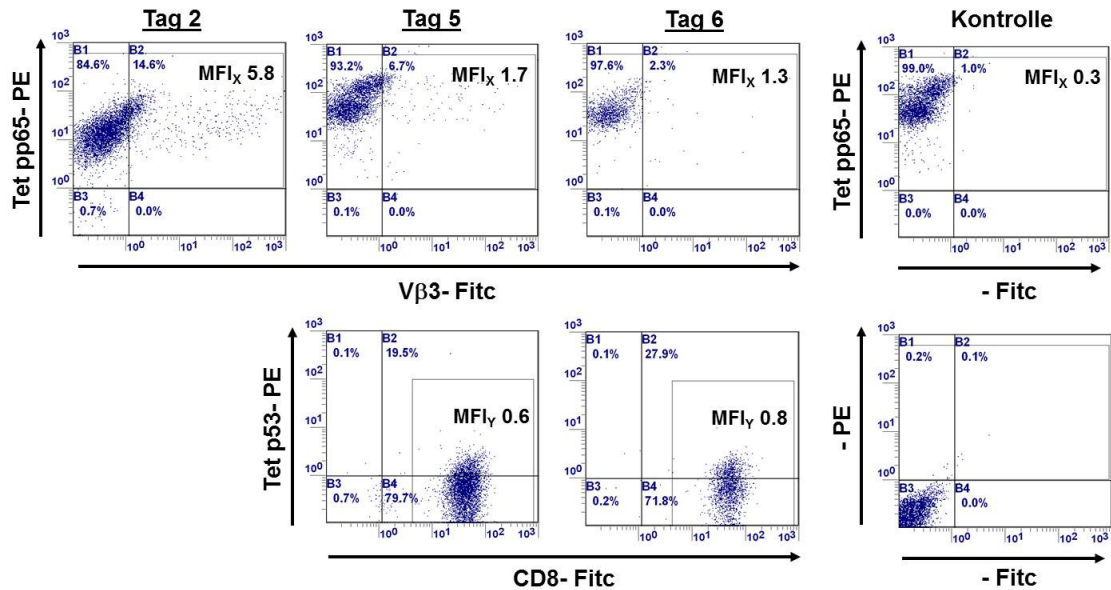


Abbildung 33: RNS Transfer eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR in pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T-Zellen

An den Tagen 2, 5 und 6 wurden Ko-Färbungen gegen den endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR sowie die exogene TZRβ Kette (Vβ3) durchgeführt. Zur detaillierten Analyse der Expression des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR erfolgten an den Tagen 5 und 6 p53-spezifische Tetramerfärbungen.

eingetretenen Limitierung der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR-RNS in den Zellen, konnte der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische TZR an der Zelloberfläche detektiert werden. Es konnten keine pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen, die nur Vβ3 positiv waren, d.h. nur die exogene TZRβ Kette exprimierten, nachgewiesen werden. Folglich konnte die p53-spezifische Tetramerfärbung auf die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen, welche neben dem endogenen TZR auch den exogenen p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen TZR exprimierten, bezogen werden. Im Weiteren erfolgte die Analyse der dualen Spezifität gegenüber den p53₂₆₄₋₂₇₂- und pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Peptiden. Hierfür wurde an dem Tag 6 nach RNS Transfer ein Interferon-γ Elisa durchgeführt (Abbildung 34). Das E:T Verhältnis wurde auf die Expression des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen eingestellt. Als Kontrolle wurden pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T-Zellen, welche mit GFP

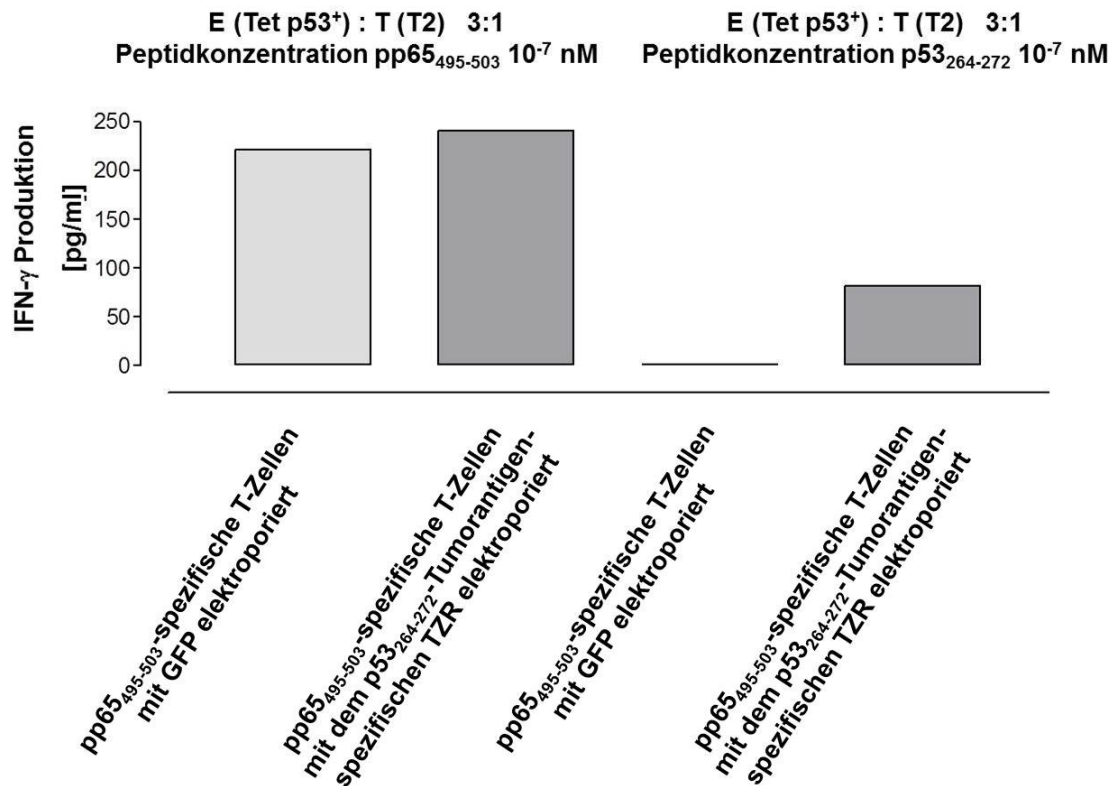


Abbildung 34: Analyse der dualen Spezifität der pp65₄₉₅₋₅₀₃- und p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen T-Zellen an Tag 6 nach dem RNS Transfer

Als Kontrolle wurden pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T-Zellen verwendet, welche mit GFP elektroporiert waren, und folglich lediglich nach einer pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen Stimulation IFN- γ sekretierten. Trotz Tag 6 nach dem RNS Transfer zeigten die pp65₄₉₅₋₅₀₃- und p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-bi-spezifischen T-Zellen eine effiziente IFN- γ Produktion sowohl nach einer pp65₄₉₅₋₅₀₃- als auch p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen Peptidstimulierung.

elektroporiert waren, eingesetzt (FACS-Daten nicht gezeigt). Die Kontrollzellen zeigten erwartungsgemäß eine pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifische Interferon- γ Freisetzung. Die p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen- und pp65₄₉₅₋₅₀₃-bi-spezifischen T-Zellen sekretierten effizient IFN- γ nach einer pp65₄₉₅₋₅₀₃- als auch p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidspezifischen Stimulierung. Das freigesetzte IFN- γ nach einer pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen Stimulierung war von der Konzentration her vergleichbar mit der Produktion an IFN- γ der Kontrollzellen (pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T-Zellen mit GFP elektroporiert). Trotz der

Limitierung der RNS und der geringeren Expression des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR war die duale Spezifität der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen nachweisbar.

4.3.2.4 Retrovirale Transduktion der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen mit einem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR

Der Hauptfokus in der Generierung von pp65₄₉₅₋₅₀₃- und p53₂₆₄₋₂₇₂-bi-spezifischen T-Zellen lag auf der retroviralen Transduktion. Es wurden mehrere pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Donoren mittels dem retroviralem Gentransfer mit einem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR ausgestattet. Als Repräsentant wurde der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Donor 8106 dargestellt. Für den retroviralen Gentransfer wurde ein p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischer Doppelketten- sowie Einzelketten-TZR verwendet. Essentiell war es, dass es sich bei den retroviralen Vektoren um ein 1-Plasmid-retrovirales System inklusive dem F2A-Element handelte. Auf diesem 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystem waren alle notwendigen Komponenten für die Expression des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR vorhanden. Der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische TZR war ein muriner TZR. Hinzukommend war der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische TZR als Doppelketten- sowie als Einzelketten-TZR-Konstrukt Kodon-optimiert und enthielt die künstliche Disulfidbrücke in den konstanten Domänen (Kuball et al. 2007). Somit spiegelte die Mu TZR β Färbung die Expression der exogenen TZR β Kette wider. Vor der Selektion mit der entsprechenden Antibiotikaresistenz exprimierten die meisten der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen den endogenen TZR (Abbildung 35). Bei der Transduktion mit dem Doppelketten-TZR (Mu Wt dc coTZR p53) konnten 16,9 % an Zellen detektiert werden, welche sowohl den endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR als auch die exogene p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische TZR β Kette exprimierten. Die Verwendung des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR (Mu Wt sc coTZR p53) führte mit 12,3 % zu doppelpositiven pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen. Nach der Selektion zeigte sich bei den pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen, welche mit dem Mu Wt dc coTZR p53 ausgestattet waren, zu 3,6 % die Expression des endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR, 41,5 % waren doppelpositiv für Tet pp65 sowie Mu TZR β und 48,7 % exprimierten nur die exogene TZR β Kette. Bei den retroviral transduzierten T-Zellen, welche mit dem Mu Wt sc coTZR p53 ausgestattet

Donor # 8106

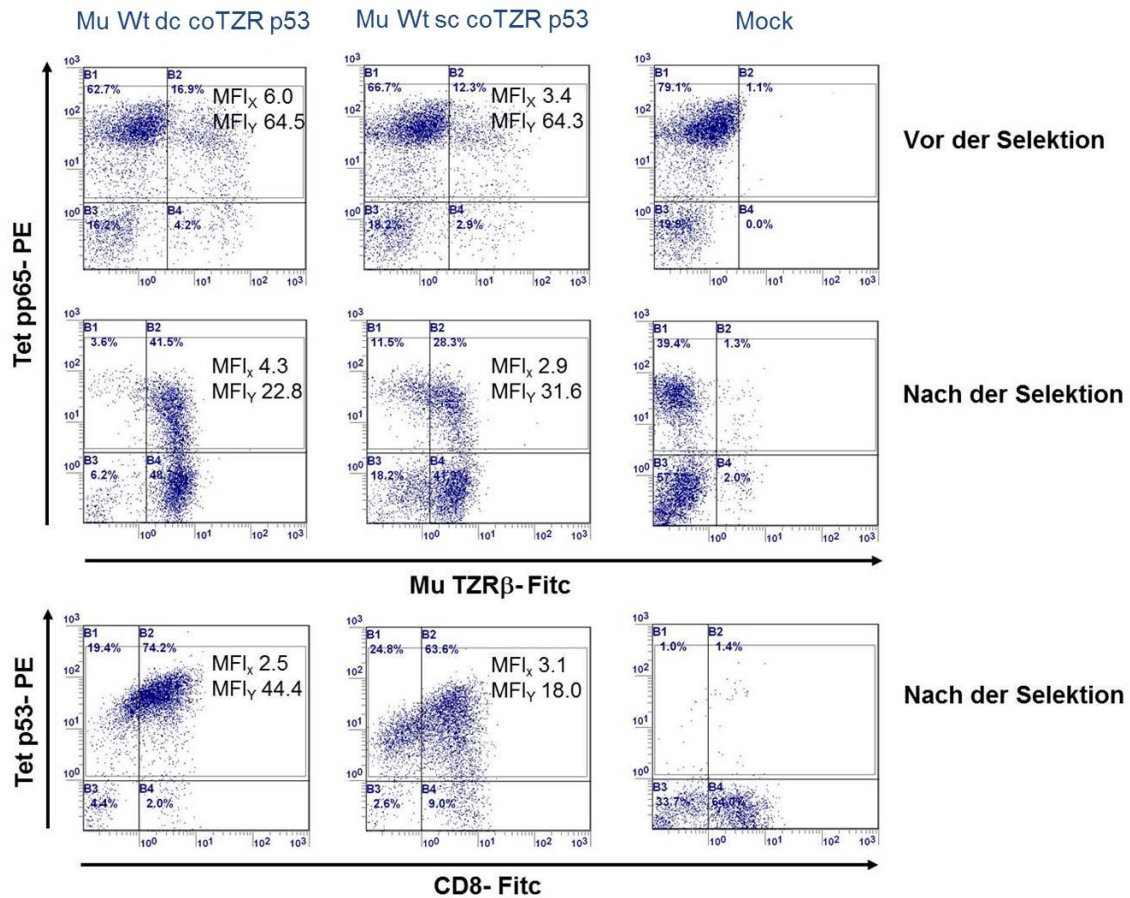


Abbildung 35: Retroviraler TZR Gentransfer eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR in die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen des Donor 8106

Es wurden Ko-Färbungen mit dem pp65-spezifischen Tetramer und einem Antikörper gegen die exogene murine TZRβ Kette (Mu TZRβ) durchgeführt. Es konnten doppelpositive T-Zellen detektiert werden, die den endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR sowie die exogene TZRβ Kette exprimierten. In der Analyse der p53-Tetramerpositivität wurden sowohl die doppelpositiven als auch singlepositiven T-Zellen für den exogenen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR angefärbt. Es ließen sich kaum pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T-Zellen detektieren, welche lediglich den endogenen TZR exprimierten.

wurden, konnten 28,3 % an doppelpositiven pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen detektiert werden. Hinzukommend exprimierten 11,5 % den endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR und 42 % die exogene TZRβ Kette. Bei Vergleich zwischen dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Doppelketten- und Einzelketten-TZR wurde

deutlich, dass bei dem Einzelketten-TZR weniger Zellen generiert wurden, welche nur die exogene TZR β Kette exprimierten. Jedoch zeigte sich auch bei den pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen, welche mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR transduziert waren, dass sich T-Zellen akkumulierten, welche den TZR runterregulierten (18,2 %). Im Vergleich zu den pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen, welche mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Doppelketten-TZR transduziert waren, zeigte sich dies lediglich zu 6,2 %. Die Akkumulation von negativen T-Zellen für den pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR konnte auch in der Mock Kontrolle beobachtet werden. Die Mehrzahl der Zellen war doppelpositiv oder einzelpositiv für den endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR. Auch ließ sich ein höherer MFI γ -Wert (31,6) aufzeigen, welcher die stärkere Expression des endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR und die damit stärkere Kompetitionskraft gegenüber dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR signalisierte. Der geringere MFI χ -Wert von 2,9 im Gegensatz zu 4,3 bei dem Doppelketten-TZR spiegelte sich in dem gebogenen Kurvenverlauf wider, was einer höheren Konkurrenz entsprach. Des Weiteren grenzte sich die doppelpositive Wolke, der mit dem Einzelketten-TZR transduzierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen, deutlich von der singlepositiven ab. Zur Analyse der Expression des exogenen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR wurden p53-spezifische Tetramerfärbungen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die transduzierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen größtenteils positiv für das p53-spezifische Tetramer waren. Jedoch konnte bei dieser Analyse nicht zwischen den pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen, welche den endogenen als auch den exogenen TZR oder lediglich den p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR exprimierten unterschieden werden. Von essentieller Bedeutung war es, dass sich kaum Zellen detektieren ließen, die lediglich für den Korezeptor CD8 positiv waren, d.h. pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T-Zellen, welche nur den endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR oder einen hybriden TZR, bestehend aus den exogenen und endogenen TZR α und - β Ketten (Verlust der Tet p53-Spezifität), exprimierten. Folglich waren in der Mu TZR β Färbung die p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen- und pp65₄₉₅₋₅₀₃-bi-spezifischen T-Zellen inbegriffen. Die Mu TZR β Expression spiegelte nicht die Expression eines hybriden TZR, d.h. die Fehlpaarung der endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR α Kette mit der exogenen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR β Kette, wider, sondern die Expression des vollständigen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR. Die mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-

Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR transduzierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen zeigten eine höherer Expression des endogenen TZR sowie der exogenen TZRβ Kette (MFI_γ 31,6) im Vergleich zu den pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen, die mit dem Doppelketten-TZR transduziert wurden (MFI_γ 22,8). Zusammenfassend konnten mittels der retroviralen Transduktion p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen- und pp65₄₉₅₋₅₀₃-bi-spezifische T-Zellen generiert werden. Im Folgenden wurde die duale Spezifität der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen- und pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen analysiert. Hierfür erfolgte die Durchführung einer intrazellulären IFN-γ Zytokinfärbung. Die T-Zellen wurden mit dem pp65-spezifischen Tetramer sowie mit dem Mu TZRβ Antikörper angefärbt (Abbildung 36). Wiederum ließen sich Zellen detektieren, die den endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR und die exogene p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische TZRβ (E) oder lediglich die exogene TZRβ Kette (G) exprimierten. Im Weiteren wurde nun gezielt auf die Interferon-γ Sekretion der doppelpositiven T-Zellen (E) nach einer pp65₄₉₅₋₅₀₃- oder p53₂₆₄₋₂₇₂- bzw. irrelevanten MDM2₈₁₋₈₈-peptidspezifischen Stimulation untersucht (Abbildung 37). Es zeigte sich gegenüber

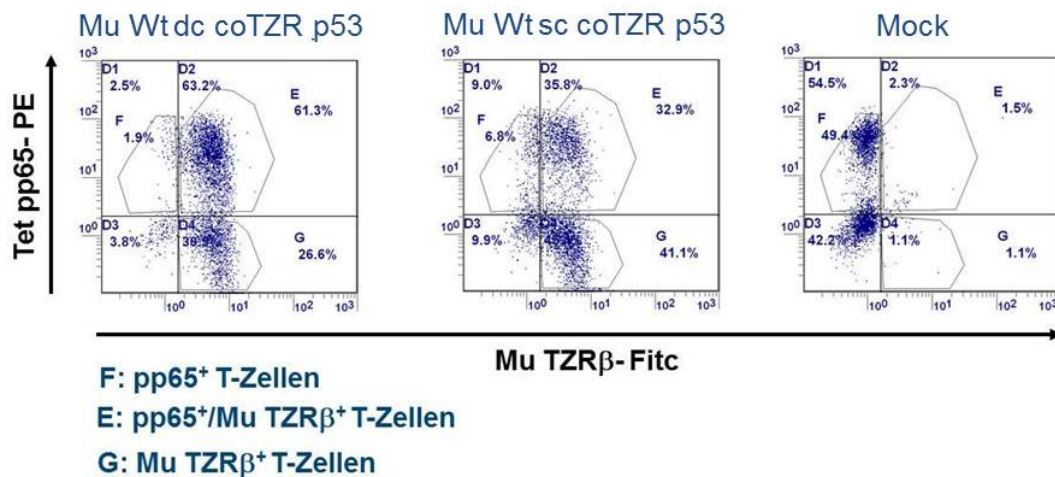


Abbildung 36: Darlegung der Zellpopulationen und der Strategie für die Auswertung der intrazellulären IFN-γ Zytokinfärbung

Es konnten T-Zellen detektiert werden, die lediglich den endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR (F), den endogenen TZR und die exogenen TZRβ Kette (E) sowie lediglich die exogene TZRβ Kette exprimierten (G). Für die Darlegung der dualen Spezifität der T-Zellen wurde in der Abbildung 37 der Bezug auf die Tet pp65⁺ / Mu TZRβ⁺ T-Zellen (E) gerichtet.

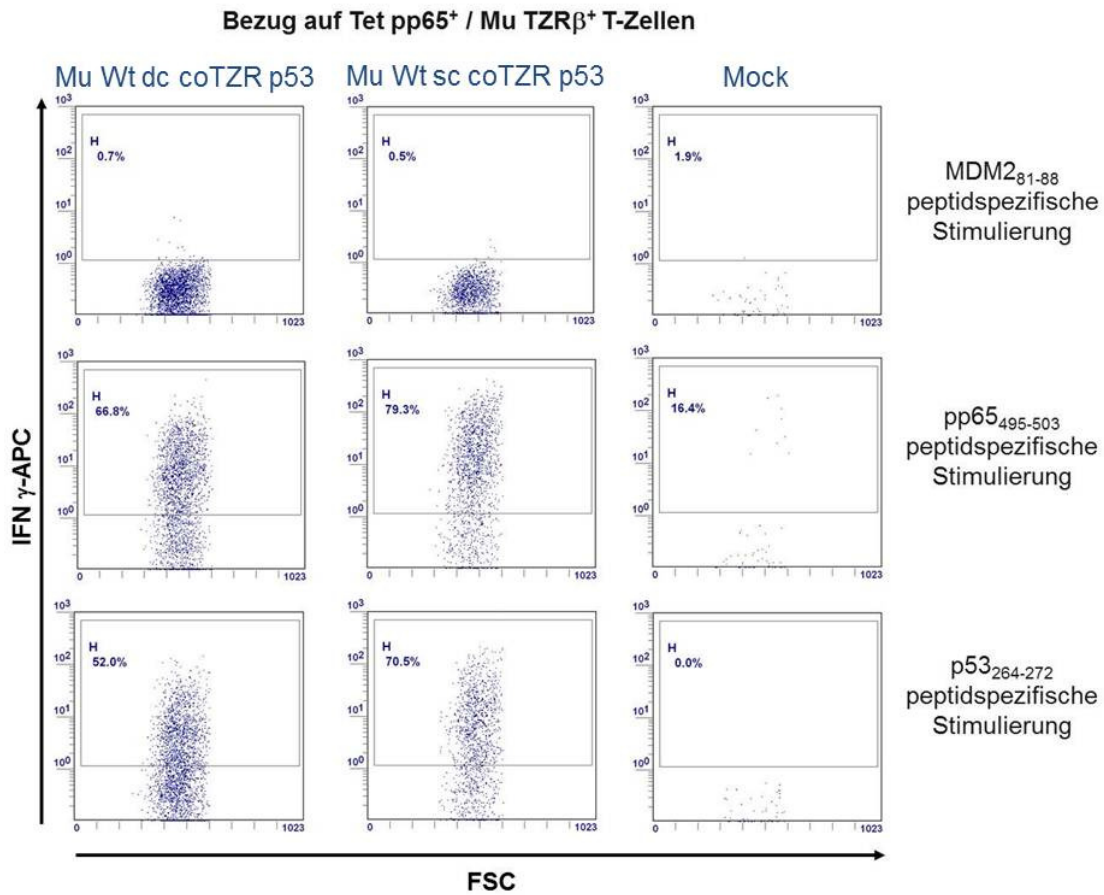


Abbildung 37: Intrazelluläre IFN- γ Zytokinfärbung der pp65₄₉₅₋₅₀₃⁻ und p53₂₆₄₋₂₇₂⁻-Tumorantigen-spezifischen T-Zellen

Die T-Zellen wurden mit MDM2₈₁₋₈₈⁻, pp65₄₉₅₋₅₀₃⁻ und p53₂₆₄₋₂₇₂⁻peptidbeladenen T2-Zellen als Zielzellen für 5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Tet pp65⁺ sowie Mu TZRβ⁺ T-Zellen (Eingrenzung E) zeigten eine spezifische IFN- γ Sekretion nach einer pp65₄₉₅₋₅₀₃⁻ sowie p53₂₆₄₋₂₇₂⁻peptidspezifischen Stimulation (Eingrenzung H). Gegenüber dem irrelevanten MDM2₈₁₋₈₈⁻Peptid konnte keine IFN- γ Freisetzung detektiert werden.

dem irrelevanten MDM2₈₁₋₈₈⁻-spezifischen Peptid keine unspezifische IFN- γ Sekretion. Interessanterweise sekretierten die doppelpositiven T-Zellen sowohl nach einer pp65₄₉₅₋₅₀₃⁻ als auch nach einer p53₂₆₄₋₂₇₂⁻peptidspezifischen Stimulierung IFN- γ . Die höheren MFI γ -Werte (31,6) und somit die höhere Expression des endogenen TZR und der exogenen TZRβ Kette bei den pp65₄₉₅₋₅₀₃⁻-spezifischen T-Zellen, die mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂⁻-spezifischen Einzelketten-TZR transduziert wurden, spiegeln sich auch in

einer effizienteren IFN- γ Sekretion wider. Es konnten effizient pp65₄₉₅₋₅₀₃⁻ und p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-bi-spezifische T-Zellen generiert werden. Auch wurde die IFN- γ Sekretion der Einzelpositivität gegenüber Mu TZR β (G) bzw. Tet pp65⁺ (F) analysiert (Daten nicht gezeigt). Bei den Mu TZR β ⁺ T-Zellen zeigte sich nach einer p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidspezifischen Stimulierung eine IFN- γ Freisetzung. In einem geringen Maße konnte auch nach einer pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen Stimulierung eine IFN- γ Sekretion detektiert werden, wobei dies mit Vorbehalt zu betrachten war. Aufgrund von T-Zellen die zwischen schwacher Doppel- und Einzelpositivität liegen könnten, aber vom Ergebnis her in die Einzelpositiven strahlten, würden diese nach einer pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen Stimulation IFN- γ sekretieren. Bei der Kontrolle Mock, d.h. pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T-Zellen, die mit dem pBullet-Leervektor transduziert wurden, konnte nach einer pp65₄₉₅₋₅₀₃ peptidspezifischen Stimulierung eine effiziente IFN- γ Sekretion nachgewiesen werden. Hinzukommend zeigte sich auch eine IFN- γ Sekretion der Tet pp65-einzelpositiven T-Zellen (F), die mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Doppelketten- oder Einzelketten-TZR transduziert waren, nach einer pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen Stimulation (Daten nicht aufgeführt). In der Abbildung 37 wurde auf die doppelpositiven T-Zellen Bezug genommen, welche erwartungsgemäß bei der Mock Kontrolle (E) nicht vorhanden waren, da Mock lediglich einzelpositiv für den endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR (Tet pp65⁺, F) war. Als Fazit zeigte sich, dass der retrovirale TZR-Gentransfer mit einem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Doppelketten- oder Einzelketten-TZR zu pp65₄₉₅₋₅₀₃⁻ und p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-bi-spezifischen T- Effektorzellen führte.

4.3.2.5 Retrovirale Transduktion eines pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T21 T-Zellklons mit einem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR

Der pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifische T21 T-Zellklon wurde mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR modifiziert. Der TZR war auf einem retroviralem Vektor inklusive dem F2A-Element kloniert (1-Plasmid-retrovirales Vektorsystem). Die T-Zellen wurden hinsichtlich ihrer pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen TZR und Mu TZR β Expression (exogene TZR β Kette) analysiert (Abbildung 38). Die Kontrolle Mock entsprach der endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR-Expression, da diese T21 T-Zellen mit dem pBullet-Leervektor retroviral transduziert wurden.

Nach der retroviralen Transduktion zeigte sich eine Abnahme der MFI, d.h. eine geringfügige Herunterregulation des endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR, sowie eine Verschiebung der Wolke Richtung Mu TZRβ Expression. Zu 35,1 % ließen sich pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T-Zellen mit zusätzlicher Expression der exogenen TZRβ Kette nachweisen. Der größte prozentuale Anteil von 63,4 % der T-Zellen exprimierte lediglich den endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen TZR oder zeigte eine schwache Doppelpositivität. Im Vergleich zum Donor 8106 (Abbildung 35) zeigte sich, dass der T21 T-Zellklon einen kompetitiv stärkeren, endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR aufwies. Dies zeigte sich, indem sich keine T-Zellen detektieren ließen, die einzelpositiv für die exogene, murine p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische TZRβ Kette waren. Hinzukommend zeigte sich lediglich eine leichte Verschiebung der Tet pp65 Einzelpositivität (63,4 %) Richtung der Tet pp65 / Mu TZRβ Doppelpositivität (35,1). Folglich zeigte sich keine vollständige Abgrenzung der Zellpopulationen. Von der Expression der exogenen TZRβ Kette konnte nicht auf eine duale Spezifität geschlossen werden, da es sich hierbei auch um einen hybriden TZR bestehend aus der endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen TZRα und der exogenen p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidspezifischen TZRβ Kette handeln könnte.

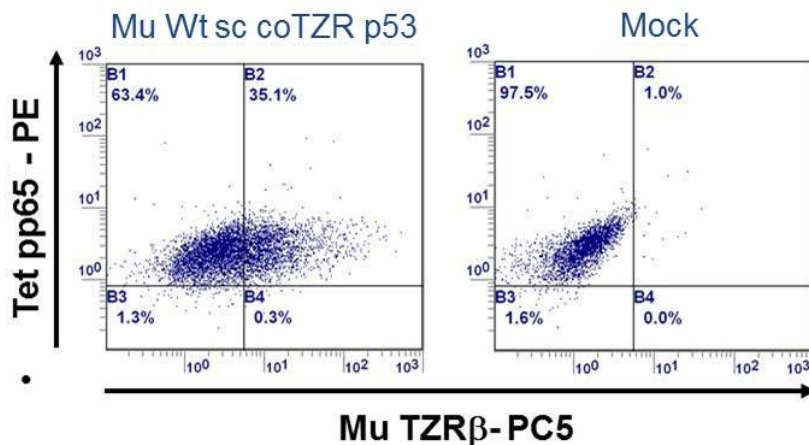


Abbildung 38: Retrovirale Transduktion des T21 T-Zellklons mit einem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR

Die Expression der exogenen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZRβ Kette führte zu einer geringfügigen Herunterregulierung des endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR. 35,1 % der T-Zellen exprimierten neben dem endogenen TZR auch die exogene TZRβ Kette.

4.3.2.6 Simultane retrovirale Transduktion eines pp65₄₉₅₋₅₀₃- und p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR in HCMV-negative T-Zellen

Es wurden PBMZ aus HCMV-negativen Donoren gewonnen und gleichzeitig mit einem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen- und einem pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR mittels retroviralem TZR Gentransfer ausgestattet. Die Grundlage war, dass der Knochenmarkspender HCMV negativ und der Empfänger HCMV positiv wären. Das Ziel dieser Methode bestand in einer effizienten Inhibition einer HCMV-Reaktivierung, mit gleichzeitig gezieltem anti-tumoralen Effekt im immunsupprimierten Knochenmarkempfänger. Es wurden hierfür ein pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischer Doppelketten- und ein p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischer Doppelketten- oder Einzelketten-TZR verwendet. Die pp65₄₉₅₋₅₀₃- sowie p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidspezifischen TZR-Konstrukte waren zwecks Optimierung in den konstanten Domänen murinisiert (Cohen et al. 2006; Voss et al. 2006; Bialer et al. 2010; Sommermeyer et al. 2010). Hinzukommend handelte es sich um ein 1-Plasmid-retrovirales Vektorsystem. Der verfügbare pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifische Einzelketten-TZR wurde nicht verwendet, da erst infolge mehrerer pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischer Stimulationszyklen eine TZR-Expression erzielt werden konnte (Kapitel 4.2.3). Im Folgenden wurden humane HCMV-negative, HLA-A2-positive T-Zellen mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten- sowie dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten-TZR transduziert (Abbildung 39). Als Kontrolle erfolgte die Transduktion von humanen HCMV-negativen T-Zellen mit den einzelnen TZR. Der murine p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR wurde in den humanen T-Zellen weitaus besser exprimiert (80,5 %) als der pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifische Doppelketten-TZR (16,9 %). Von besonderer Bedeutung war die effiziente Generierung von T-Zellen mit zwei definierten TZR an der Zelloberfläche. Ein Anteil an 31,9 % der transduzierten T-Zellen exprimierten den pp65₄₉₅₋₅₀₃- sowie den p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidspezifischen TZR (Tet pp65⁺ / Tet p53⁺). Es zeigte sich, dass der murine p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR stärker kompetitiv war als der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Doppelketten-TZR. Die transduzierten T-Zellen exprimierten entweder beide TZR oder den murinen p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidspezifischen TZR. Der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Doppelketten-TZR konnte sich nicht gegenüber dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR durchsetzen. Es ließ sich lediglich ein Anteil von 3,7 % der Zellen detektieren, die den pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten-TZR einzeln exprimierten. Zur Analyse der dualen Spezifität der Zellen wurde eine

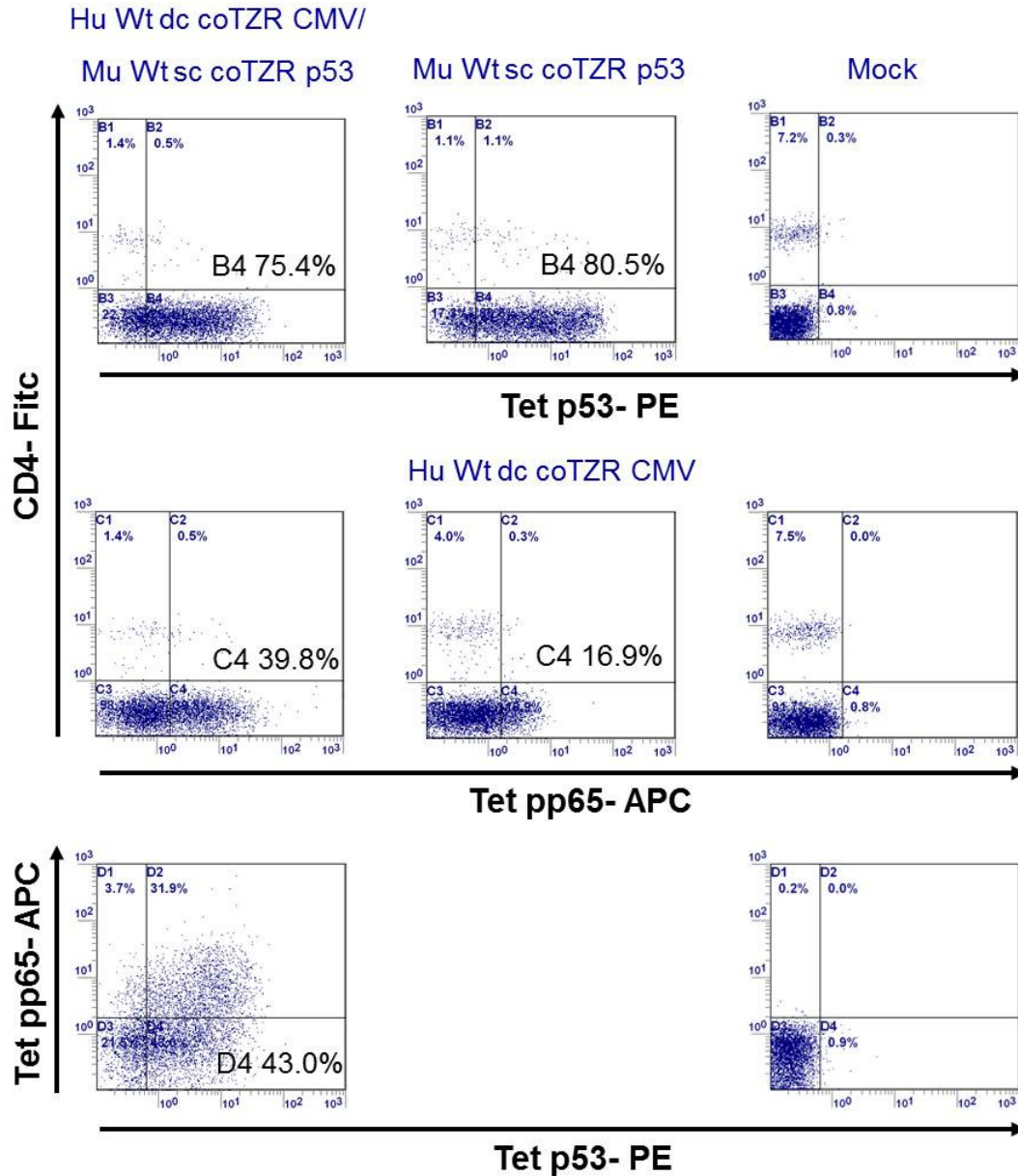


Abbildung 39: Simultane retrovirale Transduktion eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten und eines pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten-TZR in humane HCMV-negative, HLA-A2-positive T-Zellen

Es wurden HCMV-negative humane T-Zellen mit zwei TZR Spezifitäten ausgestattet. Es zeigte sich die Ko-Expression eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen und eines pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR (31,9 %) an der Zelloberfläche der transduzierten humanen T-Zellen.

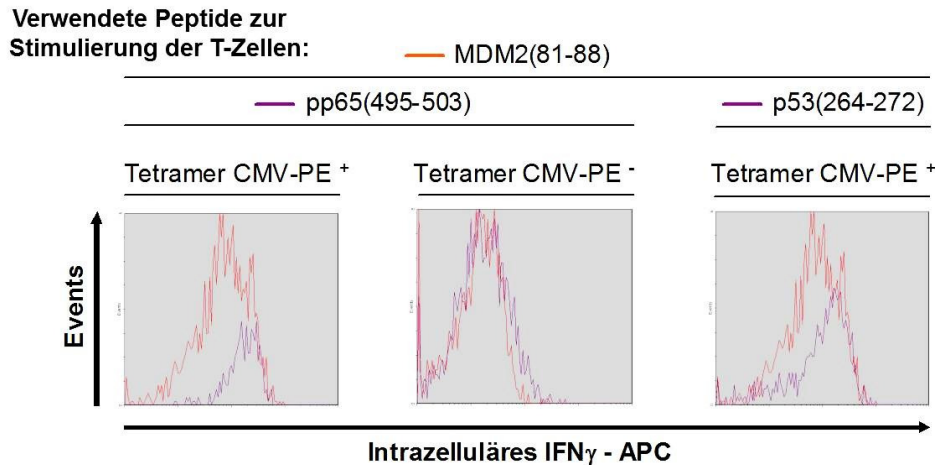


Abbildung 40: Intrazelluläre IFN- γ Färbung zur Analyse der dualen Spezifität der simultan transduzierten T-Zellen

Der rotfarbene Kurvenverlauf entsprach der Kontrolle, d.h. die irrelevante MDM2₈₁₋₈₈-spezifische Peptidstimulation der bi-spezifischen T-Zellen. Es zeigte sich keine unspezifische IFN- γ Sekretion. Sowohl nach einer pp65₄₉₅₋₅₀₃⁻ als auch nach einer p53₂₆₄₋₂₇₂⁻peptidspezifischen Stimulierung konnte eine Verschiebung des lilafarbenen Kurvenverlaufs dargelegt werden. Diese Verschiebung der Kurve signalisierte die intrazelluläre IFN- γ Freisetzung.

intrazelluläre IFN- γ Zytokinfärbung durchgeführt (Abbildung 40). Die Färbung konnte mit dem pp65-spezifischen Tetramer erfolgen, da die Expression des pp65₄₉₅₋₅₀₃⁻-spezifischen TZR der simultanen Expression des p53₂₆₄₋₂₇₂⁻-Tumorantigen-spezifischen TZR entsprach (Abbildung 39, Tet pp65⁺ /Tet p53⁺ T-Zellen). Der rotfarbene Kurvenverlauf zeigte die Tet pp65⁺ T-Zellen (Kontrolle), welche mit dem irrelevanten MDM2₈₁₋₈₈-spezifischen Peptid stimuliert wurden und zu keiner unspezifischen IFN- γ Sekretion führten. Nach einer pp65₄₉₅₋₅₀₃⁻peptidspezifischen Stimulierung zeigte sich eine Verschiebung des lilafarbenen Kurvenverlaufs, was einer spezifischen INF- γ Produktion entsprach. Gleiches war nach einer p53₂₆₄₋₂₇₂⁻peptidspezifischen Stimulierung zu beobachten. Folglich konnte eine duale Spezifität der T-Zellen nachgewiesen werden, welche Tet pp65-positiv waren, d.h. unter der Berücksichtigung der FACS-Analyse folglich auch eine Tet p53-Positivität aufzeigten (Abbildung 39). Darauffolgend wurden für die simultane retrovirale Transfektion zwei Doppelketten-TZR eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems verwendet. Als

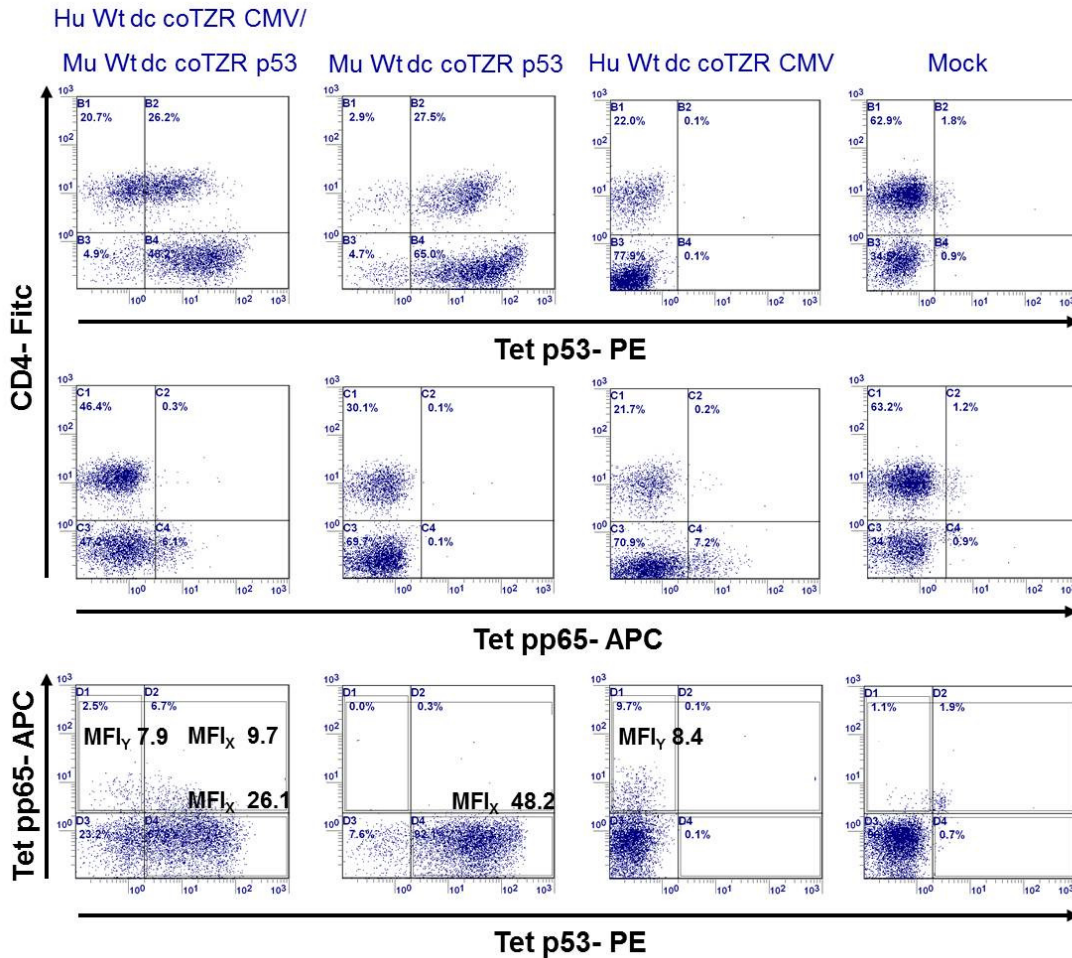


Abbildung 41: FACS-Analyse der simultan transduzierten HCMV-negativen T-Zellen

Die simultane retrovirale Transduktion mit einem p53₂₆₄₋₂₇₂⁻ und einem pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten-TZR eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems führte zu lediglich 6,7 % an bi-spezifischen T-Zellen. Der murine p53₂₆₄₋₂₇₂⁻-Tumorantigen-spezifische Doppelketten-TZR wurde weitaus besser an der Zelloberfläche exprimiert als der partiell murinisierte pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Doppelketten-TZR.

Kontrollen dienten Mock und die Transduktion der einzelnen Doppelketten-TZR (Abbildung 41). Anhand von Tetramer-Färbungen zeigte sich eine effiziente Expression der Doppelketten-TZR an der Zelloberfläche der transduzierten humanen T-Zellen. Der p53₂₆₄₋₂₇₂⁻ sowie der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Doppelketten-TZR wurden sowohl von den CD4⁺ als auch von den CD8⁺ T-Zellen exprimiert. Somit waren die TZR von den Korezeptoren CD8 und CD4 unabhängig. Es zeigte sich wiederum eine

verbesserte Expression des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR im Vergleich zu dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR. Die FACS-Analyse der simultan transduzierten T-Zellen zeigte mit 67,6 % p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische T-Zellen. Mit 6,7 % konnten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen- und pp65₄₉₅₋₅₀₃-bi-spezifische T-Zellen generiert werden. Auch ließen sich 2,5 % an Zellen detektieren, die den pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR exprimierten. Der partiell murinisierte pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Doppelketten-TZR konnte mit einem murinen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Doppelketten-TZR nicht effektiv um die Expression an der Zelloberfläche konkurrieren und wurde letztlich verdrängt. In Folge der fehlenden dualen Spezifität, wurden keine Funktionsanalysen angefertigt.

4.3.2.7 Analyse der Expression von endogenen TZR der simultan transduzierten humanen T-Zellen

Im Folgenden wurde untersucht, ob die simultane retrovirale Transduktion mit einem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR und einem pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten-TZR zu einer Herunterregulation des endogenen TZR führte. Der für die retrovirale Transfektion verwendete p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR war ein muriner Volllängen-TZR. Bei dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten-TZR handelte es sich um ein chimerisiertes, in den C-Domänen murinisiertes TZR-Konstrukt (partielle Murinisierung). Die Murinisierung in den konstanten Domänen sollte die Interaktion der exogenen TZR α und TZR β Kette sowie deren Expression an der Zelloberfläche begünstigen. Folglich war das Ziel eine Fehlinteraktion mit endogen humanen TZR α und - β Ketten zu erschweren bzw. zu inhibieren (Cohen et al. 2006). Der exogene murine (p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischer Einzelketten-TZR) und der partiell murinisierte (pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischer Doppelketten-TZR) TZR konnten durch den Hu PanTZR Antikörper nicht nachgewiesen werden. Folglich konnten die humanen TZR an der Zelloberfläche durch die Verwendung des Hu PanTZR Antikörpers detektiert und von den exogenen TZR unterschieden werden. Als Nachweis der exogenen TZR wurde eine Mu TZR β Färbung angewendet (Abbildung 42). Es zeigte sich, dass die Transduktion mit einem pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten-TZR weiterhin zu der Expression der endogenen TZR führte. Hinzukommend konnte die exogene TZR β Kette an der Zelloberfläche detektiert werden. Insgesamt erschienen 52,6 % der T-Zellen

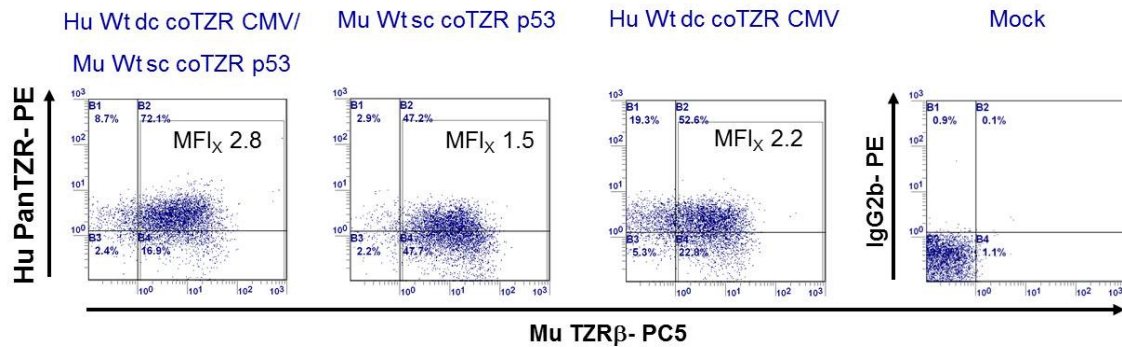


Abbildung 42: Analyse der Expression der endogenen TZR auf der Zelloberfläche der simultan transduzierten humanen T-Zellen

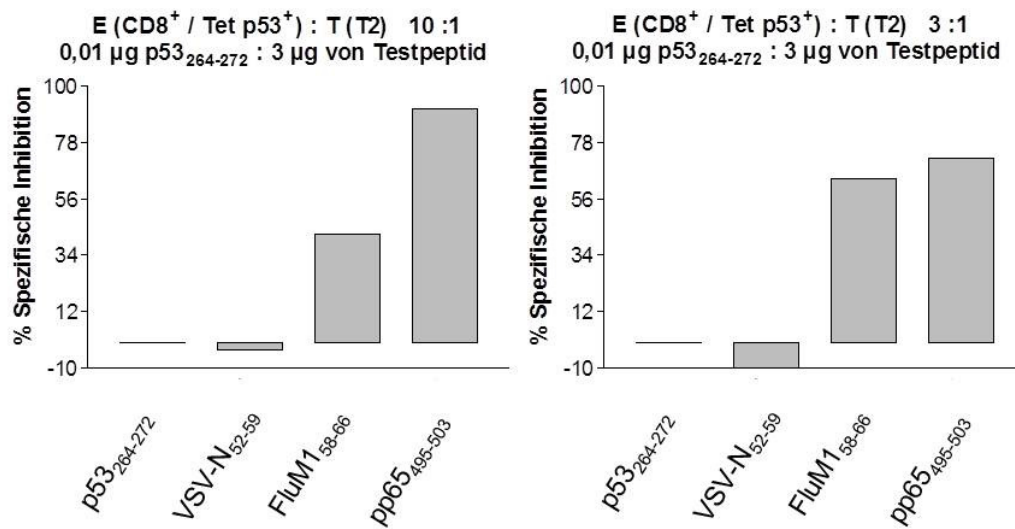
Die retrovirale Transduktion von humanen T-Zellen mit einem pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten-TZR, einem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR sowie deren simultane Transduktion zeigten stets die Expression der endogenen TZR. Der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR signalisierte mit einem MFI_x-Wert von 1,5 die stärkste Kompetitionsfähigkeit. Bei dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten-TZR und dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR handelte es sich um 1-Plasmid-retrovirale Vektoren.

Hu PanTZR / Mu TZRβ doppelpositiv. Mit einem Anteil von 19,3 % ließen sich lediglich die endogenen TZR und mit 22,8 % die exogene TZRβ Kette nachweisen. Bei dem murinen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR zeigte sich eine höhere Kompetitionsfähigkeit, so dass mit einem Anteil von 47,7 % der Zellen, diese positiv für die exogene TZRβ Kette, und mit nur noch 47,2 % positiv für die endogenen TZR sowie die exogene TZRβ Kette waren. Es konnten kaum Zellen detektiert werden, welche nur die endogenen TZR exprimierten. Die MFI_x-Werte signalisierten ebenfalls eine stärkere Kompetitionsfähigkeit des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR (MFI_x 1,5) im Vergleich zu dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten-TZR (MFI_x 2,2). Die simultan transduzierten T-Zellen exprimierten mit 72,1 % die endogenen TZR sowie die exogenen TZRβ Ketten. Hierbei konnte keine Unterscheidung zwischen der TZRβ Kette des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen- und pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR erfolgen, da der Mu TZRβ Antikörper an die murinen Bestandteile der C-Domänen beider TZR binden kann. Mit einem Anteil von 16,9 % konnten nur die exogenen TZRβ Ketten und mit 8,7 % die endogenen TZR nachgewiesen werden. Mit einem MFI_x-Wert von 2,8 zeigte sich nicht, die zu erwartende erhöhte Competition zwischen den endogenen und den zwei

exogenen TZR. Viel mehr erschien eine Ko-Expression des endogenen TZR und der exogenen TZR β Ketten vorzuliegen. Die FACS-Analysen verdeutlichten, dass trotz einer simultanen Transduktion der humanen T-Zellen mit zwei TZR-Konstrukten, keine vollständige und auch keine bessere Verdrängung der endogenen TZR von der Zelloberfläche erfolgten.

4.3.3 Analyse der Konkurrenz zwischen dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen- und dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Peptid

Für die Restimulation der pp65₄₉₅₋₅₀₃- und p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-bi-spezifischen T-Zellen wurden CD8 negative oder T2 Zellen mit einer definierten Konzentration an pp65₄₉₅₋₅₀₃- sowie p53₂₆₄₋₂₇₂-Peptid beladen. Es stellte sich daher die Frage, ob die Peptide unterschiedlich starke HLA-A2-Binder sind. Folglich müßte bei unterschiedlichen HLA-A2-Bindungseigenschaften eine getrennte Peptidbeladung der Feederzellen (CD8 negative oder T2 Zellen) erfolgen. Zur Beantwortung der Fragestellung wurde ein Konkurrenztest durchgeführt (Abbildung 43). Als Kontrollen wurden die Peptide FluM1₅₈₋₆₆ und VSV-N₅₂₋₅₉ verwendet, von denen der Konkurrenzcharakter bekannt war. VSV-N₅₂₋₅₉ war ein sehr schwacher HLA-A2-Binder, während FluM1₅₈₋₆₆ zu einer starken Verdrängung eines anderen HLA-A2-abhängigen Peptides führte. Im Folgenden wurden die Peptide p53₂₆₄₋₂₇₂ und pp65₄₉₅₋₅₀₃ analysiert. Als Effektorzellen fanden Maus-T-Zellen Verwendung, die mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Doppelketten-TZR eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems inklusive dem F2A Element transduziert waren (freundliche Zurverfügungstellung von Frau X). Die E:T Verhältnisse (10:1 und 3:1) wurden auf die CD8 und p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische TZR-Expression eingestellt. Erwartungsgemäß zeigte der schwache Konkurrent VSV-N₅₂₋₅₉ keine starke Inhibition der spezifischen Lyse der p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidbeladenen Zielzellen durch die p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Effektorzellen. Ebenso bewirkte die zusätzliche Zugabe des p53₂₆₄₋₂₇₂-Peptides zu den Zielzellen keine Beeinflussung der Lyseeigenschaft der T-Zellen. Interessanterweise konnte durch die Zugabe des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Peptides bei einem E:T von 10:1 eine Inhibition der Lyse der Zielzellen von 91 % und bei einem E:T von 3:1 von 72% ausgelöst werden. Folglich stellte das pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Peptid sogar einen stärkeren Konkurrent als das



3 µg der Testpeptide zur Verdrängung (Kompetition) des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Peptides

Abbildung 43: Analyse der Kompetition zwischen den Peptiden p53₂₆₄₋₂₇₂ und pp65₄₉₅₋₅₀₃

Bei dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Peptid handelte es sich um einen sehr starken HLA-A2 Binder. Die Folge der stärkeren HLA-A2-Bindungseigenschaft im Vergleich zu dem p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen Peptid zeigte sich in einer 91 (E:T 10:1) und 72 (E:T 3:1) prozentigen Inhibition der p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidspezifischen Lyse der Zielzellen (T2 Zellen) durch die Maus-T-Effektorzellen.

Flum1₅₈₋₆₆-Peptid dar, welches bei einem E:T von 10:1 eine Inhibition von 42 % und bei einem E:T von 3:1 von 64 % bewirkte. Der Kompetitionstest zeigte auf, dass eine getrennte Beladung der CD8 negativen oder T2 Zellen mit den entsprechenden p53₂₆₄₋₂₇₂- und pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Peptiden erforderlich war. Andernfalls würde bei einer parallelen Beladung vorzugsweise das pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Peptid präsentiert werden und keine simultane Stimulation der TZR gewährleistet sein. In den aufgeführten Stimulationsverfahren der pp65₄₉₅₋₅₀₃- und p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-bi-spezifischen T-Zellen wurden die Feederzellen stets getrennt voneinander mit dem jeweiligen pp65₄₉₅₋₅₀₃- oder p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Peptid beladen. Anschließend wurden die Feederzellen im 1:2 Verhältnis zu den bi-spezifischen T-Zellen gegeben.

Zusammenfassend konnte in dem Kapitel 4.3 dargelegt werden, dass erfolgreich p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen- und CMV-pp65₄₉₅₋₅₀₃-bi-spezifische humane T-Zellen

generiert werden konnten. Unter Berücksichtigung des HCMV-Status des Empfängers und des Spenders wurden zwei Vorgehensweisen aufgeführt.

4.4 Interaktionsverhalten eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR

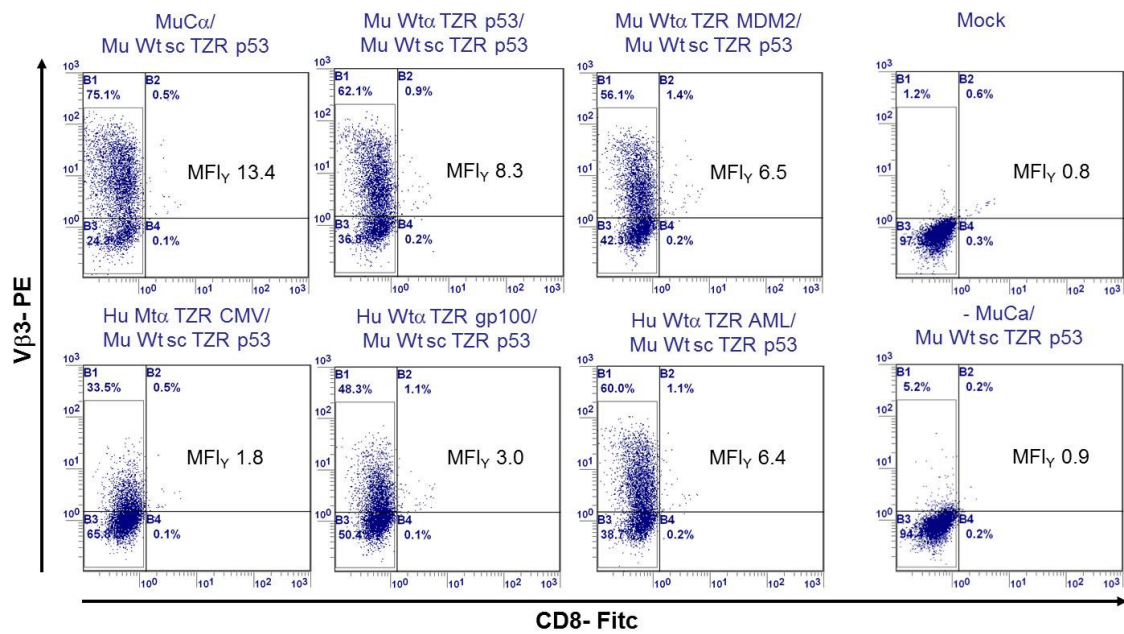
In diesem Kapitel wurde der Sicherheitsaspekt eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR eines 2-Plasmide- und eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems hinsichtlich einer Fremdinteraktion mit den endogenen TZR Ketten, d.h. dem möglichen Potential an der Bildung von hybriden TZR, analysiert. Hierfür fanden zum einen der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR Verwendung, welcher exklusive MuC α auf einem retroviralen Vektor kloniert war und für die Expression der obligatorischen Zugabe von MuC α auf einem zweiten Vektorsystem bedarf (2-Plasmide-retrovirales Vektorsystem). Zum anderen wurde der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR, welcher mit allen essentiellen Komponenten für dessen Expression auf einem retroviralen Vektorsystem sowie mit Kodonoptimierung und F2A Element vorlag, analysiert (1-Plasmid-retrovirales Vektorsystem). Im Folgenden wurde der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR mit unterschiedlichen TZR α Ketten der heterogenen humanen Spezifitäten gp100₂₈₀₋₂₈₈, AML₁₄₋₂₂ und pp65₄₉₅₋₅₀₃ sowie der murinen MDM2₈₁₋₈₈ und der homologen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifität retroviral transduziert. Essentiell war die Verwendung der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR α Kette in Hinblick auf die bereits beschriebene Zielrichtung der Generierung von pp65₄₉₅₋₅₀₃- und p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-bi-spezifischen T-Zellen, um das Risiko einer vermeintlichen hybriden TZR-Bildung einzugrenzen. Des Weiteren erfolgten die Analysen in den humanen Jurkat-76 Zellen sowie T-Zellen. Die humane Jurkat-76 Zelllinie kennzeichnete die Deletion von endogenen TZR α und - β Ketten, so dass eine nicht-kompetitive Bedingung vorlag. Hinzukommend konnte in diesen Zellen eine Situation erzielt werden, in der die Interaktionen unterschiedlicher TZR Ketten bewusst erzwungen werden konnte. Die humanen T-Zellen mit enthaltenen endogenen TZR α und - β Ketten spiegelten die reale Situation wider. Eine Interaktion des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR der Domänenabfolge V α -Li-V β -C β mit einer TZR β Kette konnte von empirischen strukturbioologischen

Aspekten her ausgeschlossen werden und würde auch theoretisch keine durch eine TZR α/β -notwendige Fehlpaarung induzierte Neoreaktivität bewirken.

4.4.1 Analyse des Interaktionsverhaltens eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR unter Verwendung eines 2-Plasmide-retroviralen Vektorsystems

Der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR, welcher ohne MuC α auf einem retroviralen Vektorkonstrukt kloniert war, benötigte für dessen Expression die stabilisierende Interaktion mit MuC α (2-Plasmide-retrovirales Vektorsystem). Im Folgenden wurden die Jurkat-76 Zellen (nicht-kompetitive Bedingung) und humanen T-Zellen (kompetitive Bedingung) mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR zusammen mit MuC α (MuC α / Mu Wt sc TZR p53) sowie als Kontrolle ohne MuC α (- MuC α / Mu Wt sc TZR p53) transduziert. Hinzukommend erfolgte die retrovirale Transduktion mit murinen (Mu Wt TZR α MDM2, Mu Wt TZR α p53) und humanen (Hu Wt TZR α gp100, Hu Wt TZR α AML, Hu Mt TZR CMV (siehe Erklärung für die Abkürzung Mt und Herkunft des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR in Kapitel 4.2.1)) TZR α Ketten anstelle von MuC α . Es wurde analysiert, ob der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR mit anderen TZR α Ketten unterschiedlicher Spezifität fremd interagieren und in irgendeiner Art und Weise stabilisiert werden konnte. Diese Fremdinteraktion würde zur Expression eines hybriden TZR führen. Im Folgenden wurden die transduzierten T-Zellen hinsichtlich der V β 3-Expression analysiert (Abbildung 44). Hierfür wurde subfamilienspezifisch gegen die TZR β Kette des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR (V β 3) gefärbt. In der Jurkat-76 Zelllinie sowie in den humanen T-Zellen zeigte sich eine V β 3-Expression der Zellen, welche mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR sowie MuC α transduziert waren. Eine fehlende Stabilisierung des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR durch diese Komponente führte zu keiner V β 3-Expression, so dass in diesem Fall ein Hintergrund von 5,2 % in den Jurkat-76 Zellen und von 15,2 % in der CD4⁺ Population sowie 9,9 % in der CD8⁺ Population der humanen T-Zellen verzeichnet werden konnte. Interessanterweise führte die Applikation einer murinen TZR α Kette (homologe p53₂₆₄₋₂₇₂- oder heterogene MDM2₈₁₋₈₈-Spezifität) zu einer V β 3-

A) Humane Jurkat-76 Zelllinie



B) Humane T-Zellen

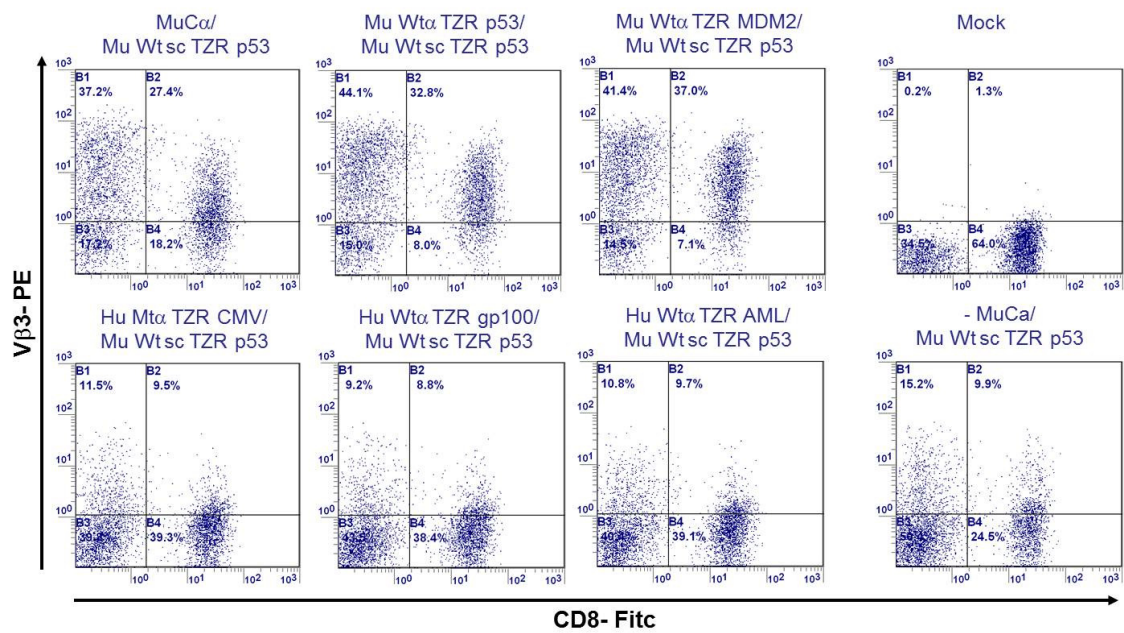


Abbildung 44: Analyse der Vβ3-Expression hinsichtlich der Interaktion des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit humanen und murinen TZRα Ketten

In den humanen Jurkat-76 Zellen (A) und humanen T-Zellen (B) konnte eine Vβ3-Expression des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR durch die Interaktion mit murinen TZRα Ketten nachgewiesen werden. Bei humanen TZRα Ketten war dies lediglich bei den Jurkat-76 Zellen möglich.

Expression. Die Bestimmung der MFI_γ-Werte der Jurkat-76 Zellen legte dar, dass der wildtypische Einzelketten-TZR (Mu Wt sc TZR p53) ko-exprimiert mit MuC α eine höhere Expression an der Zelloberfläche aufwies, als durch die stabilisierende Wirkung mit einer murinen TZR α Kette. Das beobachtete Ergebnis zwischen den Jurkat-76 Zellen und den humanen T-Zellen war kompatibel. Ein essentieller Unterschied konnte bei der Zugabe einer humanen TZR α Kette detektiert werden. Unter nicht-kompetitiven Bedingungen (Jurkat-76 Zellen) zeigte sich, dass ebenfalls eine Interaktion zwischen dem p53₂₆₄₋₂₇₂⁻-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR und den humanen TZR α Ketten unterschiedlicher Spezifitäten erfolgen konnte. Hierbei zeigte die AML₁₄₋₂₂⁻-Tumorantigen-spezifische TZR α Kette im Vergleich zu der gp100₂₈₀₋₂₈₈⁻-Tumorantigen- und pp65₄₉₅₋₅₀₃⁻-spezifischen TZR α Kette das stärkste Interaktionsvermögen mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂⁻-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR. Jedoch lag die Expression eines solchen hybriden Konstrukts weitaus niedriger als die bei einem hybriden Konstrukt bestehend aus dem p53₂₆₄₋₂₇₂⁻-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR und einer murinen TZR α Kette. Folglich konnte mit murinen TZR α Ketten besser wechselgewirkt werden. Dies war auch zu erwarten, da der p53₂₆₄₋₂₇₂⁻-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR ebenfalls muriner Herkunft war. Unter kompetitiven Bedingungen (humanen T-Zellen) konnte keine vom Hintergrund (- MuC α / Mu Wt sc TZR p53) sich abgrenzende V β 3-Positivität detektiert werden. Folglich konnte keine Interaktion des p53₂₆₄₋₂₇₂⁻-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit humanen TZR α Ketten unterschiedlicher Spezifität nachgewiesen werden. Anschließend wurden die transduzierten Zellen hinsichtlich ihrer p53₂₆₄₋₂₇₂⁻-Tumorantigen-spezifität analysiert (Abbildung 45). Es wurden Färbungen mit dem p53-spezifischen Tetramer durchgeführt. Hierdurch konnte analysiert werden, ob die Interaktion des p53₂₆₄₋₂₇₂⁻-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit einer TZR α Kette lediglich zu einer Stabilisierung der Expression des p53₂₆₄₋₂₇₂⁻-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR (Tet p53⁺) oder zu einer Interaktion mit der Vollängen-TZR α Kette (Tet p53⁻) führte. Es zeigte sich sowohl in der Jurkat-76 Zelllinie als auch in den humanen T-Zellen keine p53-spezifische Tetramerpositivität, in Folge des Anbietens von heterogenen TZR α Spezifitäten anstelle von MuC α . Interessanterweise zeigte sich mittels der Zugabe der homologen p53₂₆₄₋₂₇₂⁻-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette eine p53-spezifische Tetramer-Anfärbbarkeit. Die Bestimmung der MFI_γ-Werte der Jurkat-76

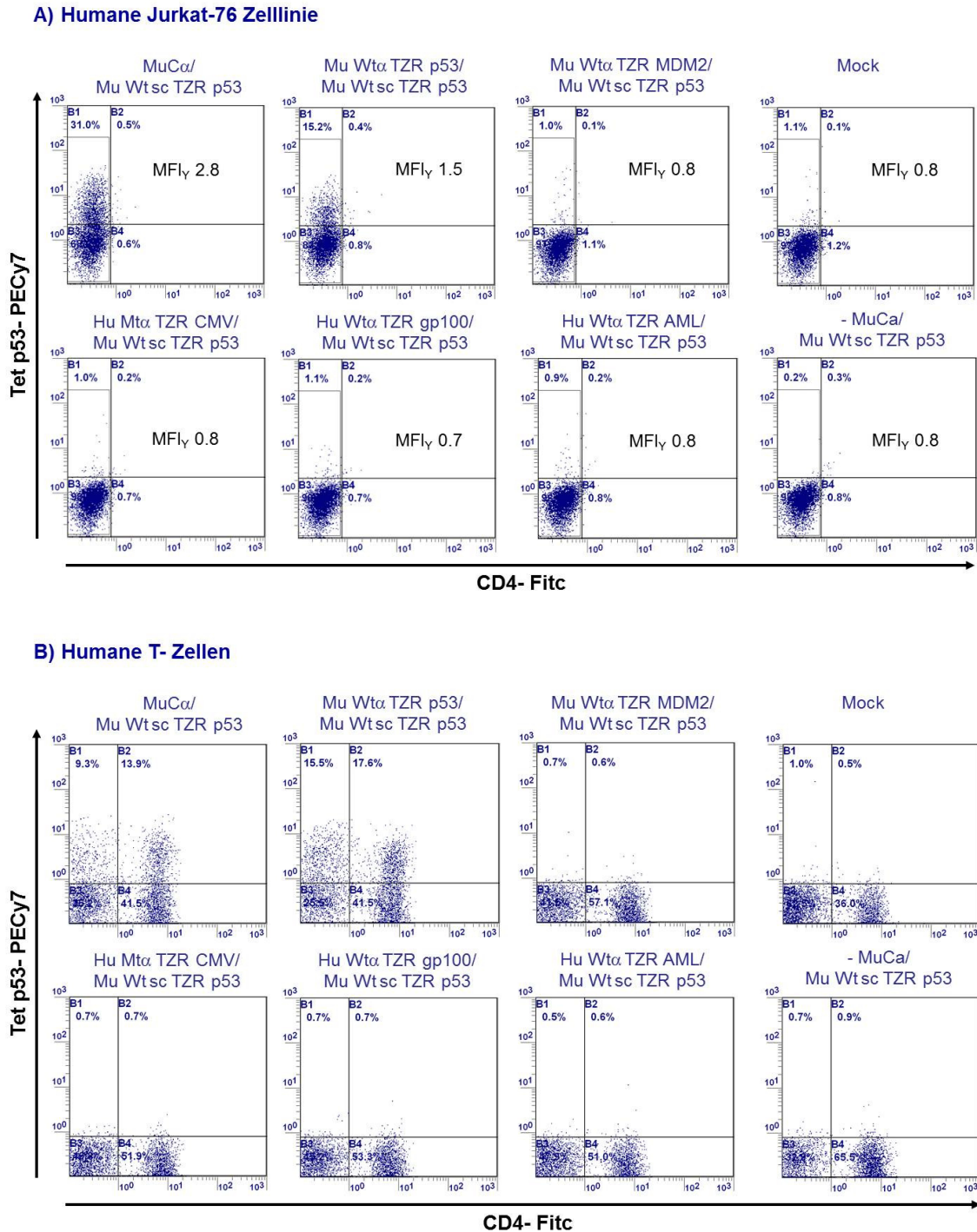


Abbildung 45: Interaktion des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR mit fremden TZR α Ketten führte zum Spezifitätsverlust

In den Jurkat-76 Zellen (A) und humanen T-Zellen (B) führte die Fremdinteraktion des Einzelketten-TZR mit spezifitätsfremden TZR α Ketten zum Spezifitätsverlust (Tet p53⁻). Bei der Interaktion mit der homologen Mu Wt α TZR p53 Kette blieb die Tet p53⁺ erhalten.

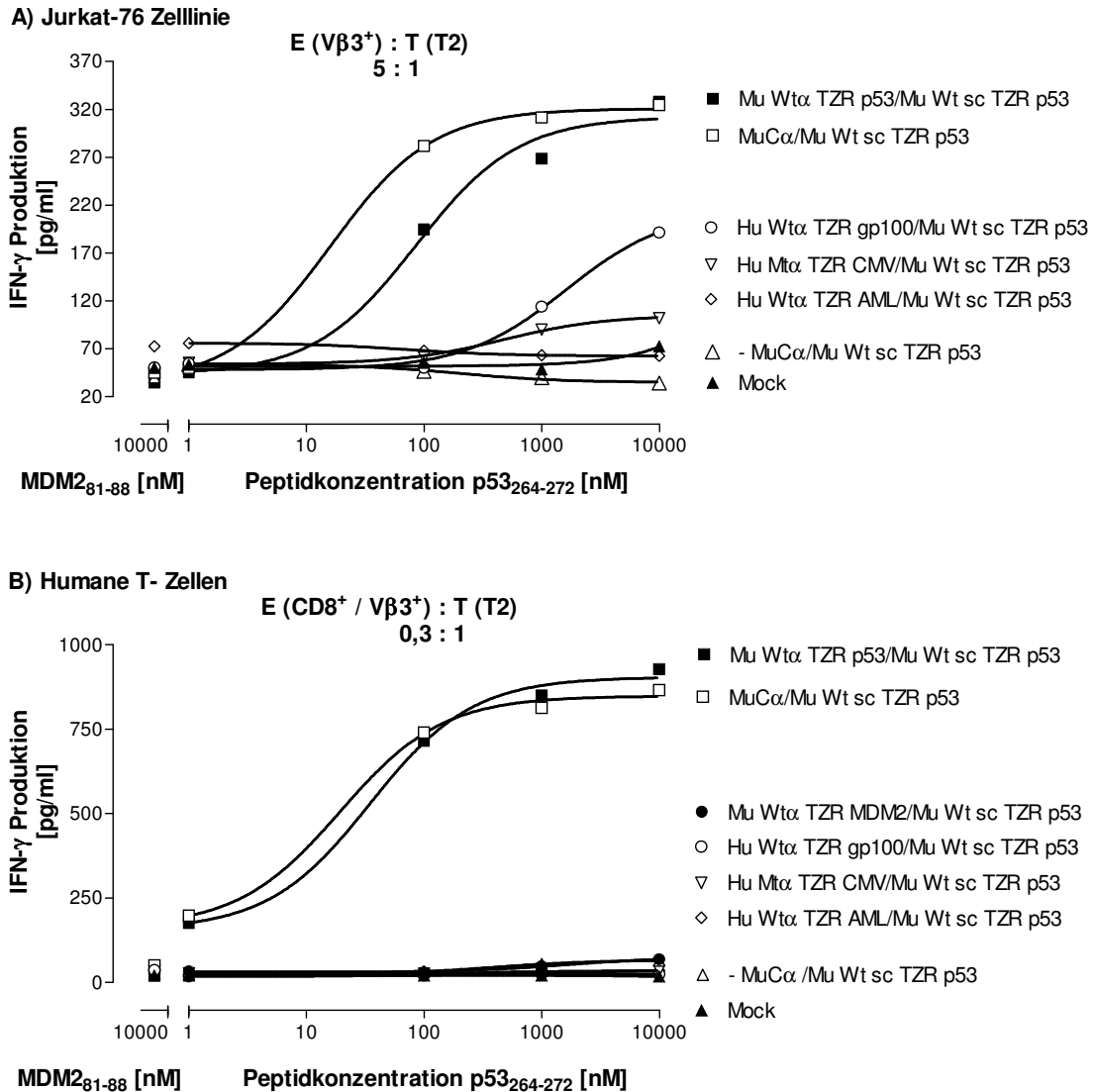


Abbildung 46: Funktionalitätsanalyse des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR sowie dessen hybride TZR-Konstrukte in einem Interferon-γ Elisa

Die Ergebnisse der Jurkat-76 Zellen (A) und der humanen T-Zellen (B) waren kompatibel. Es zeigte sich keine Interferon-γ Sekretion der Zellen nach einer p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidspezifischen Stimulierung, die mit den hybriden TZR-Konstrukten transduziert waren. Durch die Interaktion des Einzelketten-TZR mit der homologen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZRα Kette konnte eine vergleichbare, wenn auch niedrigere IFN-γ Freisetzung zu MuCα / Mu Wt sc TZR p53 erzielt werden.

Zellen signalisierten für den wildtypischen Einzelketten-TZR (MFI_γ 2,8) eine höhere Expressionsrate als für das Konstrukt bestehend aus der homologen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZRα Kette (Mu Wtα TZR p53) und dem Einzelketten-

TZR (Mu Wt sc TZR p53) (MFI_γ 1,5). Eine Expression des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR ohne die Interaktion mit MuC α oder einer TZR α Kette konnte ausgeschlossen werden. Die Kontrolle der Transfektion des Einzelketten-TZR ohne MuC α führte zu keiner p53-spezifischen Tetramerpositivität. Folglich kann keine Expression des Einzelketten-TZR ohne eine Stabilisierung über die MuC α -Domäne erfolgen. Die Analysen verdeutlichten das Potential des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit anderen TZR α Ketten fremder Spezifität zu interagieren. Die Interaktion beruhte auf eine Fremdinteraktion mit der Vollängen-TZR α Kette, welche zu der Verdrängung der V α -Domäne des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR führte. Hierdurch ließ sich der Verlust der p53-spezifischen Tetramerpositivität, bei beibehaltener V β 3-Anfärbbarkeit und damit Expressionsfähigkeit, erklären. Darauffolgend wurde der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische TZR sowie die hybriden TZR-Konstrukte hinsichtlich ihrer Funktionalität in einem Interferon- γ Elisa untersucht (Abbildung 46). Es konnte keine Alloreaktivität gegenüber dem irrelevanten MDM2₈₁₋₈₈-Tumorantigen-spezifischen Peptid detektiert werden. Ebenso zeigten die Zellen, welche mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR ohne MuC α oder mit Mock transduziert waren keine Interferon- γ Produktion. Die Ergebnisse der Jurkat-76 Zellen und der humanen T-Zellen waren kompatibel. Die hybriden TZR-Konstrukte verzeichneten keine Interferon- γ Sekretion nach einer p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidspezifischen Stimulierung, wodurch ein weiterer Beweis für den Spezifitätsverlustes des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR erbracht werden konnte. In den Jurkat-76 Zellen zeigte das hybride TZR-Konstrukt, Hu TZR α gp100 / Mu Wt sc TZR p53, eine anfangs zu verzeichnende IFN- γ Sekretion. Diese könnte darauf zurückgeführt werden, dass die Interaktion des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR nicht nur mit einer gp100₂₈₀₋₂₈₈-spezifischen Vollängen-TZR α Kette, sondern auch nur mit der C α -Domäne der gp100₂₈₀₋₂₈₈-spezifischen TZR α Kette erfolgen könnte. Folglich könnte eine geringe p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifische Funktionalität induziert werden, jedoch konnte diese geringe p53₂₆₄₋₂₇₂-Spezifität im FACS nicht nachgewiesen werden (Abbildung 45). Der hybride Mu Wt α TZR MDM2 / Mu Wt sc TZR p53 wurde in der Funktionsanalyse der Jurkat-76 Zelllinie nicht aufgeführt. Nach einer p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidspezifischen Stimulierung zeigte sich jedoch in den humanen T-Zellen keine spezifische IFN- γ Freisetzung. Die Interaktion der homologen p53₂₆₄₋

$p53_{264-272}$ -Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette mit dem $p53_{264-272}$ -Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR befähigte die Jurkat-76 Zellen und die humanen T-Zellen zur spezifischen IFN- γ Sekretion nach einer $p53_{264-272}$ -peptidspezifischen Stimulierung. Die Interaktion des $p53_{264-272}$ -Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit der $p53_{264-272}$ -Tumorantigen-spezifischen Volllängen-TZR α Kette führte zu einer geringeren IFN- γ Freisetzung im Vergleich zum $p53_{264-272}$ -Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR, der mit MuC α ko-exprimiert wurde.

4.4.2 Gezielte Punktmutagenese in der V α -Domäne des $p53_{264-272}$ -Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR

Es erfolgte die gezielte Punktmutagenese an der Aminosäuren-Position 115 in der V α -Domäne des $p53_{264-272}$ -Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR. Die Veränderung der Nukleinbase Adenin zu einem Cytosin führte zur Modifikation des Basentriplets und resultierte in der Entstehung eines Alanins anstelle eines Aspartats (siehe Anhang bzw. Datenträger). Das Ziel war es, die $p53$ -spezifische Tetramerbindung durch die Aminosäuresubstitution auszuschalten. Folglich wurde analysiert, ob eine Rekonstitution der $p53$ -spezifischen Tetramerbindung mittels der Interaktion der wildtypischen $p53_{264-272}$ -spezifischen TZR α Kette mit dem mutierten $p53_{264-272}$ -Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR erfolgen konnte. Die Untersuchung sollte einen Aufschluss über das Interaktionsverhalten des $p53_{264-272}$ -Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR liefern, d.h. ob der Einzelketten-TZR mit einer Volllängen TZR α Kette interagiert, wodurch die V α -Domäne des Einzelketten-TZR verdrängt wird und sich in einem Spezifitätsverlust widerspiegelt (siehe Kapitel 4.4.1). Im Folgenden wurden die humane Jurkat-76 Zelllinie sowie die humanen T-Zellen retroviral mit dem wildtypischen oder mutierten $p53_{264-272}$ -Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR ko-exprimiert mit MuC α als Kontrolle ausgestattet. Hinzukommend wurde der mutierte $p53_{264-272}$ -Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR mit unterschiedlichen humanen und murinen TZR α Ketten, anstelle von MuC α , kombiniert. Zuerst wurden subfamilienspezifische V β 3-Färbungen durchgeführt (Abbildung 47). Es zeigte sich, dass der mutierte $p53_{264-272}$ -Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR (MuC α / Mu Mt sc TZR $p53$) hinsichtlich der V β 3-Expression vergleichbar stark an der Zelloberfläche exprimiert wurde, wie

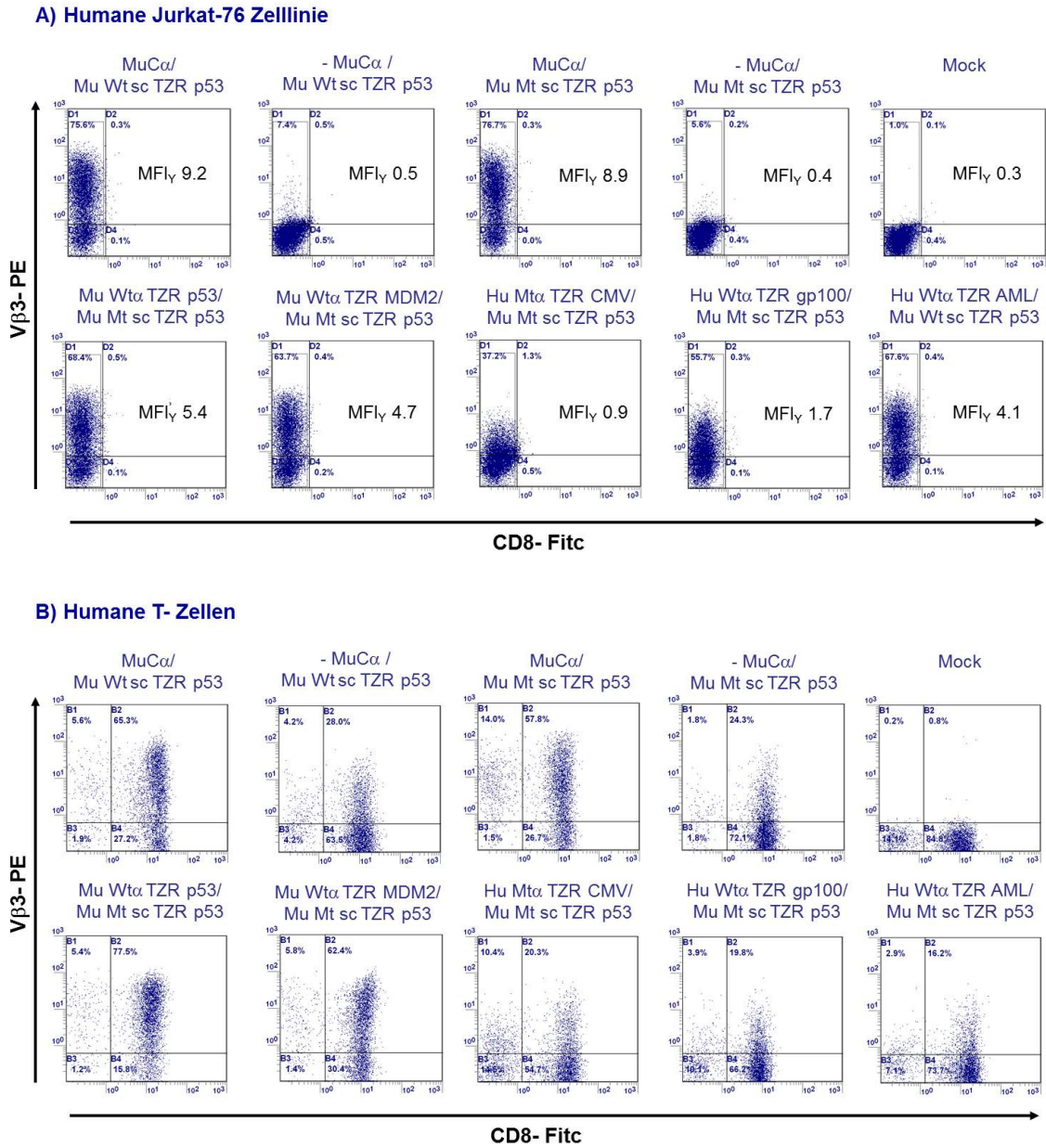


Abbildung 47: Vβ3-Expression der transduzierten Zellen mit dem mutierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR

Der mutierte p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR zeigte in der Vβ3-Analyse eine vergleichbare Expression wie der wildtypische Einzelketten-TZR. Die MFI_γ-Werte der Jurkat-76 Zellen (A) legten keine große Differenz dar. Es zeigten sich reproduzierbare Ergebnisse hinsichtlich dem erhöhten Interaktionsverhalten des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit murinen TZRα Ketten (A und B). Auch konnte in den Jurkat-76 Zellen (A) eine Interaktion mit den humanen TZRα Ketten detektiert werden.

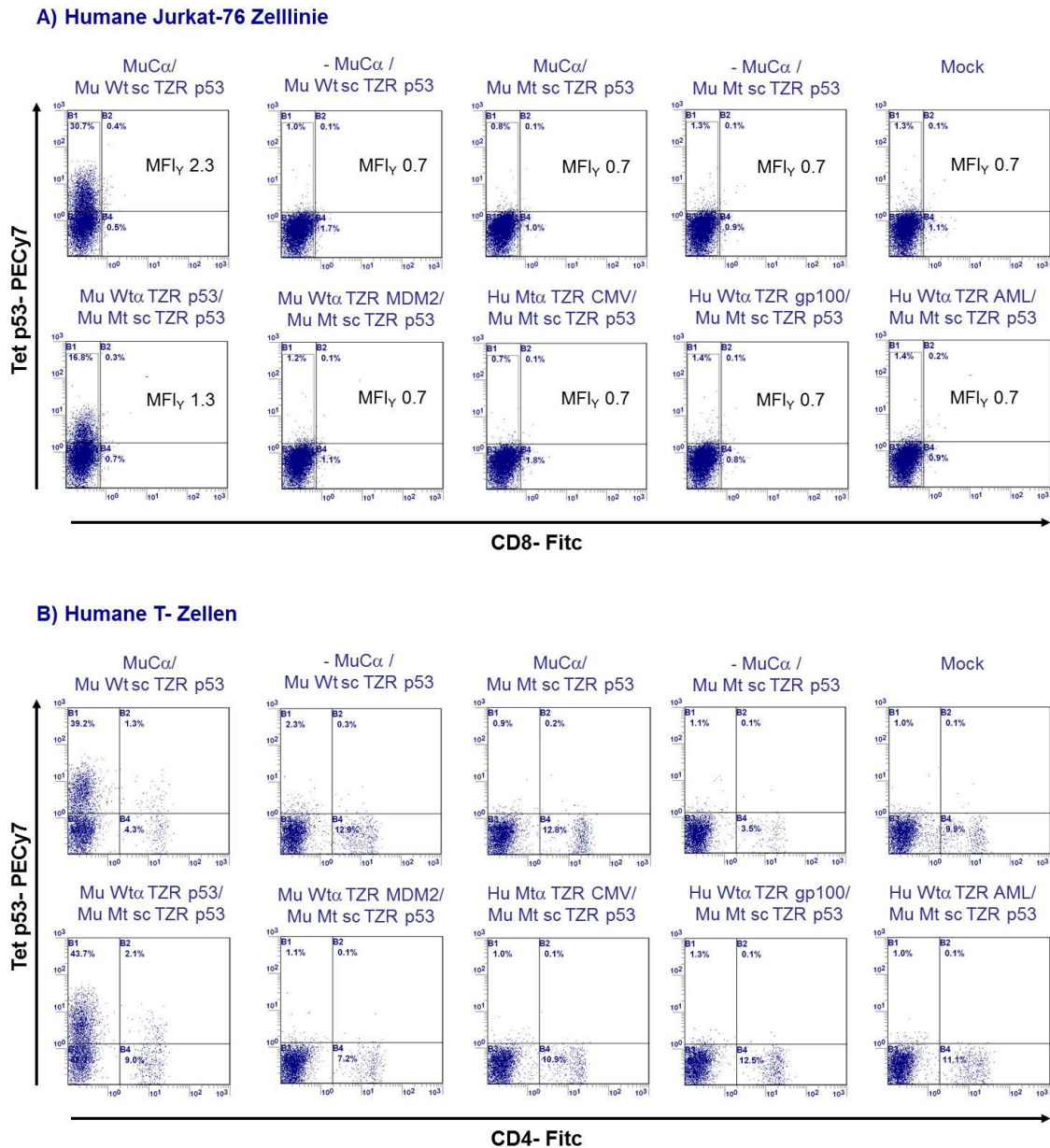


Abbildung 48: Interaktion des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit murinen TZR α Ketten resultierte in der Fremdinteraktion mit einer Volllängen-TZR α Kette

Der mutierte p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR ko-exprimiert mit MuC α konnte nicht mittels der p53-spezifischen Tetramerfärbung detektiert werden. Die Applikation einer p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette, anstelle von MuC α , führte zur Rekonstitution der p53-spezifischen Tetramerbindung. Spezifitätsfremde TZR α Ketten in Kombination mit dem mutierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR zeigten keine p53-Tetramerpositivität. Die Kontrollen Mock und die Transfektion ohne die MuC α -Domäne signalisierten den Hintergrund. Die Ergebnisse zwischen den humanen Jurkat-76 Zellen (A) und den T-Zellen (B) waren kompatibel.

der wildtypische Einzelketten-TZR. Die dargelegten MFI_γ-Werte der Jurkat-76 Zellen zeigten keine große Differenz. Des Weiteren ließ sich das Ergebnis, wie unter 4.4.1 dargelegt, unter Verwendung des mutierten Einzelketten-TZR in den humanen Jurkat-76 Zellen und T-Zellen reproduzieren. Anschließend erfolgte die Durchführung der p53-spezifischen Tetramerfärbung (Abbildung 48). Es zeigte sich, dass der wildtypische p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR ko-exprimiert mit MuCα an der Zelloberfläche detektiert werden konnte. Jedoch erschien der mutierte Einzelketten-TZR ko-exprimiert mit MuCα negativ für das p53-spezifische Tetramer. Interessanterweise ließ sich aber die p53-spezifische Tetramerbindung rekonstituieren, indem der mutierte p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR mit der wildtypischen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZRα Kette (Mu Wtα TZR p53) anstelle von MuCα kombiniert wurde. Die p53-spezifische Tetramerfärbung lieferte einen essentiellen Aufschluss über das Interaktionsverhalten des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit einer murinen TZRα Kette. Die Interaktion des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR beruhte auf der Fremdinteraktion mit einer Vollängen-TZRα Kette, wodurch die mutierte Vα-Domäne des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR verdrängt und durch die nicht mutierte Vα-Domäne der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZRα Kette ersetzt wurde. Bei der Zugabe einer MDM2₈₁₋₈₈-Tumorantigen-spezifischen TZRα Kette handelte es sich um eine fremde Spezifität der Vα-Domäne. Folglich wurde zwar die mutationstragende Vα-Domäne des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR verdrängt, aber das p53-spezifische Tetramer konnte aufgrund einer unbekanntenen Vα / Vβ Kombination nicht binden. Die Resultate zwischen einer nicht-kompetitiven (Jurkat-76 Zellen) und einer kompetitiven (humane T-Zellen) Situation waren kompatibel. Darauffolgend wurden Funktionalitätsanalysen in einem Interferon-γ Elisa durchgeführt (Abbildung 49). Es zeigte sich sowohl in den Jurkat-76 Zellen (A) als auch in den humanen T-Zellen (B), dass die eingebrachte Mutation in der Vα-Domäne des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR zu dessen Funktionsverlust führte. Jedoch konnte interessanterweise durch die Applikation der wildtypischen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZRα Kette anstelle von MuCα die Funktionalität rekonstituiert werden. In den Jurkat-76 Zellen zeigte sich eine geringere Interferon-γ Freisetzung des TZR-Konstruktes Mu Wtα TZR p53 / Mu Mt sc TZR p53 (EC₅₀-Wert 100 nM) im Vergleich

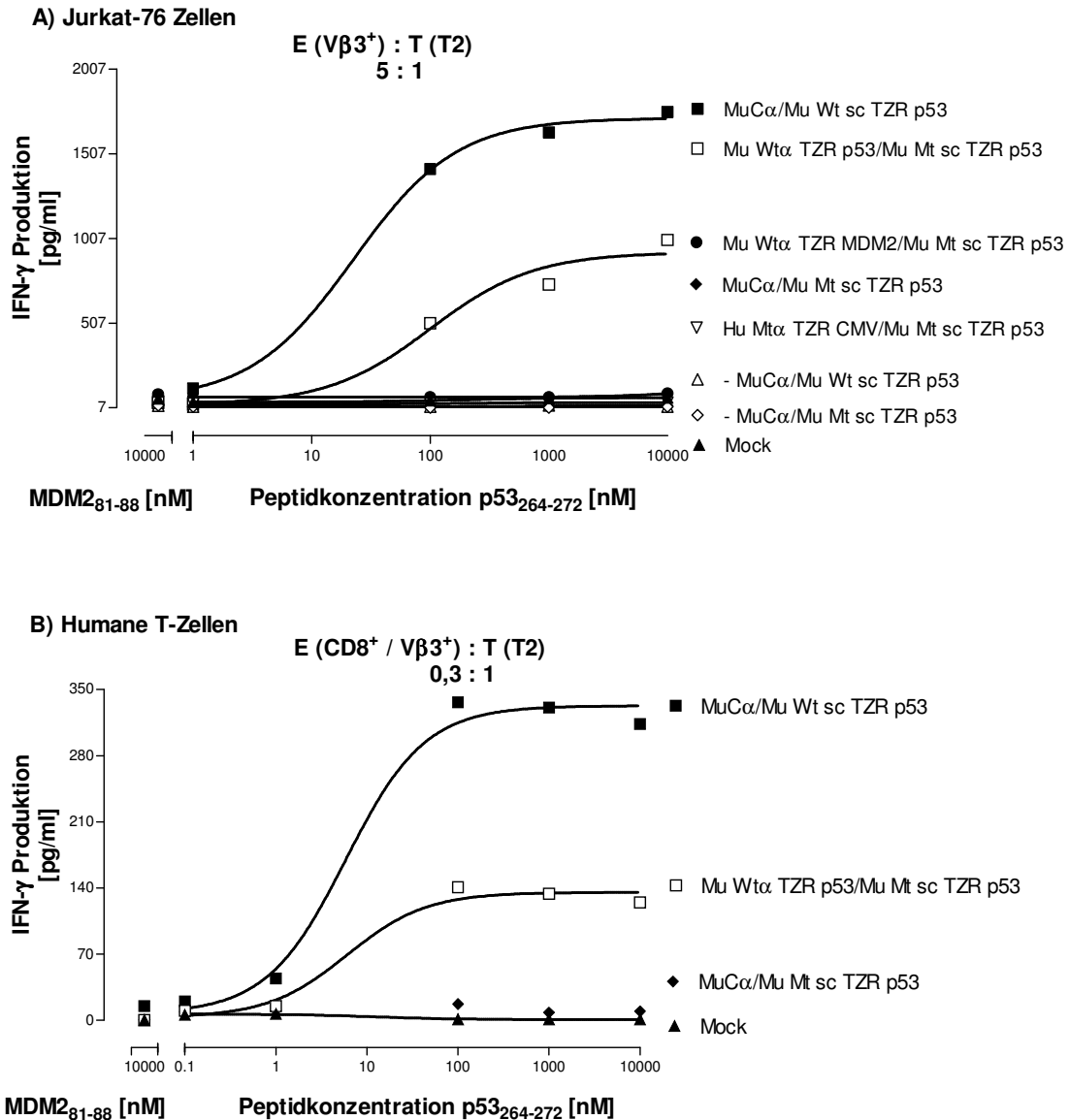


Abbildung 49: Rekonstitution der Funktionalität des mutierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR

Die Mutation in der Vα-Domäne des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR führte zu dessen Funktionsverlust. Die Applikation der wildtypischen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZRα Kette anstelle von MuCα rekonstituierte die Funktionalität. Im Vergleich zum MuCα/Mu Wt sc TZR p53 erschien dieses TZR-Konstrukt Mu Wtα TZR p53 /Mu Mt sc TZR p53 mit einer geringeren Effizienz.

zu dem wildtypischen Einzelketten-TZR (MuCα/ Mu Wt sc TZR p53) mit einem EC₅₀-Wert von 22,6 nM. Auch in den humanen T-Zellen erwies sich der wildtypische

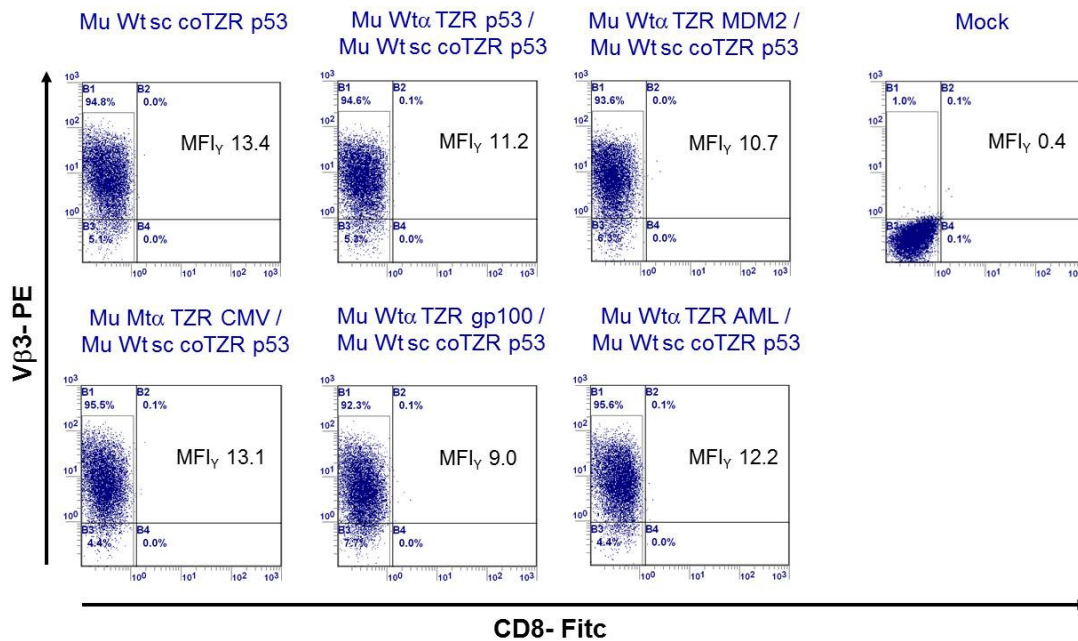
p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR (EC₅₀-Wert 6,08 nM) im Vergleich zu dem Mu Wtα TZR p53 / Mu Mt sc TZR p53 (EC₅₀-Wert 5,87 nM) als funktionaler. Jedoch zeichnete sich dies weniger an den EC₅₀-Werten als an der IFN-γ Freisetzung ab. Es konnte sowohl in der Jurkat-76 Zelllinie als auch in den humanen T-Zellen eine Rekonstitution der Funktionalität erzielt werden. Dieses Resultat unterstützte die getroffene Aussage über das Interaktionsverhalten des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR, der mit einer Vollängen-TZRα Kette interagiert. Folglich führte die Interaktion mit der wildtypischen, homologen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZRα Kette zu der Verdrängung der mutationstragenden Vα-Domäne des mutierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR, wodurch die p53-spezifische Tetramerbindung wiederhergestellt wurde. Als Kontrolle wurden bei den Jurkat-76 Zellen als Vertreter einer weiteren murinen TZRα Kette der Mu Wtα TZR MDM2 / Mu Mt sc TZR p53 und als Vertreter einer humanen TZRα Kette der Hu Wtα TZR CMV / Mu Mt sc TZR p53 mitgeführt. Es konnte keine Interferon-γ Sekretion verzeichnet werden. Die Kontrolle Mock sowie die Stimulierung mit einem irrelevanten MDM2₈₁₋₈₈-spezifischen Peptid führte zu keiner unspezifischen IFN-γ Produktion.

4.4.3 Analyse des Interaktionsverhaltens eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR unter Verwendung eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems

In den zuvor beschriebenen Unterkapiteln über das Interaktionsverhalten des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR wurde ein Einzelketten-TZR-Konstrukt verwendet, welches für die Expression 2-Plasmid-retrovirale Vektorsysteme benötigte. Der hier verwendete p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR war auf einem retroviralen Plasmid-Vektor zusammen mit der stabilisierenden sowie für die Expression essentielle MuCα-Domäne kloniert (1-Plasmid-retrovirales Vektorsystem). Hinzukommend war der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR Kodon-optimiert und mit dem F2A-Element ausgestattet. Dieser Vektor fand ebenfalls bei der Generierung von p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen- und pp65₄₉₅₋₅₀₃-bi-spezifischen T-Zellen Verwendung (siehe Kapitel 4.3.2.4 bis 4.3.2.6). Die Analysen wurden wiederum unter nicht-kompetitiven

(Jurkat-76 Zellen) und kompetitiven, realen Bedingungen (humane T-Zellen) durchgeführt. Es fand die retrovirale Transduktion des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR sowie in Kombination mit murinen und humanen TZR α Ketten statt. Zur Gewährleistung kompatibler Selektionsbedingungen nach der retroviralen Transduktion wurde der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR, welcher auf dem pBullet_neo Vektor kloniert vorlag, zusammen mit dem pBullet_puro Leervektor transfiziert. Folglich konnten die Zellen zur Selektion positiv transduzierter Zellen mit beiden Antibiotika, wie bei der kombinierten Transfektion des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit humanen und murinen TZR α Ketten (auf pBullet_puro kloniert), behandelt werden. Die transduzierten T-Zellen wurden hinsichtlich ihrer V β 3-Expression analysiert (Abbildung 50). Es zeigte sich bei der Transfektion des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit einer homologen (p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette) oder heterologen (MDM2₈₁₋₈₈-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette) murinen TZR α Kette, dass eine geringfügig geringere V β 3-Expression an der Zelloberfläche verzeichnet werden konnte. Bei der humanen Jurkat-76 Zelllinie zeigte sich eine Abnahme der MFI γ -Werte zu 11,2 (Mu Wt α TZR p53/Mu Wt sc coTZR p53) und 10,7 (Mu Wt α TZR MDM2/ Mu Wt sc coTZR p53) im Vergleich zum wildtypischen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR (Mu Wt sc coTZR p53) mit einem MFI γ -Wert von 13,4. Auch in den humanen T-Zellen zeigte sich eine geringere V β 3-Positivität. Der Mu Wt sc coTZR p53 zeigte MFI γ -Werte von 55,3 (B1/B3) und 49,2 (B2/B4) im Vergleich zu 31,8 (B1/B3) und 29,1 (B2/B4) beim Mu Wt α TZR p53/Mu Wt sc coTZR p53. Die Kombination des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit der MDM2₈₁₋₈₈-spezifischen TZR α Kette führte zu den MFI γ -Werten von 29,2 (B1/B3) und 25,7 (B2/B4). Sowohl in den Jurkat-76 Zellen als auch in den humanen T-Zellen konnte eine Abnahme der MFI γ -Werte bei der Kombination des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit der homologen p53-spezifischen TZR α Kette beobachtet werden. Diese Abnahme könnte auf eine Konkurrenz zwischen der Expression des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR und des hybriden TZR, bestehend aus der p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen TZR α Kette und dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR, zurückgeführt werden. Folglich könnte sich dieser „Stress“ für die Zelle, einen TZR exprimieren zu wollen, in

A) Humane Jurkat-76 Zelllinie



B) Humane T-Zellen

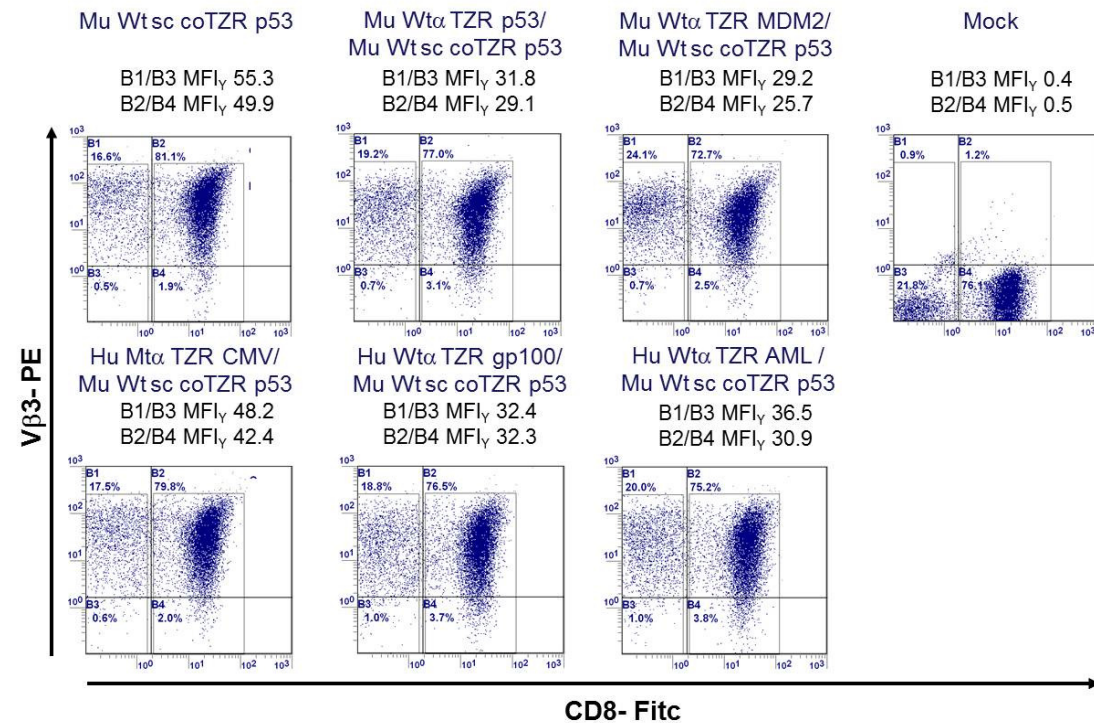
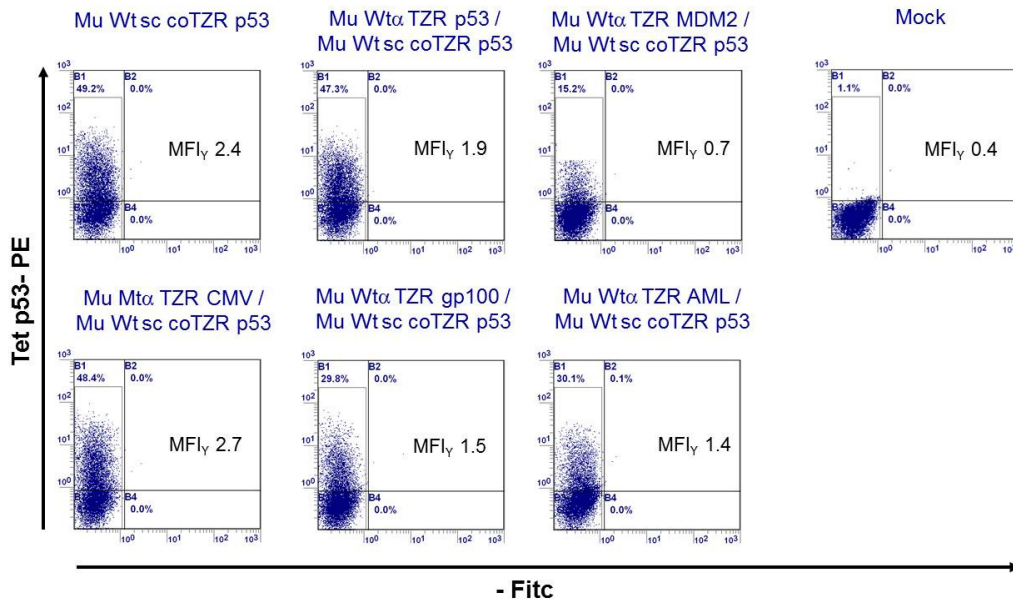


Abbildung 50: V β 3-Expression der transduzierten T-Zellen mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR in Kombination mit humanen und murinen TZR α Ketten

Die Applikation einer murinen TZR α Kette führte zu einer geringfügigen Erniedrigung der V β 3-Expression. Die humanen TZR α Ketten zeigten einen geringeren Einfluss. Die Ergebnisse zwischen den Jurkat-76 Zellen (A) und den humanen T-Zellen (B) waren kompatibel.

A) Humane Jurkat-76 Zelllinie



B) Humane T-Zellen

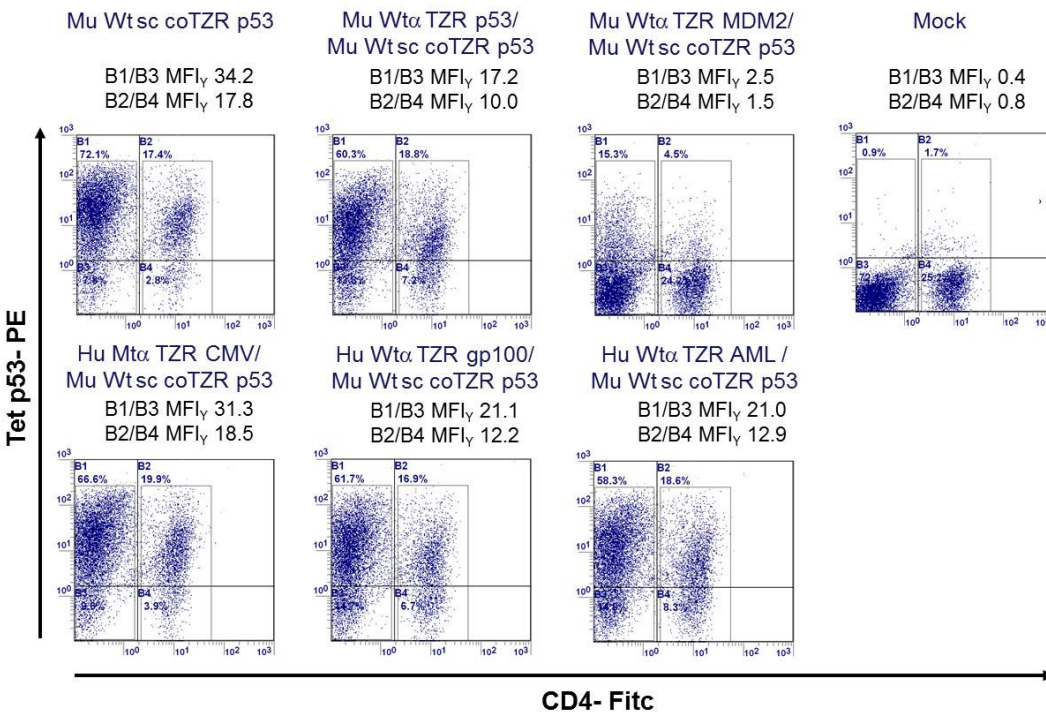


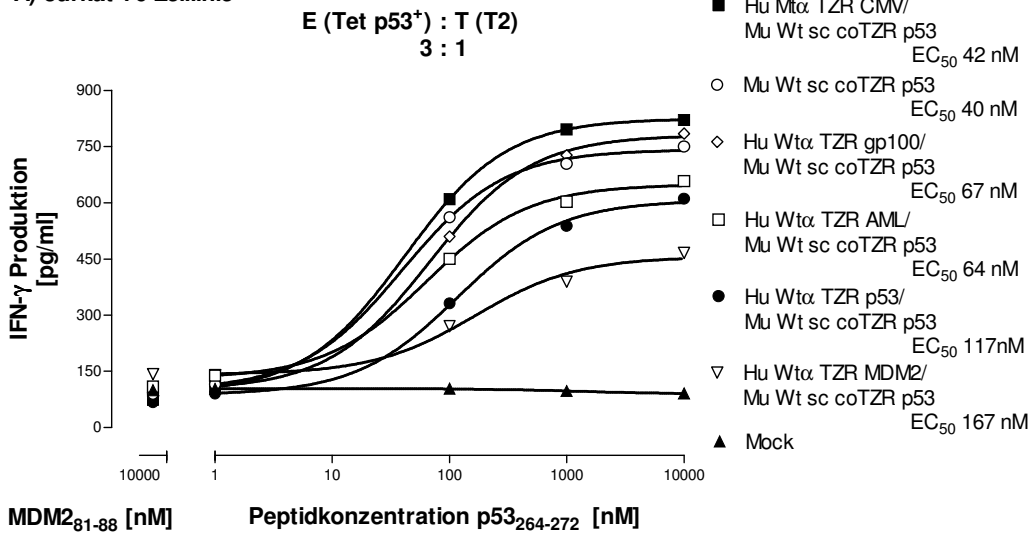
Abbildung 51: Expression des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR unter Beeinflussung einer applizierten humanen oder murinen TZR α Kette

Unter nicht-kompetitiven (A) (Jurkat-76 Zellen) sowie kompetitiven (B) (humanen T-Zellen) Bedingungen konnte stets eine p53-spezifische Tetramerpositivität verzeichnet werden. Die murine MDM2₈₁₋₈₈-spezifische TZR α Kette führte zur größten Reduktion der Expression des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR.

einer verminderten V β 3-Expression widerspiegeln. Bei der Zugabe von humanen TZR α Ketten nahmen zwar auch die MFI γ -Werte ab, jedoch interessanterweise geringfügiger. In den humanen T-Zellen ließ sich vor allem der Einfluss einer murinen TZR α Kette darlegen. Durch die Zugabe einer MDM2₈₁₋₈₈-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette erfolgte in der CD8⁺ Subpopulation eine Abnahme der MFI γ -Werte auf 25,7 und in der CD4⁺ Subpopulation auf 29,2. Diese murine TZR α Kette schien einen großen Einfluss auf die V β 3-Expression zu nehmen. Bei den humanen TZR α Ketten zeigte die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR α Kette die geringste, die AML₁₄₋₂₂- die intermediärste und die gp100₂₈₀₋₂₈₈-spezifische TZR α Kette die größte Beeinflussung der V β 3-Expression. Bei dem 2-Plasmide-retroviralen Vektorsystem (Abbildung 44 B) konnte nach der Zugabe einer humanen TZR α Kette anstelle von MuC α lediglich eine geringfügige V β 3-Expression an der Zelloberfläche detektiert werden. Hingegen zeigte sich bei einem 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystem Mu Wt sc coTZR p53, auch bei der Kombination des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit humanen TZR α Kette unterschiedlicher Spezifitäten, eine effiziente V β 3-Expression (Abbildung 50 B). Es stellte sich die Frage, ob die hier beobachtete, bessere V β 3-Expression auf eine erhöhte Fremdinteraktion oder auf die spezifische Expression des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR zurückzuführen war. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden p53-spezifische Tetramerfärbungen durchgeführt (Abbildung 51). Wiederum konnten kompatible Ergebnisse zwischen den Jurkat-76 Zellen (A) und den humanen T-Zellen (B) erzielt werden. Anhand der MFI γ -Werte zeigte sich, dass die Applikation einer murinen MDM2₈₁₋₈₈-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette zu einer rapiden Abnahme der Tetramerpositivität führte. In den Jurkat-76 Zellen zeigte sich dies in der Abnahme der MFI γ -Werte von 2,4 (Mu Wt sc coTZR p53) auf 0,7 bei dem hybriden TZR Mu Wt α TZR MDM2/Mu Wt sc coTZR p53. Auch in den humanen T-Zellen führte die Kombination des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit der murinen MDM2₈₁₋₈₈-spezifischen TZR α Kette zu einer Abnahme der MFI γ -Werte von 34,2 (B1/B3) und 17,8 (B2/B4) auf 2,5 (B1/B3) und 1,5 (B2/B4). Die Zugabe der homologen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette resultierte ebenfalls in einer geringen Abnahme (Jurkat-76 Zellen: MFI γ 2,4 auf 1,9, humane T-Zellen: MFI γ 34,2 (B1/B3) auf 17,2 und 17,8 (B2/B4) auf 10,0), jedoch nicht in solchem Maße wie bei der MDM2₈₁₋₈₈-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette. Die humanen TZR α

Ketten schienen einen geringeren Einfluss auf die Expression des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR zu nehmen. Die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR α Kette zeigte das geringste Interaktionsverhalten mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR, so dass die Tetramerpositivität kaum beeinflusst wurde (Jurkat-76 Zellen: MFI_Y 2,4 auf 2,7, humane T-Zellen: MFI_Y 34,2 (B1/B3) auf 31,3 und 17,8 (B2/B4) auf 18,5). In Bezug auf das 2-Plasmide-retrovirale Vektorsystem war das geringere Interaktionspotential des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit einer pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR α Kette kompatibel (Abbildung 44). Es zeigte sich lediglich eine geringe V β 3-Expression mit einem MFI_Y-Wert von 1,8 im Vergleich zu MuC α /Mu Wt sc TZR p53 mit einem MFI_Y-Wert von 13,4 (2-Plasmide-retrovirales Vektorsystem). Die humanen TZR α Ketten mit den Tumorantigen-spezifitäten für gp100₂₈₀₋₂₈₈ und AML₁₄₋₂₂ reduzierten die Expression des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR vergleichbar mit der homologen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette. In den Jurkat-76 Zellen zeigte sich dies im Vergleich der MFI_Y-Werte des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR von 2,4 auf 1,5 in Kombination mit der gp100₂₈₀₋₂₈₈-spezifischen TZR α Kette bzw. auf 1,4 bei Zugabe der AML₁₄₋₂₂-spezifischen TZR α Kette. Die MFI_Y-Werte in den humanen T-Zellen erniedrigten sich von 34,2 (B1/B3) und 17,8 (B2/B4) bei der Kombination des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit der gp100₂₈₀₋₂₈₈-spezifischen TZR α Kette auf 21,1 (B1/B3) und 12,2 (B2/B4) und mit der AML₁₄₋₂₂-spezifischen TZR α Kette auf 21,0 (B1/B3) und 12,9 (B2/B4). Im Vergleich zum 2-Plasmide-retroviralen Vektorsystem (Abbildung 45/46) konnte kein vollständiger Verlust der p53-spezifischen Tetramerpositivität und folglich kein Verlust der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifität des Einzelketten-TZR beobachtet werden. Trotz geringfügiger Beeinflussung der zusätzlichen TZR α Kette konnte der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR stets spezifisch an der Zelloberfläche exprimiert werden. Die murinen TZR α Ketten führten zu einer stärkeren Beeinflussung der Expression des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR als die humanen TZR α Ketten. Hinzukommend erschien bei den humanen TZR α Ketten die Beeinflussung der Expression spezifitätsabhängig zu sein. Auch zeigte sich, dass die p53-Tetramerpositivität bei der Kombination des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit der homologen p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen TZR α Kette in einer Abnahme der p53-Tetramerpositivität resultierte

A) Jurkat-76 Zelllinie



B) Humane T-Zellen

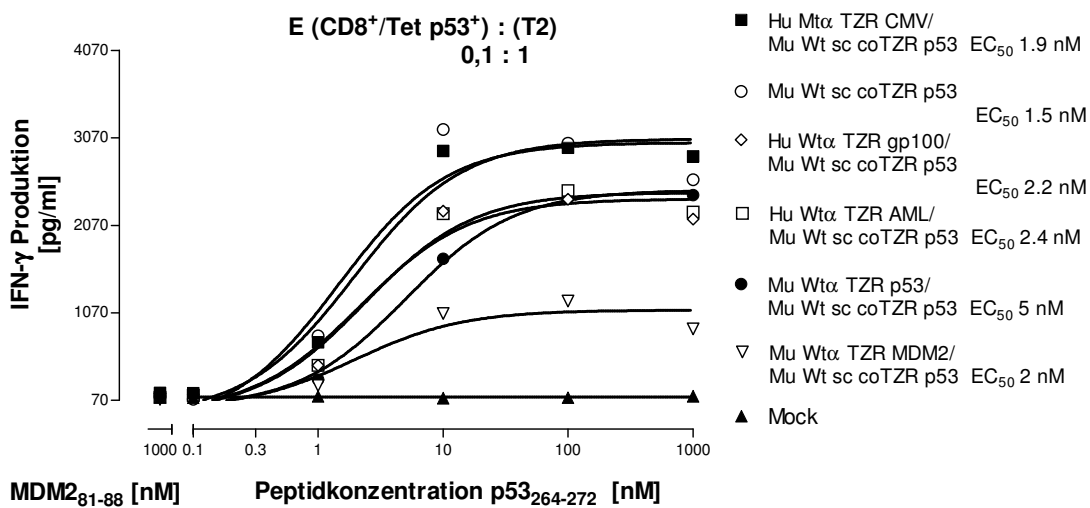


Abbildung 52: Analyse der Funktionalität des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit oder ohne die Applikation von humanen und murinen TZRα Ketten

Die Resultate waren zwischen einer nicht-kompetitiven (A) und kompetitiven (B) Situation kompatibel. Trotz geringfügiger Beeinträchtigung der applizierten humanen oder murinen TZRα Ketten blieb die Funktionalität des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR stets erhalten. Die murine MDM2₈₁₋₈₈-Tumorantigen-spezifische TZRα Kette zeigte die größte inhibitorische Wirkung. Anhand der errechneten EC₅₀-Werte wurde der Einfluss der unterschiedlichen TZRα Ketten verdeutlicht.

(Abbildung 51). Dies könnte auf einer sterischen Interaktion des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit der p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen TZR α Kette beruhen, so dass das p53-Tetramer schlechter binden konnte. Darauf folgend wurde die Funktionalität des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit und ohne zusätzliche Zugabe einer humanen oder murinen TZR α Kette untersucht (Abbildung 52). Es erfolgte die Durchführung eines Interferon- γ Freisetzungstests nach einer p53₂₆₄₋₂₇₂- und irrelevanten MDM2₈₁₋₈₈-peptidspezifischen Stimulation. Sowohl in den Jurkat-76 Zellen (A) als auch in den humanen T-Zellen (B) zeigte sich trotz der Zugabe von humanen und murinen TZR α Ketten eine gradielle Aufrechterhaltung der Spezifität des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR. Die Herunterregulation der Expression des Einzelketten-TZR (Tet p53⁺) durch die Zugabe der MDM2₈₁₋₈₈-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette, spiegelte sich auch in der stärksten Inhibition der Funktionalität wider. Bei den Jurkat-76 Zellen zeigte sich bei dem hybriden Mu Wt α TZR MDM2/Mu Wt sc coTZR p53 ein EC₅₀-Wert von 167 nM im Vergleich zum Mu Wt sc coTZR p53 mit einem EC₅₀-Wert von 40 nM. In den humanen T-Zellen konnte das Ergebnis reproduziert werden, dass der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR infolge der Interaktion mit der MDM2₈₁₋₈₈-spezifischen TZR α Kette zu einer geringeren IFN- γ -Freisetzung führte. Folglich schien die MDM2₈₁₋₈₈-Tumorantigen-spezifische TZR α Kette mit dem Einzelketten-TZR zu interagieren und dessen Funktionalität infolge geringerer spezifischer Expression zu beeinflussen. Die Applikation der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette (Jurkat-76 Zellen: EC₅₀-Wert 117 nM, humane T-Zellen: EC₅₀-Wert 5 nM) zeigte ebenfalls eine geringfügige Beeinflussung der Funktionalität und führte zur erniedrigten Freisetzung an IFN- γ . Die humanen TZR α Ketten zeigten, entsprechend ihrer detektierten Beeinflussung der Expression des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR (Tet p53⁺), eine sich widerspiegelnde geringfügige Herabsetzung der Funktionalität. Die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR α Kette (Jurkat-76 Zellen: EC₅₀-Wert 42 nM, humane T-Zellen: EC₅₀-Wert 1,9 nM) zeigte kaum eine Interaktion mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR (FACS-Analyse Tet p53⁺), was sich in kaum einer Beeinflussung der Funktionalität widerspiegelte (Jurkat-76 Zellen: EC₅₀-Wert 40 nM, humane T-Zellen: EC₅₀-Wert 1,5 nM). Die humanen TZR α Ketten für die Tumorantigen-spezifitäten gp100₂₈₀₋₂₈₈ und

insbesondere AML₁₄₋₂₂ zeigten wie in Analogie zu der p53-spezifischen Tetrameranalyse eine geringe Erniedrigung der IFN- γ Sekretion nach einer p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidspezifischen Stimulierung. Dies war sowohl in den Jurkat-76 Zellen als auch humanen T-Zellen der Fall. In den Jurkat-76 Zellen zeigte sich bei dem hybriden Hu Wt α TZR gp100/Mu Wt sc coTZR p53 ein EC₅₀-Wert von 67 nM im Vergleich zu 40 nM des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR. Dieses Ergebnis war in den humanen T-Zellen reproduzierbar mit einem EC₅₀-Wert von 2,2 nM im Vergleich zu 1,5 nM. Auch bei dem hybriden Hu Wt α TZR AML/Mu Wt sc coTZR p53 konnte in den Jurkat-76 Zellen (EC₅₀-Wert 64 nM) und in den humanen T-Zellen (EC₅₀-Wert 2,4 nM), infolge der Interaktion des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit einer humanen AML₁₄₋₂₂-spezifischen TZR α Kette, eine Beeinflussung der p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen Funktionalität nachgewiesen werden. Eine Alloreaktivität gegenüber dem MDM2₈₁₋₈₈-Tumorantigen-spezifischen Peptid konnte nicht detektiert werden. In der Tabelle 8 wurden die EC₅₀- und Bmax-Werte der retroviral transduzierten Jurkat-76 Zellen und der humanen T-Zellen gegenüber gestellt. Die EC₅₀-Werte wurden bereits im Detail miteinander verglichen, so dass auf diese im Folgenden nicht weiter eingegangen wurde. Unter dem Bmax-Wert wird ein Näherungswert verstanden, den der Kurvenverlauf theoretisch in der Sättigungsphase (Plateauphase) erreichen sollte (Abbildung 52). Die Güte, d.h. die Qualität, eines TZR wird über den EC₅₀- und Bmax-Wert (maximale Rezeptoranzahl) bestimmt. Bei den Jurkat-76 Zellen (A) zeigte sich, dass der Bmax-Wert von 741,8 pg/ml des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR durch die Interaktion mit einer MDM2₈₁₋₈₈-spezifischen (Bmax 455,8 pg/ml) sowie der homologen p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen (Bmax-Wert 606,3 pg/ml) TZR α Kette abnahm. Somit erfolgte eine Erniedrigung der Funktionalität der Jurkat-76 Zellen, die mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR in Kombination mit einer MDM2₈₁₋₈₈- oder p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen TZR α Kette transduziert waren. Bei der Interaktion des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten TZR mit humanen TZR α Ketten (Bmax-Werte: Hu Mt α TZR CMV / Mu Wt sc coTZR p53 824,8 pg/ml, Hu Wt α TZR gp100 / Mu Wt sc coTZR p53 780,6 pg/ml und Hu Wt α TZR AML / Mu Wt sc coTZR p53 648,9 pg/ml) zeigte sich eine geringere Erniedrigung der Funktionalität. Die Kombination der AML₁₄₋₂₂-spezifischen TZR α Kette und des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR schien den größten Einfluss

A) Jurkat-76 Zelllinie	EC₅₀-Werte	Bmax-Werte
Mu Wt sc coTZR p53	40 nM	741,8 pg/ml
Hu Mtα TZR CMV / Mu Wt sc coTZR p53	42 nM	824,8 pg/ml
Hu Wtα TZR gp100 / Mu Wt sc coTZR p53	67 nM	780,6 pg/ml
Hu Wtα TZR AML / Mu Wt sc coTZR p53	64 nM	648,9 pg/ml
Mu Wtα TZR p53 / Mu Wt sc coTZR p53	117 nM	606,3 pg/ml
Mu Wtα TZR MDM2 / Mu Wt sc coTZR p53	167 nM	455,8 pg/ml

B) Humane T-Zellen	EC₅₀-Werte	Bmax-Werte
Mu Wt sc coTZR p53	1,5 nM	3016 pg/ml
Hu Mtα TZR CMV / Mu Wt sc coTZR p53	1,9 nM	3058 pg/ml
Hu Wtα TZR gp100 / Mu Wt sc coTZR p53	2,2 nM	2370 pg/ml
Hu Wtα TZR AML / Mu Wt sc coTZR p53	2,4 nM	2445 pg/ml
Mu Wtα TZR p53 / Mu Wt sc coTZR p53	5 nM	2473 pg/ml
Mu Wtα TZR MDM2 / Mu Wt sc coTZR p53	2 nM	1101 pg/ml

Tabelle 8: Zusammenfassung der EC₅₀- und Bmax-Werte

Es zeigte sich sowohl in der Jurkat-76 Zelllinie (A) als auch in den humanen T-Zellen (B), dass die Interaktion des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit der MDM2₈₁₋₈₈-spezifischen TZRα Kette zu der stärksten Abnahme der Funktionalität der Zellen führte.

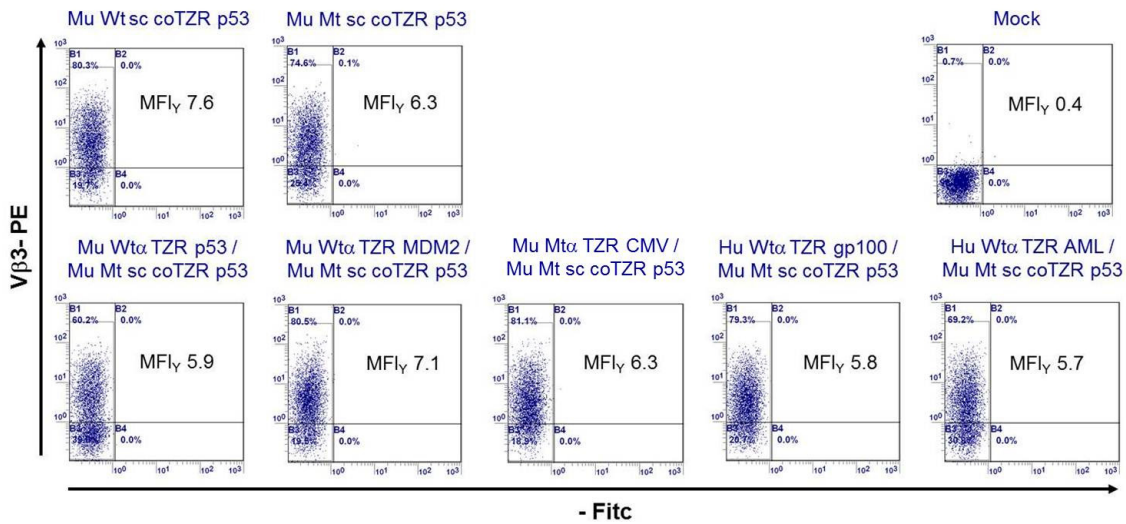
auf die spezifische IFN- γ Sekretion der Zellen zu nehmen. Bei den humanen T-Zellen (B) wurde die Funktionalität durch die Interaktion des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR (Bmax-Wert 3016 pg/ml) mit der MDM2₈₁₋₈₈-spezifischen TZR α Kette (Bmax-Wert 1101 pg/ml) am stärksten herabgesetzt. Die humane gp100₂₈₀₋₂₈₈- (Bax-Wert 2370 pg/ml) und AML₁₄₋₂₂- (Bmax-Wert 2445 pg/ml) spezifischen TZR α Ketten sowie die homologe p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische TZR α Kette (Bmax-Wert 2473 pg/ml) zeigten eine kompatible Beeinflussung der Funktionalität. Es zeigte sich eine geringere spezifische IFN- γ Sekretion der T-Zellen, die in Kombination mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR und diesen TZR α Ketten transduziert waren. Die humane pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR α Kette erschien mit einem Bmax-Wert von 3058 pg/ml keine Beeinflussung auf die Funktionalität der humanen T-Zellen zu nehmen. Insgesamt zeichnete sich auch anhand der Bmax-Werte ab, dass der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorssystems, vorzugsweise durch die Interaktion mit einer murinen MDM2₈₁₋₈₈-spezifischen TZR α Kette negativ beeinflusst wurde. Im Vergleich zum 2-Plasmide-retroviralen Vektorsystem blieb die Funktionalität des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR, kloniert auf einem 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystem stets erhalten. Bei dem 2-Plasmide-retroviralen Vektorsystem führte die Applikation einer humanen sowie murinen TZR α Kette, mit Ausnahme der homologen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette, zu einem vollständigen Verlust der Funktionalität (Abbildungen 45/46). Des Weiteren konnte, im Gegensatz zum 2-Plasmide-retroviralen Vektorsystem, im 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystem unabhängig einer kompetitiven oder nicht-kompetitiven Situation stets die Expression des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR verzeichnet werden (Abbildungen 51).

4.4.4 Gezielte Punktmutagenese des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems

Es wurde wie unter 4.4.2 beschrieben die gezielte Punktmutagenese der V α -Domäne an der Aminosäuren-Position 115 des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR durchgeführt (Anhang sowie Datenträger). Der

Aminosäureaustausch eines Adenins zu einem Cytosin resultierte in der Ausschaltung der p53-spezifischen Tetramerbindung. Im Folgenden wurde detailliert untersucht, ob die Interaktion des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR (1-Plasmid-retrovirales Vektorsystem) auf der Interaktion mit einer Volllängen-TZR α Kette, indem die V α -Domäne des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR verdrängt wird, beruhte. Es wurde analysiert, ob eine p53-spezifische Tetramerbindung mittels der Interaktion der wildtypischen p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen TZR α Kette mit dem gezielt mutierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR rekonstituiert werden konnte. Hierfür wurden die Jurkat-76 Zellen sowie die humanen T-Zellen mit dem wildtypischen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR als Kontrolle, mit dem mutierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR sowie dieser in Kombination mit murinen und humanen TZR α Ketten retroviral transduziert. Zur Analyse wurden V β 3-Färbungen durchgeführt (Abbildung 53). Insgesamt erschienen die transduzierten Jurkat-76 Zellen sowie die humanen T-Zellen positiv für die V β 3-Expression. Die Expression des mutierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR (Jurkat-76 Zellen: MFI γ 6,3, humane T-Zellen: MFI γ 47,2 (B1/B3) und 37,6 (B2/B4)) war geringfügig niedriger als die des Wildtypen (Jurkat-76 Zellen: MFI γ 7,6, humane T-Zellen: MFI γ 57,2 (B1/B3) und 43,4 (B2/B4)). Bei den Jurkat-76 Zellen zeigte sich keine große Differenz zwischen den MFI γ -Werten der Expression des mutierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR (MFI γ 6,3) und dem mutierten Einzelketten-TZR in kombinierter Transfektion mit einer murinen p53₂₆₄₋₂₇₂- (MFI γ 5,9) oder MDM2₈₁₋₈₈- (MFI γ 7,1) TZR α Kette. Auch in Kombination mit einer humanen gp100₂₈₀₋₂₈₈- (MFI γ 5,8), pp65₄₉₅₋₅₀₃- (MFI γ 6,3) oder AML₁₄₋₂₂- (MFI γ 5,7) spezifischen TZR α Kette zeigten sich im Vergleich zur Expression des Mu Mt sc coTZR p53 (MFI γ 6,3) keine hinreichenden Unterschiede. In den humanen T-Zellen verhielt sich dies etwas anders. Es zeigte sich, dass die V β 3-Expression durch eine MDM2₈₁₋₈₈-Tumorantigen-spezifische TZR α Kette (MFI γ 29,2 (B1/B3) und 23,3 (B2/B4)) sowie eine humane gp100₂₈₀₋₂₈₈-Tumorantigen-spezifische TZR α Kette (MFI γ 26,9 (B1/B3) und 23,7 (B2/B4)) im Vergleich zum Mu Mt sc coTZR p53 (MFI γ 47,2 (B1/B3) und 37,6 (B2/B4)) erniedrigt wurde. Die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR α Kette zeigte keine Beeinflussung (MFI γ 47,3 (B1/B3) und 35,9 (B2/B4)). Bei der homologen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette konnte ebenfalls eine

A) Humane Jurkat-76 Zelllinie



B) Humane T-Zellen

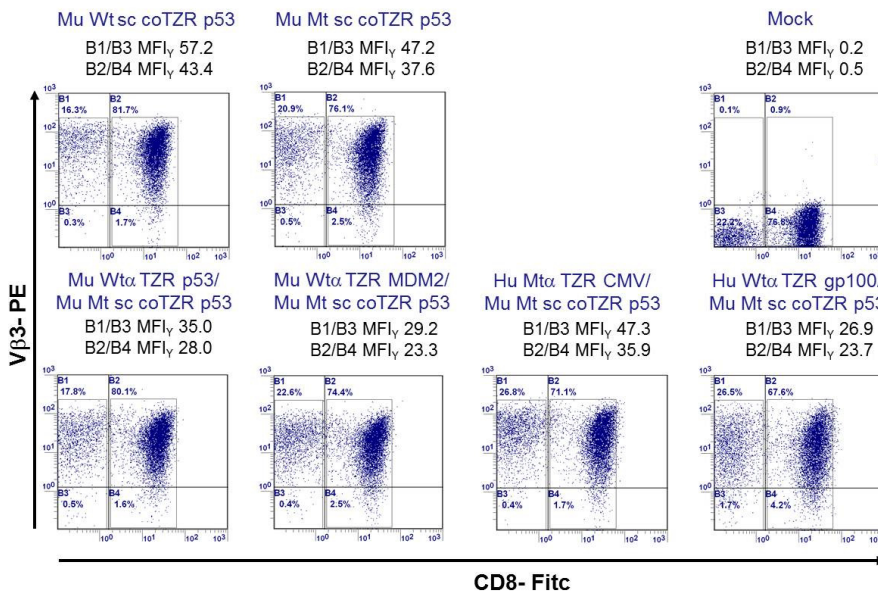
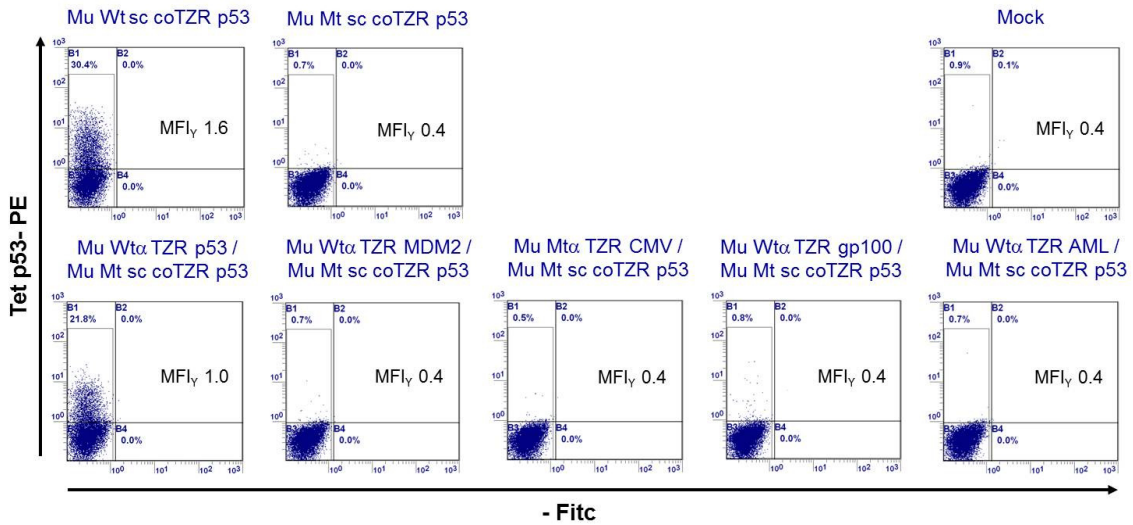


Abbildung 53: Vβ3-Expression der transduzierten Jurkat-76 Zellen und T-Zellen mit dem mutierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR sowie in kombinierter Transfektion mit humanen und murinen TZRα Ketten

Der mutierte p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR wies eine geringere Vβ3-Expression als der wildtypische auf. Der Vergleich der MFI_γ-Werte der Jurkat-76 Zellen (A) zeigte keine große Differenz, ob zusätzlich eine weitere TZRα Kette appliziert wurde. Bei den humanen T-Zellen (B) führte die Applikation einer murinen MDM2₈₁₋₈₈- und einer humanen gp100₂₈₀₋₂₈₈-Tumorantigen-spezifischen TZRα Kette zu einer Reduktion der Vβ3-Expression.

A) Humane Jurkat-76 Zelllinie



B) Humane T-Zellen

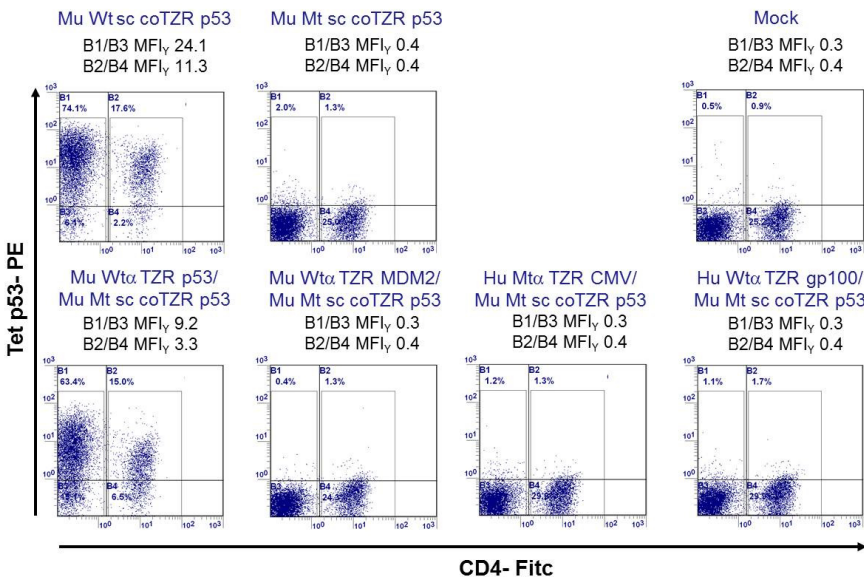
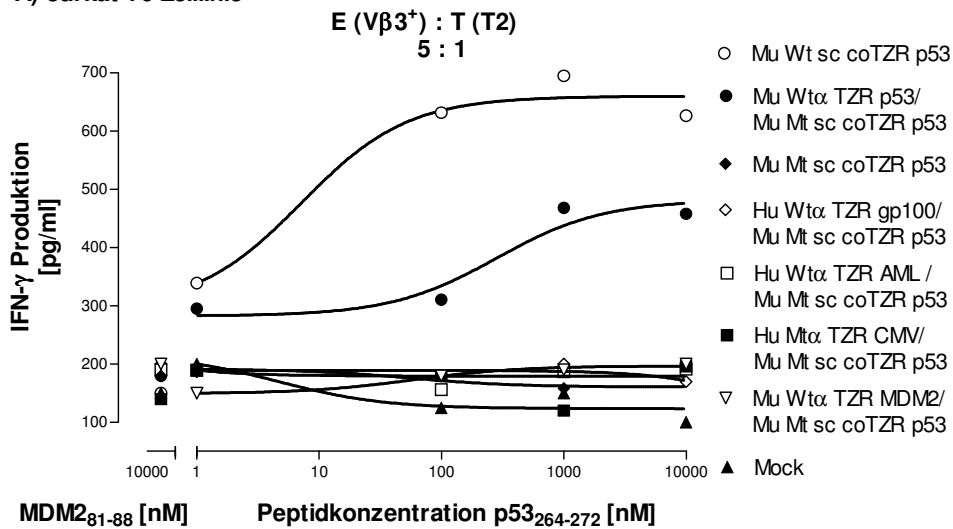


Abbildung 54: Rekonstitution der p53-spezifischen Tetramerbindung des mutierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR

Die Expression des wildtypischen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR (Mu Wt sc coTZR p53) konnte mittels der p53-spezifischen Tetramerfärbung nachgewiesen werden. Die Mutation in der Vα-Domäne des Mu Mt sc coTZR p53 führte zu der Ausschaltung der p53-spezifischen Tetramerbindung. Durch die Applikation der wildtypischen p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen TZRα Kette und dem Mu Mt sc coTZR p53 konnte diese rekonstituiert werden.

Reduktion der V β 3-Expression (MFI $_{\gamma}$ 35,0 (B1/B3) und 28,0 (B2/B4)) detektiert werden. Jedoch wesentlich geringfügiger als bei der MDM2₈₁₋₈₈-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette (MFI $_{\gamma}$ 29,2 (B1/B3) und 23,3 (B2/B4)). Diese Ergebnisse waren kompatibel mit denen aus Kapitel 4.4.2. Es sei darauf hingewiesen, dass bei den humanen T-Zellen die AML₁₄₋₂₂-Tumorantigen-spezifische TZR α Kette nicht weiter mitverwendet wurde, da diese sich meist gleich wie die gp100₂₈₀₋₂₈₈-spezifische TZR α Kette verhielt (Abbildungen 50/51). Anschließend wurden die Jurkat-76 Zellen (A) und die humanen T-Zellen (B) hinsichtlich ihrer Spezifität mittels einer p53-spezifischen Tetramerverfärbung analysiert (Abbildung 54). Es zeigte sich sowohl in den Jurkat-76 Zellen als auch in den humanen T-Zellen, dass die gezielte Punktmutagenese in der V α -Domäne des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR zu der Ausschaltung der p53-spezifischen Tetramerbindung führte. Des Weiteren erschienen alle Zellen negativ für das p53-spezifische Tetramer, die mit dem mutierten Einzelketten-TZR zusammen mit einer murinen MDM2₈₁₋₈₈-, humanen gp100₂₈₀₋₂₈₈-Tumorantigen-spezifischen oder pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR α Kette transduziert waren. Ausschließlich die Zellen, welche zusätzlich zu dem mutierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR, die wildtypische p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische TZR α Kette appliziert bekamen, zeigten die Rekonstitution der p53-spezifischen Tetramerbindung. Jedoch konnte nicht die gleiche Intensität der Tetramerspezifität erzielt werden. In den Jurkat-76 Zellen zeigte der hybride Mu Wt α TZR p53/Mu Mt sc coTZR p53 einen MFI $_{\gamma}$ -Wert von 1,0 im Vergleich zu einem MFI $_{\gamma}$ -Wert von 1,6 des wildtypischen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR. Auch in den humanen T-Zellen wies der hybride Mu Wt α TZR p53/Mu Mt sc coTZR p53 niedrigere MFI $_{\gamma}$ -Werte (9,2 (B1/B3) und 3,3 (B2/B4)) als der Mu Wt sc coTZR p53 (MFI $_{\gamma}$ -Werte 24,1 (B1/B3) und 11,3 (B2/B4)) auf. Dieses Resultat zeigte, dass der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems das Potential besitzt, mit einer Vollängen-TZR α Ketten zu agieren. Die Interaktion führte zur Verdrängung der mutationstragenden V α -Domäne des Einzelketten-TZR durch die wildtypische V α -Domäne der Vollängen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette. Im Weiteren wurde die Funktionalität in einem Interferon- γ Elisa untersucht (Abbildung 55). Es zeigte sich, dass die Mutation in der V α -Domäne des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR zum Verlust der Funktionalität führte.

A) Jurkat-76 Zelllinie



B) Humane T-Zellen

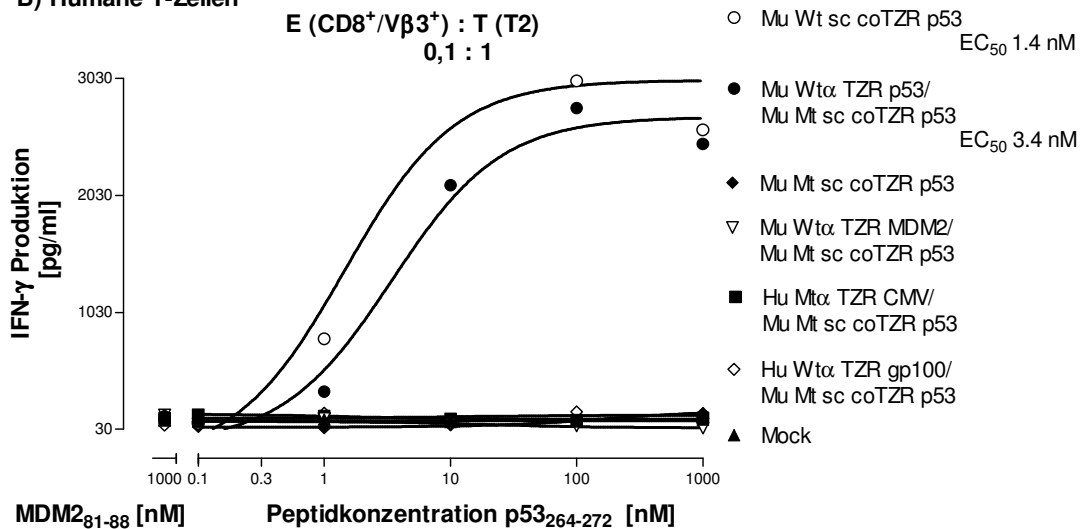


Abbildung 55: Rekonstitution der Funktionalität des mutierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR

Die Zellen, welche mit dem mutierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR transduziert waren, zeigten keine IFN-γ Sekretion nach einer p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidspezifischen Stimulierung. Die Applikation einer wildtypischen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZRα Kette rekonstituierte die Funktionalität des mutierten Einzelketten-TZR. Jedoch war diese hinsichtlich der Effizienz an sekretiertem Interferon-γ nach einer p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidspezifischen Stimulation weitaus geringer als von den Zellen, die mit dem Wildtypen (Mu Wt sc coTZR p53) transduziert waren. Eine Alloreaktivität gegenüber dem MDM2₈₁₋₈₈-Tumorantigen-spezifischen Peptid konnte nicht verzeichnet werden.

Ausschließlich die Applikation der wildtypischen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette rekonstituierte die Spezifität des mutierten Einzelketten-TZR. Diese zeigte ausgehend von den EC₅₀-Werten der humanen T-Zellen (B) eine 2,4-fach geringere Effizienz als der wildtypische p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR. Dies spiegelte sich auch in der Jurkat-76 Zelllinie (A) wider. Die Zellen, die mit dem TZR-Konstrukt bestehend aus dem mutierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR und der wildtypischen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Volllängen TZR α Kette (EC₅₀-Wert 3,4 nM) ausgestattet waren, zeigten im Vergleich zum Mu Wt sc coTZR p53 (EC₅₀-Wert 1,4 nM) eine geringere Interferon- γ Sekretion nach einer p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidspezifischen Stimulierung. Eine unspezifische IFN- γ Freisetzung nach einer irrelevanten MDM2₈₁₋₈₈-peptidspezifischen Stimulation konnte nicht verzeichnet werden. Von essentieller Bedeutung war es festzuhalten, dass die hier beobachteten Ergebnisse das Modell der Interaktion eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit einer TZR α Kette unterstützten. Jedoch konnte wie unter 4.4.2 beschrieben gezeigt werden, dass der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems, trotz eines möglichen Potentials an Fremdinteraktionen mit TZR α Ketten, vorzugsweise mit seiner eigenen Spezifität an der Zelloberfläche exprimiert wurde. Des Weiteren ließ sich kein Verlust der Funktionalität detektieren. Hinzukommend resultierten die beobachteten Interaktionen mit einer TZR α Kette vorzugsweise in der Fremdinteraktion mit einer murinen MDM2₈₁₋₈₈-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette. Bei Verwendung einer homologen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette wurde eine Interaktion forciert. Hingegen wiesen humane TZR α Ketten eine geringe bis kaum zu detektierende Interaktion mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR auf.

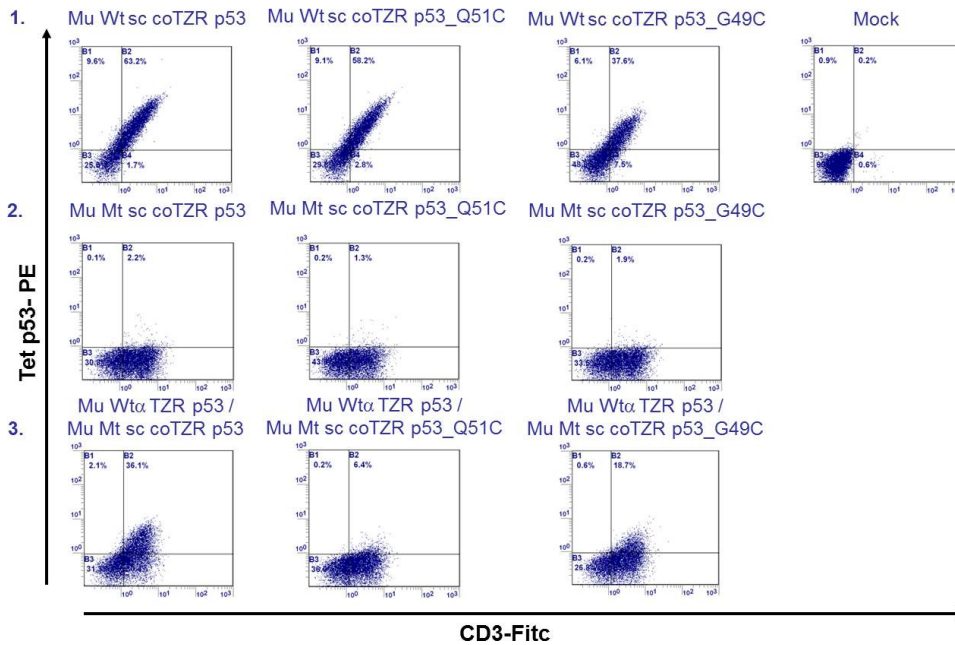
4.4.5 Optimierungsverfahren des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR zur Inhibition der Interaktion mit fremden TZR α Ketten

Die Interaktion des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR eines 2-Plasmide- oder 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems mit murinen und in einem

geringeren Maße auch mit humanen TZR α Ketten, beruhte auf eine Fremdinteraktion mit einer Vollängen-TZR α Kette. Dabei erfolgte die Verdrängung der V α -Domäne des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR, welche von der V α -Domäne der Vollängen-TZR α Kette ersetzt wurde. Es stellte sich die Frage, ob eine Optimierung der V α / V β -Bindung des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR, indem beide Domänen näher zueinander gezwungen werden, eine solche Verdrängung verhindern könnte. Im Folgenden wurde der Einbau einer zusätzlichen Disulfidbrücke mittels rationalem Protein-Design (Voss et al., 1996, 2008) und gezielter Punktmutagenese durchgeführt. Für das Klonierungsverfahren wurde der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems verwendet. Es wurden zwei Positionen für den Austausch der Aminosäuren auf der V α -Domäne des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR hinsichtlich ihrer Effizienz der Inhibition der Verdrängung der V α -Domäne ausgewählt. An der Position 49 der V α -Domäne des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR kodierten die Nukleotide für die Aminosäure Glycin, welche bewusst mittels der Veränderung des Basentriplets zu einem Cystein mutiert wurde. Entsprechend erfolgte auf diesem TZR-Konstrukt die gezielte Punktmutagenese am Ende des SL7-Linkers, indem an der Position 16 das kodierende Basentriplett für die Aminosäure Glycin in ein Cystein (G16C) formiert wurde. Die Rationale hier ist anzunehmen, dass das C-terminale Ende des Linkers bereits der V β -Domäne zuzurechnen ist und somit sozusagen eine Disulfidbrücke zwischen den V-Domänen eingerichtet wird. Den Linker zu modifizieren hat den Vorteil, die V β -Domäne selbst unverändert zu belassen, um diese möglichst nativ zu bewahren. Das erste gezielt mutierte p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR-Konstrukt wurde entsprechend der Positionen der Aminosäureaustausche in der V α -Domäne als Mu Wt sc coTZR p53_G49C bezeichnet. Das zweite p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR-Konstrukt behielt die Position des Austausches der Aminosäure auf dem SL7-Linker bei. Jedoch wurde auf der V α -Domäne des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR die Position 51 ausgewählt. Das Basentriplett kodierte für die Aminosäure Glutamin und wurde zielgerichtet in ein Cystein verändert. Das zweite gezielt mutierte p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR-Konstrukt wurde, ebenfalls entsprechend der Positionen der Aminosäureaustausche in der

V α -Domäne, als Mu Wt sc coTZR p53_Q51C bezeichnet. Auf dem Datenträger wurden die Sequenzen inklusive der Primerpaare sowie der Vergleich zwischen der Ausgangssequenz und der veränderten Nukleotidsequenz aufgeführt. Im Folgenden wurde der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR sowie die gezielt mutierten Einzelketten-TZR-Konstrukte, Mu Wt sc coTZR p53_G49C und Mu Wt sc coTZR p53_Q51C, in humane Jurkat-76 Zellen und humane T-Zellen retroviral transduziert. Ebenso erfolgte die kombinierte Transfektion der Einzelketten-TZR-Konstrukte mit der humanen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen, der murinen p53₂₆₄₋₂₇₂- und MDM2₈₁₋₈₈-Tumorantigen-spezifischen TZR α Ketten. Jedoch konnte anhand der durchgeführten FACS-Analyse kein hinreichender Aufschluss über die Effizienz der zusätzlichen Disulfidbrücke zur Inhibition der Verdrängung der V α -Domäne der Einzelketten-TZR-Konstrukte, Mu Wt sc coTZR p53_G49C und Mu Wt sc coTZR p53_Q51C, erzielt werden. Woraufhin auf die Präsentation dieser Daten verzichtet wurde. Essentieller war es, dass eine weitere Modifikation der TZR-Konstrukte durchgeführt wurde und zum gewünschten Resultat führte. Es erfolgte eine weitere zielgerichtete Punktmutagenese an der Aminosäure-Position 115 in der V α Domäne der Einzelketten-TZR-Konstrukte, Mu Wt sc coTZR p53_G49C und Mu Wt sc coTZR p53_Q51C. Die Veränderung der Nukleinbase Adenin zu einem Cytosin in der CDR3 α Schleife führte zur Modifikation des Basentriplets und resultierte in der Entstehung eines Alanins anstelle eines Aspartats. Hierdurch konnte die p53-spezifische Tetramerbindung ausgeschaltet werden (Kapitel 4.4.2 und 4.4.4). Darauffolgend wurden die humanen Jurkat-76 Zellen und die T-Zellen mit dem wildtypischen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR (Mu Wt sc coTZR p53) und den Einzelketten-TZR-Konstrukten mit integrierter zusätzlicher Disulfidbrücke (Mu Wt sc coTZR p53_G49C und Mu Wt sc coTZR p53_Q51C) retroviral transduziert. Ebenfalls erfolgte die Transduktion der mutierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR-Konstrukte, welche die Mutation in der CDR3 α Schleife der V α -Domäne zum Ausschalten der p53-spezifischen Tetramerbindung trugen (Mu Mt sc coTZR p53, Mu Mt sc coTZR p53_G49C und Mu Mt sc coTZR p53_Q51C). Hinzukommend wurden diese mutierten TZR-Konstrukte mit der wildtypischen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette kombiniert. Im Folgenden wurde untersucht, ob das Optimierungsverfahren des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR (Mu Mt sc coTZR p53_G49C und Mu Mt sc coTZR p53_Q51C) zu einer verminderten Rekonstitution der p53-spezifischen

A) Jurkat-76 Zelllinie



B) Humane T-Zellen

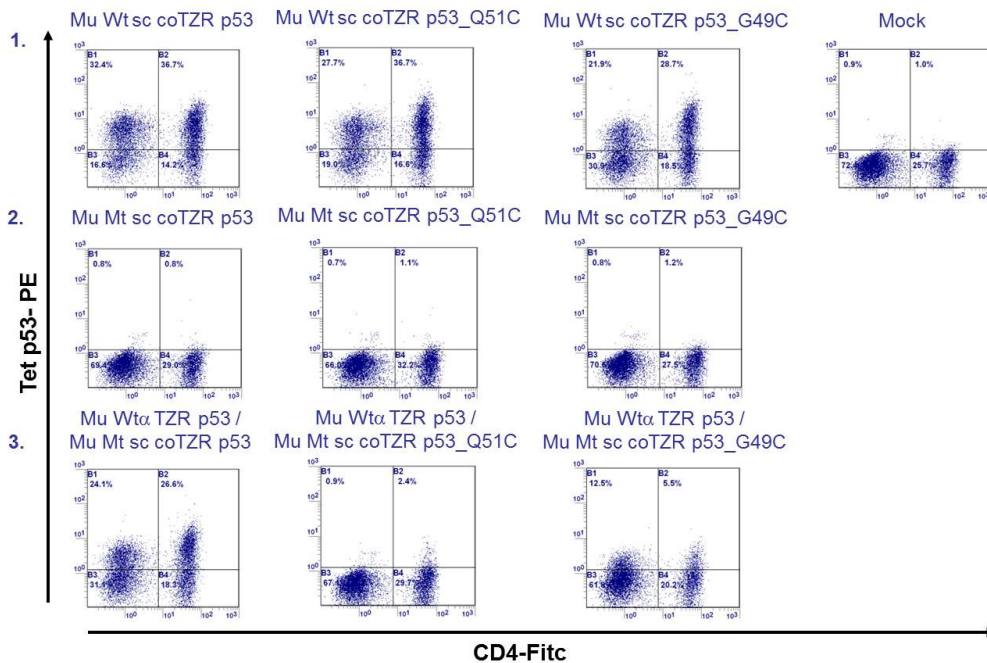
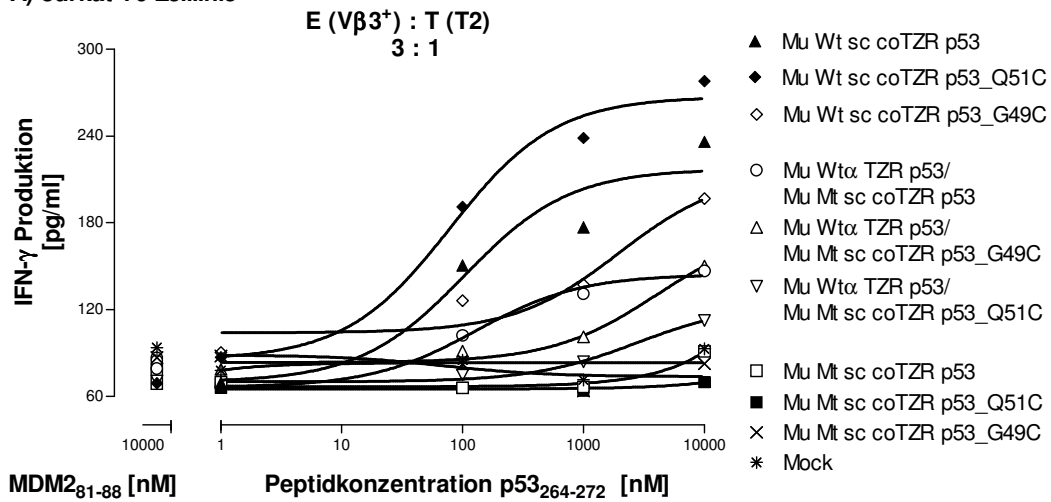


Abbildung 56: Optimierung der Vα /Vβ –Interaktion des Mu Wt sc coTZR p53

In den Jurkat-76 T-Zellen (A) zeigte sich die CD3-Oberflächenexpression im Zusammenhang mit der TZR-Expression. Sowohl in den Jurkat-76 Zellen (A) als auch in den humanen T-Zellen (B) führte die zusätzliche Disulfidbrücke, vorzugsweise an der Position 51 in der Vα-Domäne und des C-terminalen Endes des SL7-Linkers (G16C) des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR, zu einer Inhibition der Interaktion mit der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZRα Kette.

Tetramerbindung nach der Applikation einer wildtypischen p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen TZR α Kette führte. Auf die Darstellung der V β 3-Expression konnte verzichtet werden, da in den humanen Jurkat-76 Zellen mit der TZR-Expression die proportionale Hochregulation des Korezeptors CD3 erfolgte. Folglich konnte der Nachweis der Expression für die p53-spezifischen Tetramer-mutierten Einzelketten-TZR-Konstrukte durch die Ko-Färbung mit einem CD3-Antikörper durchgeführt werden. Die Kontrolle Mock zeigte in den Jurkat-76 Zellen keine CD3 Oberflächenexpression, aufgrund einer fehlenden TZR-Expression. Die Ergebnisse zwischen den humanen Jurkat-76 Zellen (A) und T-Zellen (B) waren kompatibel (Abbildung 56). Es zeigte sich, dass die Einzelketten-TZR-Konstrukte mit der zusätzlichen Disulfidbrücke zwischen der V α - und V β -Domäne (Mu Wt sc coTZR p53_G49C und Mu Wt sc coTZR p53_Q51C) vergleichbar effizient mit dem Ausgangskonstrukt (Mu Wt sc coTZR p53) exprimiert wurden (Abbildung 56 A1/B1). Eine etwas geringere Expression wies der Mu Wt sc coTZR p53_G49C auf. Die Mutation in der V α -Domäne der Einzelketten-TZR Konstrukte verlief erfolgreich, so dass eine p53-spezifische Tetramerfärbung nicht mehr möglich war (Abbildung 56 A2/B2). In den Jurkat-76 Zellen war stets eine CD3 Expression als Nachweis der Expression der mutierten Einzelketten-TZR-Konstrukte ersichtlich. Das Ausgangskonstrukt, welches dem unmodifizierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR (Mu Mt sc coTZR p53) entsprach, zeigte mit der Applikation einer wildtypischen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette in erhöhtem Maße die Rekonstitution der p53-spezifischen Tetramerbindung (Abbildung 56 A3/B3). Die Konstrukte mit der zusätzlich eingebauten Disulfidbrücke, zur Optimierung der Interaktion zwischen der V α - und V β -Domäne des Einzelketten-TZR (Mu Mt sc coTZR p53_G49C, Mu Mt sc coTZR p53_Q51C), erzielten eine substantielle Reduktion der Rekonstitution der p53-spezifischen Tetramerbindung. Mit dem Einzelketten-TZR-Konstrukt Mu Mt sc coTZR p53_G49C konnte bereits eine Reduktion erreicht werden, jedoch zeigte das Mu Mt sc coTZR p53_Q51C Konstrukt die höchste Effizienz in der Inhibition der Rekonstitution. Die Resultate implizierten die erfolgreiche Inhibition der Verdrängung der V α -Domäne des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR. Durch die zusätzliche Disulfidbrücke, vorzugsweise an der Position 51 in der V α -Domäne zu dem C-terminalen Ende des SL7-Linkers (G16C), wurde die V α / V β -Interaktion gestärkt, indem diese kovalent verbunden wurden. Diese Optimierung des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR führte zur Inhibition der Interaktion mit

A) Jurkat-76 Zelllinie



B) Humane T-Zellen

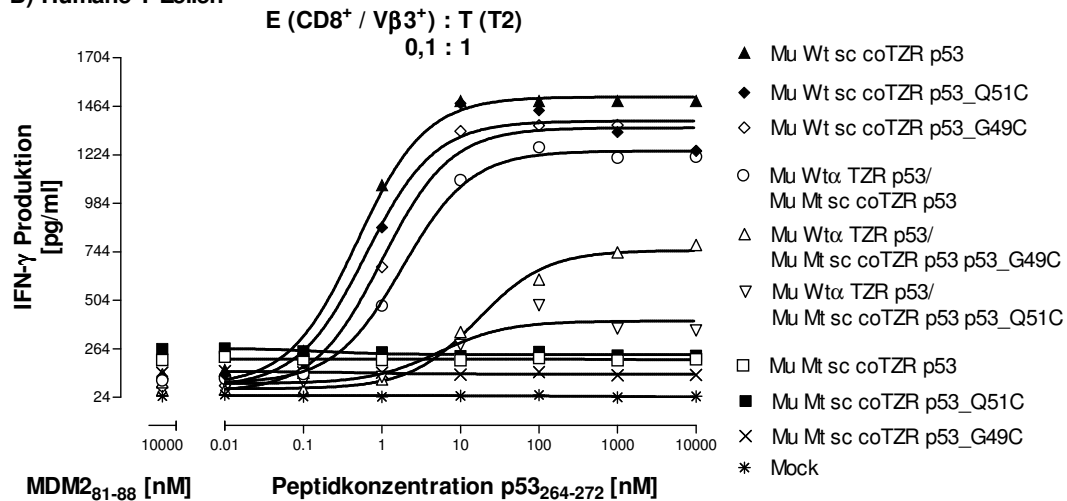


Abbildung 57: Inhibition der Rekonstitution der Funktionalität des mutierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mittels der Optimierung der V α / V β Interaktion

In den Jurkat-76 Zellen (A) zeigte sich das Einzelketten-TZR-Konstrukt Mu Wt sc coTZR p53_{Q51C} mit einer verbesserten Funktionalität. Dies ließ sich aber in den humanen T-Zellen (B) nicht reproduzieren. Essentiell war es, dass sich die Funktionalität des mutierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit zusätzlicher Modifikation einer Disulfidbrücke (Mu Mt sc coTZR p53_{G49C}, Mu Mt sc coTZR p53_{Q51C}) zusammen mit einer Mu Wt α TZR p53 nur geringfügig rekonstituieren ließ. Das Einzelketten-TZR-Konstrukt mit der Mutation an der Position 51 war am effektivsten in der Inhibition der Rekonstitution der Funktionalität (Mu Wt α TZR p53/Mu Mt sc coTZR p53_{Q51C}).

der wildtypischen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Volllängen-TZR α Kette. Hinzukommend wurden Funktionalitätsanalysen in einem Interferon- γ Elisa durchgeführt. Es wurde die Rekonstitution der Funktionalität der mutierten Einzelketten-TZR-Konstrukte (Mu Mt sc coTZR p53, Mu Mt sc coTZR p53_G49C und Mu Mt sc coTZR p53Q51C) nach der Applikation der wildtypischen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette überprüft (Abbildung 57). In den Jurkat-76 Zellen (A) schien mit dem Mu Wt sc coTZR p53_Q51C eine Effizienzsteigerung hinsichtlich der Funktionalität erzielt worden zu sein. Dies spiegelte sich jedoch nicht in den humanen T-Zellen (B) wider. Reproduzierbar und von essentieller Bedeutung war es, dass die zusätzliche Disulfidbrücke an der Position 51 in der V α -Domäne / G16C im SL7-Linker (Mu Wt α TZR p53/Mu Mt sc coTZR p53_Q51C) zu einer effizienten Inhibition der Rekonstitution der Funktionalität des mutierten Einzelketten-TZR führte. Die Mutation an der Position 49 zeigte ebenfalls einen inhibierenden Einfluss, jedoch nicht solchermaßen wie die Mutation an der Position 51. Vor allem in den humanen T-Zellen (B) konnte die effiziente inhibitorische Wirkungsweise der eingebauten Disulfidbrücke an der Position 49 oder 51 in der V α -Domäne zum C-terminalen Ende des SL7-Linker (G16C) im Vergleich zum wildtypischen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR (Mu Mt sc coTZR p53) verdeutlicht werden. Die, mit dem Mu Wt α TZR p53 / Mu Mt sc coTZR p53 TZR Konstrukt transduzierten T-Zellen sekretierten in einem erhöhten Maße IFN- γ nach einer p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidspezifischen Stimulation. Folglich konnte die Funktionalität des mutierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR (Mu Mt sc coTZR p53) effektiv wiederhergestellt werden. Die aufgeführten Resultate der FACS-Analyse spiegelten sich in der Auswertung der Funktionalität wider. Die Inhibition der Verdrängung der mutierten V α -Domäne des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR durch die Interaktion mit der wildtypischen V α -Domäne der Volllängen-p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette (Mu Wt α TZR p53), führte zur Verhinderung der Rekonstitution der Funktionalität. Die eingebaute Disulfidbrücke, vorzugsweise an der Position 51 in der V α -Domäne zum C-terminalen Ende des SL7-Linkers (G16C), optimierte die Effizienz der Interaktion zwischen der V α - und V β -Domäne des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR. Hierdurch wurde die Interaktion mit einer Volllängen-TZR α Kette minimiert. Die Analysen unterstützten das Modell der Interaktion eines p53₂₆₄₋₂₇₂-

Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit einer murinen und sehr wahrscheinlich auch mit einer humanen TZR α Kette.

4.4.6 Analyse der TZR-MHC:Peptid-Affinität des modifizierten, optimierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR

Die Optimierung des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR (Mu Wt sc coTZR p53) mit einer zusätzlichen Disulfidbrücke zwischen der V α -Domäne (Q51C) und dem C-terminalen Ende des SL7-Linkers (G16C) könnte zu einer Beeinträchtigung der TZR-MHC:Peptid-Affinität führen. Zur Analyse, ob die Modifikation des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR in einer geringeren Affinität resultierte, wurden K_D-Bestimmungen mit den TZR-Konstrukten Mu Wt sc coTZR p53 und Mu Wt sc coTZR p53_Q51C der retroviral transduzierten Jurkat-76 Zellen durchgeführt. Hierfür erfolgten konzentrationsabhängige, diluierte p53-spezifische Tetramerfärbungen (Abbildung 58). Es zeigte sich, dass die Jurkat-76 Zellen, welche mit dem Mu Wt sc coTZR p53, im Vergleich zu den Jurkat-76 Zellen, welche mit dem Mu Wt sc coTZR p53_Q51C, retroviral transduziert waren, eine nur geringfügig bessere Anfärbbarkeit mit dem p53-spezifischen Tetramer aufwiesen. Es konnte sich aber keine hinreichende Differenz in der Abnahme der p53-spezifischen Tetrameranfärbung in der Verdünnungsreihe abzeichnen. Die Bestimmung der K_D-Werte erfolgte aus der Sättigungskurve (Abbildung 59). Hierbei wurde die p53-spezifische Tetramerkonzentration gegenüber der gebundenen p53-spezifischen, durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI Tet p53) aufgetragen. Es zeigte sich, dass der Kurvenverlauf der Jurkat-76 Zellen, die mit dem Mu Wt sc coTZR p53_Q51C ausgestattet wurden, eine höhere Steigung aufzeigte als der, der transduzierten Jurkat-76 Zellen mit dem Ausgangskonstrukt Mu Wt sc coTZR p53. Jedoch konnte ein höherer Sättigungswert mit den Zellen, welche mit dem Mu Wt sc coTZR p53 transduziert waren, erzielt werden. Dieses Ergebnis war kompatibel mit der FACS-Analyse der retroviral transduzierten Jurkat-76 Zellen (Abbildung 58). Die Bestimmung der K_D-Werte erfolgte aus der halbmaximalen p53-spezifischen durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI Tet p53). Es konnte ein geringfügig niedrigerer K_D-Wert bei den Jurkat-76 Zellen, die mit dem optimierten TZR-Konstrukt Mu Wt sc coTZR p53_Q51C transduziert waren, mit einem Wert von 8,5 nM detektiert werden. Das parentale Einzelketten-Konstrukt Mu Wt sc coTZR p53

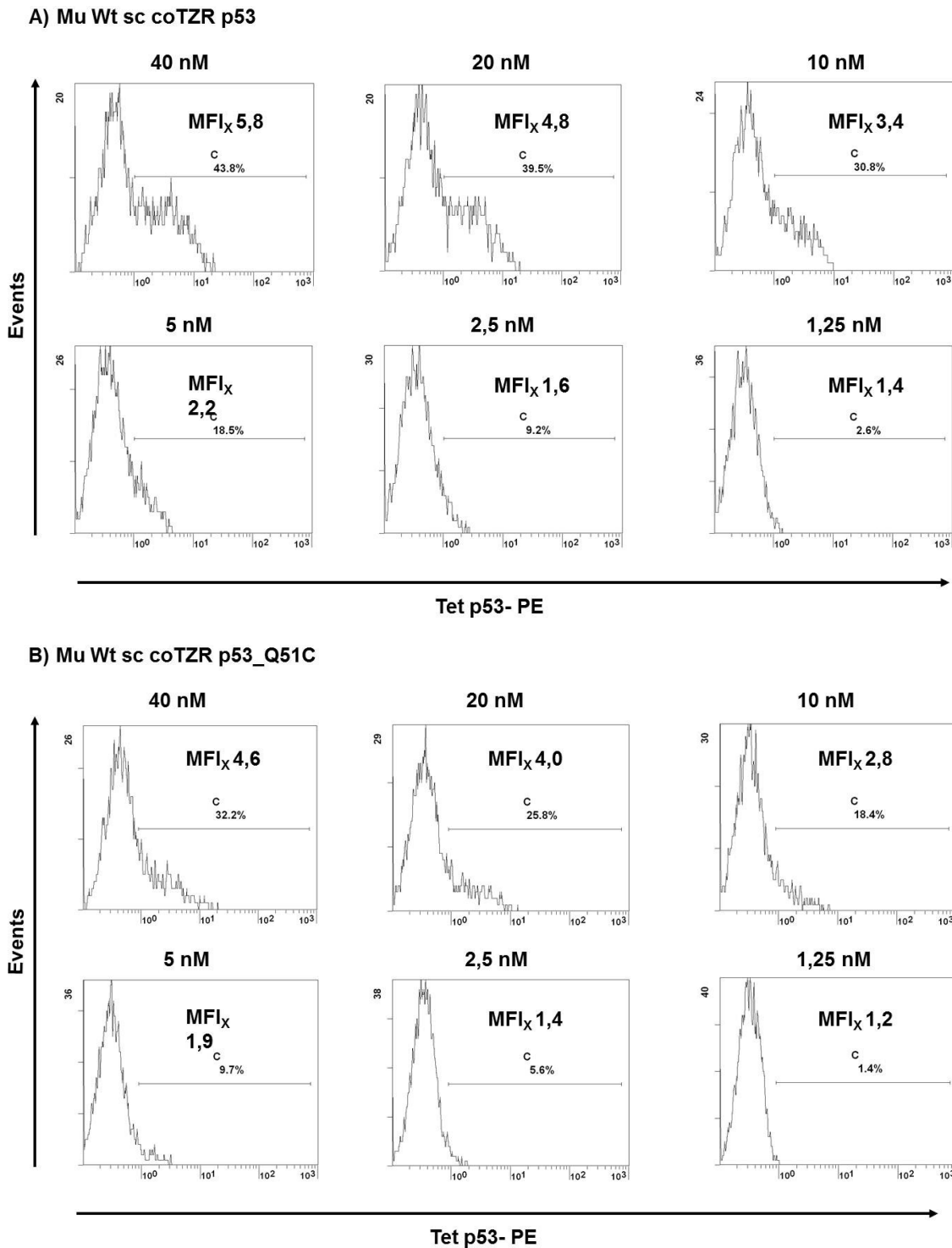


Abbildung 58: Konzentrationsabhängige p53-spezifische Tetramerfärbung

Die transduzierten Jurkat-76 Zellen, welche mit dem wildtypischen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR transduziert waren, zeigten eine höhere Anfärbbarkeit für sättigende Tet p53-Dosen im Vergleich zu den Zellen, die mit dem Mu Wt sc coTZR p53_Q51C ausgestattet wurden. Jedoch signalisierte die Abnahme der Tetramerbindung mit abnehmender Konzentration keinen hinreichenden Unterschied zwischen den beiden TZR-Konstrukten.

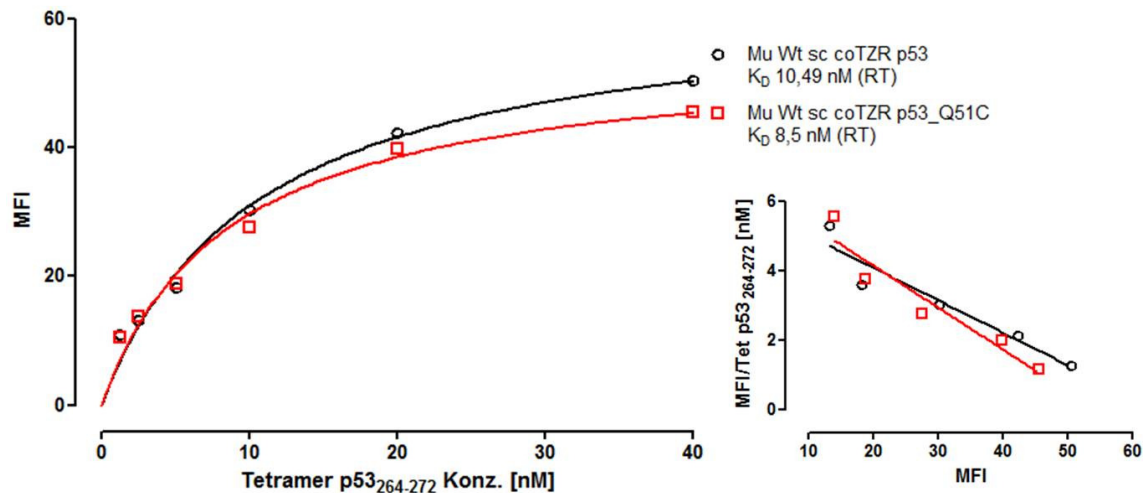


Abbildung 59: K_D -Bestimmung der TZR-Konstrukte Mu Wt sc coTZR p53 und Mu Wt sc coTZR p53_Q51C

Die p53-spezifische Tetramerkonzentration wurde gegenüber der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI/Tet p53₂₆₄₋₂₇₂) aufgetragen. Daraus ergab sich eine Sättigungskurve entsprechend der TZR-Konstrukte Mu Wt sc coTZR p53 und Mu Wt sc coTZR p53_Q51C. Die K_D -Bestimmung aus der Sättigungskurve implizierte eine kompatible TZR-MHC:Peptid-Affinität. Die Scatchard-Analyse bewies ebenso vergleichbare Dissoziationskonstanten, die an der Steigung abzulesen sind. Allerdings folgen die transformierten Werte einer leichten Krümmung, was auf Tetramer-konzentrationsabhängige Bindungsphänomene schließen läßt.

legte einen K_D -Wert von 10 nM dar. Die Modifikation des wildtypischen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR führte zu keiner Reduktion der TZR-MHC:Peptid-Affinität. Die Scatchard-Analyse, die einer Linear-Transformation der Sättigungs-Bindungsdaten durch das Auftragen des Quotienten der gebundenen und der freien Tetramer-Konzentration gegen das gebundene Tetramer entspricht, konnte die Dissoziationskonstanten in einer Linear-Regression weitgehend reproduzieren. Allerdings wies eine leichte Krümmung der Daten auf Tetramer-konzentrationsabhängige Bindungsphänomene hin.

Zusammenfassend konnte ein erhöhter Sicherheitsaspekt durch die $V\alpha$ / $V\beta$ -Optimierung des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR erzielt werden, ohne die Antigen-Erkennung zu kompromittieren.

4.4.7 Effiziente Tumorerkenkung der humanen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen T-Zellen *in vitro*

Der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems wurde hinsichtlich der effizienten Erkennung von Tumorzelllinien analysiert. Hierfür fanden die Tumorzelllinien Saos 2 /143 (Transfektante für das humane p53-Gen. Das humane p53-Gen trägt eine Mutation, die nach der Translation den Aminosäurerest 143 (V zu A) betrifft (Dittmer et al. 1993; Theobald et al. 1995) und UocB 11 Verwendung, die positiv für das wildtypische p53-Protein und das HLA-A2-Allel sind. Bei der Beladung von Zielzellen mit einer definierten Konzentration an p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischem Peptid, wurde keine reale Situation einer endogenen, proteasomalen Prozessierung von

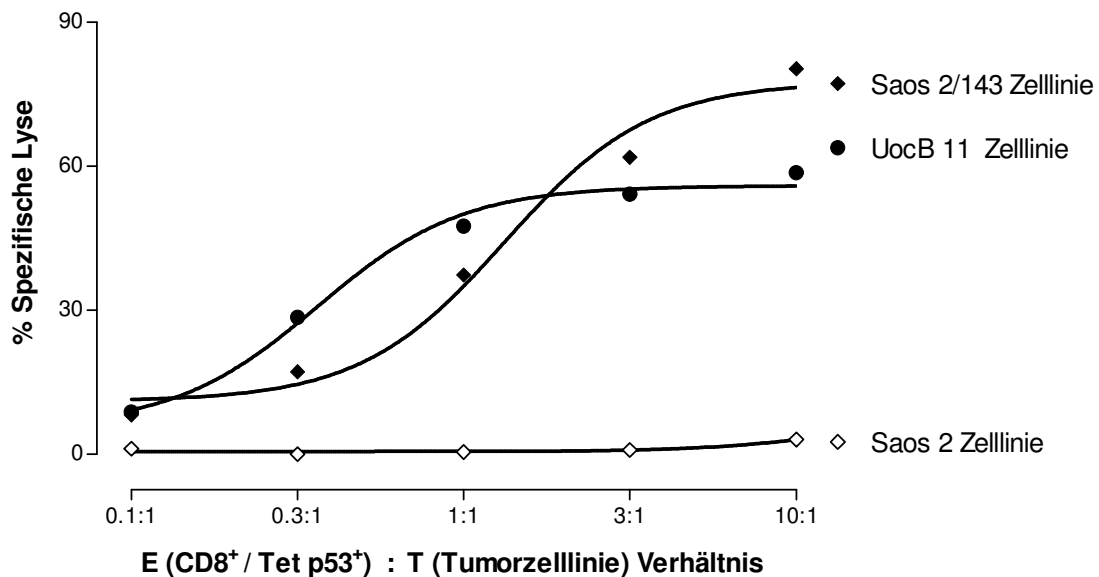


Abbildung 60: Effiziente Tumorerkenkung von p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-präsentierenden Tumorzellen mittels der retroviral generierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen T-Zellen

Die p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen humanen T-Zellen zeigten eine effiziente Lyse der Tumorzelllinien Saos 2/143 und UocB 11. Die Spezifität der Erkennung der Tumorzellen durch die T-Zellen richtete sich auf die endogene p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Peptidpräsentation. Eine Alloreaktivität gegenüber den Saos 2 Zellen konnte nicht detektiert werden.

Proteinen sowie Antigenpräsentation erzielt. Die Präsentation von endogen prozessierten Proteinen lag meist unter der, der exogenen Peptidbeladung. Von essentieller Bedeutung war die Analyse der Effektivität und Spezifität der retroviral generierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen T-Zellen hinsichtlich der Erkennung von endogenem, prozessiertem und präsentiertem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Peptid. Im Folgenden wurden humane T-Zellen mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR retroviral transduziert. Entsprechend der CD8⁺ und Tet p53⁺ Expression der transduzierten T-Zellen erfolgte die Einstellung des E:T Verhältnisses für einen ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstest (Abbildung 60). Es zeigte sich, dass die Zellen in der Lage waren effizient und effektiv die Tumorzellen zu erkennen und spezifisch zu lysieren. Als Kontrolle dienten die Saos 2 Zellen, welche nicht mit dem Gen für das p53-Protein transfiziert waren. Gegenüber diesen konnte keine Alloreaktivität detektiert werden. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass trotz einer sehr wahrscheinlich geringeren Präsentation des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Epitops an der Zelloberfläche der Tumorzellen, eine effiziente T-Zellerkennung mit entsprechender Spezifität für das p53₂₆₄₋₂₇₂-Peptid erzielt werden konnte.

Zusammenfassend konnte in dem Kapitel 4.4 dargelegt werden, dass eine Fremdinteraktion eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR eines 2-Plasmide- oder 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems mit spezifitätsfremden TZR α Ketten nicht ausgeschlossen werden konnte. Hierbei interagierte der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR mit einer Volllängen-TZR α Kette, indem die V α -Domäne des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR verdrängt wurde. Die Klonierung aller essentiellen Komponenten für die Expression des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR, d.h. inklusive der MuC α -Domäne, auf einen retroviralen pBullet-Vektor (1-Plasmid-retrovirales Vektorsystem), indizierte eine Reduktion der Fremdinteraktion. Jedoch konnte dies auch unter optimierten Bedingungen nicht ganz ausgeschlossen werden. Die Optimierung der V α / V β -Interaktion mittels dem Protein-Design im p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems förderte die spezifische TZR-Expression, ohne die TZR-MHC:Peptid-Affinität zu beeinträchtigen.

5 Diskussion

5.1 Optimierungen der TZR-Konstrukte

5.1.1 Hybride TZR und das Risiko einer „off“-zielungerichteten Autoreaktivität

Es konnte gezeigt werden, dass die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR α und - β Kette sowohl mit humanen als auch murinen TZR Ketten interagieren konnte (siehe Kapitel 4.1). Hierfür wurde die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR α und - β Kette mit spezifitätsfremden humanen und murinen TZR α und - β Ketten kombiniert. Eine TZR β Kette sollte ohne eine TZR α Kette nicht stabil an der Zelloberfläche exprimiert werden (Morgan et al. 2003; Heemskerk et al. 2004; Call und Wucherpfennig 2004). Folglich erlaubte das „Monitoring“ der TZR β Kette eine direkte Quantifizierung der Interaktion der TZR Ketten. Die Expression des wildtypischen TZR oder hybriden TZR wurde über den Nachweis der subfamilienspezifischen TZR β Kette (V β -Analyse) erbracht. Es zeigte sich sowohl unter murinen (Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ) als auch humanen (SupT1-Zelllinie) Bedingungen, dass die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR α und - β Kette durch die Interaktion mit einer humanen gp100₂₈₀₋₂₈₈-, AML₁₄₋₂₂- sowie murinen MDM2₈₁₋₈₈-, p53₂₆₄₋₂₇₂-TZR α und - β Kette an der Zelloberfläche exprimiert werden konnte (Abbildungen 9 bis 12). Die Interaktion zweier spezifitätsfremder TZR Ketten führte zur Generierung eines hybriden TZR mit unbekannter Spezifität und folglich potentiell autoreaktiven Charakter (Schumacher 2002). Somit erfolgte der Verlust der Spezifität gegenüber Tumorantigen- oder pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Zielzellen. Hierdurch könnte die neuartige Reaktivität zu einer Empfänger-gegen-Wirt-Reaktion (GvHD „*graft-versus-host disease*“) des Patienten führen. Die beobachteten Ergebnisse in Kapitel 4.1 unter nicht-kompetitiven Bedingungen (murine Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ , humane SupT1) sollten die mögliche Situation nach der retroviralen Transduktion von humanen T-Zellen widerspiegeln. Die murine und humane Zelllinie besitzt keinen endogenen TZR, so dass von einer nicht-kompetitiven Situation gesprochen werden kann. Bei den humanen T-Zellen liegt eine kompetitive Situation vor, da der exogene und endogene TZR um die Expression an der Zelloberfläche konkurrieren. Hierbei könnten ebenfalls die exogenen und endogenen TZR Ketten zu einem hybriden TZR

und einer unvorhersehbaren Spezifität führen. Das Risiko der Generierung eines hybriden TZR ist abhängig von der Beschaffenheit der endogenen TZR Ketten (Voss et al. 2008; Schumacher, 2002). Hinzukommend handelt es sich bei der Fehlpaarung nicht um einen zufälligen Prozess und ist unabhängig von der Promotoraktivität des endogenen und exogenen TZR. Das Potential der Fremdinteraktion wird vom endogenen sowie exogenen TZR bestimmt (Heemskerk et al. 2007). Zum einen könnte postuliert werden, dass die Modifikation einer polyklonalen T-Zellpopulation (10^{16}) mittels dem retroviralen Gentransfer zu einer erhöhten Diversität an neuartigen Spezifitäten führen würde (Voss et al. 2008). Folglich könnte lediglich eine geringe Fraktion an autoreaktiven T-Zellen gegenüber einem undefinierten Selbstantigen, unter MHC-abgestimmten Bedingungen, entstehen (Schumacher 2002). Zum anderen könnte aber die Entstehung von einer autoreaktiven T-Zelle und deren Expansion ausreichen, um den Tod eines Patienten durch eine GvHD auszulösen (persönliches Gespräch mit Herrn Prof. X). Da die tolerierbare Schwelle nicht bekannt ist, sollte das Ziel sein, TZR-Konstrukte mit höchster Effizienz zu optimieren und Fehlinteraktionen weitestgehend zu inhibieren. In der hier vorgelegten Dissertation wurden für die Analyse TZR-Konstrukte wildtypischer und nicht-modifizierter Natur verwendet. Folglich waren keine Kontrollmechanismen zur Inhibition einer Fehlpaarung vorhanden. Möglicherweise wäre das Resultat anders ausgefallen bei der Verwendung von modifizierten TZR-Konstrukten, so dass zwar Fehlpaarungen nachweisbar gewesen wären, aber in einem geringeren Maße. Bislang konnte eine durch hybride TZR-begünstigte Toxizität oder Autoimmunität in klinischen Studien nicht nachgewiesen werden (Zhang und Morgan 2011; Rosenberg 2010). Jedoch sollten für die klinische Anwendung, zur Limitierung des Risikopotentials, die folgenden Modifikationen eingebaut werden: Humane TZR Ketten können in den konstanten Domänen murinisiert werden (Cohen et al. 2006; Voss et al. 2006; Bialer et al. 2010; Sommermeyer et al. 2010), so dass diese vorzugsweise miteinander und weniger mit den endogenen TZR Ketten interagieren können. Des Weiteren kann eine zusätzliche, normalerweise nicht natürlich vorkommende Disulfidbrücke in den konstanten Domänen (C-Domänen) zu einer Effizienzsteigerung der exogenen TZR-Expression sowie Funktionalität führen (Kuball et al. 2007). Auch konnte gezeigt werden, dass ein bis zwei reziproke Aminosäuresubstitutionen in den C-Domänen eines TZR, die die Komplementarität der manipulierten Ketten exklusiv aufeinander abstimmen, zwar die Expression und

Funktionalität leicht verminderten, jedoch inhibitorisch auf eine Fremdinteraktion mit spezifitätsfremden TZR α und - β Ketten wirkten (Voss et al. 2008). Die Entfernung von Motiven für N-glykosidische Bindungen in den C-Domänen führte zu einer verbesserten TZR-Expression, wodurch eine erhöhte funktionale Avidität und spezifische Erkennung von Tumorzellen erzielt werden konnte (Kuball et al. 2009). Des Weiteren sind Kodonoptimierungen von essentieller Bedeutung (Scholten et al. 2006). In diesem Prozess werden Kodons modifiziert, um Gene höher exprimieren sowie kryptische Spleißseiten und RNS instabile Motive entfernen zu lassen.

Bei den hier dargelegten Analysen wurden Doppelketten-TZR-Konstrukte verwendet, welche auf einem, aus 2 Plasmiden bestehenden Vektorsystem (2-Plasmide-retrovirales System) kloniert waren. Die Interaktion der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR α und - β Kette erfolgte mit humanen (gp100₂₈₀₋₂₈₈⁻ und AML₁₄₋₂₂⁻) und murinen (MDM2₈₁₋₈₈⁻ und p53₂₆₄₋₂₇₂⁻) spezifischen TZR-Ketten (Abbildungen 9 bis 12). Es konnten keine essentiellen Unterschiede hinsichtlich der Expression des hybriden TZR im Vergleich zum Wildtypen verzeichnet werden. Hinzukommend ließ sich keine Präferenz einer Fehlinteraktion des humanen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR mit humanen TZR α und - β Ketten feststellen. Im Hinblick auf die Expression (Tabelle 3 und 4) konnte keine Aussage getroffen werden, dass ein hybrider TZR bestehend aus einer murinen und einer humanen TZR Kette eine geringere Expression aufwies. Folglich scheint der Einfluss auf die Expression eines hybriden TZR weniger von der Spezies als von der Aminosäuresequenz einer TZR Kette abzuhängen, die im Wesentlichen durch ihre Subfamilie definiert ist. Der Einfluss der Kombination der einzelnen Ketten auf die Expression wurde bereits mit einem MDM2₈₁₋₈₈⁻ und gp100₂₈₀₋₂₈₈-spezifischen TZR beschrieben (Voss et al. 2008). In dieser Publikation erfolgte die Kombination einer wildtypischen MDM2₈₁₋₈₈-spezifischen TZR α Kette mit einer wildtypischen gp100₂₈₀₋₂₈₈-spezifischen TZR β Kette sowie *vice versa* als auch die Kombination einer „knob-hole“-mutierten und wildtypischen MDM2₈₁₋₈₈⁻ sowie gp100₂₈₀₋₂₈₈-spezifischen TZR Kette. Es zeigte sich eine teils erhebliche Erniedrigung der Expression, insbesondere für die nicht-komplementären Paare Mt TZR / Wt TZR im Vergleich zu den wildtypischen TZR-Paaren. Jedoch wurde der Einfluss auf die Expression von den kombinierten TZR α und - β Ketten bestimmt. Folglich kann von einem TZR nicht eine universelle Aussage über das mögliche Interaktionsverhalten getroffen werden, da der individuelle Einfluss der endogenen TZR Ketten bisher nicht

abzusehen ist. Ein Kode, der die Interaktionen von beliebigen TZR Ketten vorhersagen kann, ist bisher nicht definiert. In der Tabelle 5 wurden die prozentualen Erhöhungen oder Erniedrigungen der Expressionen der hybriden TZR im Vergleich zum wildtypischen TZR in der murinen Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ und humanen SupT1 Zelllinie aufgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR α Kette eher zu einer Erniedrigung des hybriden TZR als zu einer Erhöhung führte. Auch könnte eine verminderte Interaktion mit einer humanen V β 14 und murinen V β 6 Subfamilie vorliegen. Die Interaktion der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR α Kette mit einer gp100₂₈₀₋₂₈₈-spezifischen TZR β Kette (V β 14) und MDM2₈₁₋₈₈-spezifischen TZR β Kette (V β 6) führte unter murinen sowie humanen Bedingungen zu einer erniedrigten Expression des hybriden TZR im Vergleich zum Wildtypen. Bei der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR β Kette könnte sich eine Hochregulation des hybriden TZR andeuten. Diese Hypothese würde im Einklang mit den Analysen eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR stehen (persönliches Gespräch mit Herrn X, unpublizierte Daten). Die Daten von Herrn Dr. X zeigten, dass die TZR β Kette in erhöhtem Maße zu einer Fehlpaarung führen konnte. Hierbei zeigte sich in *in vivo* Versuchen, dass die Mäuse an einer Empfänger-gegen-Wirt-Erkrankung („*graft-versus-host disease*“ (GvHD)) erkrankten, welche retroviral transduzierte Maus-T-Zellen mit der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR β Kette appliziert bekamen. Interessanterweise ließ sich dies nicht mit einer p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette beobachten. Folglich könnte von einer TZR β Kette eher das Potential ausgehen mit einer fremden TZR α Kette zu interagieren und eine Expression des hybriden TZR zu begünstigen. Diese Beobachtung könnte sich auch in den hier dargelegten Daten abzeichnen (Tabelle 5). Möglicherweise könnten mehr TZR β -Subfamilien vorkommen, die mit einer beliebigen TZR α Kette eine Verstärkung der Expression bedingen und mehr TZR α -Subfamilien, die mit einer beliebigen TZR β Kette zu einer Verringerung der Expression führen.

Ein weiterer Sicherheitsaspekt wäre die Verwendung eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems (Kapitel 4.3.2.4), vorzugsweise mit dem integrierten F2A-Element (Szymczak et al 2004). Mit der Modifikation eines humanen LMP2-spezifischen TZR konnte mittels der Murinisierung der konstanten Domänen, Kodonoptimierung sowie dem 2A-Element aus einem schwachen TZR eine effiziente TZR-Expression erzielt werden (Hart et al. 2008). Die Vorversuche hinsichtlich des Interaktionsverhaltens

eines pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten-TZR implizierten dessen Potential mit fremden TZR Ketten interagieren zu können. Aus diesem Grund wurden für die Generierung von bi-spezifischen T-Zellen, Doppelketten-TZR-Konstrukte mit einem möglichst geringen Potential einer Fremdinteraktion verwendet. Somit fanden 1-Plasmid-retrovirale Vektorsysteme mit integriertem F2A-Element, Kodonoptimierung, Murinisierungen sowie der zusätzlichen Disulfidbrücke in den C-Domänen Verwendung. Alternativ wurden Einzelketten-TZR-Konstrukte generiert.

5.1.2 Essentielle Faktoren der TZR-Avidität

In der gezielten Punktmutagenese eines pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten-TZR konnten neuartige TZR generiert werden. Die Substitutionen der Aminosäuren waren zum einen kurz vor der hypervariablen CDR3 α Sequenz (Austausch einer CAR- gegen eine CAS-Sequenz) und zum anderen innerhalb der CDR3 β Region (Austausch an der 2. Position eines Serins gegen ein Prolin sowie an der 8. Position der Austausch eines Asparagin gegen ein Histidin) gelegen (Tabelle 6). Die CDR3 Regionen weisen eine hohe Variabilität auf und dienen insbesondere dem direkten Kontakt mit dem Peptid (Jones et al. 2008; Varani et al. 2007; Garcia und Teyton 1998). Insgesamt sind 6 CDRs an der Bildung der α - und β -Kette des heterodimeren TZR-Moleküls involviert. Diese Regionen werden an der Zelloberfläche exprimiert und spielen eine primäre Rolle in der antigenspezifischen Registrierung durch den TZR sowie in der Kontaktfähigkeit mit dem Peptid-MHC-Komplex (Robbins et al. 2008). Hinzukommend konnten Robbins et al. zeigen, dass mit geringfügigen Aminosäuresubstitutionen in der CDR2 oder CDR3 Region eine Zunahme der Affinität des TZR sowie eine signifikante Steigerung der Fähigkeit zur Erkennung des Peptid-MHC-Komplexes erreicht werden kann.

Mit der hier dargelegten gezielten Punktmutagenese eines pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR (Hu Wt TZR CMV) konnte die Expression des mutierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten-TZR (Hu Mt TZR CMV) sowie des hybriden TZR (Hu Wt α TZR CMV/Hu Mt β TZR CMV) unter nicht-kompetitiven Bedingungen in der murinen Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ sowie humanen SupT1 und Jurkat-76 Zelllinie verbessert werden (Abbildungen 13, 15 und 16). Der hybride TZR (Hu Wt α TZR CMV/Hu Mt β TZR CMV) wurde stärker als der mutierte pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische

Doppelketten-TZR (Hu Mt TZR CMV) an der Zelloberfläche exprimiert (Tet pp65⁺). Unter kompetitiven Bedingungen (humane T-Zellen) zeigte sich eine vergleichbare Expression des Hu Mt TZR CMV und Hu Wt α TZR CMV/Hu Mt β TZR CMV. Im Vergleich zum wildtypischen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR (Hu Wt TZR CMV) fiel die Expression an der Zelloberfläche höher aus (Abbildung 18). Lediglich in der murinen Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ spiegelte sich mit der gesteigerten Expression des hybriden Hu Wt α TZR CMV/Hu Mt β TZR CMV eine geförderte Funktionalität in der IL-2 Sekretion wider (Abbildung 14). Unter humanen Bedingungen konnte dies nicht reproduziert werden (Abbildungen 17 und 19). In Folge dessen, dass sowohl unter nicht-kompetitiven (Abbildung 17: Jurkat-76 Zellen) als auch kompetitiven Bedingungen (Abbildung 19: humane T-Zellen) die erhöhte Expression des hybriden TZR (Hu Wt α TZR CMV/Hu Mt β TZR CMV) nicht in einer gesteigerten IFN- γ Sekretion bzw. Lyse der Zielzellen resultierte, könnte die unterschiedliche Funktionalität des Hu Wt α TZR CMV/Hu Mt β TZR CMV auf murine und humane Bedingungen zurückgeführt werden. Hinzukommend wurden unterschiedliche Zytokin-Sekretionen analysiert, wodurch sich ebenfalls Unterschiede ergeben könnten. Jedoch sekretieren die murinen Hybridomzellen 58 $\alpha\beta$ CD3 ζ kein IFN- γ , so dass auf einen IL-2 ELISA als Funktionsanalyse zurückgegriffen werden musste. Letztlich zeigte sich aber, dass unter humanen Bedingungen reproduzierbare Daten hinsichtlich der Expression und Funktionalität vorlagen. Sowohl unter murinen als auch humanen Bedingungen konnte die gesteigerte Expression und vergleichbare Funktionalität des mutierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR im Vergleich zum wildtypischen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR verzeichnet werden (Abbildungen 13-19). Insgesamt erschien die Expression der neuartigen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR-Konstrukte unabhängig von einer kompetitiven oder nicht-kompetitiven Situation. Folglich können intrinsische Faktoren, d.h. die bessere Interaktion mit dem CD3 Rezeptor, keine Rolle spielen (Heemskerk et al. 2007). Hinzukommend zeigte sich bei dem wildtypischen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR sowie des hybriden TZR, bestehend aus der mutierten TZR α und der wildtypischen TZR β Kette, unter murinen und humanen sowie unabhängig einer nicht-kompetitiven und kompetitiven Situation eine Korrelation der Expression und Funktionalität (Abbildungen 13-19). Die geringe Expression (Abbildungen 13, 16, 18) dieses hybriden TZR (Hu Mt α TZR CMV/Hu Wt β TZR CMV) zeigte sich auch in einer insuffizienten Funktionalität (Abbildungen 14, 17, 19). Lediglich die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR-Konstrukte, welche die modifizierte

TZR β Kette mit den Aminosäuresubstitutionen in der CDR3 β Region enthielten, zeigten eine erhöhte TZR-Expression. Folglich könnten die Aminosäureaustausche an den Positionen 2 und 8 in der CDR3 β Schleife zu einer sterisch als auch elektrostatisch begünstigten Interaktion mit einer „fremden“ TZR α Kette (Hu Wt α TZR CMV) und damit Expression führen. Andererseits könnte sich dies in einer verminderten pp65-spezifischen Tetramerpositivität sowie Funktionalität widerspiegeln (Abbildungen 13-19), indem sich ein Nachteil hinsichtlich der Interaktion mit dem Peptid-MHC-Komplex ergeben könnte. Die signifikante Rolle der CDR3 α Region auf die Effizienz der Expression konnte bereits gezeigt werden, indem 5 Aminosäuren in der CDR3 Region die Interaktion der TZR α und - β Kette beeinflussen und zu einer Reduktion des kompetitiven Potentials führen konnten (Heemskerk et al. 2007). In den hier dargelegten Ergebnissen zeigte sich, dass der Austausch einer CAR- zu einer CAS-Sequenz kurz vor der CDR3 α Schleife (Tabelle 6), d.h. die Substitution einer größeren basischen Aminosäure Arginin zu einer kleineren polaren Aminosäure Serin, zu einer verminderten Interaktion mit einer „fremden“ TZR β Kette (Hu Wt β TZR CMV) führte. Die Seitenkette, der auf das Cystein (C) folgenden zweiten Aminosäure in murinen und humanen TZR-Kristallstrukturen zeigt stets zur inneren β -Faltblatt-Struktur der V-Domäne und nicht in Richtung der TZR β , so dass der Austausch höchstens eine indirekte Verbesserung der Interaktion bedingt (Abbildungen 13-19). Besonders deutlich konnte anhand der FACS-Analyse der transduzierten humanen Jurkat-76 Zellen gezeigt werden, wie der CD3 Rezeptor proportional mit der TZR-Expression hochreguliert wird. Die niedrigere Expression des hybriden Hu Mt α TZR CMV/Hu Wt β TZR CMV spiegelte sich auch in einer geringeren CD3 Expression wider (Abbildung 16). Heemskerk et al. (2007) zeigte, dass die Bindungsaffinität zweier TZR Ketten von den variablen Domänen, den Subfamilien sowie der CDR3 Region bestimmt wird. Unter Berücksichtigung der gleichen Subfamilienzugehörigkeit der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR zeigte sich, dass Substitutionen von Aminosäuren in den CDR3 β Regionen die Expression eines TZR (Tetpp65⁺) erhöhen können (Abbildungen 13, 16, 18), jedoch ggf. aufgrund der Veränderung der Peptidbindungsstelle, mit einer geringeren Spezifität zu rechnen ist (Abbildungen 14, 17, 19). Folglich würde eine verbesserte strukturelle Avidität nicht zwangsläufig zu einer funktionellen Avidität führen. Zur Bestätigung dieser Aussage müssten weitere pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR-Konstrukte hinsichtlich der CDR3 α und

- β Region analysiert werden, um potentielle Aminosäuren zu identifizieren, die sowohl in einer gesteigerten Expression als auch Funktionalität resultieren. In einer medizinischen Doktorarbeit von Herrn X (Arbeitsgruppe von Herrn Dr. X, konnte dargelegt werden, dass Mutationen in der CDR3 Schleife eines Doppelketten-TZR der Spezifität p53₂₆₄₋₂₇₂ zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Funktionalität führen konnte. Diese unpublizierten Daten von Herrn X und Herrn Dr. X stehen im Einklang mit den hier dargelegten Ergebnissen. Im Vergleich zu den C-Domänen konnte nachgewiesen werden, dass bestimmte Aminosäureaustausche und Aminosäurepositionen einen kritischen Einfluss auf die TZR α und - β Paarung nehmen können (Voss et al. 2008). Im Gegensatz zu den variablen CDR3 Regionen konnte von der Modifikation der C-Domänen eines TZR direkt von der strukturellen auf die funktionelle Avidität geschlossen werden (Voss et al. 2008). Es ist zu berücksichtigen, dass die C-Domänen distal zur Antigen-Bindungsstelle liegen, und die CDR3 Schleifen eine Doppelfunktion in der Kettenpaarung und Antigenbindung einnehmen.

Im Weiteren wurde die Kodonoptimierung des wildtypischen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR eines 2-Plasmide-retroviralen Vektorsystems durchgeführt (Kapitel 4.2.2). Es konnte eine effizientere Expression (MFI CD8⁺ 5,7) und Funktionalität im Vergleich zum wildtypischen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR (MFI CD8⁺ 4,5) erzielt werden (Abbildungen 20 und 21). Interessanterweise führte wiederum die Kombination der Kodon-optimierten TZR α mit der mutierten TZR β Kette (MFI CD8⁺ 7,2) zu einer Steigerung der Expression im Vergleich zu Hu Wt coTZR CMV (MFI CD8⁺ 5,7) (Tetpp65⁺). Jedoch resultierte die höhere TZR-Expression nicht in einer effizienteren Funktionalität (Abbildung 21). Dieses Resultat war kompatibel mit den vorherigen und verdeutlichte den positiven Einfluss der CDR3 β Region auf die Expression, aber nicht auf die TZR-Affinität. Der Kodon-optimierte pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR (MFI CD8⁺ 5,7) wurde geringer als der mutierte pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR (MFI CD8⁺ 20,3) an der Zelloberfläche exprimiert. Jedoch konnte im Vergleich zum Ausgangsprodukt Hu Wt TZR CMV (EC₅₀: 0,07 nM *versus* 0,05 nM des kodonoptimierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR) eine effizientere IFN- γ Sekretion erzielt werden (Abbildung 21). Die Avidität eines TZR wird jedoch nicht nur von der Anzahl der TZR auf der Zelloberfläche, sondern vor allem von der Affinität des TZR mitbestimmt (Labrecque et al. 2001). Es konnte bereits *in vitro* gezeigt werden, dass 200 bis 400 TZR-Moleküle auf der Zelloberfläche nach einer Stimulierung mit anti-

CD3 Antikörpern-beladenen ferromagnetischen Kügelchen („Beads“) zu einem nachweisbaren Ca^{2+} -Einstrom führen konnten (Wei et al. 1999). Ebenso ist eine geringe Anzahl an aktiven TZR notwendig, um *in vitro* eine suffiziente Erkennung von ZTL Klonen zu erzielen (Schodin et al. 1996).

Im Weiteren wurde ein pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischer Einzelketten-TZR eines 2-Plasmide-retroviralen Vektorsystems generiert (Daten von Herrn Dr. X und hinsichtlich der Expression und Funktionalität analysiert (Kapitel 4.2.3). Interessanterweise konnte ein pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischer Einzelketten-TZR nicht mittels einer pp65-spezifischen Tetramer-Analyse nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies konnte wahrscheinlich darauf zurückgeführt werden, dass die V α - und V β -Interaktion schwach war und somit die Domänen voneinander dissoziieren konnten. Folglich führte die schwache Interaktion der variablen (V)-Domänen zu einer unzureichenden intrinsischen Stabilität des Einzelketten-TZR. Der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Einzelketten-TZR war nicht effizient konkurrenzfähig gegenüber den endogenen TZR Ketten und wurde von der Zelloberfläche verdrängt bzw. konnte erst gar nicht zur Zelloberfläche gelangen. Ebenfalls ließ sich feststellen, dass erst nach wiederholten pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen Stimulierungen der T-Zellen eine zunehmende Hochregulation des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Einzelketten-TZR erfolgte (Abbildung 22: Nachweis über die Zunahme der Mu TZR β Expression). Der Nachweis der Expression des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Einzelketten-TZR an der Zelloberfläche im Zuge der pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidspezifischen Stimulierungen könnte auf eine Zunahme der retroviralen Expression liegen. Somit könnte eine kompromitierte Stabilität durch das Expressionssystem zumindest teilweise kompensiert werden. Es wurde bereits publiziert, dass mittels einer peptidspezifischen Stimulierung, ein TZR hinsichtlich seines Expressionsverhaltens beeinflusst werden kann. HA-2-TZR-transferierte CMV-spezifische T-Zellen exprimierten in erhöhtem Maße den exogenen antileukämischen TZR und lediglich geringfügig den endogenen CMV-spezifischen TZR. Jedoch konnte mittels einer gezielten Stimulierung des exogenen bzw. endogenen oder beider TZR das Verhältnis der Expression reguliert werden (van Loenen et al. 2009). In Hinblick auf die dargelegten Ergebnisse, konnte auch die Expression des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Einzelketten-TZR durch das pp65₄₉₅₋₅₀₃-Antigen-spezifische Stimulieren bzw. Ansprechen der T-Zellen erhöht werden. Auch wurde eine pp65₄₉₅₋₅₀₃-Spezifität in einem ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstest nachgewiesen (Abbildung 23).

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Qualität eines TZR nicht nur von dessen Expression an der Zelloberfläche, sondern auch von dem TZR:MHC-Peptid-Komplex abhängig ist. Die Modifikationen zur Optimierung der TZR-Expression sowie die Inhibition von Fehlpaarung mit den endogenen TZR α und - β Ketten, können einen bewussten Einfluss auf die Funktionalität des TZR nehmen. Das komplexe und faszinierende Zusammenspiel all dieser Komponenten, lässt den Rückschluss zu, dass ein TZR, der für die zelluläre Immuntherapie geeignet sein soll, stark kompetitiv um seine eigene Expression sein sollte sowie eine suffiziente TZR-Avidität zum MHC-Peptid-Komplex aufweisen müsste. Hinzukommend sollten Modifikationen, die eine Fehlinteraktion mit spezifitätsfremden TZR α und - β Ketten inhibieren, aber gleichzeitig die Expression als auch Antigenbindung nicht negativ beeinflussen, eingefügt werden.

5.2 Generierung von bi-spezifischen T-Zellen

5.2.1 HCMV-seropositiver Status von Donor und Rezipient

Die erste Methode beschäftigte sich mit der Situation, dass der Donor und Rezipient einen HCMV-seropositiven Status aufzeigten. In dieser Konstellation ist davon auszugehen, dass in der Spender-T-Zellpopulation HCMV-reaktive T-Zellen enthalten sind. Zur Realisierung einer HCMV- und Tumor-Abwehr, könnten HCMV positive T-Zellen des Donors isoliert und mit einem Tumorantigen-spezifischen TZR ausgestattet werden. Die dargelegten Resultate belegten die erfolgreiche Isolation sowie Expansion von CMV-pp65_(NLVPMVATV)₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen (Abbildungen 25, 27-30). Die selbstgenerierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen sowie der T21 HCMV-T-Zellklon zeigten eine effiziente Lyse von pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidbeladenen Zielzellen in einem ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstest (Abbildungen 26 und 31). Hinzukommend konnte eine spezifische Zellyse von HCMV-infizierten humanen Fibroblasten verzeichnet werden, die endogen prozessiertes pp65₄₉₅₋₅₀₃-Peptid an der Zelloberfläche exprimierten (Abbildung 32). Folglich kennzeichnete die selbstgenerierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen eine effiziente pp65₄₉₅₋₅₀₃-Spezifität, die sich nicht nur in der Lyse von pp65₄₉₅₋₅₀₃-peptidbeladenen Zielzellen, sondern gerade bei der endogenen Peptidpräsentation verdeutlichte.

Anschließend erfolgte die Modifikation der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen mit einem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR. Hierfür wurden zum einen der RNS Transfer (Abbildung 33) und zum anderen die retrovirale Transduktion (Abbildung 35) angewendet. Bereits im Jahr 2004 konnte gezeigt werden, dass HCMV-spezifische T-Zellen in leukämieaktive T-Zellen gegen das mHag HA-2, ohne den Verlust der endogenen Spezifität reprogrammiert werden konnten (Heemkerk et al. 2004). Hinzukommend zeichnete sich die Entwicklung der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellkultur in Richtung einer Oligo- und Monoklonalität ab (Tabelle 7). Durch diesen Status ergibt sich ein limitiertes endogenes TZR-Repertoire, wodurch die Zellen attraktiv für den TZR-Gentransfer werden. Die Möglichkeit an der Entstehung unbekannter Spezifitäten durch hybride TZR, bestehend aus den endogenen und exogenen TZR Ketten und den daraus resultierenden gesundheitsschädlichen Immunreaktionen, würden eingeschränkt werden. Somit würde eine Minimierung an autoreaktiven T-Zellen erfolgen (Heemkerk et al. 2004). Nach der retroviralen Transduktion konnten pp65₄₉₅₋₅₀₃⁻ und p53₂₆₄₋₂₇₂-bi-spezifische sowie lediglich den exogenen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR exprimierende T-Zellen detektiert werden (Abbildung 35). Auch konnte eine geringe Anzahl an Zellen verzeichnet werden, welche lediglich den endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR exprimierten. Durch die retrovirale Transduktion der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen erfolgte eine Konkurrenz zwischen dem endogenen und exogenen TZR. Einen murinen TZR, in diesem Fall der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische TZR, kennzeichnet eine effiziente Konkurrenzfähigkeit. Es konnte bereits für einen humanen MART-1- und gp100-spezifischen TZR gezeigt werden, dass nach der Murinisierung der C-Domänen eine verbesserte TZR-Expression erzielt werden konnte. Die partielle Humanisierung der C-Domänen eines murinen MDM2-spezifischen TZR erniedrigte die TZR-Expression (Voss et al. 2006; Cohen et al. 2006). Genau diese Situation spiegelte sich in unseren Analysen wider, indem der endogene humane pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR entweder zusammen mit dem exogenen murinen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR an der Zelloberfläche exprimiert werden konnte, oder aber lediglich der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische TZR, indem der endogene TZR verdrängt wurde (Abbildung 35). Es stellte sich nun die Frage, welche Faktoren die Expression eines TZR begünstigen sowie warum ein muriner TZR eine höhere Konkurrenz aufweisen könnte. Zum einen sind intrinsische Faktoren von essentieller Bedeutung, d.h. wie effizient der

TZR mit dem CD3 Rezeptor interagieren kann und an der Oberfläche zusammen exprimiert wird (Heemskerk et al. 2007). Folglich stellt der CD3 Rezeptor einen limitierenden Faktor dar, welcher nur begrenzt exprimiert vorliegt (Sommermeyer und Uckert 2010). Es konnte gezeigt werden, dass der Kotransfer von CD3- und TZR-Genen in primäre Maus-T-Zellen die TZR-Expression sowie antigenspezifische T-Zellfunktion erhöhen können (Ahmadi et al. 2011). In einem Versuch mit $\gamma\delta$ -T-Zellen konnte mittels der retroviralen Transduktion von 3 unterschiedlichen TZR dargelegt werden, dass durch die fehlende Interaktion der TZR α und - β Ketten mit dem CD3 Rezeptor, die Ketten anfälliger für die Proteolyse im endoplasmatischen Retikulum waren (Heemskerk et al. 2007). Hinzukommend konnte gezeigt werden, dass neben der notwendigen CD3 Interaktion, es auch von der TZR-Ketten-Affinität abhängt, wie gut sich die zueinander gehörenden Ketten finden und inwiefern eine Fehlinteraktion erfolgen kann. Folglich hängt die Ko-Expression zweier TZR sowohl von dem endogenen als auch exogenen TZR ab. Zum anderen wurde publiziert, dass murine C-Domänen zu einer besseren nicht-kovalenten Bindung mit dem CD3 Rezeptor befähigt sind. Hierfür wurde mit dem milden Detergenz NP40 die TZR-CD3 Interaktion gestört. Lediglich bei dem murinen p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen und dem murinisierten MART-1-spezifischen TZR konnte eine definierte CD3 ζ Bande detektiert werden. Bei Humanisierungen der TZR verschwand die Bande. Die Hypothese der Autoren war, dass die extrazelluläre Region der murinen C-Domänen mit dem CD3 Komplex besser agieren kann, da die Transmembranregion konserviert zwischen Maus und Mensch vorliegt (Cohen et al. 2006). Hinzukommend wurden in den konstanten Domänen minimale Aminosäurepositionen identifiziert, welche nach einer Murinisierung zu einer Stärkung der TZR α und - β Ketten-Interaktion führten und folglich in einer gesteigerten TZR-Expression resultierten (Sommermeyer und Uckert 2010; Bialer et al. 2010). Die kompetitive Eigenschaft eines endogenen TZR zeigte sich auch bei der retroviralen Transduktion des Tyrosinase₃₆₈₋₃₇₆-spezifischen T-Zellklons mit einem MDM2₈₁₋₈₈- oder pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR. In beiden Fällen konnte der endogene TZR nicht mehr an der Zelloberfläche detektiert werden (Abbildung 24). In der subfamilienspezifischen V β -Analyse (V β 6 gegen die exogene MDM2₈₁₋₈₈-spezifische TZR β Kette, V β 13.1 gegen die exogene pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR β Kette) erschienen die transduzierten Zellen vorzugsweise die exogene TZR β Kette zu exprimieren. Es konnten lediglich bei 9,5 %, der mit dem MDM2₈₁₋₈₈-spezifischen TZR und 9,3 %, der mit dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR

transduzierten T-Zellen eine V β 14-Expression detektiert werden (Abbildung 24). Der Verlust der V β 14 Expression könnte zum einen auf einer Fehlpaarung, vorzugsweise der exogenen TZR β Kette mit der endogenen TZR α Kette, basieren. Eine Fehlpaarung der exogenen TZR α mit der endogenen TZR β Kette (V β 14⁺) konnte eingegrenzt werden, da andernfalls die V β 14-Expression nicht erniedrigt wäre. Zum anderen könnte eine kompetitive Verdrängung des endogenen Tyrosinase₃₆₈₋₃₇₆-spezifischen TZR vorliegen. Letztlich zeigte dieses Beispiel, dass wenn der endogene TZR keine effiziente Konkurrenz aufweist, unabhängig von der TZR-Spezifität und des Spezies-Ursprungs (TZR MDM2: Maus, TZR pp65: Mensch) des exogenen TZR, nicht mehr exprimiert werden kann. Bei Übertragung dieser Erkenntnisse auf die Situation nach der retroviralen Transduktion der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen, lässt sich erklären, warum manche pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen den endogenen TZR an der Zelloberfläche verlieren und lediglich den murinen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR exprimieren. Bei dem HCMV Donor 8106 handelte es sich um eine oligoklonale Kultur, folglich weisen die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen endogene TZR unterschiedlicher V β -Subfamilien-Zugehörigkeit auf und besaßen somit unterschiedliche intrinsische Qualitäten (Tabelle 7). Bei den pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen, die nur den p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR exprimierten, könnte es sich um Zellen handeln, deren endogener TZR eine insuffiziente Qualität aufweist. Folglich könnte dieser mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR nicht kompetitiv wirken und würde verdrängt werden. Die p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen- und pp65₄₉₅₋₅₀₃-bi-spezifischen T-Zellen zeigten eine effiziente duale Spezifität gegenüber pp65₄₉₅₋₅₀₃- und p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidbeladenen Zielzellen (Abbildung 37). Die monospezifischen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen T-Zellen (Abbildung 36 G) zeigten lediglich eine spezifische IFN- γ Sekretion nach einer p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidspezifischen Stimulation (Daten nicht gezeigt). Somit führte die Herunterregulation des endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR zum Verlust der pp65₄₉₅₋₅₀₃-Spezifität. Jedoch stellte sich die Frage, ob die unterschiedlichen Expressionsmuster als ein Nachteil für den Patienten oder nicht eher als ein Vorteil der Behandlung gesehen werden könnte? In einer *in vivo* Situation befinden sich meist die viralen Antigene nicht in den Kompartimenten mit der Malignität (Heemskerk et al. 2004). Folglich könnten drei Abwehrsysteme erzielt werden, zum einen T-Zellen, welche bewusst das Tumorgewebe angreifen, sowie geringe HCMV⁺ T-Zellen, die gegen die virale Infektion gerichtet sind, und zum

anderen die bi-spezifischen T-Zellen. Die pp65₄₉₅₋₅₀₃⁻ und p53₂₆₄₋₂₇₂⁻-Tumorantigen-spezifischen T-Zellen (Abbildung 36 E) haben den Vorteil einer dualen Spezifität und sollten somit zum einen den Virustiter senken als auch eine Tumorregrression bewirken. Hinzukommend stellt sich der essentiellste Vorteil von bi-spezifischen T-Zellen in der Stimulierung dar, d.h. durch die erhöhte Verbreitung des pp65₄₉₅₋₅₀₃⁻-Peptides in der Peripherie sollte eine hinreichende Stimulation des pp65₄₉₅₋₅₀₃⁻-spezifischen TZR gewährleistet sein. Hierdurch würde die Proliferation sowie Persistenz der bi-spezifischen T-Zellen gestärkt werden. Bei den monospezifischen p53₂₆₄₋₂₇₂⁻-Tumorantigen-spezifischen T-Zellen (Abbildung 36 G), die den endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃⁻-spezifischen TZR herunterregulierten, wäre dieser Vorteil nicht gegeben, so dass diese Zellen auf den Stimulus einer p53₂₆₄₋₂₇₂⁻-Expression, vorzugsweise von Seiten des Tumors, angewiesen wären. Hierbei würde sich ein Nachteil in der Proliferation der monospezifischen T-Zellen ergeben, welche in Folge einer Vernachlässigung des p53₂₆₄₋₂₇₂⁻-spezifischen Stimulus sterben könnten. Es wurde bereits publiziert, dass die TZR-Expression von bi-spezifischen T-Zellen nicht statisch, sondern dynamisch ist. Dies bedeutet, dass nach einer peptidspezifischen Stimulation des jeweiligen TZR eine Hoch- oder Herunterregulation erfolgen konnte. Dies zeigte sich sowohl für den endogenen als auch exogenen TZR. Jedoch implizierte der endogene CMV-spezifische TZR eine geringere Abhängigkeit von der Stimulation hinsichtlich der Expression und Funktionalität als der exogene TZR. Letztlich konnte die Aufrechterhaltung der dualen Spezifität *in vitro* nachgewiesen werden. Hinzukommend wurde gezeigt, dass bereits eine geringe Stimulation des endogenen CMV-spezifischen TZR durch das Virus genügen könnte, um die antileukämische Immunantwort durch den exogenen TZR zu fördern, wie es im Fall eines mHAg-spezifischen HA-2-TZR gezeigt wurde (van Loenen et al. 2009). Folglich würde eine gegenseitige Beeinflussung der TZR-Affinität erfolgen. Möglicherweise könnte dies für die p53₂₆₄₋₂₇₂⁻-Tumorantigen-monospezifischen T-Zellen bedeuten (Abbildung 36 G), dass bei erhöhtem Virustiter der endogene pp65₄₉₅₋₅₀₃⁻-spezifische TZR wieder hochreguliert werden könnte. Aufgrund der dynamischen TZR-Expression nach der jeweiligen Peptidstimulation, würden die tumorreaktiven pp65₄₉₅₋₅₀₃⁻-spezifischen T-Zellen ein breites und flexibles Wirkspektrum aufweisen. Dossett et al. (2009) konnten bereits nach einem Monat einen Verlust der Spezifität und der Expression des exogenen TZR verzeichnen. Jedoch konnte mittels der spezifischen Stimulierung des endogenen TZR eine Hochregulation des exogenen

TZR sowie die Proliferation der tumorreaktiven T-Zellen *in vivo* bewirkt werden. Hierdurch konnte einer Vernachlässigung bzw. dem Übergang der applizierten T-Zellen in einen ruhenden Zustand entgegengewirkt werden. Aufgrund der erhöhten Viruslast sollte der endogene TZR einen effizienten Impuls bekommen. Folglich dürfte der Faktor der Herunterregulation des exogenen TZR über aktive, Clathrin-vermittelte Prozesse (Dietrich et al. 1994) gemäßigt sein. Inwieweit „*Gene-silencing*“ durch z.B. Methylierungen gegenwirkt und die Transkriptionsrate herabsetzt, hängt maßgeblich vom verwendeten Vektorsystem ab (Yang et al. 2008). In Neuroblastoma-Patienten konnte gezeigt werden, dass EBV-spezifische T-Zellen, die mit einem antitumoralen CAR ausgestattet waren, im Gegensatz zu ZTLs, welche nur mit einem CAR modifiziert wurden, ein längeres Überleben sowie eine effiziente Spezifität aufwiesen (Pule et al. 2008).

Des Weiteren wurde als ein potentielles Risiko beschrieben, dass der transduzierte exogene TZR einen niedrig-affinen, und daher tolerierten Selbstantigen-spezifischen endogenen TZR anregen und zu einer Autoimmunität führen könnte (Schumacher 2002). Bei der Generierung von pp65₄₉₅₋₅₀₃- und p53₂₆₄₋₂₇₂-bi-spezifischen T-Zellen würde dieses „Risiko“ zum eigenen Nutzen umgekehrt werden.

Hinzukommend konnten Unterschiede zwischen der Verwendung eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten- und Doppelketten-TZR beobachtet werden (Abbildung 35). Bei dem p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen Doppelketten-TZR ließ sich eine Abnahme der Expression des endogenen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR verzeichnen (MFI_γ 22,8). Dies könnte mit einer Fehlinteraktion der endogenen und exogenen TZR α und - β Ketten zusammenhängen. Der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Doppelketten-TZR ist zwar auf einem 1-Plasmid-retroviralen Vektor kloniert, jedoch zeigte sich auch in *in vivo* Versuchen ein potentielles Risiko einer GvHD im Gegensatz zu dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR (persönliches Gespräch mit Herrn Dr. X). Hinzukommend führte die intrazelluläre IFN- γ Zytokinfärbung nach einer pp65₄₉₅₋₅₀₃- und p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidspezifischen Stimulation zu einer effizienten IFN- γ Sekretion der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen, die mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR transduziert waren (Abbildung 37: 79,3 % *versus* 66,8 % bei der pp65₄₉₅₋₅₀₃- und 70,5 % *versus* 52 % nach einer p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidspezifischen Stimulation). Letzteres könnte auf eine

effizientere pp65₄₉₅₋₅₀₃- und p53₂₆₄₋₂₇₂-bi-Spezifität und simultane Expression beider TZR zurückzuführen sein.

Bei der retroviralen Transduktion des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T21 T-Zellklons mit einem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR konnten lediglich 35,1 % der Zellen mit einer dualen Spezifität generiert werden (Abbildung 38). Hinzukommend zeigte sich, dass der endogene pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR etwas geringer an der Zelloberfläche exprimiert wurde. Infolgedessen das der T21 T-Zellklon eine Monoklonalität aufwies und der V β 14 Subfamilie (FACS-Analyse nicht gezeigt) angehörte, ließ sich die geringe Generierung von bi-spezifischen T-Zellen nicht auf unterschiedliche Subfamilien bzw. unterschiedliche kompetitive endogene TZR zurückführen. Ebenfalls können unterschiedliche CDR3 Schleifen von Antigen-spezifischen TZR gleicher Subfamilien einen Einfluss auf die Expression nehmen (Heemskerk et al. 2007). Jedoch konnte dieser Aspekt ausgeschlossen werden, da es sich um einen T-Zellklon handelte. Folglich war der endogene pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR ein starker Kompetitor mit einer hohen intrinsischen Qualität, so dass trotz einem Einzelketten und murinen TZR nur wenige Zellen den p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR exprimierten.

5.2.2 Unterschiedlicher HCMV-Status zwischen Donor und Rezipient

Die effiziente Generierung von HCMV-spezifischen T-Zellen von HCMV-seronegativen Donoren mittels dem TZR Gentransfer, konnte bereits gezeigt werden (Schub et al. 2009 sowie eigene Daten). Jedoch würde hierbei nur eine antivirale Behandlung erfolgen. Der CMV-Status des Donors spielt eine relevante Rolle im Verlauf des Patienten. Die Transplantation eines HCMV-positiven Rezipienten mit einem HCMV-negativen Transplantat würde bei einer CMV-Reaktivierung zu einer insuffizienten zellulären Immunantwort führen (Zhou et al. 2009). Bei einer Donor-Lymphozyten-Infusion (DLI) muss der HLA-Status zwischen dem Empfänger und dem allogenen Spender berücksichtigt werden. Ansonsten könnte eine aufkommende GvHD zum Tod des Patienten führen. Im Falle dessen, dass der zu transplantierende Patient hinzukommend einen HCMV-seropositiven Status aufweisen würde, müsste dies ebenfalls berücksichtigt werden. Würde sich nun kein geeigneter Spender finden, welcher vom HLA- und / oder CMV-Status mit dem Patienten übereinstimmen würde, dann müsste auf einen HLA-passenden und

HCMV-seronegativen Spender zurückgegriffen werden. Bei der DLI würde ein Spender vorzugsweise nach dem HLA-Status ausgewählt werden, da einer HCMV-Reaktivierung medikamentös (z.B. Ganciclovir / Acyclovir) entgegengewirkt werden könnte. Letztlich könnte es aber für die Immuntherapie interessant sein, im Falle der Situation, dass der Donor einen HCMV-seronegativen und der Empfänger einen HCMV-seropositiven Status aufweisen würde, die Methode der simultanen retroviralen Transduktion anzuwenden. Hierdurch würde sowohl eine antivirale als auch antitumorale Immunantwort ausgelöst werden. In der dargelegten Dissertation wurden für die Generierung von bi-spezifischen HCMV-negativen T-Zellen ein pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischer Doppelketten-TZR eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems, welcher Kodon-optimiert und partiell murinisiert war, verwendet. Hinzukommend wurde ein p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischer Einzelketten- und Doppelketten-TZR verwendet, welcher ebenfalls auf einem 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystem kloniert sowie Kodon-optimiert war. Die Verwendung des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten- und des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR führte zur effizienten Generierung von bi-spezifischen T-Zellen (Abbildung 39). Hinzukommend ließ sich eine duale Spezifität gegenüber pp65₄₉₅₋₅₀₃- und p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidbeladenen Zielzellen in einer intrazellulären Zytokinfärbung nachweisen (Abbildung 40). Jedoch konnten *in vitro* ebenfalls T-Zellen detektiert werden, welche lediglich den p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR exprimierten. Dies könnte zum einen darauf zurückgeführt werden, dass ein Doppelketten-TZR einer größeren Fehlpaarung, mit den, in den doppelt-transduzierten T-Zellen immer noch vorliegenden endogenen TZR, unterliegt als ein Einzelketten-TZR (Zhang et al. 2004). Zum anderen ein kompletter muriner TZR (p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischer TZR) effizienter an der Zelloberfläche exprimiert werden könnte. Hierfür würde auch sprechen, dass der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Doppelketten-TZR kompetitiver gegenüber einem pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten-TZR erschien (Abbildung 41). Es konnte bereits dargelegt werden, dass murinisierte TZR Ketten vorzugsweise miteinander interagieren und weniger anfällig für Fehlinteraktionen sind (Sommermeyer und Uckert 2010). Wobei hier trotz allem eine Fehlinteraktion zu Grunde liegen könnte, indem humane, wenn auch partiell murinisierte, TZR Ketten potentieller mit endogenen TZR α und - β Ketten als murine Vollängen-TZR Ketten interagieren könnten. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die V-Domänen des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR stärkere

Interaktionskräfte aufweisen könnten als die des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR (Heemskerk et al. 2007). Es stellte sich nun die Frage, warum ein pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischer Doppelketten-TZR mit einem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR, aber nicht mit einem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Doppelketten-TZR ko-exprimiert werden konnte. Beide Doppelketten-TZR unterliegen nunmehr dem Potential einer unerwünschten Fehlinteraktion mit den endogenen TZR α und - β Ketten. Wobei von dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR möglicherweise ein höheres Potential ausgehen könnte. Es konnte gezeigt werden, dass ein murinierter WT1/A2 TZR eine vollständige Reduktion von Fehlinteraktion im Vergleich zum nicht-modifizierten TZR nicht ausschließt (Govers et al. 2010). In stringenteren Bedingungen zeigte sich, dass ein muriner Vollängen-TZR insgesamt kompetitiver als ein partiell murinierter TZR war (Abbildungen 39 und 41). Mit der Analyse der Anzahl der Integrationsstellen in das Genom sowie des mRNA Anteiles der Zellen mittels einer genomischen DNS-PCR sowie der RT-PCR, hätte die aufgestellte Hypothese manifestiert werden können, dass die Resultate auf einer Konkurrenz und nicht auf unterschiedlichen Integrationen bzw. transkriptionellen Aktivitäten beruhen. Da jedoch gleiche retrovirale Vektorkonstrukte (pBullet Vektor) verwendet wurden, sollten vergleichbare Integrationsstellen sowie gleiche Transkriptionsraten gewährleistet sein. Folglich spricht vieles für die dargelegte Erläuterung. Bei der Analyse der Expression der endogenen TZR, der simultan transduzierten HCMV-negativen T-Zellen, konnte der kompetitive Charakter des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR im Vergleich zum pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten-TZR dargestellt werden (Abbildung 42). Es zeigte sich bei dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR eine stärkere Herunterregulierung der endogenen TZR Ketten als bei dem pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten-TZR.

Bei der simultanen Transduktion erschienen die meisten Zellen positiv für die endogenen (Hu PanTZR⁺) und exogenen TZR β Ketten (Mu TZR β ⁺). Dies könnten zum einen T-Zellen sein, welche den exogenen TZR, sowie in geringerem Maße den endogenen TZR exprimierten, und zum anderen Zellen, die neben dem endogenen oder exogenen TZR auch einen hybriden TZR an der Zelloberfläche enthielten. Die Resultate stellten die effiziente Generierung von Virus- und tumorreaktiven HCMV-negativen T-Zellen dar, sowie die kompetitiven Charaktere eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen, murinen Vollängen-Einzelketten- oder Doppelketten-

TZR im Vergleich zu einem partiell murinisierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten-TZR. Es zeigte sich, dass ein muriner Vollängen-TZR unabhängig dessen, ob dieser als Einzelketten- oder Doppelketten-TZR-Konstrukt vorliegt, kompetitivere Eigenschaften im Vergleich zu einem partiell murinisierten Doppelketten-TZR aufzeigte.

5.3 Sicherheitsaspekt eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR

5.3.1 „On“-zielgerichtete Reaktionen sowie Immunogenität eines partiell murinisierten oder Vollängen-murinen-TZR

Das Risiko beim retroviralen TZR-Gentransfer besteht darin, dass der exogene TZR zu einer sogenannten „on“-zielgerichteten Reaktion führen könnte (Schumacher 2002; Jorritsma et al. 2007). Diese Reaktionen richten sich gegen körpereigene, nicht maligne Zielzellen, welche endogene Selbstantigene präsentieren. Bei p53 handelt es sich um ein universelles Antigen, welches normalerweise nur geringfügig, aufgrund der zügigen Degradierung mittels des Ubiquitin-Proteasom-Abbauweges, auf körpereigenen Zellen exprimiert wird. Jedoch führen Mutationen in ~ 50 % der humanen Tumore zu einer Überexpression (Offringa 2009; Theobald et al. 1997). Hinzukommend könnte sich ein therapeutisches Fenster ergeben, indem sich Tumore aufgrund ihrer stabileren Expression von p53 von dem Normalgewebe unterscheiden lassen könnten (Theobald et al. 1995). Das hier verwendete Epitop von p53₂₆₄₋₂₇₂ ist wildtypisch und schließt eine Akkumulierung von Mutationen („*hotspot mutations*“) aus, so dass der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische TZR stets das betreffende Antigen erkennen und reaktionsfähig sein sollte (persönliches Gespräch Dr. X). Die meisten Mutationen betreffen außenliegende Bereiche oder nahe gelegene Randbereiche des betreffenden p53₂₆₄₋₂₇₂-Epitops. Es konnte bereits in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. X gezeigt werden, dass trotz einer vorhandenen Mutation vor dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Epitop eine p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Erkennung durch den p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen TZR gewährleistet war. Somit ist eine Anwendung des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR in der TZR-Gentherapie gegeben. Derzeit wird analysiert, ob Mutationen, die näher an das p53₂₆₄₋₂₇₂-Epitop reichen zu einer Beeinflussung der p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen

Peptidpräsentation führen könnten, d.h. eine mögliche Überexpression des wildtypischen p53₂₆₄₋₂₇₂-Peptides die Folge wäre. Trotz allem besteht das Risiko, das normale, körpereigene Zellen, welche p53 über den MHC I-Komplex im Rahmen der endogenen Peptidpräsentation an der Zelloberfläche exprimieren, durch p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifische T-Effektorzellen erkannt und angegriffen werden. Bislang konnten solche „on“-zielgerichteten Reaktionen in laufenden humanisierten Mausmodellen *in vivo* nicht nachgewiesen werden (Petschenka et al. 2012, Posterpräsentation auf dem Cancer Immunotherapy Meeting (CIMT) in Mainz, Deutschland). Jedoch gibt es in aktivierten humanen T-Zellen *in vitro* Hinweise darauf (Mroz et al. 2012, Posterpräsentation auf dem Cancer Immunotherapy Meeting (CIMT) in Mainz, Deutschland), die aber nur einen schwachen Effekt im autologen System zeigen.

Nun stellt sich die Frage, welches Risiko von einem Vollängen-TZR, wie dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR, im Vergleich zu einem partiell murinisierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR ausgehen könnte. In einer klinischen Studie mit einem murinen gp100₁₅₄₋₁₆₂- und einem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR konnte eine humorale Immunantwort sowie teilweise eine zusätzliche Inhibition der TZR-Funktion nachgewiesen werden (Davis et al. 2010). Jedoch war dies lediglich bei 31,3 %, der mit dem gp100₁₅₄₋₁₆₂-, und bei 10 %, der mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen murinen TZR behandelten Patienten der Fall. Hinzukommend führte die Bildung von Antikörpern nicht zwangsläufig zu einer Inhibition der TZR Funktion. Die Reaktion des Patienten war unabhängig der Anzahl an transplantierten transduzierten T-Zellen und bei einer humoralen Immunantwort spezifisch auf die transduzierten T-Zellen gerichtet. Des Weiteren konnte eine Tumorregression trotz einer humoralen Immunantwort beobachtet werden. Letztlich zeigte sich, dass die humorale Immunantwort vorzugsweise gegen die V- und nicht die C-Domänen gerichtet war. Folglich würde dies bedeuten, dass ein muriner Vollängen-TZR in den C-Domänen nicht humanisiert werden müsste, jedoch zur Inhibition einer humoralen Immunantwort, die murinen V-Domänen. Die minimal bzw. partiell murinisierten TZR würden einen Vorteil darstellen, indem sich die Murinisierungen vorzugsweise auf die C-Domänen richten würden. Hinzukommend könnten auch Epitope vom retroviralen Vektor an der Immunogenität beteiligt sein (Davis et al. 2010; Schumacher 2002; Lamers et al. 2011). Bei dem retroviralen Vektor mit dem enthaltenen F2A-Element wurde beispielsweise ein schwach immunogenes H2-D^b-Bindungsepitop (KQTLNFDLL) beschrieben (Dossett et al.

2009). Von essentieller Bedeutung ist festzuhalten, dass auch bei der Verwendung eines murinen Vollängen-TZR zwar teils eine Immunantwort gegen die genmodifizierten T-Zellen beobachtet wurde, jedoch diese sich auf eine Minderheit der Fälle bezogen und vor allem keinen Einfluss auf die klinische Wirkung nahmen. In einer weiteren klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass die durchgeführte Depletion der Lymphozyten zur Förderung des Anwachsens der transplantierten T-Zellen einen Schutzmechanismus des Patienten bewirkte. Die Suppression des Immunsystems führte zur Unfähigkeit auf die xenogenen Eigenschaften reagieren zu können (Johnson et al. 2009). Trotz allem sollte natürlich das Risiko einer Immunogenität sowie die mögliche Schädigung des Patienten nicht vernachlässigt werden. Jedoch stellt sich die Frage, welche Nebenwirkungen gerade noch tolerabel sind, um eine Tumorregression und das Überleben eines Patienten zu sichern.

5.3.2 Interaktionsverhalten eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR

Es konnte gezeigt werden, dass Fehlinteraktionen bei der Verwendung eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR sowohl mit humanen als auch murinen TZR α Ketten erfolgen konnte. Die Analysen wurden unter nicht-kompetitiven Bedingungen in der Jurkat-76 Zelllinie sowie unter kompetitiven Bedingungen in den humanen T-Zellen durchgeführt. Die Jurkat-76 Zellen kennzeichnete der Verlust von endogenen TZR α und - β Ketten, so dass ein transduzierter TZR keiner Konkurrenz unterliegt. In den humanen T-Zellen liegt, aufgrund des Vorhandenseins von endogenen TZR α und - β Ketten, eine Konkurrenz um die TZR-Expression zwischen exogenen und endogenen TZR vor. Das Interaktionsverhalten des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit spezifitätsfremden TZR α Ketten, spiegelte sich in der Abnahme der Tetp53-Positivität wider (Abbildungen 45 und 51). Der Verlust der Tetp53-Positivität, d.h. der Spezifitätsverlust des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR, reflektierte sich in einem IFN- γ Elisa mit abnehmender (1-Plasmid-retrovirales Vektorsystem) Funktionalität oder

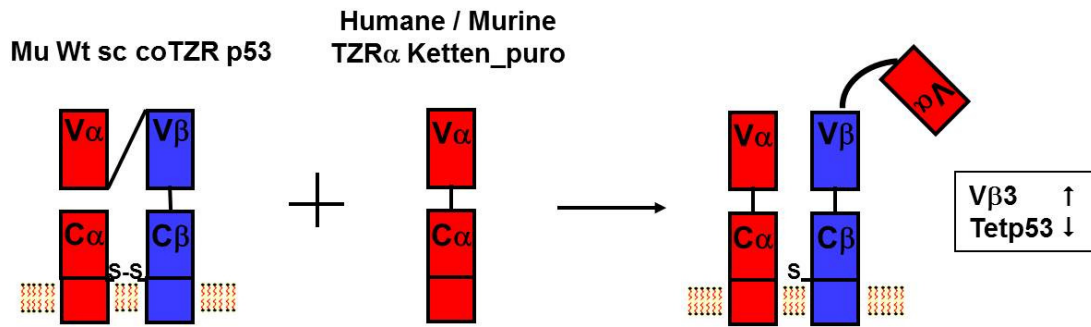


Abbildung 61: Interaktionsverhalten des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit fremden TZR α Ketten

Die Darstellung des Interaktionsverhaltens des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR erfolgte anhand des 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems. Jedoch ist dieses auf das 2-Plasmide-retrovirale Vektorsystem (MuC α /Mu Wt sc TZR p53) übertragbar. Der Nachweis der Expression erfolgte über die subfamilienspezifische V β 3 Färbung. Infolge von spezifitätsfremden TZR α Ketten geht die p53-spezifische Tetramerfärbung verloren bzw. nimmt ab.

vollständigem Spezifitätsverlust (2-Plasmide-retrovirales Vektorsystem) des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR (Abbildungen 46 und 52). Es konnte im Detail analysiert werden, dass sehr wahrscheinlich die Interaktion des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit einer Vollängen-TZR α -Kette auf der Verdrängung der V α -Domäne des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR beruhte (Abbildung 61). Eine Interaktion des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit einer TZR β Kette konnte von empirischen strukturellen Aspekten her ausgeschlossen werden. Auch würde sich theoretisch keine durch eine TZR α / β notwendige Fehlinteraktion induzierte Neoreaktivität bewirken lassen (persönliches Gespräch mit Herrn Dr. X. Die Expression des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR eines 2-Plasmide- oder 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems konnte stets über den V β 3 Nachweis erfolgen (Abbildungen 47 und 53). Jedoch zeigten sich hinsichtlich der p53-spezifischen Tetramerbindung Beeinflussungen. Die detaillierte Darstellung und Manifestierung des Interaktionsverhaltens erfolgte mit der gezielten Punktmutagenese der V α -Domäne an der Aminosäuren-Position 115, zur

Ausschaltung der p53-spezifischen Tetramerbindung. Hierbei führte die Veränderung der Nukleinbase Adenin zu einem Cytosin in dem betreffenden Basentriplett zu der Aminosäure Alanin anstelle eines Aspartats. Es ließen sich essentielle Unterschiede zwischen einem 2-Plasmide- und einem 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystem feststellen. In einem 2-Plasmide-retroviralen Vektorsystem zeigte sich, dass, im Vergleich zu einer nicht-kompetitiven Situation in den Jurkat-76 Zellen, eine kompetitive Situation (humane T-Zellen) den p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR vor einer Fremdinteraktion mit TZR α Ketten schützte (Abbildungen 44 und 45). Im Gegensatz zu den Jurkat-76 Zellen (nicht-kompetitive Situation) konnte in den humanen T-Zellen (kompetitive Situation) keine Interaktion mit humanen TZR α Ketten festgestellt werden (V β -Analyse: Abbildung 44). Lediglich mit der homologen p53₂₆₄₋₂₇₂ sowie der spezifitätsfremden, aber ebenfalls murinen MDM2₈₁₋₈₈-spezifischen TZR α Kette zeigte sich die Expression eines hybriden TZR. Es sei daraufhin gewiesen, dass es sich bei der Interaktion zwischen dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR und der homologen p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen TZR α Kette aufgrund der gleichen Spezifität nicht wirklich um einen hybriden TZR handelte. Der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR war unter kompetitiven Bedingungen (humane T-Zellen) nicht kompetitiv genug mit einer endogenen TZR β Kette um die TZR α Kette zu konkurrieren und somit seine Expression an der Zelloberfläche zu erzwingen. Unter nicht-kompetitiven Bedingungen (Jurkat-76 Zellen) konnte die Interaktion des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR auch mit humanen TZR α Ketten dargelegt werden (Abbildung 44). Die Interaktion resultierte sowohl in dem Verlust der p53-Spezifität (Tetp53-Analyse: Abbildung 45) als auch in der Funktionalität (Abbildung 46 A). Die detaillierte Analyse des Interaktionsverhaltens des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit spezifitätsfremden TZR α Ketten erfolgte mittels der gezielten Punktmutagenese der V α -Domäne des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR. Diese führte zur Ausschaltung der p53-spezifischen Tetramerbindung (Abbildung 48). Es zeigte sich, dass die Interaktion vermutlich auf der Verdrängung der V α -Domäne des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR durch die spezifitätsfremde TZR α Kette beruhte (Abbildungen 47-49). Bei dem 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystem (sc TZR zusammen mit MuC α kloniert) konnte nachgewiesen werden, dass durch die Integration der MuC α -

Domäne auf den retroviralen Vektor, der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR unabhängig einer nicht- oder kompetitiven Situation stets exprimiert werden konnte (Abbildungen 50 und 51). Trotz allem ließ sich eine Fehlinteraktion, vorzugsweise mit murinen TZR α Ketten, nicht vermeiden. Die Kopplung beider Leserahmen auf einem Konstrukt *via* F2A bot keinen entscheidenden kinetischen Vorteil der Dimerisierung. In erhöhtem Maße ließ sich ein Verlust der Spezifität des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR durch die Fehlinteraktion mit einer murinen MDM2₈₁₋₈₈-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette nachweisen (Abbildungen 50 und 51). Mit humanen TZR α Ketten war das Ausmaß an Fremdinteraktion mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR auch von der assoziativen Stärke der TZR α Kette abhängig (siehe Expressionsverhalten des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR in Kombination mit einer pp65₄₉₅₋₅₀₃-, gp100₂₈₀₋₂₈₈- oder AML₁₄₋₂₂-spezifischen TZR α Kette: Abbildungen 50 und 51). Die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR α Kette (Tetp53⁺: Jurkat-76: MFI $_{\gamma}$ 2,7; humane T-Zellen: B1/B3 MFI $_{\gamma}$ 31,3, B2/B4 MFI $_{\gamma}$ 18,5) kennzeichnete ein schwächeres Potential gegenüber den gp100₂₈₀₋₂₈₈- (Tetp53⁺: Jurkat-76: MFI $_{\gamma}$ 1,5; humane T-Zellen: B1/B3 MFI $_{\gamma}$ 21,1, B2/B4 MFI $_{\gamma}$ 12,2) und AML₁₄₋₂₂-spezifischen (Tetp53⁺: Jurkat-76: MFI $_{\gamma}$ 1,4; humane T-Zellen: B1/B3 MFI $_{\gamma}$ 21,0, B2/B4 MFI $_{\gamma}$ 12,9) TZR α Ketten mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR zu interagieren. Folglich schien das Interaktionspotential TZR-Subfamilien abhängig zu sein. Die Fremdinteraktion des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems spiegelte sich auch in der abnehmenden p53-spezifischen Funktionalität mit zunehmendem Interaktionspotential mit fremden TZR α Ketten wider. (Abbildung 52). Die sich verzeichnende Abnahme der V β - und p53-spezifischen Tetramer-Expression sowie Funktionalität, bei der Kombination des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit der homologen p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen TZR α Kette, könnte mit einer sterischen Interaktion zusammenhängen. Hierdurch könnte die Expression (V β -Expression erniedrigt im Vergleich zum Wildtypen), p53-spezifische Tetramerbindung sowie p53-spezifische Funktionalität beeinträchtigt werden (Abbildungen 50-52). Das Interaktionsverhalten des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems beruhte wie bei dem 2-Plasmid-retroviralen Vektorsystem auf die Verdrängung der V α -Domäne des p53₂₆₄₋₂₇₂-

Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR durch eine spezifitätsfremde TZR α Kette (Abbildungen 53-55).

Im Gegensatz zu dem 2-Plasmide-retroviralen Vektorsystem war der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems Kodon-optimiert sowie mit einer zusätzlichen Disulfidbrücke in den C-Domänen (Kuball et al. 2007) ausgestattet. Trotz der künstlichen Disulfidbrücke in den C-Domänen konnte eine residuelle Fremdinteraktion nachgewiesen werden. Bei dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR eines 2-Plasmide-retroviralen Vektorsystems handelte es sich um einen TZR, welcher bislang nicht Kodon-optimiert wurde und auch die künstliche Disulfidbrücke zwischen den C-Domänen nicht enthielt. Unpublizierte Daten mit einem gp100₂₈₀₋₂₈₈-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR, welcher murinisiert oder minimal murinisiert sowie mit der zusätzlichen Disulfidbrücke zwischen den C-Domänen modifiziert war, zeigte im 2-Plasmide-retroviralen Vektorsystem kompatible Ergebnisse zu den hier dargelegten (unpublizierte Daten von Herrn Dr. X und Frau Dr. X). Folglich konnten die Daten zwischen einem murinen Vollängen-p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen Einzelketten-TZR und einem partiell- bzw. minimal murinisierten humanen gp100₂₈₀₋₂₈₈-spezifischen Einzelketten-TZR zueinander in Bezug gesetzt werden. Essentiell war es, dass trotz der Optimierungen zur Inhibition einer Fehlinteraktion, diese nicht vollständig ausgeschlossen werden konnten. Erst kürzlich wurde publiziert, dass Einzelketten-TZR einer Fehlpaarung unterliegen können. Das aufgeführte Modell der Fehlinteraktion war kompatibel mit dem hier dargelegten. Hinzukommend wurde das gleiche Fazit gezogen, dass trotz der Optimierungen über den Einzelketten-TZR-Ansatz zur Inhibition von Fehlinteraktionen das Potential an Fehlpaarung zwar beeinflusst, aber nicht gänzlich vermieden werden konnte (Aggen et al. 2011).

Es wurde versucht, das Phänomen residueller Fehlpaarungen eines Einzelketten-TZR durch Protein-Design auszuschließen. Von essentieller Bedeutung ist es, dass der hier dargelegte neuartige Lösungsvorschlag auf der effizienten Steigerung der V α -V β -Interaktion mittels einer zusätzlichen Disulfidbrücke (Voss et al., 1996) zwischen der V α -Domäne und dem C-terminalen Ende des SL7 Linkers beruhte. Für den Optimierungsprozess wurde der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems verwendet (Kapitel 4.4.5). Die Verwendung von Disulfidbrücken in den C-Domänen zur Optimierung der

TZR α und TZR β Interaktion konnte bereits gezeigt werden (Kuball et al. 2007; Boulter et al. 2003). Aufgrund der Effizienz von Disulfidbrücken wurde eine solche in der genannten Position gezielt integriert und von einer Verkürzung des SL7 Linkers abgesehen. Es konnte gezeigt werden, dass die Disulfidbrücke mit der Bezeichnung Q51C in V α und G16C im Linker (gemäß IMGT-Nomenklatur) am effektivsten die V α -V β Interaktion stabilisierte und eine Verdrängung der V α -Domäne des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR verhinderte. Diese Optimierung bewirkte, dass die V α - und V β -Domänen näher zueinander gezwungen wurden. Folglich fand eine TZR α Kette keinen Platz, um mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR zu interagieren. Eine geringfügige Interaktion mit der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette (Abbildung 56) sowie Rekonstitution der Spezifität und spezifische Interferon- γ Sekretion nach einer p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidspezifischen Stimulierung konnte detektiert werden (Abbildung 57). Jedoch sollten für eine klinisch nahe Relevanz niedrige Peptidkonzentrationen betrachtet werden, da im Patienten meist in einem geringen Maße Tumorantigen-spezifische Peptide präsentiert werden. Folglich war es essentiell, dass sich bei einer Peptidkonzentrationen von 10 nM keine Rekonstitution einer spezifischen IFN- γ Sekretion der humanen T-Zellen, die mit dem Mu Wt α TZR p53/Mu Mt sc coTZR p53_Q51C transduziert waren, zeigte (Abbildung 57 B). Im Gegensatz dazu, ließ sich bei den T-Zellen, welche mit dem Ursprungskonstrukt (Mu Wt α TZR p53/Mu Mt sc coTZR p53) retroviral transduziert waren, auch bei 10 nM eine effektive Rekonstitution detektieren. Das Konstrukt mit der Disulfidbrücke V α G49C/SL7 G16C führte zu einer geringeren effektiven Inhibition der Fehlinteraktion (Abbildungen 56 und 57). Hinzukommend zeigten die p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR-Konstrukte (Mu Wt sc coTZR p53_Q51C und Mu Wt sc coTZR p53_G49C) eine vergleichbare p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifische IFN- γ Sekretion wie das Ausgangsprodukt Mu Wt sc coTZR p53 in einem Interferon- γ Elisa (Abbildung 57). Bei Vergleich der optimierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR zeigte sich bei dem Mu Wt sc coTZR p53_Q51C eine etwas bessere Funktionalität als beim Mu Wt sc coTZR p53_G49C. Die Ergebnisse legten die essentielle Integration der Disulfidbrücke an der Position Q51C in V α und G16C im Linker des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems dar. Hierdurch konnte eine effektive Stabilisierung der V α -V β

Interaktion und folglich spezifische Expression erzielt werden. Zwar zeigte sich bei der K_D -Bestimmung in der Tetramerenbindung eine etwas gesteigerte Affinität des Konstruktes mit der Disulfidbrücke Q51C/G16C (16 nM) gegenüber 20 nM des Ausgangskonstruktes (Abbildungen 58 und 59). Aber dies spiegelte sich nicht in einem Interferon- γ Elisa wider. Es zeigte sich, dass das Ausgangskonstrukt zu einer geringfügig effizienteren IFN- γ Sekretion nach einer p53₂₆₄₋₂₇₂-peptidspezifischen Stimulierung führte (Abbildung 57). Es wurde bereits dargelegt, dass die Dissoziationsrate eines Tetramers nicht direkt mit der zellulären Avidität korreliert und diese spezifisch für jede TZR-MHC:Peptid Kombination erscheint (Auszug aus Johnson et al. 2006). Letztlich konnte mit der K_D -Bestimmung manifestiert werden, dass die zusätzliche Disulfidbrücke zu einer vergleichbaren Affinität des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR führte. Letztlich könnte in *in vivo* Versuchen darlegt werden, inwiefern die unterschiedliche IFN- γ Sekretion eine Relevanz auf die Tumorregression nehmen könnte. Sehr wahrscheinlich würde sich kein Unterschied manifestieren lassen, mit Ausnahme eines höheren Sicherheitsaspektes mit der Disulfidbrücke Q51C/G16C. Folglich konnte eine effiziente und effektive Optimierung des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten TZR eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems erzielt werden, ohne einen maßgeblichen Spezifitätsverlust zu verursachen.

Aus den dargelegten Ergebnissen kann keine Aussage über den möglichen Einfluss eines IRES- (interne ribosomale Eintrittsstelle) *versus* F2A-Elementes getroffen werden, aufgrund des unterschiedlichen Vektordesigns. Unter dem IRES-Element wird eine spezifische Faltung der mRNA verstanden, welche ohne weitere Initiationsfaktoren die Bindung der mRNA an die Ribosomen vermittelt. Das IRES-Element gewährleistet die Translation des dahinter geschalteten Genes (Leisegang et al. 2008). Der Nachteil eines IRES-Elementes gegenüber einem F2A-Element besteht darin, dass das Gen abwärts eine geringere Expression aufweist als das Gen vor dem IRES-Element. Dies verdeutlicht die essentielle Anwendung von retroviralen Vektoren mit dem integrierten selbstspaltenden 2A-Peptid, wodurch die Expression von hintereinander geschalteten Genen zu gleichen Mengen gewährleistet wird (Szymczak et al. 2004; Yin et al. 2011). Hinzukommend kennzeichnete retrovirale Vektoren, welche das F2A-Element aufwiesen, eine geförderte TZR-Expression sowie Funktionalität der Effektorzellen (Wargo et al. 2009). Die Optimierungen des retroviralen Vektordesigns durch das F2A-Element waren aber nicht auf

Unterschiede in der Anzahl der Integrationsstellen in das Genom zurückzuführen (Leisegang et al. 2008). Zur Darlegung des Einflusses des F2A-Elementes müsste das 2-Plasmide-retrovirale Vektorsystem des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR zu einem 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystem umkonstruiert werden. Jedoch wurden diese Analysen nicht durchgeführt, weil hier im Blickfeld das Interaktionsverhalten eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR eines 1-Plasmid- oder 2-Plasmide-retroviralen Vektorsystems, unabhängig vom Einfluss eines IRES- oder F2A-Elementes, stand.

5.3.3 Ausblick

Im Weiteren soll ein Ausblick hinsichtlich einer translationalen klinischen Anwendung der hier dargelegten Forschungsergebnisse gegeben werden. Für Zytomegalie (HCMV)-positive Tumorpatienten würde sich ein therapeutisches Fenster bei der Verwendung von pp65₄₉₅₋₅₀₃- und Tumorantigen-bi-spezifischen T-Zellen ergeben. In der hier dargelegten Dissertation wurde als Tumorantigen das p53₂₆₄₋₂₇₂-Epitop betrachtet. Jedoch sind in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. X und Herrn Dr. X weitere Tumorantigen-spezifische TZR als Doppelketten- oder Einzelketten-TZR etabliert. Hier seien als Beispiele von humanen Vertretern die gp100₂₈₀₋₂₈₈- und AML₁₄₋₂₂-Tumorantigen-spezifischen TZR sowie als murines Beispiel der MDM2₈₁₋₈₈-Tumorantigen-spezifische TZR aufgeführt. Eine Generierung von bi-spezifischen T-Zellen könnte ebenfalls auf andere Tumorantigene übertragen werden, die für solide, aber auch insbesondere hämatologische Neoplasien in Betracht kommen.

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Kombination von spezifitätsfremden TZR α und - β Ketten eines Doppelketten-TZR hybride TZR entstehen können (Abbildungen 9-12). Folglich sollte das Ziel für eine klinische Anwendung sein, den Sicherheitsaspekt eines TZR zu erhöhen. Dies könnte durch die bereits beschriebenen Modifikationen, wie z.B. die künstliche Disulfidbrücke zwischen den konstanten Domänen (Kuball et al. 2007), durch Einzelketten- und Doppelketten-TZR-Konstrukte (1-Plasmid-retrovirale Vektorsysteme) sowie die essentielle Verstärkung der V α /V β -Interaktion durch die neuartige künstliche Disulfidbrücke, zwischen V α Q51C und dem C-terminalen Ende des SL7-Linkers G16C in Einzelketten-TZR-Konstrukten, erfolgen (siehe eigene Daten). Eine Übertragung der Disulfidbrücke auf andere TZR-Spezifitäten konnte durch die Arbeit von Herrn Dr. X mit dem gp100₂₈₀₋₂₈₈-spezifischen Einzelketten-TZR gezeigt werden. Für die Generierung von bi-spezifischen T-Zellen zeigte sich, dass der maßgebliche Erfolg in der Expression zweier TZR an der Zelloberfläche von der intrinsischen Qualität des endogenen und exogenen TZR (Abbildungen 35-38) sowie von der Kombination unterschiedlicher Vektorkonstrukte (Abbildungen 39 und 41) bestimmt wird. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte, müsste für die retrovirale Transduktion von isolierten HCMV⁺ T-Zellen ein TZR verwendet werden, welcher zum einen hoch-affin gegenüber seinem Tumorantigen ist und zum anderen einen effizienten kompetitiven Charakter aufweist. Es zeigte sich, dass Einzelketten-TZR-Konstrukte kompetitiver

gegenüber Doppelketten-TZR-Konstrukten sind. Hinzukommend können Einzelketten-TZR-Konstrukte das Risiko einer GvHD minimieren (unpublizierte Daten von Herrn Dr. X). Auch konnte dargelegt werden, dass der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR (1-Plasmid-retrovirales Vektorsystem) ein geringeres Potential einer Fehlinteraktion mit einer pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR α Kette aufzeigte (Abbildung 51). Ebenso war mit den TZR α Ketten der Spezifitäten gp100₂₈₀₋₂₈₈ und AML₁₄₋₂₂ stets eine spezifische Expression sowie Funktionalität des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR vorhanden (Abbildungen 51 und 52). Folglich zeichnete sich die Anwendbarkeit für die Generierung von bi-spezifischen T-Zellen in der Kombination eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen- und pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR ab.

Der hier verwendete p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR (1-Plasmid-retrovirales System) führte zu einer effizienten Lyse von endogenen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-präsentierenden Tumorzellen (Saos2/143, UocB11) (Abbildung 60). Auch in *in vivo* Versuchen zeigte sich eine effektive Tumorerkennung (unpublizierte Daten von Herrn Dr. X). Die Generierung von bi-spezifischen T-Zellen mittels der simultanen retroviralen Transduktion zeigte sich am effektivsten in der Verwendung eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR sowie eines pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten-TZR *versus* zwei Doppelketten-TZR-Konstrukten (1-Plasmid-retrovirale Vektorsysteme). Im Folgenden müsste analysiert werden, wie es sich mit dem Interaktionsverhalten eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR und eines pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Einzelketten-TZR verhalten würde (1-Plasmid-retrovirale Vektorsysteme). Interessant wäre es eine Steigerung der TZR-Expression beider TZR zu erzielen. Für die translationale Onkologie würde sich sehr wahrscheinlich die Verwendung von Einzelketten-TZR-Konstrukten von 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystemen zur Steigerung des Sicherheitsaspektes anbieten (Kapitel 4.4.3-4.4.6 sowie unpublizierte Daten von Herrn Dr. X). Hinzukommend könnte das optimierte p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR-Konstrukt, mit der Disulfidbrücke zwischen V α Q51C und dem C-terminalen Ende des SL7 Linkers G16C, für eine effizientere TZR-Expression und Funktionalität, von besonderem Interesse sein. Im Folgenden müsste analysiert werden, wie es sich mit der Fehlinteraktion eines pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Einzelketten-TZR mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen

Einzelketten-TZR des wildtypischen und optimierten (Q51C/G16C) TZR-Konstruktes verhalten würde (1-Plasmid-retrovirale Vektorsysteme).

Essentiell ist es, dass unerwünschte „on“-zielgerichtete oder „off“-zielungerichtete Reaktion des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR sehr wahrscheinlich eingeschränkt werden können, da es sich um einen Tumorpatienten mit einer reaktivierten Zytomegalie handeln würde. Folglich würden nur infizierte Körperzellen das pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Epitop exprimieren. Da es sich um ein virales Antigen handelt, sollte es auf nicht-infizierten, körpereigenen, gesunden Zellen nicht vorkommen. Folglich würde, wenn überhaupt, lediglich von dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR ein Risikopotential ausgehen. Wobei dieses hinsichtlich einer „on“-zielgerichteten Reaktion bereits *in vivo* analysiert wurde und bislang keine Hinweise darauf beruhen (Petschenka et al. 2012, Posterpräsentation auf dem CIMT Meeting in Mainz, Deutschland).

Im Rahmen der Dissertation konnten keine *in vivo* Versuche mit CMV-infizierten Mäusen, die das humane pp65₄₉₅₋₅₀₃-Epitop effizient exprimierten, durchgeführt werden (Kooperation mit Herrn Prof. X/X). Die Antigenpräsentation in den *in vivo*-Modellen war bislang nicht ausreichend, um eine T-Zellantwort hervorzurufen. Derzeit erfolgen weitere Optimierungsverfahren, um eine Anwendung des *in vivo* Systems zur Verfügung zu stellen. Es wäre von essentiellern Interesse zu untersuchen, inwiefern die bi-spezifischen T-Zellen zu einer Abnahme des Virustiters und einer Tumorregression *in vivo* führen könnten. Hinzukommend wäre ein Vergleich der Tumorregression zwischen Mäusen mit transplantierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen T-Zellen *versus* pp65₄₉₅₋₅₀₃- und p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-bi-spezifischen T-Zellen spannend, d.h. ob sich eine Effizienzsteigerung („triggering“ des TZR) des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR durch den pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR erzielen lassen würde.

Zum anderen könnte die endogene p53₂₆₄₋₂₇₂-Expression durch ein Medikament dem sogenannten „small molecule“ Nutlin-3a gezielt gesteigert werden. Vorversuche in Kooperation mit Herrn PD Dr. X und Herrn Dr. X zeigten in der Western Blot Analyse eine gezielte Erhöhung der wildtypischen p53-Expression (beispielsweise JVM-2 und IM-9 Zelllinien). Als Kontrolle diente die Zelllinie Saos2/143 mit mutiertem p53, so dass Nutlin-3a wirkungslos erschien. Hinzukommend konnte in einem ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstest gezeigt werden, dass retroviral transduzierte humane T-Zellen mit

einem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR (1-Plasmid-retrovirales Vektorsystem) zu einer gesteigerten Erkennung und Lyse, der mit Nutlin-3a behandelten Zellen führten (eigene unpublizierte Daten).

Des Weiteren beschäftigen sich aktuelle Forschungsprojekte mit der „*Next-Generation Sequencing (NGS)*“ Technologie (Metzker 2010). Ziel ist es Tumore hinsichtlich Mutationen zu analysieren bis hin zum gesamten Genom eines Patienten, um eine individuelle Immuntherapie durchführen zu können. Des Weiteren könnten effizienter Antigene identifiziert werden, die vom Tumor überexprimiert werden. Anschließend würden gezielt allogene oder autologe T-Zellen mit dem betreffenden TZR ausgestattet und in den Patienten reinjiziert werden. Auch im Hinblick auf die Generierung von bi-spezifischen T-Zellen könnte die *NGS*-Technologie eine effiziente Anwendbarkeit finden. Durch die Identifikation tumorrelevanter Antigene, könnte eine zielgerichtete Isolation von TZR aus Tumorpatienten erfolgen. Somit könnte das TZR-Repertoire für die retrovirale Transduktion vergrößert werden. Hinzukommend könnten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T-Zellen bzw. auch HCMV-spezifische T-Zellen anderer Epitop-Spezifitäten gezielt mit individuellen Tumorantigen-spezifischen TZR retroviral ausgestattet werden. Die *NGS* könnte auch für die Identifikation weiterer Virus-spezifischer Antigene verwendet werden. Auch bei der simultanen retroviralen Transduktion von HCMV-negativen T-Zellen könnten individuell benötigte TZR angewendet werden. Folglich würde eine individuelle Immuntherapie zu einer effizienteren Tumorregression führen. Hinzukommend wäre eine schnelle Identifizierung von potentiellen Antigenen und der Generierung von TZR-modifizierten tumorreaktiven sowie ggf. bi-spezifischen Effektor-T-Zellen gegeben. Auch könnte hierdurch eine Erhöhung des Wirt-gegen-Leukämie („*Graft-versus-Leukemia*“, GvL)-Effektes und der Limitierung bis hin zur vollständigen Inhibition einer GvHD erzielt werden.

6 Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass von einem CMV-pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten-TZR (2-Plasmide-retrovirales Vektorsystem) ein Potential der Fremdinteraktion mit spezifitätsfremden humanen gp100₂₈₀₋₂₈₈- und AML₁₄₋₂₂- sowie murinen MDM2₈₁₋₈₈- und p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR α und - β Ketten besteht. Folglich zeichneten sich essentielle Optimierungsverfahren (Kodonoptimierung des pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten-TZR (2-Plasmide-retrovirales Vektorsystem), Generierung eines pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten-(1-Plasmid-retrovirales Vektorsystem) und Einzelketten-TZR (2-Plasmide-retrovirales Vektorsystem)) ab. Hinzukommend wurden neuartige pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Doppelketten-TZR mittels der gezielten Punktmutagenese generiert.

Für die Generierung von bi-spezifischen T-Zellen wurden zwei Strategien etabliert. Das erste Verfahren hatte zur Voraussetzung, dass der Donor und Rezipient einen HCMV-seropositiven Status aufweisen würden. Es ließen sich effizient pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T-Zellen aus HCMV-seropositiven Blutproben isolieren und expandieren. Die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen charakterisierte eine effiziente pp65₄₉₅₋₅₀₃-Spezifität, welche sowohl durch eine exogene pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Peptidbeladung von Zielzellen als auch endogene pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische Peptidpräsentation durch HCMV-infizierte humane Fibroblasten untersucht wurde. Nach der Expansion der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen wurden diese mit einem Kodon-optimierten p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten- oder Doppelketten-TZR eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems retroviral transduziert. Die Effizienz der TZR-Expression beider TZR war von der jeweiligen intrinsischen strukturellen Stabilität sowie deren kompetitiven Stärke um die Bindung an CD3 abhängig. In einer intrazellulären Interferon- γ Zytokinfärbung zeigte sich eine effiziente Funktionalität der bi-spezifischen T-Zellen. In der zweiten Strategie wurde die Situation behandelt, dass der Donor HCMV-seronegativ und der Rezipient HCMV-seropositiv sind. Hierbei wurde das Verfahren der simultanen Kotransfektion mit einem pp65₄₉₅₋₅₀₃- und p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen TZR etabliert. Bei der Verwendung eines pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten- und p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifischen Einzelketten-TZR (1-Plasmid-retrovirale Vektorsysteme) ließen sich effizient pp65₄₉₅₋₅₀₃- und p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-bi-spezifische T-Zellen generieren. Die duale Spezifität wurde in einer

intrazellulären IFN- γ Zytokinfärbung nachgewiesen. Hinzukommend konnte der Einfluss einer möglichen Competition um CD3 und Fehlinteraktion mit den endogenen TZR α und - β Ketten dargelegt werden.

Da sich ein Einzelketten-TZR der Spezifität p53₂₆₄₋₂₇₂ als vorteilhaft in der Generierung von bi-spezifischen T-Zellen erwies, hinterfragten wir, ob ein Einzelketten-TZR-Format tatsächlich Fehlinteraktionen verhindert. Hierzu wurden Interaktionsanalysen eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR mit einer humanen gp100₂₈₀₋₂₈₈- und AML₁₄₋₂₂- sowie murinen MDM2₈₁₋₈₈- als auch der homologen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen TZR α Kette im 2-Plasmide- sowie 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystem durchgeführt. Die Analysen erfolgten sowohl unter nicht-kompetitiven Bedingungen in der humanen Jurkat-76 Zelllinie, welche den genomischen Verlust von endogenen TZR α und - β Ketten kennzeichnete, als auch unter kompetitiven Bedingungen in den humanen T-Zellen, die endogene TZR α und - β Ketten besitzen. In dem 2-Plasmide-retroviralen Vektorsystem konnte gezeigt werden, dass unter nicht-kompetitiven Bedingungen der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR in erhöhtem Maße mit der murinen MDM2₈₁₋₈₈- sowie homologen p53₂₆₄₋₂₇₂- als auch mit den humanen TZR α Ketten der Spezifitäten AML₁₄₋₂₂, gp100₂₈₀₋₂₈₈ und pp65₄₉₅₋₅₀₃ (V β 3-Analyse) interagieren konnte. Die humanen AML₁₄₋₂₂- und gp100₂₈₀₋₂₈₈-spezifischen TZR α Ketten zeigten eine stärkere Interaktion mit dem p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR als die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische TZR α Kette. Unter kompetitiven Bedingungen schien das Interaktionspotential vorzugsweise auf den murinen TZR α Ketten zu liegen, so dass sehr wahrscheinlich die exogene humane TZR α Kette vorzugsweise mit der endogenen humanen TZR β Kette interagiert als mit dem murinen p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR. Interessanterweise zeigte sich im 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystem ein geringeres Interaktionsverhalten mit murinen und vor allem humanen TZR α Ketten. Wiederum konnte sich bei den humanen TZR α Ketten mit den Spezifitäten gp100₂₈₀₋₂₈₈ und AM₁₄₋₂₂ ein stärkeres Interaktionspotential im Vergleich zur humanen pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen TZR α Kette nachweisen lassen. Folglich schien das Interaktionspotential zumindest TZR-Subfamilien-abhängig zu sein. Eine Antigen-spezifitäts-Abhängigkeit ist nicht auszuschließen, da von X gezeigt wurde, dass die CDR3-Antigenerkennungsschleifen Bindungsbeiträge zwischen TZR-Ketten

leisten. Der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR eines 2-Plasmide- oder 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems interagiert mit einer murinen oder humanen Vollängen-TZR α Kette, wodurch die V α -Domäne des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR verdrängt wurde. Folglich führte die Fehlinteraktion zu einem Verlust bzw. einer Minimierung der p53₂₆₄₋₂₇₂-Spezifität (V β 3⁺/Tetp53). Essentiell war es, dass der p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifische Einzelketten-TZR eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems, trotz minimaler Beeinflussungen, stets an der Zelloberfläche exprimiert werden konnte und sich kein vollständiger Verlust der p53₂₆₄₋₂₇₂-Spezifität verzeichnen ließ.

Aufgrund der Verdrängung der V α -Domäne durch eine Vollängen-TZR α -Kette erfolgte die Optimierung der V α /V β -Interaktion des p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR (1-Plasmid-retrovirales Vektorsystem). Es konnte ein neuartiger p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischer Einzelketten-TZR mit einer zusätzlichen künstlichen Disulfidbrücke zwischen V α (Q51C) und dem C-terminalen Ende des SL7-Linkers (G16C) generiert werden. Dieser Einzelketten-TZR zeigte im Vergleich zum Ausgangskonstrukt eine stärkere V α /V β -Bindung, ausgelesen an einer effizienten Reduktion der residuellen Kettenfehlinteaktion, sowie eine effiziente TZR-Expression und Funktionalität als auch eine vergleichbare TZR-MHC:Peptid-Affinität.

Zusammenfassend konnte eine effiziente Generierung von pp65₄₉₅₋₅₀₃- und p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-bi-spezifischen T-Zellen sowie eine strukturelle und funktionelle Optimierung eines p53₂₆₄₋₂₇₂-Tumorantigen-spezifischen Einzelketten-TZR im Kontext der Anwendung CMV/Tumorantigen-bi-spezifischer T-Zellen erreicht werden.

7 Literaturverzeichnis

Abad JD, Wrzensinski C, Overwijk W, De Witte MA, Jorritsma A, Hsu C, Gattinoni L, Cohen CJ, Paulos CM, Palmer DC, Haanen JB, Schumacher TN, Rosenberg SA, Restifo NP, Morgan RA (2008): T-cell receptor gene therapy of established tumors in a murine melanoma model. In: *J Immunother* 31 (1), S. 1-6

Aggen, D. H.; Chervin, A. S.; Schmitt, T. M.; Engels, B.; Stone, J. D.; Richman, S. A. et al. (2012): Single-chain ValphaVbeta T-cell receptors function without mispairing with endogenous TCR chains. In: *Gene Ther* 19 (4), S. 365–374.

Ahmadi, Maryam; King, Judith W.; Xue, Shao-An; Voisine, Cecile; Holler, Angelika; Wright, Graham P. et al. (2011): CD3 limits the efficacy of TCR gene therapy in vivo. In: *Blood* 118 (13), S. 3528–3537.

Bendle, Gavin M.; Linnemann, Carsten; Hooijkaas, Anna I.; Bies, Laura; Witte, Moniek A. de; Jorritsma, Annelies et al. (2010): Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy. In: *Nat Med* 16 (5), S. 565-70, 1p following 570.

Besser, Michal J.; Shapira-Frommer, Ronnie; Treves, Avraham J.; Zippel, Dov; Itzhaki, Orit; Hershkovitz, Liat et al. (2010): Clinical responses in a phase II study using adoptive transfer of short-term cultured tumor infiltration lymphocytes in metastatic melanoma patients. In: *Clin Cancer Res* 16 (9), S. 2646–2655.

Bialer, Gil; Horovitz-Fried, Miryam; Ya'acobi, Shlomo; Morgan, Richard A.; Cohen, Cyrille J. (2010): Selected murine residues endow human TCR with enhanced tumor recognition. In: *J Immunol* 184 (11), S. 6232–6241.

Birkholz, K.; Hombach, A.; Krug, C.; Reuter, S.; Kershaw, M.; Kampgen, E. et al. (2009): Transfer of mRNS encoding recombinant immunoreceptors reprograms CD4+ and CD8+ T cells for use in the adoptive immunotherapy of cancer. In: *Gene Ther* 16 (5), S. 596–604.

Blank, U.; Boitel, B.; Mege, D.; Ermonval, M.; Acuto, O. (1993): Analysis of tetanus toxin peptide/DR recognition by human T cell receptors reconstituted into a murine T cell hybridoma. In: *Eur J Immunol* 23 (12), S. 3057–3065.

Bollard, Catherine M.; Aguilar, Laura; Straathof, Karin C.; Gahn, Benedikt; Huls, M. Helen; Rousseau, Alexandra et al. (2004): Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus+ Hodgkin's disease. In: *J Exp Med* 200 (12), S. 1623–1633.

Boon, T.; van der Bruggen, P. (1996): Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. In: *J Exp Med* 183 (3), S. 725–729.

Boulter, J. M.; Glick, M.; Todorov, P. T.; Baston, E.; Sami, M.; Rizkallah, P.; Jakobsen, B. K. (2003): Stable, soluble T-cell receptor molecules for crystallization and therapeutics. In: *Protein Engineering Design and Selection* 16 (9), S. 707–711.

- Brichard, V.; van Pel, A.; Wolfel, T.; Wolfel, C.; Plaen, E. de; Lethe, B. et al. (1993): The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. In: *J Exp Med* 178 (2), S. 489–495.
- Bullock, W. O.; Fernandez J.M., und Short, J. M. (1987) XI1-blue: A High Efficiency Plasmid Transforming. In: *Reca Es. Bio Techniques* 5: 367–379
- Call, Matthew E.; Pyrdol, Jason; Wucherpfennig, Kai W. (2004): Stoichiometry of the T-cell receptor-CD3 complex and key intermediates assembled in the endoplasmic reticulum. In: *EMBO J* 23 (12), S. 2348–2357.
- Call, Matthew E.; Wucherpfennig, Kai W. (2004): Molecular mechanisms for the assembly of the T cell receptor-CD3 complex. In: *Mol Immunol* 40 (18), S. 1295–1305.
- Call, Matthew E.; Pyrdol, Jason; Wiedman Martin; Wucherpfennig, Kai W. (2002): The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. In: *Cell* 111 (7), S. 967-979.
- Chamoto, Kenji; Tsuji, Takemasa; Funamoto, Hiromi; Kosaka, Akemi; Matsuzaki, Junko; Sato, Takeshi et al. (2004): Potentiation of tumor eradication by adoptive immunotherapy with T-cell receptor gene-transduced T-helper type 1 cells. In: *Cancer Res* 64 (1), S. 386–390.
- Cheever, M. A.; Disis, M. L.; Bernhard, H.; Gralow, J. R.; Hand, S. L.; Huseby, E. S. et al. (1995): Immunity to oncogenic proteins. In: *Immunol Rev* 145, S. 33–59.
- Clay, T. M.; Custer, M. C.; Sachs, J.; Hwu, P.; Rosenberg, S. A.; Nishimura, M. I. (1999): Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity. In: *J Immunol* 163 (1), S. 507–513.
- Coccoris, Miriam; Swart, Erwin; Witte, Moniek A. de; van Heijst, Jeroen W. J.; Haanen, John B. A. G.; Schepers, Koen; Schumacher, Ton N. M. (2008): Long-term functionality of TCR-transduced T cells in vivo. In: *J Immunol* 180 (10), S. 6536–6543.
- Cohen, Cyrille J.; Li, Yong F.; El-Gamil, Mona; Robbins, Paul F.; Rosenberg, Steven A.; Morgan, Richard A. (2007): Enhanced antitumor activity of T cells engineered to express T-cell receptors with a second disulfide bond. In: *Cancer Res* 67 (8), S. 3898–3903.
- Cohen, Cyrille J.; Zhao, Yangbing; Zheng, Zhili; Rosenberg, Steven A.; Morgan, Richard A. (2006): Enhanced antitumor activity of murine-human hybrid T-cell receptor (TCR) in human lymphocytes is associated with improved pairing and TCR/CD3 stability. In: *Cancer Res* 66 (17), S. 8878–8886.
- Comoli, Patrizia; Pedrazzoli, Paolo; Maccario, Rita; Basso, Sabrina; Carminati, Ornella; Labirio, Massimo et al. (2005): Cell therapy of stage IV nasopharyngeal carcinoma with autologous Epstein-Barr virus-targeted cytotoxic T lymphocytes. In: *J Clin Oncol* 23 (35), S. 8942–8949.
- Cooper, L. J.; Kalos, M.; Lewinsohn, D. A.; Riddell, S. R.; Greenberg, P. D. (2000): Transfer of specificity for human immunodeficiency virus type 1 into primary human T lymphocytes by introduction of T-cell receptor genes. In: *J Virol* 74 (17), S. 8207–8212.

- Cooray, Samantha; Howe, Steven J.; Thrasher, Adrian J. (2012): Retrovirus and lentivirus vector design and methods of cell conditioning. In: *Methods Enzymol* 507, S. 29–57.
- Coulie, P. G.; Brichard, V.; van Pel, A.; Wolfel, T.; Schneider, J.; Traversari, C. et al. (1994): A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. In: *J Exp Med* 180 (1), S. 35–42.
- Davis, Jeremy L.; Theoret, Marc R.; Zheng, Zhili; Lamers, Cor H. J.; Rosenberg, Steven A.; Morgan, Richard A. (2010): Development of human anti-murine T-cell receptor antibodies in both responding and nonresponding patients enrolled in TCR gene therapy trials. In: *Clin Cancer Res* 16 (23), S. 5852–5861.
- Day, Elizabeth K.; Carmichael, Andrew J.; Berge, Ineke J. M. ten; Waller, Edward C. P.; Sissons, J. G. Patrick; Wills, Mark R. (2007): Rapid CD8+ T cell repertoire focusing and selection of high-affinity clones into memory following primary infection with a persistent human virus: human cytomegalovirus. In: *J Immunol* 179 (5), S. 3203–3213.
- Dietrich J; Hou X; Wegener A. M.; Geisler C (1994): CD3 gamma contains a phosphoserine-dependent di-leucine motif involved in down-regulation of the T cell receptor. In: *EMBO J* 13 (9), S. 2156-2166.
- Dembic, Z.; Haas, W.; Weiss, S.; McCubrey, J.; Kiefer, H.; Boehmer, H. von; Steinmetz, M. (1986): Transfer of specificity by murine alpha and beta T-cell receptor genes. In: *Nature* 320 (6059), S. 232–238.
- Disis, M. L.; Smith, J. W.; Murphy, A. E.; Chen, W.; Cheever, M. A. (1994): In vitro generation of human cytolytic T-cells specific for peptides derived from the HER-2/neu protooncogene protein. In: *Cancer Res* 54 (4), S. 1071–1076.
- Distler, Eva; Wolfel, Catherine; Kohler, Sylvia; Nonn, Marion; Kaus, Nina; Schnurer, Elke et al. (2008): Acute myeloid leukemia (AML)-reactive cytotoxic T lymphocyte clones rapidly expanded from CD8(+) CD62L((high)+) T cells of healthy donors prevent AML engraftment in NOD/SCID IL2Rgamma(null) mice. In: *Exp Hematol* 36 (4), S. 451–463.
- Dittmer, D.; Pati, S.; Zambetti, G.; Chu, S.; Teresky, A. K.; Moore, M. et al. (1993): Gain of function mutations in p53. In: *Nat Genet* 4 (1), S. 42–46.
- Dossett, Michelle L.; Teague, Ryan M.; Schmitt, Thomas M.; Tan, Xiaoxia; Cooper, Laurence Jn; Pinzon, Cristina; Greenberg, Philip D. (2009): Adoptive immunotherapy of disseminated leukemia with TCR-transduced, CD8+ T cells expressing a known endogenous TCR. In: *Mol Ther* 17 (4), S. 742–749.
- Dudley, Mark E.; Wunderlich, John R.; Robbins, Paul F.; Yang, James C.; Hwu, Patrick; Schwartzentruber, Douglas J. et al. (2002): Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. In: *Science* 298 (5594), S. 850–854.

- Dudley, Mark E.; Yang, James C.; Sherry, Richard; Hughes, Marybeth S.; Royal, Richard; Kammula, Udai et al. (2008): Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. In: *J Clin Oncol* 26 (32), S. 5233–5239.
- Garcia, K. C.; Teyton, L. (1998): T-cell receptor peptide-MHC interactions: biological lessons from structural studies. In: *Curr Opin Biotechnol* 9 (4), S. 338–343.
- Gattinoni, Luca; Klebanoff, Christopher A.; Palmer, Douglas C.; Wrzesinski, Claudia; Kerstann, Keith; Yu, Zhiya et al. (2005): Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8⁺ T cells. In: *J Clin Invest* 115 (6), S. 1616–1626.
- Gattinoni, Luca; Powell, Daniel J., JR; Rosenberg, Steven A.; Restifo, Nicholas P. (2006): Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. In: *Nat Rev Immunol* 6 (5), S. 383–393.
- Gillespie GM, Wills MR, Appay V, O'Callaghan C, Murphy M, Smith N, Sissons P, Rowland-Jones S, Bell JI, Moss PA (2000): Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirus-specific CD8⁽⁺⁾ T lymphocytes in healthy seropositive donors. In: *J Vir* 74 (1), S. 8140-8150.
- Gnjatic S; Cai Z; Viguier M; Chouaib S; Guillet JG; Choppin J (1998): Accumulation of the p53 protein allows recognition by human CTL of a wild-type p53 epitope presented by breast carcinomas and melanomas. In: *J Immunol* 160 (1), S. 328-333.
- Govers, Coen; Sebestyen, Zsolt; Coccoris, Miriam; Willemsen, Ralph A.; Debets, Reno (2010): T cell receptor gene therapy: strategies for optimizing transgenic TCR pairing. In: *Trends Mol Med* 16 (2), S. 77–87.
- Gratama, J. W.; van Esser, J. W.; Lamers, C. H.; Tournay, C.; Lowenberg, B.; Bolhuis, R. L.; Cornelissen, J. J. (2001): Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺ T lymphocytes in T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection. In: *Blood* 98 (5), S. 1358–1364.
- Hacein-Bey-Abina, S.; Kalle, C. von; Schmidt, M.; McCormack, M. P.; Wulffraat, N.; Leboulch, P. et al. (2003): LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. In: *Science* 302 (5644), S. 415–419.
- Hacein-Bey-Abina, Salima; Garrigue, Alexandrine; Wang, Gary P.; Soulier, Jean; Lim, Annick; Morillon, Estelle et al. (2008): Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. In: *J Clin Invest* 118 (9), S. 3132–3142.
- Hart, D. P.; Xue, S-A; Thomas, S.; Cesco-Gaspere, M.; Tranter, A.; Willcox, B. et al. (2008): Retroviral transfer of a dominant TCR prevents surface expression of a large proportion of the endogenous TCR repertoire in human T cells. In: *Gene Ther* 15 (8), S. 625–631.
- Heemskerk, Mirjam H. M.; Hagedoorn, Renate S.; van der Hoorn, Menno A. W. G.; van der Veken, Lars T.; Hoogeboom, Manja; Kester, Michel G. D. et al. (2007): Efficiency of T-cell receptor expression in dual-specific T cells is controlled by the intrinsic qualities of the TCR chains within the TCR-CD3 complex. In: *Blood* 109 (1), S. 235–243.

- Heemskerk, Mirjam H. M.; Hoogeboom, Manja; Hagedoorn, Renate; Kester, Michel G. D.; Willemze, Roel; Falkenburg, J. H. Frederik (2004): Reprogramming of virus-specific T cells into leukemia-reactive T cells using T cell receptor gene transfer. In: *J Exp Med* 199 (7), S. 885–894.
- Hoffmann, T. K.; Nakano, K.; Elder, E. M.; Dworacki, G.; Finkelstein, S. D.; Appella, E. et al. (2000): Generation of T cells specific for the wild-type sequence p53(264-272) peptide in cancer patients: implications for immunoselection of epitope loss variants. In: *J Immunol* 165 (10), S. 5938–5944.
- Hollstein, M.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Harris, C. C. (1991): p53 mutations in human cancers. In: *Science* 253 (5015), S. 49–53.
- Houbiers, J. G.; Nijman, H. W.; van der Burg, S. H.; Drijfhout, J. W.; Kenemans, P.; van de Velde, C. J. et al. (1993): In vitro induction of human cytotoxic T lymphocyte responses against peptides of mutant and wild-type p53. In: *Eur J Immunol* 23 (9), S. 2072–2077.
- Johnson, Laura A.; Heemskerk, Bianca; Powell, Daniel J., JR; Cohen, Cyrille J.; Morgan, Richard A.; Dudley, Mark E. et al. (2006): Gene transfer of tumor-reactive TCR confers both high avidity and tumor reactivity to nonreactive peripheral blood mononuclear cells and tumor-infiltrating lymphocytes. In: *J Immunol* 177 (9), S. 6548–6559.
- Johnson, Laura A.; Morgan, Richard A.; Dudley, Mark E.; Cassard, Lydie; Yang, James C.; Hughes, Marybeth S. et al. (2009): Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. In: *Blood* 114 (3), S. 535–546.
- Jones, Lindsay L.; Colf, Leremy A.; Stone, Jennifer D.; Garcia, K. Christopher; Kranz, David M. (2008): Distinct CDR3 conformations in TCRs determine the level of cross-reactivity for diverse antigens, but not the docking orientation. In: *J Immunol* 181 (9), S. 6255–6264.
- Jorritsma, Annelies; Gomez-Eerland, Raquel; Dokter, Maarten; van de Kastelee, Willeke; Zoet, Yvonne M.; Doxiadis, Ilias I. N. et al. (2007): Selecting highly affine and well-expressed TCRs for gene therapy of melanoma. In: *Blood* 110 (10), S. 3564–3572.
- Kawakami, Y.; Eliyahu, S.; Jennings, C.; Sakaguchi, K.; Kang, X.; Southwood, S. et al. (1995): Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. In: *J Immunol* 154 (8), S. 3961–3968.
- Kessels, H. W.; Wolkers, M. C.; van den Boom, M. D.; van der Valk, M. A.; Schumacher, T. N. (2001): Immunotherapy through TCR gene transfer. In: *Nat Immunol* 2 (10), S. 957–961.
- Kessels, Helmut W. H. G.; Schepers, Koen; van den Boom, Marly D.; Topham, David J.; Schumacher, Ton N. M. (2006): Generation of T cell help through a MHC class I-restricted TCR. In: *J Immunol* 177 (2), S. 976–982.
- Kolb, Hans-Jochem; Schmid, Christoph; Barrett, A. John; Schendel, Dolores J. (2004): Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. In: *Blood* 103 (3), S. 767–776.
- Kondo, K.; Xu, J.; Mocarski, E. S. (1996): Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (20), S. 11137–11142.

- Kuball, Jurgen; Dossett, Michelle L.; Wolfl, Matthias; Ho, William Y.; Voss, Ralf-Holger; Fowler, Carla; Greenberg, Philip D. (2007): Facilitating matched pairing and expression of TCR chains introduced into human T cells. In: *Blood* 109 (6), S. 2331–2338.
- Kuball, Jurgen; Hauptrock, Beate; Malina, Victoria; Antunes, Edite; Voss, Ralf-Holger; Wolfl, Matthias et al. (2009): Increasing functional avidity of TCR-redirectioned T cells by removing defined N-glycosylation sites in the TCR constant domain. In: *J Exp Med* 206 (2), S. 463–475.
- Kuball, Jurgen; Schmitz, Frank W.; Voss, Ralf-Holger; Ferreira, Edite Antunes; Engel, Renate; Guillaume, Philippe et al. (2005): Cooperation of human tumor-reactive CD4+ and CD8+ T cells after redirection of their specificity by a high-affinity p53A2.1-specific TCR. In: *Immunity* 22 (1), S. 117–129.
- Labrecque, N.; Whitfield, L. S.; Obst, R.; Waltzinger, C.; Benoist, C.; Mathis, D. (2001): How much TCR does a T cell need? In: *Immunity* 15 (1), S. 71–82.
- Labrecque, S.; Naor, N.; Thomson, D.; Matlashewski, G. (1993): Analysis of the anti-p53 antibody response in cancer patients. In: *Cancer Res* 53 (15), S. 3468–3471.
- Lamers, Cor H. J.; Willemsen, Ralph; van Elzaker, Pascal; van Steenbergen-Langeveld, Sabine; Broertjes, Marieke; Oosterwijk-Wakka, Jeannette et al. (2011): Immune responses to transgene and retroviral vector in patients treated with ex vivo-engineered T cells. In: *Blood* 117 (1), S. 72–82.
- Leisegang, Matthias; Engels, Boris; Meyerhuber, Peter; Kieback, Elisa; Sommermeyer, Daniel; Xue, Shao-An et al. (2008): Enhanced functionality of T cell receptor-redirectioned T cells is defined by the transgene cassette. In: *J Mol Med (Berl)* 86 (5), S. 573–583.
- Lennette, E. T.; Winberg, G.; Yadav, M.; Enblad, G.; Klein, G. (1995): Antibodies to LMP2A/2B in EBV-carrying malignancies. In: *Eur J Cancer* 31 (11), S. 1875–1878.
- Levine, A. J.; Momand, J.; Finlay, C. A. (1991): The p53 tumour suppressor gene. In: *Nature* 351 (6326), S. 453–456.
- Linnemann, Carsten; Schumacher, Ton N. M.; Bendle, Gavin M. (2011): T-cell receptor gene therapy: critical parameters for clinical success. In: *J Invest Dermatol* 131 (9), S. 1806–1816.
- Marijt, Erik; Wafelman, Amon; van der Hoorn, Menno; van Bergen, Cornelis; Bongaerts, Rian; van Luxemburg-Heijs, Simone et al. (2007): Phase I/II feasibility study evaluating the generation of leukemia-reactive cytotoxic T lymphocyte lines for treatment of patients with relapsed leukemia after allogeneic stem cell transplantation. In: *Haematologica* 92 (1), S. 72–80.
- Metzker, Michael L. (2010): Sequencing technologies - the next generation. In: *Nat Rev Genet* 11 (1), S. 31–46.
- Milano, Filippo; Pergam, Steven A.; Xie, Hu; Leisenring, Wendy M.; Gutman, Jonathan A.; Riffkin, Ivy et al. (2011): Intensive strategy to prevent CMV disease in seropositive umbilical cord blood transplant recipients. In: *Blood* 118 (20), S. 5689–5696.

- Morgan, Richard A.; Dudley, Mark E.; Wunderlich, John R.; Hughes, Marybeth S.; Yang, James C.; Sherry, Richard M. et al. (2006): Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. In: *Science* 314 (5796), S. 126–129.
- Morgan, Richard A.; Dudley, Mark E.; Yu, Yik Y. L.; Zheng, Zhili; Robbins, Paul F.; Theoret, Marc R. et al. (2003): High efficiency TCR gene transfer into primary human lymphocytes affords avid recognition of melanoma tumor antigen glycoprotein 100 and does not alter the recognition of autologous melanoma antigens. In: *J Immunol* 171 (6), S. 3287–3295.
- Mroz K.; Eckhard L.; Knies D.; Thomas S.; Klobuch S.; Guillaume P.; Romero P.; Theobald M.; Voss R.H. (2012): In vitro “on-target”-reactivity of affinity-modified p53₂₆₄₋₂₇₂ tumor antigen-specific TCRs retrovirally transduced into human T-cells. In: *Cancer Immunotherapy Meeting (CIMT)* in Mainz 2012, Posterpräsentation.
- Neudorfer, Julia; Schmidt, Burkhard; Huster, Katharina M.; Anderl, Florian; Schiemann, Matthias; Holzapfel, Gerd et al. (2007): Reversible HLA multimers (Streptamers) for the isolation of human cytotoxic T lymphocytes functionally active against tumor- and virus-derived antigens. In: *J Immunol Methods* 320 (1-2), S. 119–131.
- Newrzela, Sebastian; Cornils, Kerstin; Li, Zhixiong; Baum, Christopher; Brugman, Martijn H.; Hartmann, Marianne et al. (2008): Resistance of mature T cells to oncogene transformation. In: *Blood* 112 (6), S. 2278–2286.
- Offringa, Rienk (2009): Antigen choice in adoptive T-cell therapy of cancer. In: *Curr Opin Immunol* 21 (2), S. 190–199.
- Pike-Overzet, Karin; van der Burg, Mirjam; Wagemaker, Gerard; van Dongen, Jacques J. M.; Staal, Frank J. T. (2007): New insights and unresolved issues regarding insertional mutagenesis in X-linked SCID gene therapy. In: *Mol Ther* 15 (11), S. 1910–1916.
- Petschenka J.; Antunes E.; Theobald M.; Echchannaoui H. (2012): An optimized single chain p53(264-272)-specific T-cell receptor devoid of ON/OFF target autoimmunity in a humanized mouse model of adoptive T-cell transfer. In: *Cancer Immunotherapy Meeting (CIMT)* in Mainz 2012, Posterpräsentation.
- Pule, Martin A.; Savoldo, Barbara; Myers, G. Doug; Rossig, Claudia; Russell, Heidi V.; Dotti, Gianpietro et al. (2008): Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. In: *Nat Med* 14 (11), S. 1264–1270.
- Reddehase, M. J. (2000): The immunogenicity of human and murine cytomegaloviruses. In: *Curr Opin Immunol* 12 (6), S. 738.
- Reddehase, Matthias J. (2002): Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. In: *Nat Rev Immunol* 2 (11), S. 831–844.

- Reusser, P.; Riddell, S. R.; Meyers, J. D.; Greenberg, P. D. (1991): Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. In: *Blood* 78 (5), S. 1373–1380.
- Riddell SR, Greenberg PD (1990): The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells. In: *J Immunol Methods* 128 (2), S. 189-201.
- Riddell, S. R.; Reusser, P.; Greenberg, P. D. (1991): Cytotoxic T cells specific for cytomegalovirus: a potential therapy for immunocompromised patients. In: *Rev Infect Dis* 13 Suppl 11, S. S966-73.
- Riddell, S. R.; Watanabe, K. S.; Goodrich, J. M.; Li, C. R.; Agha, M. E.; Greenberg, P. D. (1992): Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. In: *Science* 257 (5067), S. 238–241.
- Robbins, Paul F.; Dudley, Mark E.; Wunderlich, John; El-Gamil, Mona; Li, Yong F.; Zhou, Juhua et al. (2004): Cutting edge: persistence of transferred lymphocyte clonotypes correlates with cancer regression in patients receiving cell transfer therapy. In: *J Immunol* 173 (12), S. 7125–7130.
- Robbins, Paul F.; Li, Yong F.; El-Gamil, Mona; Zhao, Yangbing; Wargo, Jennifer A.; Zheng, Zhili et al. (2008): Single and dual amino acid substitutions in TCR CDRs can enhance antigen-specific T cell functions. In: *J Immunol* 180 (9), S. 6116–6131.
- Robert, B.; Guillaume, P.; Luescher, I.; Romero, P.; Mach, J. P. (2000): Antibody-conjugated MHC class I tetramers can target tumor cells for specific lysis by T lymphocytes. In: *Eur J Immunol* 30 (11), S. 3165–3170.
- Rooney, C. M.; Smith, C. A.; Ng, C. Y.; Loftin, S.; Li, C.; Krance, R. A. et al. (1995): Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. In: *Lancet* 345 (8941), S. 9–13.
- Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, Citrin DE, Restifo NP, Robbins PF, Wunderlich JR, Morton KE, Laurencot CM, Steinberg SM, White DE, Dudley ME. (2011): Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. In: *Clin Cancer Res* 17 (13), S. 4550-4557
- Rosenberg, S. A. (1992): Gene therapy for cancer. In: *JAMA* 268 (17), S. 2416–2419.
- Rosenberg, S. A.; Packard, B. S.; Aebbersold, P. M.; Solomon, D.; Topalian, S. L.; Toy, S. T. et al. (1988): Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. In: *N Engl J Med* 319 (25), S. 1676–1680.
- Rosenberg, Steven A. (2010): Of Mice, Not Men: No Evidence for Graft-versus-Host Disease in Humans Receiving T-Cell Receptor–Transduced Autologous T Cells. In: *Mol Ther* 18 (10), S. 1744–1745.
- Sadovnikova, E.; Jopling, L. A.; Soo, K. S.; Stauss, H. J. (1998): Generation of human tumor-reactive cytotoxic T cells against peptides presented by non-self HLA class I molecules. In: *Eur J Immunol* 28 (1), S. 193–200.

- Schaft, Niels; Willemsen, Ralph A.; Vries, Jolanda de; Lankiewicz, Birgit; Essers, Bram W. L.; Gratama, Jan-Willem et al. (2003): Peptide fine specificity of anti-glycoprotein 100 CTL is preserved following transfer of engineered TCR alpha beta genes into primary human T lymphocytes. In: *J Immunol* 170 (4), S. 2186–2194.
- Schodin, B. A.; Tsomides, T. J.; Kranz, D. M. (1996): Correlation between the number of T cell receptors required for T cell activation and TCR-ligand affinity. In: *Immunity* 5 (2), S. 137–146.
- Scholten, Kirsten B. J.; Kramer, Duco; Kueter, Esther W. M.; Graf, Marcus; Schoedl, Thomas; Meijer, Chris J. L. M. et al. (2006): Codon modification of T cell receptors allows enhanced functional expression in transgenic human T cells. In: *Clin Immunol* 119 (2), S. 135–145.
- Schub, Andrea; Schuster, Ingrid G.; Hammerschmidt, Wolfgang; Moosmann, Andreas (2009): CMV-specific TCR-transgenic T cells for immunotherapy. In: *J Immunol* 183 (10), S. 6819–6830.
- Schumacher, Ton N. M. (2002): T-cell-receptor gene therapy. In: *Nat Rev Immunol* 2 (7), S. 512–519.
- Sebestyen, Zsolt; Schooten, Erik; Sals, Tamara; Zaldivar, Irene; San Jose, Esther; Alarcon, Balbino et al. (2008): Human TCR that incorporate CD3zeta induce highly preferred pairing between TCRalpha and beta chains following gene transfer. In: *J Immunol* 180 (11), S. 7736–7746.
- Sherman, L. A.; Theobald, M.; Morgan, D.; Hernandez, J.; Bacik, I.; Yewdell, J. et al. (1998): Strategies for tumor elimination by cytotoxic T lymphocytes. In: *Crit Rev Immunol* 18 (1-2), S. 47–54.
- Sommermeier, Daniel; Uckert, Wolfgang (2010): Minimal amino acid exchange in human TCR constant regions fosters improved function of TCR gene-modified T cells. In: *J Immunol* 184 (11), S. 6223–6231.
- Sommermeier D, Neudorfer J, Weinhold M, Leisegang M, Engels B, Noessner E, Heemskerk MH, Charo J, Schendel DJ, Blankenstein T, Bernhard H, Uckert W. (2006): Designer T cells by T cell receptor replacement. In: *Eur J Immunol* 36 (11), S. 3052-3059
- Soneoka Y, Cannon PM, Ramsdale EE, Griffiths JC, Romano G, Kingsman SM, Kingsman AJ (1995): A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. In: *Nucleic Acids Res* 23 (4), S. 628-633.
- Stanislawski, T.; Voss, R. H.; Lotz, C.; Sadovnikova, E.; Willemsen, R. A.; Kuball, J. et al. (2001): Circumventing tolerance to a human MDM2-derived tumor antigen by TCR gene transfer. In: *Nat Immunol* 2 (10), S. 962–970.
- Szymczak, Andrea L.; Workman, Creg J.; Wang, Yao; Vignali, Kate M.; Dilioglou, Smaroula; Vanin, Elio F.; Vignali, Dario A. A. (2004): Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. In: *Nat Biotechnol* 22 (5), S. 589–594.
- Tahara, Hiroyuki; Fujio, Keishi; Araki, Yasuto; Setoguchi, Keigo; Misaki, Yoshikata; Kitamura, Toshio; Yamamoto, Kazuhiko (2003): Reconstitution of CD8+ T cells by retroviral transfer of the TCR alpha beta-chain genes isolated from a clonally expanded P815-infiltrating lymphocyte. In: *J Immunol* 171 (4), S. 2154–2160.

- Taylor-Wiedeman J, Sissons JG, Borysiewicz LK, Sinclair JH (1991): Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. In: *J Gen Virol* 72 (9), S. 2059-2064.
- Theobald, M.; Biggs, J.; Dittmer, D.; Levine, A. J.; Sherman, L. A. (1995): Targeting p53 as a general tumor antigen. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (26), S. 11993–11997.
- Theobald, M.; Biggs, J.; Hernandez, J.; Lustgarten, J.; Labadie, C.; Sherman, L. A. (1997): Tolerance to p53 by A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. In: *J Exp Med* 185 (5), S. 833–841.
- Theobald, M.; Ruppert, T.; Kuckelkorn, U.; Hernandez, J.; Haussler, A.; Ferreira, E. A. et al. (1998): The sequence alteration associated with a mutational hotspot in p53 protects cells from lysis by cytotoxic T lymphocytes specific for a flanking peptide epitope. In: *J Exp Med* 188 (6), S. 1017–1028.
- Theoret, Marc R.; Cohen, Cyrille J.; Nahvi, Azam V.; Ngo, Lien T.; Suri, Kimberly B.; Powell, Daniel J., JR et al. (2008): Relationship of p53 overexpression on cancers and recognition by anti-p53 T cell receptor-transduced T cells. In: *Hum Gene Ther* 19 (11), S. 1219–1232.
- Tindle, R. W. (1996): Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. In: *Curr Opin Immunol* 8 (5), S. 643–650.
- van Lent, Anja U.; Nagasawa, Maho; van Loenen, Marleen M.; Schotte, Remko; Schumacher, Ton N. M.; Heemskerk, Mirjam H. M. et al. (2007): Functional human antigen-specific T cells produced in vitro using retroviral T cell receptor transfer into hematopoietic progenitors. In: *J Immunol* 179 (8), S. 4959–4968.
- van Loenen, Marleen M.; Boer, Renate de; Amir, Avital L.; Hagedoorn, Renate S.; Volbeda, Gerdien L.; Willemze, Roelof et al. (2010): Mixed T cell receptor dimers harbor potentially harmful neoreactivity. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (24), S. 10972–10977.
- van Loenen, Marleen M.; Hagedoorn, Renate S.; Kester, Michel G. D.; Hoogeboom, Manja; Willemze, Roel; Falkenburg, J. H. Frederik; Heemskerk, Mirjam H. M. (2009): Kinetic preservation of dual specificity of coprogrammed minor histocompatibility antigen-reactive virus-specific T cells. In: *Cancer Res* 69 (5), S. 2034–2041.
- Varani, Luca; Bankovich, Alexander J.; Liu, Corey W.; Colf, Leremy A.; Jones, Lindsay L.; Kranz, David M. et al. (2007): Solution mapping of T cell receptor docking footprints on peptide-MHC. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (32), S. 13080–13085.
- Vierboom MP, Nijman HW, Offringa R, van der Voort EI, van Hall T, van den Broek L, Fleuren GJ, Kenemans P, Kast WM, Melief CJ (1997): Tumor eradication by wild-type p53-specific cytotoxic T lymphocytes. In: *J Exp Med* 186 (5), S. 695-704
- Vlad, Anda M.; Finn, Olivera J. (2004): Glycoprotein tumor antigens for immunotherapy of breast cancer. In: *Breast Dis* 20, S. 73–79.
- Vlad, Anda M.; Kettel, Jessica C.; Alajez, Nehad M.; Carlos, Casey A.; Finn, Olivera J. (2004): MUC1 immunobiology: from discovery to clinical applications. In: *Adv Immunol* 82, S. 249–293.

- Voss, R. H.; Ermler, U.; Essen, L. O.; Wenzl, G.; Kim, Y. M.; Flecker, P. (1996): Crystal structure of the bifunctional soybean Bowman-Birk inhibitor at 0.28-nm resolution. Structural peculiarities in a folded protein conformation. In: *Eur J Biochem* 242 (1), S. 122–131.
- Voss, Ralf-Holger; Kuball, Jurgen; Engel, Renate; Guillaume, Philippe; Romero, Pedro; Huber, Christoph; Theobald, Matthias (2006): Redirection of T cells by delivering a transgenic mouse-derived MDM2 tumor antigen-specific TCR and its humanized derivative is governed by the CD8 coreceptor and affects natural human TCR expression. In: *Immunol Res* 34 (1), S. 67–87.
- Voss, Ralf-Holger; Kuball, Jurgen; Theobald, Matthias (2005): Designing TCR for cancer immunotherapy. In: *Methods Mol Med* 109, S. 229–256.
- Voss, Ralf-Holger; Thomas, Simone; Pfirschke, Christina; Hauptrock, Beate; Klobuch, Sebastian; Kuball, Jurgen et al. (2010): Coexpression of the T-cell receptor constant alpha domain triggers tumor reactivity of single-chain TCR-transduced human T cells. In: *Blood* 115 (25), S. 5154–5163.
- Voss, Ralf-Holger; Willemsen, Ralph A.; Kuball, Jurgen; Grabowski, Margarete; Engel, Renate; Intan, Ratna S. et al. (2008): Molecular design of the Calphabeta interface favors specific pairing of introduced TCRalphabeta in human T cells. In: *J Immunol* 180 (1), S. 391–401.
- Walter, E. A.; Greenberg, P. D.; Gilbert, M. J.; Finch, R. J.; Watanabe, K. S.; Thomas, E. D.; Riddell, S. R. (1995): Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. In: *N Engl J Med* 333 (16), S. 1038–1044.
- Wargo, Jennifer A.; Robbins, Paul F.; Li, Yong; Zhao, Yangbing; El-Gamil, Mona; Caragacianu, Diana et al. (2009): Recognition of NY-ESO-1+ tumor cells by engineered lymphocytes is enhanced by improved vector design and epigenetic modulation of tumor antigen expression. In: *Cancer Immunol Immunother* 58 (3), S. 383–394.
- Warren, Edus H.; Fujii, Nobuharu; Akatsuka, Yoshiki; Chaney, Colette N.; Mito, Jeffrey K.; Loeb, Keith R. et al. (2010): Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens. In: *Blood* 115 (19), S. 3869–3878.
- Weekes, M. P.; Wills, M. R.; Mynard, K.; Carmichael, A. J.; Sissons, J. G. (1999): The memory cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to human cytomegalovirus infection contains individual peptide-specific CTL clones that have undergone extensive expansion in vivo. In: *J Virol* 73 (3), S. 2099–2108.
- Wei, X.; Tromberg, B. J.; Cahalan, M. D. (1999): Mapping the sensitivity of T cells with an optical trap: polarity and minimal number of receptors for Ca(2+) signaling. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (15), S. 8471–8476.
- Willemsen, Ralph A.; Debets, Reno; Chames, Patrick; Bolhuis, Reinder L. H. (2003): Genetic engineering of T cell specificity for immunotherapy of cancer. In: *Hum Immunol* 64 (1), S. 56–68.
- Wills, M. R.; Carmichael, A. J.; Mynard, K.; Jin, X.; Weekes, M. P.; Plachter, B.; Sissons, J. G. (1996): The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural

- protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. In: *J Virol* 70 (11), S. 7569–7579.
- Wills, M. R.; Carmichael, A. J.; Weekes, M. P.; Mynard, K.; Okecha, G.; Hicks, R.; Sissons, J. G. (1999): Human virus-specific CD8⁺ CTL clones revert from CD45RO^{high} to CD45RA^{high} in vivo: CD45RA^{high}CD8⁺ T cells comprise both naive and memory cells. In: *J Immunol* 162 (12), S. 7080–7087.
- Witte, Moniek A. de; Bendle, Gavin M.; van den Boom, Marly D.; Coccoris, Miriam; Schell, Todd D.; Tevethia, Satvir S. et al. (2008): TCR gene therapy of spontaneous prostate carcinoma requires in vivo T cell activation. In: *J Immunol* 181 (4), S. 2563–2571.
- Witte, Moniek A. de; Bendle, Gavin M.; van den Boom, Marly D.; Coccoris, Miriam; Schell, Todd D.; Tevethia, Satvir S. et al. (2008): TCR gene therapy of spontaneous prostate carcinoma requires in vivo T cell activation. In: *J Immunol* 181 (4), S. 2563–2571.
- Witte, Moniek A. de; Coccoris, Miriam; Wolkers, Monika C.; van den Boom, Marly D.; Mesman, Elly M.; Song, Ji-Ying et al. (2006): Targeting self-antigens through allogeneic TCR gene transfer. In: *Blood* 108 (3), S. 870–877.
- Witte, Moniek A. de; Jorritsma, Annelies; Kaiser, Andrew; van den Boom, Marly D.; Dokter, Maarten; Bendle, Gavin M. et al. (2008): Requirements for effective antitumor responses of TCR transduced T cells. In: *J Immunol* 181 (7), S. 5128–5136.
- Wolfel, T.; Hauer, M.; Schneider, J.; Serrano, M.; Wolfel, C.; Klehmann-Hieb, E. et al. (1995): A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. In: *Science* 269 (5228), S. 1281–1284.
- Wolfel, T.; van Pel, A.; Brichard, V.; Schneider, J.; Seliger, B.; Zum Meyer Buschenfelde, K. H.; Boon, T. (1994): Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes. In: *Eur J Immunol* 24 (3), S. 759–764.
- Yang, S.; Cohen, C. J.; Peng, P. D.; Zhao, Y.; Cassard, L.; Yu, Z. et al. (2008): Development of optimal bicistronic lentiviral vectors facilitates high-level TCR gene expression and robust tumor cell recognition. In: *Gene Ther* 15 (21), S. 1411–1423.
- Yin, Qingsong; Zha, Xianfeng; Yang, Lijian; Chen, Shaohua; Zhou, Yubing; Wu, Xiuli; Li, Yangqiu (2011): Generation of diffuse large B cell lymphoma-associated antigen-specific Valpha6/Vbeta13⁺T cells by TCR gene transfer. In: *J Hematol Oncol* 4, S. 2.
- Zhang, Ling; Morgan, Richard A. (2012): Genetic engineering with T cell receptors. In: *Adv Drug Deliv Rev* 64 (8), S. 756–762.
- Zhang, Tong; He, Xianghui; Tsang, Tom C.; Harris, David T. (2004): Transgenic TCR expression: comparison of single chain with full-length receptor constructs for T-cell function. In: *Cancer Gene Ther* 11 (7), S. 487–496.
- Zhou, Wendi; Longmate, Jeff; Lacey, Simon F.; Palmer, Joycelynne M.; Gallez-Hawkins, Ghislaine; Thao, Lia et al. (2009): Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of

multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients. In: *Blood* 113 (25), S. 6465–6476.

8 Anhang

Primer:

Gezielte Punktmutagenese des Hu Wt TZR CMV zu Hu Mt TZR CMV:

for_Mt AV 18 : 5' GCCACATACCTCTGTGCAAGTAACACCGGTAAC 3'

rev_Mt AV 18 : 5' GTTACCGGTGTTACTTGCACAGAGGTATGTGGC 3'

for_Mt BV 13 : 5' TTCTGTGCCAGCAGTCCCGTGACCGGGACAGGCCA

CTATGGCTACACCTT 3'

rev_Mt BV 13 : 5' GAAGGTGTAGCCATAGTGGCCTGTCCCGGTCACGG

GACTGCTGGCACAGA 3'

Klonierung von Hu Wt α coTZR CMV in den retroviralen pBullet_puro und Hu Wt β coTZR CMV in den retroviralen pBullet_neo Vektor:

for_co_pp65 α _NcoI: 5' AGAGGTACCATGGAGAAGAAC 3'

rev_co_pp65 α _BamHI: 5' GAGCTCGGATCCTCAGCTGCT 3'

Interner Primer von co_pp65 α : 5' CCTGAACTTCCAGAACCTGAG 3'

for_co_pp65 β _NcoI: 5' AGAGGTACCATGGGCATCGGA 3'

rev_co_pp65 β _BamHI: 5' GAGCTCGGATCCTCAGAAGTC 3'

Klonierung des Hu Wt dc coTZR CMV eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems in den retroviralen pBullet_puro Vektor:

for_dc TZR CMV_NcoI: 5' GAGAGGTCCCATGGAAAAGAACCCCTGGCT 3'

rev_dc TZR CMV_BamHI: 5' GAGCTCGGATCCTCATCAGCTGTTCTTCTTC 3'

Mu α /Mu Wt sc TZR p53 eines 2-Plasmide-retroviralen Vektorsystems:

Hu Wt sc TZR p53 wurde in den retroviralen pBullet_neo Vektor kloniert:

for_sc p53_phosphoryliert: 5' GTCCTGGCGCTCCTCCCAGTGCTGGGGATAC 3'

rev_sc p53_BamHI: 5' GCGACGGAGGATCCTTCAGGAATTTTTTTTC 3'

MuC α wurde in den retroviralen pBullet_puro Vektor kloniert:

for_C α _phosphoryliert:: 5' GAAAGGCTGCTGTGCTCTCTGCTGGGGCTTC 3'

rev_C α _BamHI: 5' GAGAGGTCCGATCCGCTCAACTGGACCACAG 3'

Gezielte Punktmutagenese in der V α -Domäne des Mu Wt sc TZR p53 eines 2-Plasmid-retroviralen Vektorsystems:

for_sc TZR p53_115_A: 5' TGTTTTGAGCGAGGCTAGCAACTATCAGTTG 3'

rev_sc TZR p53_115_A: 5' CAACTGATAGTTGCTAGCCTCGCTCAAAAACA 3'

Klonierung des Mu Wt sc coTZR p53 eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems in den retroviralen pBullet_neo Vektor:

f_sc TZR p53_93_phosphoryliert:

5' GTGCTGGCCCTGCTGCCCGTGCTGGGCATC 3'

r_sc TZR p53_93_BamHI:

5' GAGCTCGGATCCTCATCAGCTGCTCCACAG 3'

Gezielte Punktmutagenese in der V α -Domäne des Mu Wt sc coTZR p53 eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems:

F_sc TZR p53_93_115A: 5' TGCGTCCTGTCCGAGGCTAGCAACTACCAGCTG 3'

R_sc TZR p53_93_115A: 5' CAGCTGGTAGTTGCTAGCCTCGGACAGGACGCA 3'

Einbau einer zusätzlichen Disulfidbrücke zwischen der V α -Domäne und dem Ende des SL7-Linkers des Konstruktes Mu Wt sc coTZR p53 eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems

R_sc p53_93_G49C: 5' GCAGCAGCTGCAGGCACTGCCGGGGTACTG 3'

F_sc p53_93_G49C: 5' CAGTACCCCGGCAGTGCCTGCAGCTGCTGC 3'

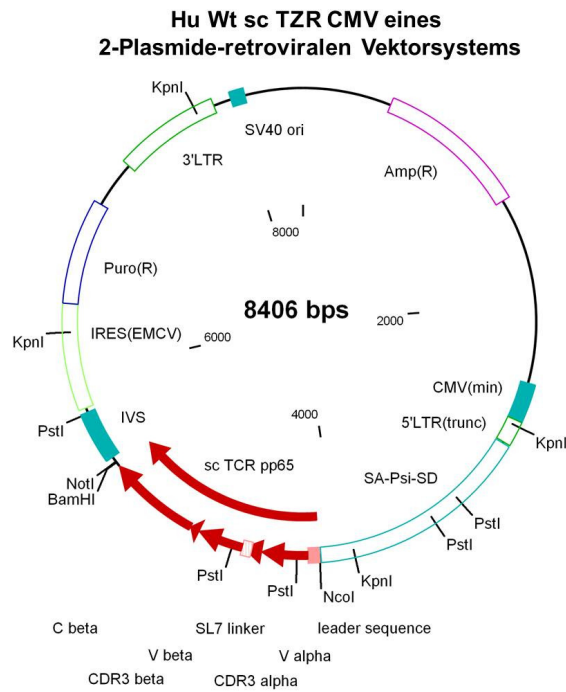
R_sc p53_93_Q51C: 5' GACTTCAGCAGCAGGCACAGCCCCTGCCGG 3'

F_sc p53_93_Q51C: 5' CCGGCAGGGGCTGTGCCTGCTGCTGAAGTAC 3'

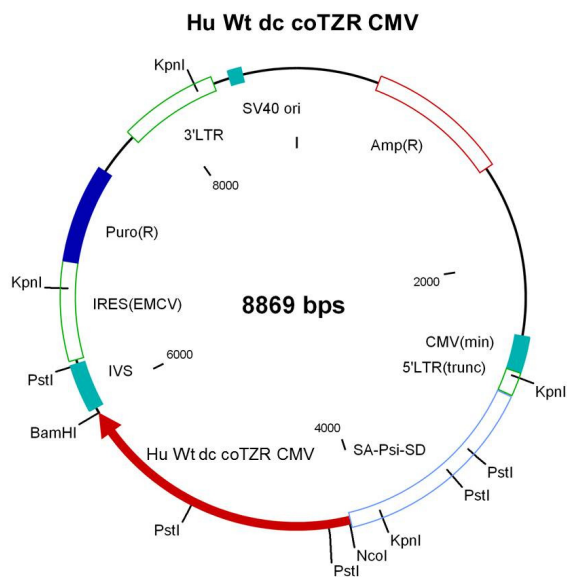
F_SL7_G16C: 5' CGGAAGCGGCAGCTGCGGGGGCGGAAACAGC 3'

R_SL7_G16C: 5' GCTGTTTCCGCCCGCAGCTGCCGCTTCCG 3'

Vektorkarte vom pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Einzelketten-TZR eines 2-Plasmid-retroviralen Vektorsystems:



Vektorkarte vom Kodon-optimierten pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Doppelketten-TZR eines 1-Plasmid-retroviralen Vektorsystems:



Der beigefügte Datenträger enthält die Sequenzen sowie gebundenen Primer.

9 Danksagung

10 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Diana Knies

Anschrift: Ludwig-Gerhardt-Str. 1a

65232 Taunusstein, Deutschland

Geburtsdatum: 05. Oktober 1980

Geburtsort: Wiesbaden, Deutschland

Staatsangehörigkeit: deutsch

BERUFLICHE TÄTIGKEITEN

- | | |
|-----------------------|--|
| Seit 12 / 2007 | Naturwissenschaftliche Doktorandin in der III. Medizinischen Klinik (Hämatologie, Onkologie, und Pneumologie) in der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Deutschland |
| 04 / 2007 – 11 / 2007 | Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Chemotherapeutischen Forschungsinstitut im Georg Speyer Haus in Frankfurt/Main, Deutschland |
| 09 / 2004 – 05 / 2005 | Studentische Mitarbeiterin im Institut für Rechtsmedizin der Universitätsmedizin Mainz, Deutschland |
| 08 / 2001 – 10 / 2004 | Nebentätigkeit als studentische Hilfskraft bei der SGS INSTITUT FRESENIUS Chemische und Biologische Laboratorien GmbH, Taunusstein, Deutschland |

UNIVERSITÄTSAUSBILDUNG

- | | |
|-----------------------|--|
| 10 / 2000 – 12 / 2006 | Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Deutschland
Abschluss Diplom Biologin |
|-----------------------|--|

SCHULBILDUNG

1987 – 1991	Besuch der Grundschule, Taunusstein–Bleidenstadt, Deutschland
1997 – 2000	Besuch des Carl–von–Ossietzky Oberstufengymnasiums, Wiesbaden, Deutschland
06 / 2000	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife (Abitur)

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Mainz, den 8.07.2012

Diana Knies