

Aus der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Konstruktion eines HLA-unabhängigen "single-chain"
T-Zellrezeptors (scTCR) gegen TRP2

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Martin Wölfel
aus Mainz

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher

Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 30.06.2020

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis	vii
Tabellenverzeichnis	ix
Abkürzungsverzeichnis	x
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Literaturdiskussion	2
2.1 Immuntherapie des malignen Melanoms	2
2.2 Eigenschaften und Bedeutung der T-Zellen im Immunsystem.....	2
2.2.1 T-Zellen und T-Zellentwicklung.....	2
2.2.2 T-Zellrezeptoren.....	3
2.2.3 MHC-abhängige und -unabhängige Erkennung von Antigenen	5
2.3 Tumormimmuntherapie.....	7
2.3.1 Grenzen der körpereigenen antitumoralen T-Zellimmunität	7
2.3.2 Adoptiver T-Zelltransfer	8
2.3.2.1 Tumordinfiltrierende T-Zellen (TILs).....	8
2.3.2.2 T-Zellrezeptor-modifizierte T-Zellen	9
2.3.2.3 CAR-modifizierte T-Zellen	11
2.4 Das Melanommodell Ma-Mel-86	13
2.4.1 HLA-unabhängige T-Zellreaktivität im Melanommodell Ma-Mel-86	13
2.5 TRP2/L-Dopachrom-Tautomerase	14
3 Material und Methoden	16
3.1 Material	16
3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	16
3.1.1.1 Geräte	16
3.1.1.2 Verbrauchsmaterialien	17
3.1.2 Chemikalien, Reagenzien, Medien, Lösungen und Puffer.....	18
3.1.2.1 Chemikalien, Reagenzien und Medien.....	18
3.1.2.2 Puffer und Lösungen.....	20
3.1.3 Antibiotika	20
3.1.4 Antikörper.....	21
3.1.5 Molekularbiologische Materialien.....	22
3.1.5.1 Enzyme	22
3.1.5.2 Molekularbiologische Kits.....	22
3.1.5.3 Plasmide und Vektoren	22
3.1.5.4 Oligonukleotide.....	24

3.1.6 Nährmedien, Zelllinien und Bakterienstämme	26
3.1.6.1 Nährmedien und Zellkulturmedien	26
3.1.6.2 E. coli-Bakterienstämme	27
3.1.6.3 Zelllinien	27
3.1.7 Software, Webseiten und Webtools.....	30
3.2 Methoden.....	31
3.2.1 Molekularbiologische Methoden	31
3.2.1.1 Restriktion von DNA.....	31
3.2.1.2 Amplifikation von DNA mittels PCR.....	31
3.2.1.3 Einfrieren prokaryotischer Zellen.....	36
3.2.1.4 Transformation von Bakterien	36
3.2.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA	36
3.2.1.6 Isolierung von genomischer DNA.....	37
3.2.1.7 Isolierung von RNA	37
3.2.1.8 Bestimmung der DNA-Konzentration	37
3.2.1.9 Agarose-Gelelektrophorese	37
3.2.1.10 Gelextraktion von DNA-Banden	38
3.2.1.11 Sequenzierung und Sequenzanalyse.....	38
3.2.1.12 Gateway®-Cloning-Technologie	38
3.2.2 Zellbiologische Methoden	41
3.2.2.1 Zellkultur.....	41
3.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl.....	41
3.2.2.3 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen	42
3.2.2.4 Isolierung humaner peripherer Blutlymphozyten aus <i>Buffy Coats</i>	42
3.2.2.5 Magnetische Zellseparation	42
3.2.2.6 Transfektion von Phoenix-Ampho-Zellen	43
3.2.2.7 Retrovirale Transduktion humaner PBMC und Jurkat 76-Zellen.....	43
3.2.2.8 Transiente Transfektion von HEK 293T_Dko ^{CIITA+B2M} mit Lipofectamine™ 2000	44
3.2.2.9 Stimulation der PBMCs vor Transduktion	44
3.2.2.10 Stimulation der PBMCs nach Transduktion.....	44
3.2.2.11 ⁵¹ Cr-Freisetzungstest.....	45
3.2.2.12 Durchflusszytometrie (FACS™)	46
3.2.2.13 Interferon-γ-ELISpot-Assay	46
4 Ergebnisse.....	48
4.1 Generierung des scTCR_αTRP2-Konstrukts im Zielvektor pMX-DEST	48
4.1.1 Amplifikation des Linker SL7.....	50
4.1.2 Konstruktion von Fragment I.1.....	51
4.1.3 Konstruktion von Fragment I.2.....	52
4.1.4 Konstruktion von Fragment I.3.....	53
4.1.5 Konstruktion von Fragment I.4.....	54

4.1.6 Konstruktion von Fragment I.5.....	55
4.1.7 Klonierung von Fragment I.5 in den Zielvektor pMX-DEST.....	56
4.2 Expression des scTCR_αTRP2 in Jurkat 76-CD8^{hi} und humanen PBMCs	58
4.2.1 Expression des scTCR_αTRP2 in Jurkat 76-CD8 ^{hi}	58
4.2.2 Expression des scTCR_αTRP2 in PBMCs.....	59
4.3 Nachweis der Funktionalität des scTCR_αTRP2.....	61
4.3.1 MHC-unabhängige Erkennung von hTRP2 durch scTCR_αTRP2- transgene PBMCs.....	61
4.3.2 Vergleich der Erkennung von hTRP2 durch CD4 ⁺ und CD8 ⁺ scTCR_αTRP2-transgene PBMCs.....	64
4.3.3 Evaluierung der lytischen Kapazität scTCR_αTRP2-transgener PBMCs..	66
4.3.4 Evaluierung der lytischen Kapazität CD4 ⁺ scTCR_αTRP2-transgener PBMCs.....	66
4.4 Generierung des TCR-SCS_αTRP2-Konstrukts im Zielvektor pMX-DEST	68
4.4.1 Konstruktion von Fragment II.1.....	70
4.4.2 Konstruktion von Fragment II.2.....	71
4.4.3 Konstruktion von Fragment II.3.....	71
4.4.4 Integration von Fragment II.3 in den Zielvektor pMX-DEST.....	72
4.5 Expression des TCR-SCS_αTRP2 in Jurkat 76-CD8^{hi} und humanen PBMCs.....	73
4.6 Nachweis der Integration und Transkription von pMX-DEST_TCR- SCS_αTRP2 in Jurkat 76-CD8^{hi}.....	74
5 Diskussion.....	77
5.1 Konstruktion, Expression und Funktionalität des MHC-unabhängigen scTCR_αTRP2.....	77
5.1.1 Die Konstruktion des MHC-unabhängigen scTCR_αTRP2.....	77
5.1.2 Evaluation der Expression des MHC-unabhängigen scTCR_αTRP2.....	78
5.1.3 Evaluation der Funktionalität des MHC-unabhängigen scTCR_αTRP2....	80
5.1.4 Die MHC-unabhängige Erkennung des scTCR_αTRP2.....	81
5.1.5 Die lytische Kapazität CD4 ⁺ scTCR_αTRP2-transgener PBMCs.....	81
5.2 Konstruktion und Expression des MHC-unabhängigen TCR-SCS_αTRP2	82
5.2.1 Konstruktion des MHC-unabhängigen TCR-SCS_αTRP2.....	82
5.2.2 Evaluation der Expression des MHC-unabhängigen TCR-SCS_αTRP2...	83
5.3 Überlegungen zur Immunogenität artifizieller Rezeptoren.....	84
5.4 Ausblick.....	85

6 Zusammenfassung	87
7 Literaturverzeichnis	88
8 Anhang	95
8.1 cDNA- und Aminosäuresequenzen der TCR-Konstrukte	95
8.1.1 cDNA- und Aminosäuresequenz des scTCR_αTRP2-Konstrukts	95
8.1.2 cDNA- und Aminosäuresequenz des TCR-SCS_αTRP2-Konstrukts	96
8.2 Fragmentkarten	97
8.2.1 cDNA-Fragmente der RT-PCR und DNA-Fragmente der PCR-Amplifikation genomischer DNA.....	97
8.3 Vektorkarten.....	98
8.3.1 pDONR™221 attP1/-P2.....	98
8.3.2 pGMP_93.....	98
8.3.3 pHIT-60 und pCOLT-GALV.....	99
8.3.4 pMX-DEST	99
Danksagung.....	xiii
Lebenslauf	xiv

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1: Aufbau des T-Zellrezeptors	5
Abb. 2-2: Schematische Darstellung der Antigenpräsentation durch MHC-Klasse I und II	6
Abb. 2-3: Schematische Darstellung gentechnischer Veränderungen zur Optimierung exogener T-Zellrezeptoren	11
Abb. 2-4: Schematische Darstellung der 1.-3. Generation chimärer Antigenrezeptoren (CAR)	12
Abb. 3-1: Schematische Darstellung der SOE-PCR	34
Abb. 3-2: Schematische Darstellung der Gateway®-Cloning-Technologie	40
Abb. 4-1: Schematische Darstellung der Fragmente und Primer zur Herstellung des scTCR_αTRP2-Konstrukts	48
Abb. 4-2: Schematische Darstellung des auf der Zelloberfläche exprimierten Konstrukts scTCR_αTRP2	49
Abb. 4-3: Überprüfung der Fragmentgröße des Megaprimer I auf ein Agarosegel	51
Abb. 4-4: Überprüfung der Größe von Fragment I.1 auf ein Agarosegel	52
Abb. 4-5: Überprüfung der Größe von Fragment I.2 auf ein Agarosegel	53
Abb. 4-6: Überprüfung der Größe von Fragment I.3 auf ein Agarosegel	54
Abb. 4-7: Überprüfung der Größe von Fragment I.4 auf ein Agarosegel	55
Abb. 4-8: Überprüfung der Größe von Fragment I.5 auf ein Agarosegel	56
Abb. 4-9: Überprüfung des Rekombinationserfolgs von Fragment I.5	57
Abb. 4-10: scTCR_αTRP2- und dcTCR_αTRP2- Expression retroviral transduzierter Jurkat 76-CD8 ^{hi}	59
Abb. 4-11: scTCR_αTRP2- und dcTCR_αTRP2-Expression retroviral transduzierter PBMCs	60
Abb. 4-12: Erkennung von Targetzellen durch den scTCR_αTRP2 nach retroviraler Transduktion humaner PBMCs	63
Abb. 4-13: Erkennung der Targetzellen durch scTCR_αTRP2-transgene CD4 ⁺ und CD8 ⁺ PBMCs	65
Abb. 4-14: Überprüfung der lytischen Kapazität retroviral transduzierter PBMCs mittels eines ⁵¹ Cr-Freisetzungstests	66
Abb. 4-15: Überprüfung der lytischen Kapazität CD4 ⁺ retroviral transduzierter PBMCs mittels eines ⁵¹ Cr-Freisetzungstests	67
Abb. 4-16: Schematische Darstellung der Fragmente und Primer zur Herstellung des TCR-SCS_αTRP2-Konstrukts	69
Abb. 4-17: Schematische Darstellung des auf der Zelloberfläche exprimierten Konstrukts TCR-SCS_αTRP2	70
Abb. 4-18: Überprüfung der Rekombination von Fragment II.3	73

Abb. 4-19: TCR-SCS_αTRP2-Expression retroviral transduzierter Jurkat 76-CD8 ^{hi} und PBMCs	74
Abb. 4-20: Überprüfung der Integration und Transkription von pMX-DEST_TCR-SCS_αTRP2 in Jurkat 76-CD8 ^{hi} -Zellen	76
Abb. 8-1: cDNA- und Aminosäuresequenz des scTCR_αTRP2-Konstrukts	95
Abb. 8-2: cDNA- und Aminosäuresequenz des TCR-SCS_αTRP2-Konstrukts	96
Abb. 8-3: cDNA-Fragmente der RT-PCR und DNA-Fragmente der PCR-Amplifikation genomischer DNA	97
Abb. 8-4: Vektorkarte pDONR TM 221 attP1/-P2	98
Abb. 8-5: Vektorkarte pGMP_93	98
Abb. 8-6: Vektorkarte pMX-DEST	99

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1: IMGT-Daten der einzelnen Regionen des dcTCR_αTRP2 aus dem Klon CTL2C/417	14
Tab. 3-1: Reaktionsansatz für die Restriktion von DNA.....	31
Tab. 3-2: Reaktionsbedingungen für die Standard-PCR.....	32
Tab. 3-3: Reaktionsbedingungen für die O-PCR	33
Tab. 3-4: Für die SOE-PCR verwendete Reagenzien	35
Tab. 3-5: Reaktionsbedingungen für den zweiten Schritt der SOE-PCR.....	35
Tab. 3-6: Reaktionsbedingungen für den dritten Schritt der SOE-PCR.....	35
Tab. 3-7: Reaktionsbedingungen für die Sequenzierung linearer DNA-Fragmente...38	
Tab. 4-1: Durchflusszytometrisch ermittelte mα/βC-TCR-Expression (in %), der mit den Konstrukten scTCR und dcTCR transduzierten Jurkat 76-CD8 ^{hi}	59
Tab. 4-2: Durchflusszytometrisch ermittelte mα/βC-TCR-Expression (in %) der mit den scTCR- und dcTCR-Konstrukten transduzierten PBMCs	61
Tab. 4-3: Durchflusszytometrisch ermittelte mα/βC-TCR-Expression (in %) und damit der Anteil der doppelpositiven scTCR_αTRP2 ⁺ bzw dcTCR_αTRP2 ⁺ und CD4 ⁺ bzw. CD8 ⁺ Populationen pMX-DEST_scTCR_αTRP2- bzw. pMX-DEST_dcTCR_αTRP2-transgener PBMCs	64
Tab. 4-4. Kennzeichnung der mit den Primerpaaren 1-5 amplifizierten Fragmente A-G	76

Abkürzungsverzeichnis

⁵¹ Cr	Chrom-51
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
Amp	Ampicillin
APC	Allophycocyanin, engl. <i>antigen-presenting cell</i>
att	engl. <i>attachment site</i>
bp	Basenpaar
BP-Reaktion	Reaktion im Rahmen der Gateway®-Cloning-Technologie zum Austausch des im Eingangsvektor enthaltenen ccdB-Gens gegen das durch PCR gewonnene DNA-Fragment
CIITA	engl. <i>class II major histocompatibility complex transactivator</i>
CAR	engl. <i>chimeric antigen receptor</i>
ccd	engl. <i>controlled cell death</i>
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
CDR	engl. <i>complementarity-determining region</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSF2RA	engl. <i>colony stimulating factor 2 receptor alpha subunit</i>
CTL	engl. <i>cytotoxic T lymphocyte</i>
CTLA-4	engl. <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
dcTCR	engl. <i>double-chain T cell receptor</i>
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DHICA	engl. <i>5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid</i>
Dko	Doppelknockout
DMEM	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DR4	engl. <i>death receptor 4</i>
E.coli	Escherichia coli
EC	engl. <i>embryonal carcinoma cells</i>
ELISpot	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent spot</i>
F	engl. <i>forward</i>
F2A	Furin-2A
FACS	engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FasL	Fas-Ligand
FIS	engl. <i>Factor for Inversion Stimulation</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanate
FP	engl. <i>forward primer</i>
GM-CSF	engl. <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GvH	engl. <i>graft-versus-host</i>
H ₂ O	Wasser
HER	engl. <i>human epidermal growth factor receptor</i>

HLA	engl. <i>human leukocyte antigen</i>
hV α	humane variable TCR α -Domäne
hV β	humane variable TCR β -Domäne
IgSF	engl. <i>immunoglobulin superfamily</i>
IHF	engl. <i>Integration Host Factor</i>
IMGT	engl. ImMunoGeneTics
INF- γ	Interferon- γ
ITAM	engl. <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motifs</i>
Kan	Kanamycin
Lsg.	Lösung
LR-Reaktion	Reaktion im Rahmen der Gateway [®] -Cloning-Technologie zum Austausch des DNA-Fragments im Eingangsvektor gegen das ccdB-Gen im Zielvektor
LTR	engl. <i>long terminal repeats</i>
MACS	engl. <i>magnetic activated cell sorting</i>
mC α	murine konstante TCR α -Domäne
mC β	murine konstante TCR β -Domäne
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i>
MLTC	engl. <i>mixed lymphocyte-tumour cell culture</i>
MLV	Maus-Leukämie-Virus, Murines Leukämievirus
mTRP2	murines TRP2
ng	Nanogramm
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OP	engl. <i>overlapping primer</i>
O-PCR	Orientierungs-PCR
ori	engl. origin of replication
p	engl. <i>position</i>
PA	Phoenix Ampho
PBMC	engl. <i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	engl. <i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PD-1	engl. <i>programmed cell death protein 1</i>
PE	Phycoerythrin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	engl. <i>reverse</i>
rIL-2	rekombinantes Interleukin-2
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i>
RP	engl. <i>reverse primer</i>
rpm	engl. <i>revolutions per minute</i>
RPMI	engl. <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT	Raumtemperatur
RV	Residualvolumen
scFv	engl. <i>single-chain variable fragment</i>
scTCR	engl. <i>single-chain T cell receptor</i>

SOE-PCR	engl. <i>splicing-by-overlap-extension-PCR</i>
TALEN	engl. <i>transcription activator-like effector nuclease</i>
TBE	TRIS-Borsäure-EDTA
TCR	engl. <i>T cell receptor</i>
TCR-SCS	engl. <i>T cell receptor single-chain signaling</i>
TE	Testeinheit
TIL	engl. <i>tumor infiltrating lymphocyte</i>
TNF	engl. <i>tumor necrosis factor</i>
TRAC	engl. <i>T cell receptor α-chain constant region</i>
TRAIL	engl. <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRAJ	engl. <i>T cell receptor α-chain junction region</i>
Transd.	Transduktion
TRAV	engl. <i>T cell receptor α-chain variable region</i>
TRBC	engl. <i>T cell receptor β-chain constant region</i>
TRBD	engl. <i>T cell receptor β-chain diversity region</i>
TRBJ	engl. <i>T cell receptor β-chain junction region</i>
TRBV	engl. <i>T cell receptor β-chain variable region</i>
TRP1	engl. <i>tyrosinase-related protein 1</i>
TRP2	engl. <i>tyrosinase-related protein 2</i>
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
XIS	Exzisionase
μ l	Mikroliter

1 Einleitung und Zielsetzung

In der Arbeitsgruppe [REDACTED] ([REDACTED]) wurden von einer Patientin mit metastasiertem Melanom aus Lymphknotenmetastasen die stabilen Melanomzelllinien Ma-Mel-86a, -b, -c und -f etabliert und diese in Kooperation mit der Arbeitsgruppe [REDACTED] ([REDACTED]) weiter untersucht. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden der Patientin PBMCs (engl. *peripheral blood mononuclear cells*) entnommen und diese in gemischten Lymphozyten-Tumorzell-Kulturen (MLTC, engl. *mixed lymphocyte-tumour cell culture*) mit den autologen Melanomzelllinien stimuliert. In diesen MLTCs kam es unter anderem zur Expansion von CD8⁺ Responderlymphozyten, die die HLA (engl. *human leukocyte antigen*)-Klasse I-defiziente Melanomzelllinie Ma-Mel-86b erkannten und lysierten. Mittels cDNA (engl. *complementary DNA*)-Expressionsscreening wurden bislang zwei der Antigene identifiziert, gegen die die Responderlymphozyten gerichtet waren. Eines davon ist TRP2 (engl. *tyrosinase-related protein 2*). Aus einem gegen TRP2 gerichteten T-Zellklon (2C/417) wurde ein HLA-unabhängiger dcTCR (engl. *double-chain T cell receptor*) kloniert, mit dem Ziel einer therapeutischen Anwendung im Rahmen des adoptiven Transfers gentechnisch modifizierter T-Zellen.

Fehlpaarungen endogener und exogener TCR-Ketten bei der adoptiven T-Zellrezeptor-Gentherapie erhöhen das Risiko potentieller Autoimmunität ("*off-target/off-tumor*"-Toxizität). Mit Hinblick auf eine spätere therapeutische Nutzung beim malignen Melanom sollte ein scTCR (engl. *single-chain T cell receptor*) aus dem gegen TRP2 gerichteten HLA-unabhängigen dcTCR konstruiert und auf seine Expression und Funktionalität überprüft werden. Ein scTCR unterscheidet sich von einem dcTCR unter anderem darin, dass die variablen Domänen des TCR über einen Linker miteinander verbunden sind.

Als alternativer und neuer Ansatz sollte ein ebenfalls gegen TRP2 gerichtetes TCR-SCS-Konstrukt (engl. *T cell receptor single-chain signaling*) generiert werden, das aus der antigenbindenden Domäne (V α -Linker-V β) des zuvor konstruierten scTCR und der "Scharnier"-, Transmembran- und intrazellulären Signaldomäne eines CAR (engl. *chimeric antigen receptor*) der zweiten Generation bestehen sollte. Dieses Konstrukt sollte im Anschluss ebenfalls auf seine Expression und Funktionalität getestet werden.

2 Literaturdiskussion

2.1 Immuntherapie des malignen Melanoms

Das Melanom ist eine maligne Entartung pigmentproduzierender Melanozyten und wird auch als schwarzer Hautkrebs bezeichnet. Melanozyten produzieren Melanin, ein dunkles Pigment, welches die Haut vor UV-Licht schützt ^[1]. Maligne Melanome sind zugleich die seltenste und prognostisch ungünstigste Form des Hautkrebses ^[2]. Dabei besteht noch Unklarheit über die Mechanismen der Entartung von Melanozyten ^[3]. Bei früher Erkennung des Melanoms und bei fehlender Metastasierung, können Melanome prognostisch günstig mit vergleichsweise wenig Aufwand operativ entfernt werden ^[4]. Metastasierte Melanome sind jedoch stark resistent gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung und hatten noch vor 10 Jahren eine 5-Jahres-Überlebensrate von unter 10 % ^[5].

Das körpereigene Immunsystem wendet sich gegen Tumorzellen. Daher bietet die Modulation des Immunsystems, vornehmlich der Reaktivität der T-Lymphozyten, einen sehr wirksamen Ansatz für die Therapie des malignen Melanoms ^[6]. Mit der Einführung immuntherapeutischer Checkpoint-Inhibitoren wie CTLA-4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) - und PD-1(engl. *programmed cell death protein 1*) -Inhibitoren wurde die Überlebensrate der betroffenen Patienten deutlich gesteigert ^[5]. Ein weiterer vielversprechender Therapieansatz ist die *Ex vivo*-Expansion und Reinfusion von körpereigenen, besonders tumorreaktiven T-Lymphozyten und von T-Lymphozyten, die gentechnisch mit einem gegen melanomspezifische Antigene gerichteten T-Zellrezeptor ausgestattet wurden ^[5, 7].

2.2 Eigenschaften und Bedeutung der T-Zellen im Immunsystem

2.2.1 T-Zellen und T-Zellentwicklung

T-Zellen gehören zu den Lymphozyten und lassen sich anhand ihrer Oberflächenmarker (CD, engl. *cluster of differentiation*) grob in CD4⁺ T-Helferzellen und regulatorische T-Zellen sowie CD8⁺ zytotoxische T-Zellen einteilen. T-Helferzellen interagieren u.a. mit Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen, setzen je nach Subtyp unterschiedlichen Zytokine in unterschiedlichen Mustern frei und tragen maßgeblich zur Induktion von B- und T-Zellimmunantworten bei. Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen eliminieren Erreger-infizierte Zellen und bekämpfen entartete Zellen durch

Auslösung einer Apoptose. Nach Bindung von T-Zellrezeptoren an Peptid/MHC-Komplexe werden im Zytoplasma gespeicherte zytotoxische Granula freigesetzt, die Perforin, Granzyme und Granulysin enthalten, und lösen in Zielzellen Apoptose aus. Regulatorische T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung von Autoimmunität und generell überschießender Reaktivität von T-Lymphozyten. [8]

T-Lymphozyten entstehen im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen und wandern anschließend über Blutgefäße Chemokin-gesteuert in den Thymus, in dem die Entwicklung, die Rekombination der T-Zellrezeptorgene und die Proliferation der T-Lymphozyten stattfindet [9]. Vor Eintritt in den Thymus exprimieren die Vorläuferzellen weder CD4 noch CD8 und werden daher als doppelt-negative Thymozyten bezeichnet [9]. Während der Wanderung im Kortex des Thymus werden die Thymozyten für CD4 und CD8 doppelt-positiv [8, 9]. Im Kortex findet zunächst die positive Selektion statt [8]. Dabei wird die Erkennung von Molekülen des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes (MHC) und damit auch die Funktionsfähigkeit des T-Zellrezeptors der Vorläufer-T-Zellen überprüft [8]. Bei fehlender Erkennung oder zu starker Affinität zu MHC-Molekülen wird bei betroffenen T-Lymphozyten Apoptose induziert [8]. Nach überstandener positiver Selektion wandern die Thymozyten in das Thymusmark und sind dann entweder CD4⁺ oder CD8⁺ [9]. In der sich anschließenden negativen Selektion im Thymusmark werden körpereigene Peptide über MHC-Komplexe präsentiert [8]. Erkennen T-Lymphozyten Peptid/MHC-Komplexe, werden sie aufgrund potentieller Autoreaktivität eliminiert [9]. Die reifen T-Lymphozyten wandern anschließend aus dem Thymus über Blutgefäße in periphere sekundäre Lymphorgane [9].

2.2.2 T-Zellrezeptoren

Die Antigenerkennung von T-Zellen erfolgt über T-Zellrezeptoren (TCR) [8]. Diese bestehen zum größten Teil aus α - und β -Polypeptidketten, die α : β -Heterodimere bilden [8]. Ein kleiner Anteil von T-Zellen exprimiert TCR mit γ : δ -Heterodimeren, deren Funktion jedoch noch nicht gänzlich ergründet ist [10]. Die α - und β -Polypeptidketten bestehen jeweils aus einer konstanten und einer variablen Region (**Abb. 2-1**) [8]. TRAC (engl. *T cell receptor α -chain constant region*) und TRBC (engl. *T cell receptor β -chain constant region*), die bis ins Zytoplasma der T-Zelle reichen und die TCR in der Membran stabilisieren, bilden die konstanten Regionen der beiden Ketten und sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden [8]. Die variablen Regionen dienen der

Antigenerkennung^[8]. Sie werden für die α -Kette in TRAJ (engl. *T cell receptor α -chain junction region*) und TRAV (engl. *T cell receptor α -chain variable region*) und für die β -Kette in TRBJ (engl. *T cell receptor β -chain junction region*), TRBD (engl. *T cell receptor β -chain diversity region*) und TRBV (engl. *T cell receptor β -chain variable region*) eingeteilt^[8]. Um eine möglichst große Vielfalt von Antigenen erkennen zu können, benötigt das Immunsystem unter anderem neben einem großen Repertoire von B-Zellrezeptoren auch ein großes Repertoire an TCR. Deren Diversität wird durch die Rekombination der Gensegmente der junktionalen (TRAJ/TRBJ), variablen (TRAV/TRBV) und bei der β -Kette zusätzlich der TRBD-Regionen ermöglicht^[8]. Innerhalb der variablen Ketten der TCR gibt es zudem jeweils drei unterschiedliche hypervariable CDR (engl. *complementarity-determining regions*)^[11]. Die drei CDR beider Ketten bilden zusammen das "Collier de perles", das Epitop-bindende Paratop^[12, 13]. $\alpha\beta$ -TCR erkennen Peptid/MHC-Komplexe mit sehr hoher Spezifität nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Grundsätzlich können in einem individuellen TCR-Repertoire mehr als 10^{18} unterschiedliche TCR gebildet werden^[8].

Auf der Zelloberfläche befinden sich TCR in einem Komplex mit CD3, das aus den Untereinheiten CD3 γ , CD3 δ und CD3 ϵ , und sog. Zeta (ζ)-Ketten (Abb. 2-1) besteht^[14]. Die CD3-Untereinheiten und die Zeta-Ketten tragen in ihren zytoplasmatischen Anteilen hochkonservierte Abschnitte, sog. ITAMs (engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*). Bei erfolgreicher Bindung eines TCR kommt es zu einer Phosphorylierung der ITAMs, wodurch eine Signalkaskade ausgelöst wird^[15].

CD28 (nicht abgebildet) ist ein kostimulatorischer Rezeptor der TCR und wird als über eine Disulfidbrücke verbundenes Homodimer mit IgSF-Domänen (engl. *immunoglobulin superfamily*) in Verbindung mit transmembranären und zytoplasmatischen signalübermittelnden Domänen auf T-Zellen exprimiert^[16]. Dieser Rezeptor bindet die von antigenpräsentierenden Zellen (APC, engl. *antigen-presenting cell*) exprimierten Oberflächenproteine CD80 und CD86 und verstärkt bei erfolgter Bindung nicht nur die T-Zell-Aktivierung, sondern löst weitreichende epigenetische, transkriptionelle und posttranslationale Veränderungen in T-Zellen aus, die als essentiell für die Immunhomöostase betrachtet werden^[16].

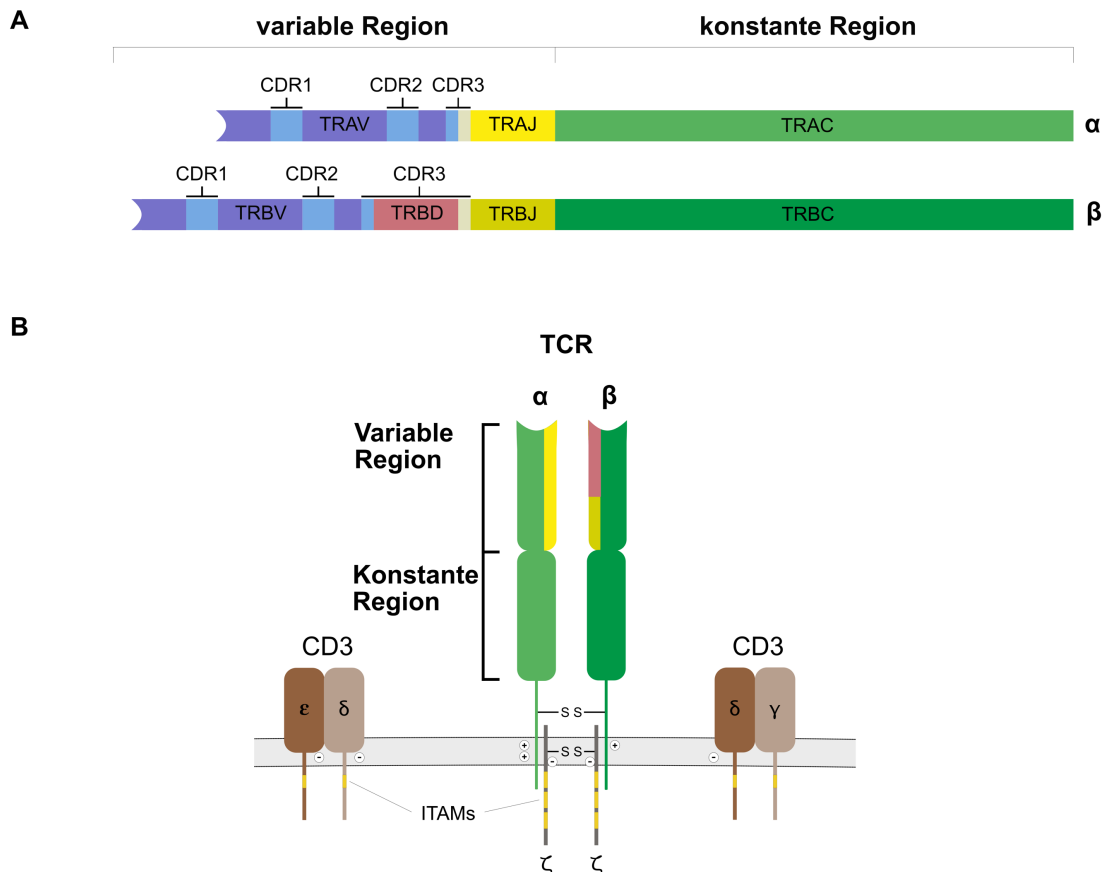


Abb. 2-1: Aufbau des T-Zellrezeptors. (A) Lineare Darstellung der konstanten und variablen Regionen der α - und β -Ketten von TCR. TRAC (engl. *T cell receptor α -chain constant region*) und TRBC (engl. *T cell receptor β -chain constant region*) bilden die ins Zytosol der T-Zelle reichende konstante Region. TRAJ (engl. *T cell receptor α -chain junction region*) und TRAV (engl. *T cell receptor α -chain variable region*) und für die β -Kette TRBJ (engl. *T cell receptor β -chain junction region*), TRBD (engl. *T cell receptor β -chain diversity region*) und TRBV (engl. *T cell receptor β -chain variable region*) sind neben den CDRs (engl. *complementarity-determining regions*) Bestandteile der variablen Regionen von TCR. **(B) Schematische Darstellung des TCR-CD3-Komplexes.** Darstellung der α - und β -Kette eines TCR im Komplex mit den ITAM (engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*)-tragenden CD3-Untereinheiten und mit den Zeta (ζ)-Ketten. Modifiziert nach Janeway, 8. Edition, 2012 ^[17].

2.2.3 MHC-abhängige und -unabhängige Erkennung von Antigenen

T-Zellen erkennen grundsätzlich Antigene MHC-abhängig. Den CD4⁺ T-Zellen werden Antigene von APCs, wie Monozyten bzw. Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen, über MHC-Klasse II-Moleküle präsentiert. Diese werden nur von Zellen exprimiert, die in physiologischer Weise Immunantworten initiieren können. CD8⁺ T-Zellen erkennen Antigene über MHC-Klasse I-Moleküle, die von allen nukleären Körperzellen exprimiert werden. T-Zellen erkennen generell Antigene in Form von Peptiden, die im Zellinneren auf unterschiedlichen Wegen prozessiert und an MHC-Moleküle nicht-kovalent gebunden werden. Vereinfacht präsentieren MHC-Klasse I-

Moleküle Peptidantigene aus zelleigenen Proteinen und MHC-Klasse II-Moleküle Antigene aus dem extrazellulären Raum, die über Endozytose aufgenommen wurden. MHC-Klasse I- und II-Moleküle werden beim Menschen von HLA-Genen kodiert und auch als HLA-Klasse I und II bezeichnet. Beide Moleküle bestehen aus α : β -Heterodimeren (**Abb. 2-2**). MHC-Klasse I-Moleküle sind Komplexe aus einer α -Kette mit drei extrazellulären Domänen (α_1 , α_2 , α_3) und dem daran nicht-kovalent gebundenen β_2 -Mikroglobulin ohne transmembranäre Verankerung, aber mit stabilisierender Funktion. MHC-Klasse II-Moleküle besitzen eine α - und eine β -Kette, die beide in der Zellmembran verankert sind. Die Peptidbindungstaschen, in denen Peptidantigene liegen, werden bei MHC-Klasse I durch die Domänen α_1 und α_2 , bei MHC-Klasse II durch α_1 und β_1 gebildet [18, 19]. [8]

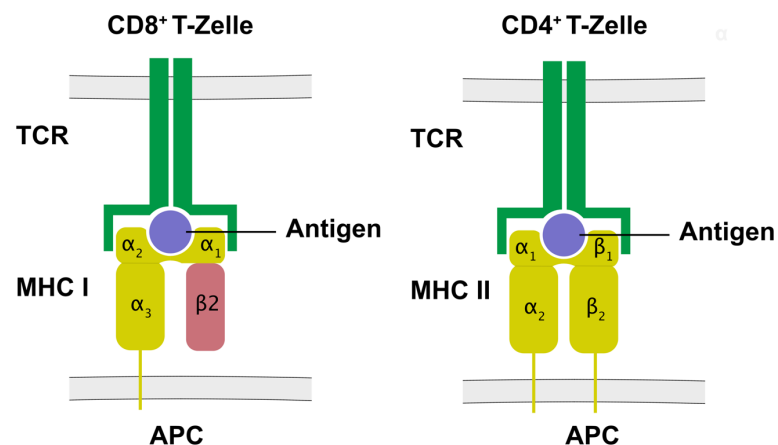


Abb. 2-2: Schematische Darstellung der Antigenpräsentation durch MHC-Klasse I und II. APC: engl. *antigen presenting cell*; MHC: engl. *major histocompatibility complex*; TCR: engl. *T cell receptor*.

Die Existenz MHC-unabhängiger Erkennung von T-Zellen wurde von A. Singer und Kollegen in Mäusen belegt. Diese Arbeitsgruppe berichtete, dass solche T-Zellen intakte Oberflächenproteine erkennen und normalerweise durch den Thymus eliminiert werden [20]. Es sind einige wenige Beispiele von T-Zellen bekannt, die Tumorzellen HLA-unabhängig erkannten. 1987 wurde von Sponaas *et al.* eine MHC-unabhängige Erkennung von Antigenen auf embryonalen Karzinomzellen (EC, engl. *embryonal carcinoma cells*) durch zytotoxische T-Zellen beschrieben [21]. 1989 beobachteten Barnd *et al.* die MHC-unabhängige Erkennung des Mucins MUC1 durch zytotoxische T-Zellen auf Pankreas- und Brusttumoren [22]. Wang und Hanada fanden eine MHC-unabhängige Erkennung von Nierenzellkarzinomzellen durch CD4⁺ T-Zellen [23, 24]. Dabei wurde das auf den T-Zellen exprimierte TRAIL (engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) durch die Matrix-Metalloproteinase 14 der Nierenzellkarzinomzellen

abgespalten. Das lösliche TRAIL wurde dann vom TRAIL-Rezeptor DR4 (von engl. *death receptor 4*) auf den Tumorzellen gebunden [23, 24]. Der Komplex TRAIL-DR4 wurde schließlich vom TCR der tumorreaktiven CD4⁺ T-Zellen erkannt [23, 24].

2.3 Tumorimmuntherapie

2.3.1 Grenzen der körpereigenen antitumoralen T-Zellimmunität

Das menschliche Immunsystem ist neben der Bekämpfung von Viren, Bakterien und Pilzen auch in der Lage, Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren. Tumorzellen gehen jedoch aus körpereigenen Zellen hervor und teilen mit ihnen sehr viele Merkmale. Unter anderem dadurch wird die selektive Erkennung entarteter Zellen stark erschwert. Im Thymus werden Lymphozyten, die eine Reaktivität gegen Antigene von körpereigenen Zellen zeigen, negativ selektioniert und damit eliminiert. Dies wirkt einerseits der Entstehung autoimmunreaktiver Lymphozyten entgegen, behindert aber andererseits die Erkennung von Tumorzellen. Es gibt jedoch weitgehend oder sicher tumorspezifische Antigene, die von Tumorzellen, aber nicht oder nur zu einem geringen Ausmaß von normalen Körperzellen exprimiert werden und die durch das Immunsystem erkannt werden können [25]. Dazu gehören insbesondere sog. Cancer/Germline-Antigene und mutierte Neoantigene, wie z.B. mutiertes KRAS [26]. Obwohl also Tumore durchaus Antigene tragen, die eine spezifische Erkennung durch das körpereigenen T-Zellsystem ermöglichen, stehen dem eine Vielzahl von Immunevasionsmechanismen entgegen, mittels derer sich Tumorzellen ebenso wie Normalgewebe mit hoher Effizienz dem T-zellulären Immunsystem entziehen können [27]. Der Verlust von MHC-Expression unterschiedlicher Ausprägung stellt einen wesentlichen Immunevasionsmechanismus von Tumoren dar, wie dies auch bei menschlichen Tumoren eindrucksvoll belegt wurde [26, 28, 29].

In der Tumorimmuntherapie wird versucht, die Tumorimmunantwort zu fördern und Immunevasionsmechanismen der Tumorzellen zu hemmen. Der von Chen und Mellman beschriebene Krebsimmunzyklus benennt die Hürden und zugleich die Orientierungspunkte für eine erfolgreiche Immuntherapie [30]. In diesem Sinne wurde in den letzten Jahren als 5. Therapiesäule in der Onkologie die Hemmung von immunologischen Kontrollpunkten, sog. Immun-Checkpoints, fest etabliert. Dabei handelt es sich bislang vor allem um Antikörper gegen CTLA-4 und PD-1 bzw. PD-L1 [31]. Ihre Wirkung setzt eine präexistente antitumorale T-Zellantwort voraus, die durch

Checkpoint-Blockade sozusagen freigesetzt wird. Obwohl klinisch auch bei fortgeschrittenen Erkrankungen erfolgreich, profitiert nur eine Untergruppe von Patienten mit langdauernden Remissionen von der Checkpoint-Inhibition. Die Gründe hierfür sind multifaktoriell und resultieren aus komplexen Zusammenhängen, die bisher nur ansatzweise verstanden sind ^[32]. Die Checkpoint-Blockade nutzt die Kraft der körpereigenen Immunabwehr, der durch o.g. Immunevasionsmechanismen, aber auch durch natürliche Beschränkungen und therapeutisch induzierte Schädigung des T-Zellrepertoires Grenzen gesetzt sind. Derzeit wird versucht, rationale Konzepte für die Kombination der Checkpoint-Blockade mit anderen immunologischen oder nicht-immunologischen Therapiemodalitäten zu kombinieren, um das Potential der körpereigenen Immunabwehr auszuschöpfen ^[33, 34]. Als hierzu komplementäre Strategie wird der adoptive Transfer *ex vivo* generierter und expandierter, tumorreaktiver T-Zell-Effektoren entwickelt.

2.3.2 Adoptiver T-Zelltransfer

Als adoptiver T-Zelltransfer wird die Infusion *ex vivo* expandierter T-Zellen bezeichnet. Dabei wird zwischen dem Transfer von tumorinfiltrierenden (TIL, engl. *tumor infiltrating lymphocyte*) und gentechnisch modifizierten T-Zellen unterschieden.

2.3.2.1 Tumorinfiltrierende T-Zellen (TILs)

Beim metastasierten malignen Melanom wurden mit dem Transfer von TILs klinische Ansprechraten von 50-70 % verzeichnet ^[35]. Der Effekt von TILs wurde in Einzelfällen auch für epitheliale Tumore gezeigt ^[26, 36]. Die Therapie mit TILs hat jedoch einige Nachteile, wie zum Beispiel die für die Isolation der Zellen notwendige Resektion von Tumorgewebe, dessen quantitativ und qualitativ begrenzte Verfügbarkeit und eine limitierte *In vivo*-Expansion und -Persistenz der T-Lymphozyten ^[37]. Aus diesen Gründen fand die TIL-Therapie bislang keine weite Verbreitung.

Eine Alternative zur TIL-Therapie bietet der Transfer von gentechnisch modifizierten T-Zellen, die *ex vivo* mit HLA-restringierten TCR oder HLA-unabhängigen chimären Antigenrezeptoren (CAR) ausgestattet werden. Dies eröffnet vielseitige Anwendungsmöglichkeiten. Insbesondere können dafür T-Zellen aus dem peripheren Blut verwendet werden und nicht aus Tumorgewebe, wie dies bei der TIL-Therapie notwendig ist ^[38].

2.3.2.2 T-Zellrezeptor-modifizierte T-Zellen

Die erste erfolgreiche Studie zum Transfer gentechnisch veränderter T-Zellen, die mit Melan-A-/MART-1-spezifischen α : β -TCR retroviral transduziert waren, bei Patienten mit metastasiertem malignem Melanom wurde 2006 von Morgan *et al.* veröffentlicht [39]. Dabei wurde eine teils mehrmonatige Persistenz transduzierter T-Zellen und bei zwei von 17 Patienten eine partielle Tumorregression beobachtet. Artifiziiell affinitätsverstärkte, HLA-restringierte TCR gegen Melan-A/MART-1 und gp100, die gegenüber natürlich vorkommenden TCR eine gesteigerte Bindungsaffinität aufwiesen, waren bei klinischer Anwendung wirksamer, führten aber auch zur Destruktion von Melanozyten mit Hautrötungen und nachfolgender Vitiligo sowie Uveitis, Irisverklebungen und Innenohrstörungen im Sinne sog. "on-target/off-tumor"-Effekten [40]. Die therapeutische Anwendung von artifiziiell generierten TCR hoher Affinität gegen MAGE-A3 bzw. gegen ein gemeinsames Epitop von MAGE-A3,-A9 und -A12 führte sogar zu "off-target/off-tumor"-Effekten mit tödlichem Ausgang in mehreren Fällen [41, 42]. Jedoch wurden hochaffine TCR gegen NY-ESO-1 bislang in mehreren Studien an Patienten mit Melanom, Synovialsarkom und Multiplem Myelom ohne schwerwiegende Toxizität angewandt [43-45]. Weitere TCR, insbesondere gegen sog. Cancer Testis-Antigene mit hoher Tumorspezifität sind derzeit in klinischer Erprobung [46-48].

Über die oben genannten "on-target/off-tumor"- bzw. "off-target/off-tumor"-Effekte von therapeutischen TCR hinaus, sind Fehlpaarungen endogener und exogener TCR-Ketten, als "Mispairing" bezeichnet, eine weitere Gefahrenquelle. Wie in Tierexperimenten gezeigt, kann "Mispairing" zur Bildung von TCRs mit Spezifität gegen körpereigene Antigene und damit zur Entstehung von schwerwiegenden Transplantat-gegen-Wirt (GvH) -Reaktionen (GvH, engl. *graft-versus-host*) führen [49-51]. Bislang wurden verschiedene Wege zur Modifizierung des TCR zur Minimierung der Fehlpaarung und Erhöhung der Expression verfolgt. Eine deutlich erhöhte Expression des exogenen TCR wurde durch Kodonoptimierung (**Abb. 2-3**) und Insertion eines 2A-Elements zwischen die α - und β -Kette des exogenen TCRs erreicht [52-54]. Durch die Verbindung beider Ketten mit selbst-spaltendem 2A wird eine einzelne mRNA (TCR α -2A-TCR β) generiert und das bei der Translation entstehende Fusionsprotein durch einen ribosomalen Mechanismus gespalten. Durch diesen Vorgang werden beide TCR-Ketten äquimolar exprimiert [55, 56]. Um eine bevorzugte Bindung der exogenen TCR-Ketten zu erzielen, wurden in verschiedenen Studien die

konstanten Domänen des TCR murinisiert (Abb. 2-3) ^[57]. Um eine mögliche Immunreaktion gegen murine Epitope zu vermeiden, ist eine Alternative oder aber auch eine Ergänzung zur Murinisierung, zur Erhöhung der Stabilität des Konstrukts, die Insertion von Cystein-Resten in die konstanten Domänen beider Ketten (Abb. 2-3) ^[58]. Dadurch werden zusätzliche Disulfidbrücken gebildet, die zur Stabilität des TCR beitragen ^[58].

Eine neuere Strategie, um die Fehlpaarung der endogenen und exogenen TCR-Ketten zu reduzieren, ist die Konstruktion eines einzelkettigen T-Zellrezeptors (scTCR), dessen variable Domänen α und β über einen serin- und glycinhaltigen Linker miteinander verbunden sind. In früheren scTCR-Konstruktionen wurden nur drei Domänen (V α -Linker-V β -C β) mit zusätzlicher intrazellulären Signaldomäne CD3 ζ verwendet, um ein einzelkettiges Konstrukt zu erhalten ^[59, 60]. Publikationen von Voss *et al.* und Knies *et al.* zur Optimierung von scTCRs zeigten eine deutlich erhöhte Oberflächenexpression des scTCR bei Anbindung einer konstanten Domäne α über ein 2A-Element und Murinisierung beider konstanten Domänen (Abb. 2-3) ^[61, 62]. Zudem wurden bei erfolgter Murinisierung der konstanten Domänen des scTCR *in vitro* eine erhöhte Freisetzung von INF- γ (Interferon- γ) und eine stärkere Affinität zu CD3 beobachtet ^[57]. Eine Limitierung der Expression von exogenen TCRs ist nämlich die Abhängigkeit von endogen exprimiertem CD3, welches für eine erfolgreiche Expression einen Komplex mit dem TCR bilden muss. Dabei konkurrieren endogene und exogene TCR-Ketten um das endogene CD3 ^[56]. In der kürzlich erschienenen Arbeit von Echchannaoui *et al.* wurden diese Vorteile eines scTCR bestätigt und das Ausbleiben von GvH-Reaktionen, wie sie durch das parallel getestete homologe dcTCR-Konstrukt ausgelöst wurden, in *In vivo*-Experimenten demonstriert ^[51].

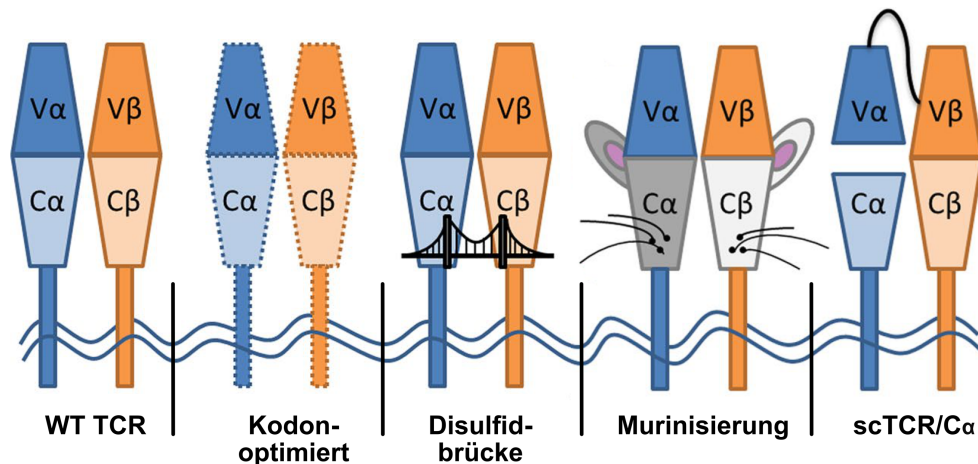


Abb. 2-3: Schematische Darstellung gentechnischer Veränderungen zur Optimierung exogener T-Zellrezeptoren. C α / β : konstante Domäne α / β ; scTCR: engl. *single-chain T cell receptor*; V α / β : variable Domäne α / β ; WT TCR: Wildtyp eines T-Zellrezeptors. Modifiziert nach Spear *et al.*, 2016 ^[57].

2.3.2.3 CAR-modifizierte T-Zellen

Eine vielversprechende Alternative zu konventionellen TCR oder davon abgeleiteten scTCR ist der Einsatz chimärer Antigenrezeptoren (CARs). CARs bestehen aus der extrazellulären antigenbildenden Region eines Antikörpers und einer intrazellulären Signaldomäne, die beide über eine "Scharnier"- und Transmembranregion, meist aus CD8 α oder IgG4, miteinander verbunden sind (**Abb. 2-4**) ^[63]. Die antigenbindende Domäne kann dabei als sogenanntes scFv (engl. *single-chain variable fragment*) mit dem Aufbau V α -Linker-V β von beliebigen, meist murinen Antikörpern bezogen werden und wird von den über einen Linker verbundenen variablen Domänen α und β des Antikörpers gebildet ^[63, 64]. CARs bieten gegenüber TCRs und gentechnisch modifizierten TCRs einige Vorteile. Durch Verwendung von CARs kommt es nicht zu Fehlpaarungen mit endogenen TCR-Ketten, und es gibt keine Limitierung der Expression durch eine notwendige Assoziation mit endogenem CD3, da CARs eine eigene intrazelluläre CD3 ζ -Domäne besitzen (Abb. 2-4) ^[57]. Außerdem sind CARs dazu befähigt, durch ihre von einem Antikörper bezogene antigenbindende Domäne, nicht nur Proteine, sondern auch Kohlenhydrate, Proteoglykane und Ganglioside zu erkennen ^[64]. Zudem erkennen CARs Oberflächenantigene MHC-unabhängig, weswegen sie auch HLA-defekte Tumorzellen erkennen können und somit einen wesentlichen Immunevasionsmechanismus umgehen lassen.

In der ersten Generation von CARs wurde die Signalregion der γ -Kette eines Fc-Rezeptors verwendet, die später aufgrund der höheren Anzahl an ITAMs durch die

Signalregion einer CD3 ζ -Kette ersetzt wurde (Abb. 2-4). In der zweiten Generation wurden zur Verbesserung von Effektivität und Lebensdauer CAR-transduzierter T-Zellen eine kostimulatorische CD28-Domäne, und in der darauffolgenden aktuellen dritten Generation noch zusätzlich eine zweite kostimulatorische Domäne aus CD27, DAP10, 4-1BB oder OX40 vor der CD3 ζ -Signalregion eingebaut (Abb. 2-4) [57].

Insbesondere gegen CD19 gerichtete CARs waren sehr erfolgreich und sind mittlerweile für die Behandlung bei B-Zell-Leukämien und -Lymphomen zugelassen. Eine Vielzahl weiterer CARs befindet sich bei hämatologischen Neoplasien und bei soliden Tumoren in unterschiedlichen Phasen klinischer Erprobung [65, 66]. Bei soliden Tumoren sind CAR-T-Zellen bislang weit weniger erfolgreich als bei B-Zell-Neoplasien. Schwere „*on-target/off-tumor*“-Toxizität mit teils letalen Folgen ereigneten sich im Rahmen von CAR-Studien bei Patienten mit Kolonkarzinom und Nierenzellkarzinom [67, 68]. Es wird daher nach Antigenen mit spezifischer Tumorexpression gesucht und nach Strategien, um selbst bei limitierter Targetexpression in Normalgewebe „*on-target/off-tumor*“-Toxizität zu minimieren oder ganz zu vermeiden [69, 70].

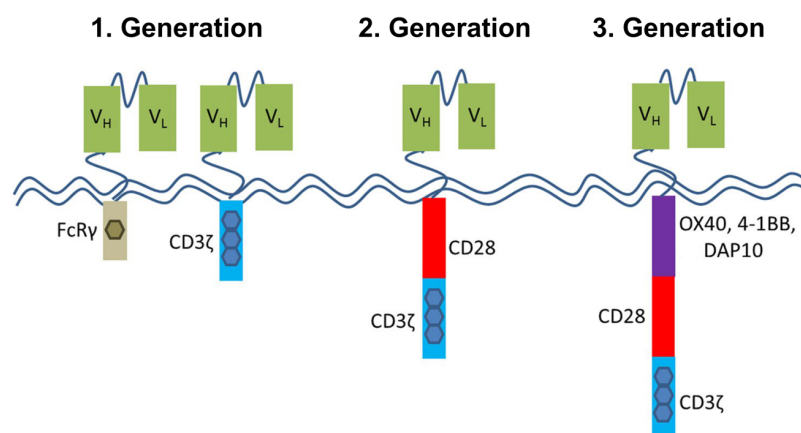


Abb. 2-4: Schematische Darstellung der 1.-3. Generation chimärer Antigenrezeptoren (CAR).

V_H: schwere (von engl. *heavy*) Kette einer variablen Domäne eines Antikörpers; V_L: leichte (von engl. *light*) Kette einer variablen Domäne eines Antikörpers; FcR γ : Signaldomäne der γ -Kette eines Fc-Rezeptors. Die Polygone in den Signaldomänen entsprechen der Anzahl an ITAMs. Modifiziert nach Spear *et al.*, 2016 [57].

Als neues Rezeptorkonstrukt wurde 2014 von Stone *et al.* die Verbindung der über einen Linker verbunden variablen Domänen eines TCR (V α -Li-V β) mit der "Scharnier"- (CD8 α), Transmembran- (CD28) und intrazellulären Signaldomäne (CD28 und CD3 ζ) eines CAR vorgestellt und als TCR-SCS (engl. *T cell receptor single-chain signaling*) bezeichnet. Die antigenbindende Domäne wurde dabei aus einem gegen das

synthetische Protein SIY gerichteten hochaffinen H2-K^b (MHC-Klasse I-Molekül der Maus) -abhängigen dcTCR hergestellt. Im Mausmodell zeigten TCR-SCS-transgene T-Zellen eine deutliche Reaktivität gegen ihre Zielzellen und eine bis zu einem Monat andauernde Persistenz.^[71]

2.4 Das Melanommodell Ma-Mel-86

Das Melanommodell Ma-Mel-86 wurde von Paschen *et al.* von einer Patientin mit metastasiertem Melanom etabliert. Die Patientin wurde sowohl mit Strahlentherapie als auch mit verschiedenen Arten der Immuntherapie behandelt. Aus zu unterschiedlichen Zeitpunkten operativ resezierten Lymphknotenmetastasen wurden die permanenten Melanomzelllinien Ma-Mel-86a, -b, -c und -f etabliert. Ma-Mel-86a exprimiert alle MHC-Klasse I-Moleküle. Durch biallelische Deletionen im β 2-Mikroglobulin (B2M) -Gen tragen die Zelllinien Ma-Mel-86b und -f keinerlei MHC-Klasse I-Moleküle auf ihren Oberflächen. Ma-Mel-86c weist einen MHC-Klasse I-Haplotyp-Verlust auf. Ma-Mel-86a-Zellen sind durch einen vollständigen Expressionsverlust der melanosomalen Differenzierungsantigene gp100 (engl. *glycoprotein 100*), Tyrosinase und TRP2 (engl. *tyrosinase-related protein 2*, auch bezeichnet als L-Dopachrom-Tautomerase) charakterisiert, wogegen Ma-Mel-86b, -c und -f diese Differenzierungsantigene exprimieren. Zudem wurden aus dem peripheren Blut der Patientin zu verschiedenen Zeitpunkten über Jahre hinweg mononukleäre Zellen (PBMCs) asserviert. Die darin enthaltenen Lymphozyten wurden in sog. gemischten Lymphozyten/Tumorzell-Kulturen (MLTC; engl. *mixed lymphocyte/tumor cell cultures*) mit autologen HLA-Klasse I-positiven Melanomzelllinien stimuliert. Aus den respondierenden Lymphozyten wurden tumorreaktive zytotoxische T-Zellen (CTL; engl. *cytotoxic T cells*) expandiert und teils kloniert. Sie erkannten auf Ma-Mel-86a patienten- und tumorspezifische mutierte Neoantigene und auf Ma-Mel-86c melanosomale Differenzierungsantigene.^[72, 73]

2.4.1 HLA-unabhängige T-Zellreaktivität im Melanommodell Ma-Mel-86

Einige der aus den autologen MLTCs hervorgegangenen CTL-Klone erkannten und lysierten die HLA-Klasse I-defizienten Melanomzelllinien Ma-Mel-86b und -f. Die Erkennung durch diese CTL-Klone war mit einem Antikörper gegen CD3, aber nicht mit Antikörpern gegen HLA-Klasse I- oder HLA-Klasse II-Moleküle blockierbar. Dies ließ auf eine HLA-unabhängige, aber TCR-vermittelte Erkennung schließen. Als

Zielantigene dieser HLA-unabhängigen T-Zellen wurden bisher mittels cDNA-Expressionsscreening TRP2 und CSF2RA (engl. *colony stimulating factor 2 receptor alpha subunit*), die alpha-Kette des Rezeptors für GM-CSF (engl. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), identifiziert. ^[73]

Aus zwei verschiedenen TRP2-reaktiven T-Zellklonen, die neben Melanomzellen auch Melanozyten lysierten, wurden T-Zellrezeptoren kloniert (TCR1 aus dem Klon CTL2C/417, TCR2 aus dem Klon CTL11C/171) und zur funktionellen Testung in allogene CD8⁺ T-Zellen transferiert ^[73, 74]. Der humane TRP2-reaktive α : β -TCR aus dem Klon CTL2C/417 erkannte zusätzlich murines TRP2 ^[73, 74]. Zur Optimierung des TCR1, der Gegenstand dieser Arbeit ist, erfolgte in Vorarbeiten eine Murinisierung der konstanten Domänen, eine Kodonoptimierung und der Einsatz zusätzlicher Cysteinreste. In **Tab. 2-1** sind die beteiligten Allele (gem. IMGT-Datenbank, engl. *ImMunoGeneTics database*) und die CDR-Sequenzen der beiden TCR-Ketten aus dem Klon CTL2C/417 wiedergegeben ^[73].

TCR-Kette	IMGT-Daten				CDR1	CDR2	CDR3
α	TRAV3*01	-	TRAJ10*01	TRAC*01	VSGNPY	YITGDNLV	AVRDMIE GGGNKLT
β	TRBV28*01 (V β 3)	TRBD 1*01	TRBJ15*01	TRBC1*01	MDHEN	SYDVKM	ASSRQGA VGQPQH

Tab. 2-1: IMGT-Daten der einzelnen Regionen des dcTCR_ α TRP2 aus dem Klon CTL2C/417 ^[73].

2.5 TRP2/L-Dopachrom-Tautomerase

Die TRP2, auch als L-Dopachrom-Tautomerase bezeichnet, wird als melanosomales Protein auf Melanozyten, Melanomzellen und in der Retina exprimiert und gehört zusammen mit der Tyrosinase und TRP1 zur Familie der Tyrosinasen, die als melanosomale Proteine eine Rolle in der Melanogenese spielen ^[75-77]. Dabei initiiert die Tyrosinase die Melanogenese, während TRP1 und TRP2 regulatorische Funktionen übernehmen ^[78]. Die Expression und Aktivität von TRP2 korreliert jedoch im Gegensatz zu TRP1 und zur Tyrosinase nicht mit dem Melaningehalt, sondern mit der Zellproliferation ^[78, 79]. Von Negroiu *et al.* wurde neben der melanosomalen auch eine intermittierende plasmamembranäre Lokalisation von TRP2 beobachtet ^[80].

TRP2 ist ein Zink bindendes regulatorisches Enzym, welches das rot-pigmentierte Zwischenprodukt Dopachrom zur farblosen Vorstufe DHICA (engl. *5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid*) des Eumelanins isomerisiert und als erstes von

Tsukamoto *et al.* (1992) beschrieben wurde [78, 81, 82]. Darüber hinaus wurde eine antiapoptotische Wirkung von TRP2 beschrieben [83]. Dies passt zu älteren Beobachtungen, dass TRP2 Resistenz von Melanomzellen gegenüber Ultraviolettstrahlung sowie Chemo- und Strahlentherapie vermittelt [79, 84, 85].

Humanes TRP2 ist zu 83 % identisch mit murinem TRP2 [82]. Das für humanes TRP2 kodierende Gen liegt auf Chromosom 13 [86]. TRP2 wurde in murinen Mausmodellen und beim Menschen als Zielantigen MHC-restringierter Melanom-reaktiver T-Zellen identifiziert [87, 88].

TRP2 wird auf malignen Melanomen und in begrenztem Maße auf nicht-malignen Zellen exprimiert. Es verschafft durch seine antiapoptotische Wirkung Melanomzellen einen Überlebensvorteil, weswegen von einer stabilen Expression von TRP2 auszugehen ist. Aus all diesen Gründen erscheint es vielversprechend, die im Melanommodell Ma-Mel-86 beobachtete HLA-unabhängige T-Zellerkennung, die auch bei HLA-negativer Erkrankung noch wirksam sein kann, für den adoptiven TCR-Transfer weiterzuentwickeln.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

3.1.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Autoklav	Systec GmbH (Linden)
Bakterienbrutschrank	Heraeus (Hanau)
Bestrahlungsanlage Gammacell 2000 (¹³⁷ Cäsium)	Molsgaarg Medical (Gansloe, Dänemark)
CERTOMAT® H und SII	Sartorius (Göttingen)
Chemikalienwaage	Sartorius (Göttingen)
Chronos und Biosafe® KRYOMATC	Messer Griesheim (Bad Soden)
CO ² -Inkubator BBD6220	Heraeus (Hanau)
CTL-ImmunoSpot® S6 Micro Analyzer	CTL Europe GmbH (Bonn)
Digital Graphic Printer UP-D890	Biometra (Göttingen)
Durchflusszytometer BD FACS Canto™II	BD Biosciences (Heidelberg)
Durchreichautoklav	Holzner (Nußloch)
ErgoOne	Starlab (Ahrensburg)
Gelelektrophorese	
Gelelektrophoresekammern	PEQLAB (Erlangen)
Gene Pulser Xcell™ Elektroporationssystem	Bio-Rad GmbH (München)
GenePower Supply GPS200/400	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Heizblock Thermomixer comfort, 5436	Eppendorf (Hamburg)
HERA safe; HERA Function Line	Heraeus (Hanau)
Inkubator HERAccl® 150	Heraeus (Hanau)
Kolbenhubpipetten	Starlab GmbH (Hamburg)
Magnetischer Zellseparator	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
Magnetständer MACS Multi Stand und MiniMACS™; OctoMACS™-Separator	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
Mehrkanalpipetten	Biohit (Helsinki, Finnland)
Mikroskop Eclipse TS100; TMS	Nikon (Alzenau)
mLINE	Biohit (Helsinki, Finnland)
MVE1400 Series	Cryo-Tech (Flemington, USA)
pH-Meter Toledo Five Easy	Mettler-Toledo GmbH (Wertheim)
Pipetman	Gilson (Middleton, USA)
Qubit®2.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Stickstoffbank	
Stickstoffvorratstank XL-180	Taylor-Wharton (Husum)
Thermocycler T1, Tgradient	Biometra (Göttingen)

Tiefkühlagerschrank HERA freeze (-80 °C)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Ultraspec 3000 UV/Visible Spectrophometer	Pharmacia (Freiburg)
UVsolo TS Imaging System	Biometra (Göttingen)
VX-150	Systec (Wettenberg)
Wasserdeionisierungsanlage Purelab Classic ELGA	Elga Labwater (Celle)
Werkbank steril Hera safe	Heraeus (Hanau)
Zentrifugen	
Megafuge 3.0 R; 40R	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Multifuge Rotina 420	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge 5424; 5415 R	Eppendorf (Hamburg)

3.1.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Bechergläser	
Glas (0,5 /1 /2 l)	Jenaer Glas (Zwiesel) / Schott (Mainz)
Kunststoff (0,1 /0,2 /0,5 /1 l)	Vitlab (Seeheim-Jugenheim)
Einfrier-Behälter	
Nalgene® Cryo Freezing Container	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Qualifreeze Cryo Einfriergerät	Qualilab (Bruchsal)
Elektroporationssystem	
Elektroporationsküvetten (2 mm)	VWR International GmbH (Darmstadt)
Gene Pulser®	Bio-Rad GmbH (München)
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,2 /0,5 /1,5 /2 ml)	Eppendorf (Wesseling)
FACS-Röhrechen (5 ml)	Greiner Bio-One (Nürtingen)
Filtereinheiten (0,22 µm /0,45 µm)	Whatman GmbH (Dassel)
MultiScreen® Filterplates, S2EM004M99 (MultiScreen-IP, 0,45 µm, weiß, steril)	Merck Millipore (Carrigtwohill, Irland)
Nunc™-Impfösen	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Petrischalen	
Petri Dish (ø 30 /90 mm)	Greiner Bio-One GmbH (Kremsmünster, Österreich)
Zellkulturschale mit Nocken® (ø 100 mm)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Pipette mit Spitze CELLSTAR® (2 /5 /10 /25 /50 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Pipettenspitzen TipOne® (10 /200 /1000 µl)	Starlab GmbH (Hamburg)
Präzisionsküvetten aus Quarzglas SUPRASIL®	Hellma GmbH & Co. KG (Müllheim)
Röhrchen CELLSTAR® (15 /50 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)

Sterifilter

Stericup® (500 ml: 0,22 µm / 0,45 µm)	Merck Millipore GmbH (Schwalbach)
Steriton™ (0,22 / 0,45 µm)	
Zählkammer Fuchs-Rosenthal (0,2 mm Tiefe, 0,0625 cm²)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen)
Zellkultur Multiwellplatte CELLSTAR® (6- / 24- / 48- / 96-Well)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Zellkulturflaschen CELLSTAR® (25 / 75 / 175 cm²)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Zellseparation	
MS-Säulen (25 MS)	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
Nylonzell-Separationsfilter (30 µm)	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)

3.1.2 Chemikalien, Reagenzien, Medien, Lösungen und Puffer

3.1.2.1 Chemikalien, Reagenzien und Medien

Produkt	Hersteller
AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol) -Tabletten	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
AIM V® Medium (1x) (Serum Free Medium + L-Glutamine, 50 µg/ml Streptomycin Sulfate, 10 µg/ml Gentomycin)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Aqua / Aqua ad injectabilia	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Bacto™ Agar	BD Biosciences (Heidelberg)
Bacto™ Tryptane	BD Biosciences (Heidelberg)
Bacto-Yeast Extract	BD Biosciences (Heidelberg)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Chrom ⁵¹ -Radionuklid	PerkinElmer LAS GmbH (Rodgau)
dH ₂ O	Fresenius Kabi France (Sèvres, Frankreich)
N,N-Dimethylformamid	Carl Roth AG (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA (Darmstadt)
dNTP-Mix (10 mM)	New England Biolabs (NEB) (Frankfurt am Main)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Lonza (Köln)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (1x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Ethylendiamin-Tetraacetat (EDTA)	Merck KGaA (Darmstadt)

Essigsäure	Carl Roth AG (Karlsruhe)
Ethanol (absolut)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
FACSClean™	BD Biosciences (Heidelberg)
FACSFlow™	BD Biosciences (Heidelberg)
FACSRinse™	BD Biosciences (Heidelberg)
Fötale Kälberserum (Fetal bovine serum (FCS))	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
FuGENE® 6 Transfection Reagent	Promega (Mannheim)
Gelfarbstoff	
peqGREEN (20.000x)	PEQLAB (Erlangen)
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Hepes Buffer 1 M (in 0,85 % NaCl)	Lonza (Köln)
Histopaque®-1077 (Ficoll)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Humanserum (HS)	Transfusionszentrale Universitätsmedizin Mainz
Hexadimethrine bromide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
rekombinantes Interleukin-2 (rIL-2), Proleukin®S	Novartis, Sandoz Pharmaceuticals GmbH (Holzkirchen)
Isopropanol	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Ladepuffer	
Gel Loading Dye Blue (6x)	NEB (Frankfurt am Main)
Lipofectamine™2000 Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Molekulargewichtsmarker	
GeneRuler 1 kb DNA ladder	NEB (Frankfurt am Main)
GeneRuler 100 bp DNA ladder	NEB (Frankfurt am Main)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth AG (Karlsruhe)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA (Darmstadt)
Opti-MEM I (1x) (Reduced Serum Medium + L-Glutamine + Hepes)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
PBS-Pulver	Merck KGaA (Darmstadt)
RPMI 1640 (+ L-Glutamine, NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
SOC Outgrowth Medium	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
STAR PURE AGAROSE (Low Eco Standard)	Starlab (Hamburg)
TAE Buffer (50x)	Serva Electrophoresis GmbH (Berlin)
TBE Buffer (10x) (Tris, Borsäure, EDTA)	Serva Electrophoresis GmbH (Berlin)
terraline® liquid	Schülke&Mayr GmbH (Norderstedt)
Tryptanblau	Merck KGaA (Darmstadt)
Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Wasserstoffperoxid 30 %	Carl Roth AG (Karlsruhe)

3.1.2.2 Puffer und Lösungen

Produkt	Herstellung
Acetatpuffer	4,6 ml 0,2 N Essigsäure; 11ml 0,2 N Natriumacetat; 46,9 ml dH ₂ O
Ampicillin (50 mg/ml)	50 g Ampicillin <i>ad</i> 1 l mit dH ₂ O auffüllen.
Avidin-Peroxidase-Lsg.	10 ml Ansatz: 10 ml PBS (1x); 0,1 % Tween [®] 20; 1 Tropfen A und 1 Tropfen B (VECTASTAIN [®] Elite [®] ABC HRP Kits)
ELISpot Wasch-Lsg.	PBS (1x); 0,05 % Tween 20
Essigsäure (0,2 N)	11,3 g Essigsäure (96 %) <i>ad</i> 1 l mit dH ₂ O auffüllen.
FACS Fixierungs-Lsg.	1,35 ml Formaldehyd (37%ig) <i>ad</i> 50 ml mit PBS (1x) auffüllen.
FACS Puffer	5 g BSA <i>ad</i> 500 ml mit PBS (1x) auffüllen.
Gel-Puffer (0,5xTBE)	50 ml TBE (10x) <i>ad</i> 1 l mit dH ₂ O auffüllen.
Glycerol (60 %)	30 ml Glycerol <i>ad</i> 50 ml mit LB-Medium auffüllen.
MACS-Puffer	2 mM EDTA; 0,5 % BSA auffüllen <i>ad</i> 0,5 l mit PBS und steril filtrieren (0,22 µm)
PBS (1x)	95,5 g Instamed PBS-Pulver <i>ad</i> 10 l mit dH ₂ O auffüllen.
Peroxidase-Substrat-Lsg.	50 ml Ansatz: 1 Tablette AEC in 2,5 ml Dimethylformamid lösen und <i>ad</i> 50 ml mit Acetatpuffer auffüllen.
Polybrene (5 mg/ml)	50 mg Hexadimethrine bromide in 10 ml 0,9%iger NaCl-Lösung lösen und steril filtrieren (0,22 µm).
Trypanblau (Tb)	Lsg. A: 0,2 % Tb-Lsg. (1 g Tb <i>ad</i> 500 ml mit dH ₂ O auffüllen) Lsg. B: 4,5 % NaCl-Lsg. (22,5 g NaCl <i>ad</i> 500 ml mit dH ₂ O auffüllen) 3 Teile A + 1 Teil B und steril filtrieren mit Stericup (0,22 µm)

3.1.3 Antibiotika

Antibiotikum	Konzentr.	Hersteller
Ampicillin	100 µg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Geneticin [®] Selective Antibiotic (G418 Sulfate)	50 mg/ml	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Kanamycin	50 µg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Penicillin-Streptomycin	500 µg/ml	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Puromycin	10 mg/ml	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)

3.1.4 Antikörper

Die nachfolgenden Antikörper wurden für ELISpot [Primär- (1°AK) und Sekundärantikörper (2°AK)], Durchflusszytometrie, magnetische Zellseparation (MACS) und Zellstimulation verwendet. Die FACS-Antikörper waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein isothiocyanate (FITC), Phycoerythrin (PE) oder Allophycocyanin (APC) markiert.

Methode	Antikörper und Spezifität	Konzentr./ Menge	Hersteller/ Bezugsquelle
ELISpot	Mab1-D1K (Maus-IgG1) 1°AK α -human-IFN- γ	10 μ g/ml	Mabtech AB (Nacka, Schweden)
	Mab7-B6-Biotin (Maus-IgG1) 2°AK α -human-IFN- γ (biotinyliert)	2 μ g/ml	Mabtech AB (Nacka, Schweden)
	W6/32: Blockade-AK (α -HLA Klasse I)	90 μ g/ml	Hybridomüberstand (Ursprung von Parham et al.) [89]
	OKT3	30 ng/ml	Hybridomüberstand ATCC (Manassas, USA)
FACS	IgG1 (Maus) Isotyp FITC/PE	5 μ l	Beckman Coulter (Krefeld)
	m α / β C-TCR		Acris Antibodies GmbH
	α -human-CD3-FITC / PE	5 μ l	Beckman Coulter (Krefeld)
	α -human-CD4-APC / PE	1 μ l	Beckman Coulter (Krefeld)
	α -human-CD8-APC / PE	1 μ l	Beckman Coulter (Krefeld)
MACS	α -human-V β 3-FITC	20 μ l	Beckman Coulter (Krefeld)
	anti-CD4-MicroBeads	15 μ l	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
Stimulation	anti-CD8-MicroBeads	15 μ l	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach)
	CD3/CD28 beads	4×10^7 beads/ml	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
	OKT3	30 ng/ml	Hybridomüberstand ATCC (Manassas, USA)

3.1.5 Molekularbiologische Materialien

3.1.5.1 Enzyme

Enzym	Verwendungszweck	Konzentr.	Puffer	Hersteller
BsrGI	5' T GTAC A 3' 3' A CATG T 5'	10 U/μg DNA	NEBuffer 3.1	NEB (Frankfurt am Main)
PerfectTaq™ Plus Master Mix	Orientierungs-PCR (O-PCR)			5 Prime GmbH (Hamburg)
Q5® High Fidelity DNA- Polymerase	DNA-Synthese	10 U/μg DNA	Q5® Reaction Buffer + Q5® GC Enhancer	NEB (Frankfurt am Main)
SacI	Linearisation	10 U/μg DNA	NEBuffer 1.1	NEB (Frankfurt am Main)

3.1.5.2 Molekularbiologische Kits

Kit	Hersteller
HiSpeed® Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
MinElute® Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
RNase-Free DNase Set	Qiagen (Hilden)
RNeasy Plus Micro Kit	Qiagen (Hilden)
Superscript®III Reverse Transcriptase Kit	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
VECTATSTAIN® Elite® ABC Kit, Standard, PK-6100	Vector Laboratories Ltd. (Peterborough, England)

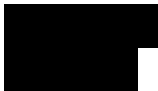
3.1.5.3 Plasmide und Vektoren

Im Folgenden sind alle verwendeten Vektorplasmide mit Bezeichnung [IMGT-Nomenklatur (h: engl. *human*, m: engl. *murine*)], spezifischen Merkmalen und ihrer Bezugsquelle verzeichnet.

Plasmid	Bezeichnung	Merkmal	Bezugsquelle
pcDNA 3.1 – hTRP2 ¹	<i>pcDNA3.1_V5/HS-TOPO-TRP2 #10</i>	humanes TRP2	
pcDNA3.1- α TRP2-TRAV	<i>pcDNA3.1_α-TRP2_hTRAV3*01_hTRAJ10*01_hTRAC*01</i>	variable Domäne α des HLA-unabhängigen dcTCR_ α TRP2	
pcDNA3.1- α TRP2-TRBV	<i>pcDNA3.1_α-TRP2_hTRBV28*β1_hTRPD1*01_hTRBJ1-5*01_hTRBC1*01</i>	variable Domäne β des HLA-unabhängigen dcTCR_ α TRP2	
pCOLT-GALV ¹ [90]	Verpackungsplasmid, welches für Proteine des Gibbonaffen-Leukämie-Virus codiert	<i>env</i> -Gene (Hüllprotein)	
pDONR TM 221 -attP1/-P2 ² (Abb. 8-4)	Gateway [®] <i>pDONRTM221 P1-P2</i>	Kanamycinresistenz Primerbindung: M13_F & M13_R attR-flankierte Cm ^R -/ <i>ccdB</i> -Gene	Gateway [®] Cloning Kit
pGMP_93 (Abb. 8-5)	<i>scTCR_α-p53</i>	"single-chain" TCR gegen p53	
pHIT-60 ¹ [91]	Verpackungsplasmid, welches für Proteine des Maus-Leukämie-Virus (MLV) codiert	<i>gag</i> - & <i>pol</i> -Gen (Strukturproteine und Enzyme)	
pMK-63.28.z		MycTag "Scharnier"-, transmembran-, und intrazelluläre Domäne eines CAR der zweiten Generation (CD8 α -CD28-CD3 ζ)	
pMX-DEST ² (Abb. 8-6)	<i>pMX_DEST_Cm^RccdB - #3</i>	Ampicillinresistenz Primerbindung: SE206_F attR-flankierte Cm ^R -/ <i>ccdB</i> -Gene	

¹ in "NEB[®] 10-beta Competent E. coli (High Efficiency)" kultiviert

² in "One Shot[®] *ccdB* Survival[™] 2 T1R Competent Cells" kultiviert

pMX-DEST_cTCR-2C/417 ¹	<i>pMX_DEST (hTRAV3*01_TRAJ_m TRAC)-F2A(TRBV28*β1_hTRPD_hTRBJ_m TRBC)_L9P (Vβ3)</i>	Ampicillinresistenz bicistronische α - und β -TCR-Kette (TRP2-spezifisch, chimärisiert, HLA-Klasse 1-unabhängig, kodonoptimiert, V β 3-Kette)	
-----------------------------------	---	--	---

3.1.5.4 Oligonukleotide

3.1.5.4.1 Oligonukleotide für Klonierung, Sequenzierung und verschiedene PCR-Verfahren der TCR-Konstrukte

Die folgenden Oligonukleotide (Primer) wurden durch die Firma IDT (Integrated DNA Technologies, Leuven (Belgien)) synthetisiert. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden zur Anwendung mit dH₂O auf 10 pmol/ μ l konzentriert. Dabei wurden die Oligonukleotide für unterschiedliche molekularbiologische Verfahren verwendet (K: Klonierung, O: Orientierungs-PCR, S: Sequenzierung, RT: Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)).

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
hV α _p1_F	ATCCACCATGGCCTCTGCACCCATCTC	S/ K/ O/ RT
M13_F	TGTAACGACGGCCAGT	S
M13_R	CAGGAAACAGCTATGACC	S
mC α _p1872_R	TCATCAGCTGCTCCACAGTCTCAGTGTC	S
Se206_F	TTACACAGTCCTGCTGACCACC	S/ O

3.1.5.4.2 Oligonukleotide für die Konstruktion und Chimärisierung der TCR-Konstrukte

Die folgenden Oligonukleotide wurden zudem für die Konstruktion und Chimärisierung der TCR-Konstrukte verwendet.

Primerbezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
attB1_hV α _p1_F	GGGGACAAGTTTGTACA AAAAGCAGGCTTCGGA TCCACCATGGCCTCTGC ACCCATCTC	scTCR_ α TRP2 TCR-SCS_ α TRP2
attB2_CD3 ζ _p1581_R	GGGGACCAGCACTTTGT ACAAGAAAGCTGGGTAT	TCR-SCS_ α TRP2

	CATTATCTAGGTGGCAG GGCCTGC	
attB2_mC α _p1872_R	GGGGACCAGCACTTTGT ACAAGAAAGCTGGGTAT CATCAGCTGCTCCACAG TCTCAGTGTC	scTCR_ α TRP2 (Konstruktion Fragment I.3 und I.4)
hV β -mC β _p799_F	ACTCGACTCTCCATCCT AGAGGACCTGCGGAAC GTGAC	scTCR_ α TRP2 (Konstruktion Fragment I.3)
hV β -mC β _p831_R	GTTCCGCAGGTCCTCTA GGATGGAGAGTCGAGT C	scTCR_ α TRP2 (Konstruktion Fragment I.1 und Fragment I.5)
mC β _p1034_R	GACAGGCAGTAGCTGTA GTTGCTC	RT-PCR / PCR (Amplifikation aus genomischer DNA)
Megaprimer I (M I)	vgl. Abschnitte 4.1.1 und 8.1.1	scTCR_ α TRP2 (Konstruktion Fragment I.1)
MycTag_p802_F	CGACTCTCCATCCTAGA GCAGAAGCTGATC	TCR-SCS_ α TRP2
MycTag_p831_R	GATCAGCTTCTGCTCTA GGATGGAGAGTCG	TCR-SCS_ α TRP2
CD3 ζ _p1581_R	TTATCTAGGTGGCAGGG CCTGC	TCR-SCS_ α TRP2
SL7-hV α _p400_F	GAACTCAATATCCAGGG CACCAGCGGCAGCAG	scTCR_ α TRP2 (Konstruktion M I)
SL7-hV α _p427_R	TGCCGCTGGTGCCCTG GATATTGAGTTCCAATTT	scTCR_ α TRP2 (Konstruktion Fragment I.2)
SL7-hV β _p486_R	TACTTTCACATCTACTCC GCCCCCTCCGCTGC	scTCR_ α TRP2 (Konstruktion M I)

3.1.5.4.3 Templates und Oligonukleotide für die Konstruktion der Fragmente I.1 - I.5, II.1 - II.3 und des Megaprimer I

Im Folgenden sind die für die Konstruktion der einzelnen Fragmente verwendeten Templates und Oligonukleotide mit den entsprechenden *Annealing*-Temperaturen verzeichnet. Die DNA-Sequenzen der Primer sind im Abschnitt 3.1.5.4.2 zu finden.

Fragment	Template	Template-Menge	Primer	Annealing-Temperatur ³
Fragm. I.1	pcDNA3.1- αTRP2-TRBV	10 ng	Megaprimer I hVβ-mCβ_p831_R	70 °C
Fragm. I.2	pcDNA3.1- αTRP2- TRAV	10 ng	attB1_hVα_p1_F SL7-hVα_p427_R	63 °C
Fragm.I.3	pGMP_93	10 ng	attB2_mCα_p1872_R hVβ-mCβ_p799_F	66 °C
Fragm. I.4	Fragment I.1 Fragment I.2	400 ng 400 ng	attB1_hVα_p1_F hVβ-mCβ_p831_R	60 °C
Fragm. I.5	Fragment I.3 Fragment I.4	400 ng 400 ng	attB1_hVα_p1_F attB2_mCα_p1872_R	60 °C
Fragm. II.1	pMX-DEST_ scTCR_αTRP2	5 ng	attB1_hVα_p1_F MycTag_p831_R	52 °C
Fragm. II.2	pMK-63.28.z ⁴	5 ng	MycTag_p802_F attB2_CD3ζ_p1581_R	52 °C
Fragm. II.3	Fragment II.1 Fragment II.2	400 ng 400 ng	attB1_hVα_p1_F attB2_CD3ζ_p1581_R	60 °C
Mega- primer I	pGMP_93	5 ng	SL7-hVα_p400_F SL7-hVβ_p486_R	62.6 °C

3.1.6 Nährmedien, Zelllinien und Bakterienstämme

3.1.6.1 Nährmedien und Zellkulturmedien

AIM V*	10 % Humanserum (HS) (hitzeinaktiviert (HI) bei 56 °C für 45 min)
DMEM*	10 % FCS (HI); 1 % L-Glutamin; 1 % Penicillin/ Streptomycin; 25 mM HEPES
DMEM ^o	1 % L-Glutamin; 1 % Penicillin/ Streptomycin; 25 mM HEPES
Einfriermedium	Eukaryotische Zellen: FCS (HI) oder HS (HI) + 10 % DMSO Bakterien: 60 %-haltiges Glycerol
huRPMI	10 % HS (HI); 1 % Penicillin/Streptomycin
LB-Medium	10 g Bacto™ Trypton; 5 g Hefe-Extrakt; 10 g NaCl mit d. H ₂ O auf 1 l auffüllen und mit 5 N NaOH den pH-Wert auf 7 einstellen, anschließend Autoklavieren bei 121 °C.
LB-Medium*	Für ein selektives Wachstum bestimmter Bakterien wurde autoklaviertes LB-Medium vor der Verwendung mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt.
LB-Agar	500 ml LB-Medium; 7,5 g Bacto™ Agar Autoklavieren bei 121 °C

³ Q5® High Fidelity DNA-Polymerase-adaptierte *Annealing*-Temperatur (+3 °C)

⁴ linearisiert mit SacI an Position 3528

	Für die Herstellung von Agar-Platten wurde der LB-Agar zunächst in der Mikrowelle vollständig erhitzt und nach einer Abkühlphase mit dem Antibiotikum versetzt, bevor es in Petrischalen gegossen wurde.
RPMI*	10 % FCS (HI); 1 % Penicillin/Streptomycin
RPMI ^E	10 % FCS (HI)
RPMI ^T	10 % FCS (HI); 1 % Penicillin/Streptomycin; 25 mM HEPES
RPMI ^Ø	ohne jegliche Zusätze

3.1.6.2 E. coli-Bakterienstämme

Für die Transformationen wurden "NEB[®] 10-beta Competent E. coli (High Efficiency)"-Bakterien der Firma NEB (Frankfurt am Main) verwendet, die im Folgenden mit ihrem spezifischen Genotyp dargestellt sind. Für die Herstellung und Kultivierung von Gateway[®]-kompatiblen Vektoren wurden die "One Shot[®] ccdB Survival[™] 2 T1R Competent Cells" verwendet (im Gateway[®] Vector Conversion System Kit von Thermo Fisher Scientific enthalten).

Bakterienstamm	spezifischer Genotyp
NEB [®] 10-beta Competent E. coli High Efficiency (1–3 x 10 ⁹ cfu/µg)	$\Delta(ara-leu) 7697 araD139 fhuA \Delta lacX74 galK16 galE15 e14-\phi 80dlacZ\Delta M15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (Str^R) rph spoT1 \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$
One Shot [®] ccdB Survival [™] 2 T1R Competent Cells (>1 x 10 ⁹ cfu/µg)	F-mcrA $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 ara\Delta 139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG fhuA::IS2$

3.1.6.3 Zelllinien

B78H1 und B78H1-hTRP2

B78H1 ist ein in Dr. Selma Silagis Labor etablierter amelanotischer Klon der murinen B16-Melanomzelllinie. Im Gegensatz zur B16-Zelllinie sind B78H1-Zellen aufgrund einer TAP-Defizienz MHC-Klasse I-negativ [93, 94]. In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich eine B78H1-Zelllinie verwendet, die nach stabiler Transfektion mit einem für humanes TRP2 kodierenden Expressionsplasmid eine hohe und stabile Expression von humanem TRP2 aufwies (bezeichnet als B78H1-hTRP2) und freundlicherweise von [REDACTED] bereitgestellt wurde.

Jurkat 76-CD8^{hi}

Jurkat ist eine, aus dem peripheren Blut eines 14-jährigen T-Zell-Leukämie-Patienten etablierte immortalisierte T-Zelllymphomlinie ^[95]. Die von dieser Linie abstammenden Jurkat 76-Zellen sind defizient hinsichtlich endogener TCR α - und β -Ketten und eignen sich daher für eine Expressionsevaluierung transfizierter TCR-Ketten mittels durchflusszytometrischer Analyse ^[96]. In dieser Arbeit wurden CD8⁺, CD4⁻ Jurkat 76-Zellen verwendet, die freundlicherweise von [REDACTED] ([REDACTED] [REDACTED]) bereitgestellt wurden.

Ma-Mel-86

Die Melanomzelllinien Ma-Mel-86a, -b, -c und -f wurde von Paschen *et al.* zu verschiedenen Zeitpunkten aus Lymphknotenmetastasen einer Patientin (Ma-Mel-86) mit malignem Melanom etabliert. Sie unterscheiden sich hinsichtlich der Expression von MHC-Klasse I und melanosomalen Differenzierungsantigenen. Ma-Mel-86a exprimiert MHC-Klasse I-Moleküle, jedoch keine melanosomalen Differenzierungsantigene (gp100, Tyrosinase und TRP2). Ma-Mel-86c besitzt nur noch einen MHC-Klasse I-Haplotypen. Ma-Mel-86b und -f tragen aufgrund von biallelischen Deletionen des β 2-Mikroglobulin-Gens auf ihren Oberflächen keine MHC-Klasse I-Moleküle.

Ausgehend von der Melanomzelllinie Ma-Mel-86b wurde die MHC-Klasse II-defiziente Zelllinie Ma-Mel-86b_ko^{CIITA} generiert ^[97]. Dabei wurden die CIITA (engl. *class II major histocompatibility complex transactivator*) -Gene mittels der TALEN (engl. *transcription activator-like effector nuclease*) -Technologie ausgeschaltet.

Periphere Blutlymphozyten (PBMCs)

Aus "Buffy Coats" (BC) wurden mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) gesunder Blutspender separiert. Diese wurden freundlicherweise von der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz bereitgestellt.

Phoenix-Ampho

Zur Herstellung von Retroviren wurde die Phoenix-Ampho (PA) -Zelllinie verwendet, welche vom Nolan Labor (Stanford Universität, USA) mittels stabiler Transfektion eines Maus-Leukämievirus (MLV) -Systems aus der HEK 293T-Zelllinie entwickelt wurde ^[98]. In der vorliegenden Arbeit wurde die dritte Generation der PA-Zellen verwendet, in der

das Risiko der Generierung eines replikationsbefähigten Retrovirus durch zwei Mechanismen reduziert wird. Einer von ihnen basiert auf der Aufteilung der benötigten viralen Gene (*gag/pol*, *env*) auf die zwei voneinander unabhängigen Hilfskonstrukte pHIT-60 und pCOLT-GALV (Abschnitt 8.3.3). Es wären dementsprechend drei Rekombinationen für die Generierung von replikationsfähigen Retroviren erforderlich. Zudem werden nicht von MLV abgeleitete Promotoren verwendet. Dies mindert zusätzlich das Rekombinationspotential.

HEK 293T und 293T_Dko^{CIITA+B2M}

HEK 293T-Zellen tragen das "*SV40 large T antigen*", welches die DNA-Replikation von episomalen Plasmiden mit einem "*SV40 origin of replication*" und somit eine transiente Transfektion mit hoher Expressionsstärke ermöglicht. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von [REDACTED] ([REDACTED]) zur Verfügung gestellt.

HEK 293T_Dko^{CIITA+B2M} ist eine klonale CIITA+B2M-Doppelknockout (Dko) -Variante von HEK 293T-Zellen, die mithilfe der TALEN-Technologie etabliert wurde [97]. Durch den CIITA+B2M-Dko ist diese Zelllinie defizient für MHC-Klasse I- und Klasse II-Moleküle und eignet sich insbesondere für die Stimulation und Spezifitätsanalyse MHC-unabhängiger T-Zellen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden HEK 293T_Dko^{CIITA+B2M}-Zellen transient mit humanem TRP2 transfiziert.

397-Mel

Die humane Melanomzelllinie 397-Mel war bereits im Labor verfügbar. Die Zelllinie exprimiert MHC-Klasse I und hTRP2/mTRP2.

3.1.7 Software, Webseiten und Webtools

Im Folgenden ist die für die vorliegende Arbeit verwendete Software aufgelistet.

Software	Entwickler
BD FACS Diva	BD Biosciences (Heidelberg)
CLC Sequence Viewer 6.8.1	CLC bio (Dänemark)
FinchTV	Geospiza (Seattle, USA)
FlowJo 7.6.5	Tree Star, Inc. (Ashland, USA)
Geneious R8.1.8	Biomatters Ltd. (Auckland, New Zealand)
Geneious Prime	Biomatters Ltd. (Auckland, New Zealand)
ImmunoSpot®	C.T.L. (Bonn, Deutschland)

Zudem wurden folgende frei verfügbare Webtools und Webseiten verwendet.

Software	Webadresse
BLAST NCBI	blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
IMGT	imgt.org
NEBaseChangerTM	nebasechanger.neb.com
OligoAnalyzer 3.1	eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Restriktion von DNA

Um DNA an spezifischen Stellen zu spalten werden sogenannte Restriktionsendonukleasen verwendet. Diese erkennen meist palindromische Sequenzen und spalten Phosphodiesterbindungen im DNA-Doppelstrang durch Hydrolyse. In der vorliegenden Arbeit wurde der Vektor pMK-63.28.z (Abschnitt 3.1.5.3) zur Konstruktion von Fragment II.2 mit *SacI* linearisiert. Zudem wurde ein Verdau von pMX-DEST_TCR-SCS_αTRP2 mit *BsrGI* zur Überprüfung des Inserts mittels Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Restriktionsansätze wurden nach festem Schema pipettiert (**Tab. 3-1**) und bei 25 °C für 1,5 h inkubiert. Die Überprüfung der Linearisation erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese.

Linearisation	Menge	Verdau	Menge
pMK-63.28.z	5 µg	pMX-DEST_TCR-SCS_αTRP2	740 ng
Puffer (10x)	2 µl	Puffer (10x)	2 µl
Restriktionsenzym (<i>SacI</i>)	20 U	Restriktionsenzym (<i>BsrGI</i>)	20 U
d. H ₂ O	RV	d. H ₂ O	RV
Gesamtvolumen	20 µl	Gesamtvolumen	20 µl

Tab. 3-1: Reaktionsansatz für die Restriktion von DNA.

3.2.1.2 Amplifikation von DNA mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) ist ein *In vitro*-Verfahren zur Vermehrung von definierten DNA-Abschnitten. Für die PCR werden zusätzlich zum DNA-Template, dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphate) und einer thermostabilen DNA-Polymerase, zwei Oligonukleotide (Primer) benötigt, die den zu amplifizierenden Abschnitt der DNA flankieren. Der erste Schritt der PCR ist die Doppelstrang-Denaturierung, auf die die Anlagerung der Oligonukleotide, auch als Hybridisierung bezeichnet, bei einer spezifischen Temperatur (*Annealing*-Temperatur) folgt. Die *Annealing*-Temperatur ist abhängig von Größe und GC-Gehalt der Oligonukleotide und wurde mit dem Webtool OligoAnalyzer 3.1 von IDT und mit Geneious R8.1.8 ermittelt. Nach der Anlagerung folgt die DNA-Synthese durch die DNA-Polymerase. Der neu entstandene komplementäre DNA-Strang kann nun im nachfolgenden Zyklus selbst als Template dienen. Dabei steigt die Anzahl der

amplifizierten Abschnitte pro Zyklus exponentiell. In der vorliegenden Arbeit wurden für Polymerase-Kettenreaktionen verschiedene Q5[®]-Polymerasen von NEB verwendet. Die Reaktion fand im T1 Thermocycler der Firma Biometra (Göttingen) statt.

3.2.1.2.1 Standard-PCR

Im Rahmen der Konstruktion des scTCR_αTRP2 und des TCR-SCS_αTRP2 wurde die PCR dazu verwendet, die einzelnen Fragmente herzustellen und die äußeren Fragmente I.2 und I.3 für den scTCR_αTRP2 und II.1 und II.2 für den TCR-SCS_αTRP2 mit flankierenden attB-Rekombinationssequenzen auszustatten. Im Folgenden ist der dafür verwendete Pipettieransatz aufgeführt.

DNA	5-10 ng
Q5 [®] Reaction Buffer 5x	20 µl
GC Enhancer 5x	20 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
dNTPs [10 mM]	2 µl
Q5 [®] High Fidelity Polymerase [2000 U/ml]	0,5 µl
d. H ₂ O	RV

Die Reaktion wurde unter den in **Tab. 3-2** wiedergegebenen Reaktionsbedingungen im Thermocycler ausgeführt.

Schritt	Temperatur	Zeit
1 Initiale Denaturierung	98 °C	5 min
2 Denaturierung	98 °C	10-30 s
3 Hybridisierung	60 - 72 °C	45 s
4 Elongation	72 °C	30 s/kb
5 Terminale Elongation	72 °C	2-3 min
6 Aufbewahrung	4 °C	

Schritt 2-4 x 30-35 Zyklen

Tab. 3-2: Reaktionsbedingungen für die Standard-PCR.

3.2.1.2.2 Orientierungs-PCR

Die Orientierungs-PCR (O-PCR) ermöglicht die direkte Überprüfung des Transformationserfolgs von Bakterien. Durch spezifische Oligonukleotide, die an den Grenzen des Inserts binden, kann die im Vektor klonierte DNA amplifiziert werden. Dafür wurden von Agarplatten jeweils eine Bakterienkolonie in 100 µl LB-Medium mit Antibiotikum resuspendiert und 10 µl pro PCR-Reaktionsgefäß bei 10.000 rpm (engl. *revolutions per minute*) für 10 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in einem 20 µl PCR-Ansatz resuspendiert. Im Anschluss an die PCR wurde jeweils 8 µl der Amplifikate mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert und von positiven Klonen eine 5 ml-Minikultur angelegt. Im Folgenden ist der für die O-PCR verwendete Pipettieransatz, bei einem Gesamtvolumen von 20 µl, aufgeführt.

<i>PerfectTaq™ Plus MasterMix (2x)</i>	10 µl
Primer <i>sense</i> [10 pmol]	10 pmol
Primer <i>reverse</i> [10 pmol]	10 pmol
dH ₂ O	auf 20 µl

Die Reaktion wurde unter den in **Tab. 3-3** wiedergegebenen Reaktionsbedingungen im Thermocycler durchgeführt.

Schritt	Temperatur	Zeit
1 Initiale Denaturierung	94 °C	5 min
2 Denaturierung	94 °C	10 s
3 Hybridisierung	60 - 72 °C	45 s
4 Elongation	72 °C	1 min/kb
5 Terminale Elongation	72 °C	2-3 min
6 Aufbewahrung	4 °C	

Schritt 2-4 x 30-35 Zyklen

Tab. 3-3: Reaktionsbedingungen für die O-PCR.

3.2.1.2.3 Splicing-by-Overlap-Extension-PCR (SOE-PCR)

Die "Splicing-by-Overlap-Extension"-PCR (SOE-PCR) ermöglicht die Verbindung mehrerer DNA-Fragmente zu einem langen DNA-Strang^[99]. Im ersten Schritt werden mittels Standard-PCRs die zu verbindenden Fragmente so verlängert, dass überlappende Sequenzen entstehen (**Abb. 3-1**: Schritt 1). Im zweiten Schritt kommt es zur Hybridisierung der überlappenden Sequenzen und Elongation durch die Q5[®]-

DNA-Polymerase (Abb. 3-1: Schritt 2). Im dritten Schritt der SOE-PCR werden äußere Primer eingesetzt, um die Amplifikation des gesamten Fragments zu erhalten (Abb. 3-1: Schritt 3). In den **Tabellen 3-4, 3-5** und **3-6** sind die für den zweiten und dritten Schritt der SOE-PCR verwendeten Reagenzien und Reaktionsbedingungen im Thermocycler aufgeführt. Für den ersten Schritt der SOE-PCR, der eine Standard-PCR darstellt, vgl. Abschnitt 3.2.1.2.1.

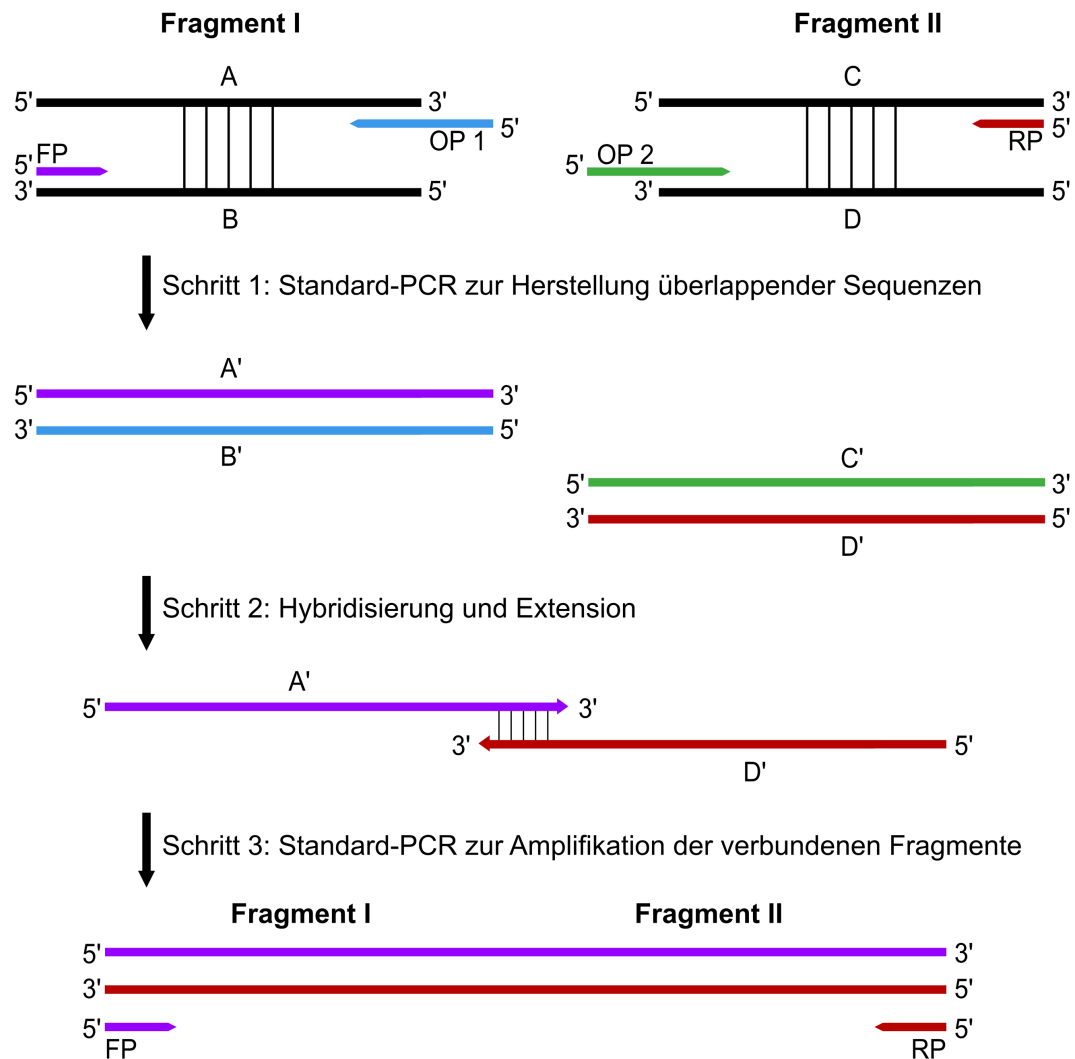


Abb. 3-1: Schematische Darstellung der SOE-PCR. Schritt 1: Herstellung überlappender Sequenzen mittels Standard-PCR und Oligonukleotiden, die diese Sequenzen tragen (Primer für Fragment I: lila (FP, engl. *forward primer*) und hellblau (OP 1, engl. *overlapping primer*); Primer für Fragment 2: dunkelrot (RP, engl. *reverse primer*) und hellgrün (OP 2). Schritt 2: Darstellung der Hybridisierung und Extension der Fragmente am Beispiel der Stränge A' und D'. Schritt 3: Amplifikation der verbundenen Fragmente mittels Oligonukleotiden, die an den äußeren Enden der Fragmente binden. Modifiziert nach Luo *et al.*, 2013 ^[99].

Schritt 2		Schritt 3	
Fragment 1 (400 ng)	x µl	<i>Forward</i> Primer (10pmol/µl)	1 µl
Fragment 2 (400 ng)	x µl	<i>Reverse</i> Primer (10pmol/µl)	1 µl
Q5 [®] - <i>Buffer</i>	5 µl	Q5 [®] - <i>Buffer</i>	5 µl
Q5 [®] -GC- <i>Enhancer</i>	5 µl	Q5 [®] -GC- <i>Enhancer</i>	5 µl
Q5 [®] -DNA-Polymerase	0,25 µl	Q5 [®] -DNA-Polymerase	0,25 µl
dNTPs	1 µl	dNTPs	1 µl
d. H ₂ O	RV	d. H ₂ O	RV
Gesamtvolumen	25 µl	Gesamtvolumen	25 µl

Tab. 3-4: Für die SOE-PCR verwendete Reagenzien. Für den dritten Schritt der SOE-PCR wurden die Reagenzien von Schritt 3 dem Reaktionsansatz von Schritt 2 hinzugefügt.

Schritt	Temperatur	Zeit
1 Initiale Denaturierung	98 °C	5 min
2 Denaturierung	98 °C	10 s
3 Hybridisierung	<i>Annealing</i> -Temperatur der Primer	45 s
4 Elongation	72 °C	45 s
5 Terminale Elongation	72 °C	3 min
6 Aufbewahrung	4 °C	

Schritt 2-4 x 15 Zyklen

Tab. 3-5: Reaktionsbedingungen für den zweiten Schritt der SOE-PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit
1 Initiale Denaturierung	98 °C	5 min
2 Denaturierung	98 °C	10 s
3 Hybridisierung	<i>Annealing</i> -Temperatur der Primer	30 s
4 Elongation	72 °C	45 s
5 Terminale Elongation	72 °C	3 min
6 Aufbewahrung	4 °C	

Schritt 2-4 x 30 Zyklen

Tab. 3-6: Reaktionsbedingungen für den dritten Schritt der SOE-PCR.

3.2.1.2.4 Reverse Transkription

Die Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) ist ein Verfahren zum Nachweis von RNA. Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase retroviralen Ursprungs, die RNA zu cDNA umschreibt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Superscript®III Reverse Transcriptase Kit von Thermo Fisher Scientific nach Angaben des Herstellers verwendet. Dabei wurde für die Reaktion 1-5 µg Total-RNA und als Primer Oligo-dT eingesetzt.

3.2.1.3 Einfrieren prokaryotischer Zellen

Um Bakterien längerfristig zu lagern, wurden 750 µl der gewünschten Bakteriensuspension mit 250 µl 60 %-iger Glycerollösung versetzt, in Kryoröhrchen überführt und diese in Kryoboxen langsam auf -80 °C abgekühlt.

3.2.1.4 Transformation von Bakterien

Transformation ist die Aufnahme von Fremd-DNA in transformationsbefähigte Bakterien. Hierfür wurden jeweils 50 µl kompetenter E. coli-Bakterien (NEB®DH10-beta) auf Eis aufgetaut, mit 3 µl DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien im Wasserbad 30 s einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt, mit einer darauffolgenden 2-minütigen Inkubation auf Eis. Anschließend wurden den Bakterien 250 µl SOC-Outgrow-Medium hinzugefügt und bei 37 °C 1 h im Schüttler bei 220 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurden 10-150 µl Bakterien je nach Resistenzlage mit Ösen auf geeignete Antibiotika-haltige Agarplatten gestrichen und bei 30 °C inkubiert.

3.2.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA aus Bakterien zu extrahieren, wurden 5 ml antibiotikahaltiges LB-Medium (Minikultur) mit je einem Klon aus den Agarplatten angeimpft und im Schüttler (220 rpm) bei 30 °C inkubiert. Maxikulturen wurden mit 100 ml LB angesetzt, mit 5 ml der Minikultur angeimpft und im Schüttler (220 rpm) bei 30 °C inkubiert.

Zur Extraktion der Plasmid-DNA aus den Bakterien wurde das QIAprep® Spin Miniprep Kit, HiSpeed® Plasmid Maxi Kit nach Protokoll des Herstellers verwendet. Die Elution erfolgte bei Minikulturen mit 30 µl oder 50 µl dH₂O und bei Maxikulturen mit 0,5-0,7 ml dH₂O. Anschließend wurde die optische Dichte der DNA gemessen.

3.2.1.6 Isolierung von genomischer DNA

Zur Isolierung von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen wurde das QIAamp® DNA Mini Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS 1.5×10^5 Zellen eingesetzt. Nach Isolierung wurde die optische Dichte der DNA gemessen und die Größe des DNA-Fragments mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

3.2.1.7 Isolierung von RNA

Um aus eukaryotischen Zellen RNA zu isolieren, wurde das RNeasy Plus Micro Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden jeweils 5×10^5 Zellen eingesetzt, die vor Beginn der Isolierung zweimal mit PBS gewaschen wurden. Um Verunreinigung der RNA durch DNA zu vermeiden, wurde zudem ein DNA-Verdau mittels des RNase-Free DNase Sets nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Isolierung wurde die optische Dichte der RNA gemessen und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

3.2.1.8 Bestimmung der DNA-Konzentration

Mithilfe des Ultraspec 3000 UV/Visible Spektrophotometers wurden Konzentrationen von DNA und RNA gemessen. Die Probe wurde 40- oder 80-fach verdünnt und die optische Dichte gegen dH_2O gemessen. Die Konzentration wurde über das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm für Nukleinsäuren berechnet. Reine DNA weist dabei ein Verhältnis von 1,8 bis 2 auf.

3.2.1.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ermöglicht eine Auftrennung von unterschiedlich großen DNA-Fragmenten im elektrischen Feld. Dabei wandern die Fragmente abhängig von ihrer Größe und negativen Ladung unterschiedlich weit. Zur Herstellung des Agarosegels wurde 1 % agarosehaltiger 0,5 x TRIS-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE) aufgekocht. Das verdampfte H_2O wurde nach dem Aufkochen mit dH_2O aufgefüllt und der Lösung 1 μ l des Gelfarbstoffes peqGreen™ hinzugefügt. Das ausgehärtete Gel wurde dann in die Gelelektrophoresekammer eingesetzt und diese mit 0,5x TBE-Puffer gefüllt. Um nun die Größe der Fragmente abschätzen zu können, wurden zunächst je 0,25 μ g der Molekulargewichtsmarker (100 bp DNA *ladder*, 1 kb DNA *ladder*) ebenso wie die DNA-Fragmente mit 1x Ladepuffer gemischt und in die Geltaschen gegeben. Die Spannung wurde mit einer Dauer von 30-60 min angelegt und war abhängig von der Größe der

Gelelektrophoresekammer (60-120 mV). Mittels des UVsolo-TS-Systems der Analytik Jena AG wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht.

3.2.1.10 Gelextraktion von DNA-Banden

Die Extraktion von einzelnen DNA-Banden aus einem mit 1x TAE angesetzten Agarosegel erfolgte mithilfe des MinElute® Gel Extraction Kit. Die Banden wurden mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und nach den Angaben des Herstellers mit 10 µl dH₂O eluiert.

3.2.1.11 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Zur Sequenzierung linearer DNA-Fragmente wurden je nach Fragmentlänge 100-200 ng DNA in 2 µl angesetzt und dazu 10 pmol der Primer und jeweils 1 µl des ABI-Sequenzierungspuffers sowie des Sequenzierungsenzyms hinzugefügt. Die hierfür verwendeten Reaktionsbedingungen sind in Tab. 3-7 aufgeführt.

Sequenzierungen der Plasmid-DNA oder von PCR-Produkten wurden von der Firma StarSEQ (Mainz) durchgeführt. Dafür wurde der Sequenzierungsansatz mit 600-700 ng Plasmid-DNA bzw. 80-100 ng des PCR-Produkts und jeweils 10 pmol des spezifischen Oligonukleotids versetzt und mit dH₂O auf 7 µl aufgefüllt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit FinchTV und Geneious R8.1.8.

Schritt	Temperatur	Zeit
1	95 °C	2 min
2	95 °C	10 s
3	56 °C	4 min

Schritt 2 x 25 Zyklen

Tab. 3-7: Reaktionsbedingungen für die Sequenzierung linearer DNA-Fragmente.

3.2.1.12 Gateway®-Cloning-Technologie

Die Gateway®-Cloning-Technologie ermöglicht die effiziente Integration von beliebigen DNA-Abschnitten in einen Zielvektor. Dafür wird das sequenzspezifische System des Bakteriophagen λ genutzt, welcher sein Genom in einen Bakterienwirt integriert und je nach Bedarf zwischen lytischem und lysogenem Zyklus wechselt. Die λ Int (Integrase), eine Tyrosin-Rekombinase, erkennt spezifische att-Erkennungssequenzen (engl. *attachment site*) und katalysiert dort einen lytischen oder lysogenen Prozess. Welcher

Prozess katalysiert wird, ist abhängig davon, welche Zusammensetzungen der Enzyme FIS (engl. *Factor for Inversion Stimulation*), IHF (engl. *Integration Host Factor*) und XIS (Exzisionase) anwesend sind. Bei den att-Erkennungssequenzen wird auch *in vitro* zwischen Phagensequenzen (attP) und Bakteriensequenzen (attB) unterschieden. Leichte Sequenzvariationen (attB1, attB2) ermöglichen eine gerichtete Klonierung und eine definierte Reihenfolge, in der die DNA-Fragmente im Zielvektor erscheinen. Der BP Clonase™ Enzyme Mix (Int, IHF) vermittelt die sog. BP-Reaktion (**Abb. 3-2**), in der das DNA-Fragment in den Eingangsvektor (pDONR™221) integriert wird. Dabei werden die attP-Sequenzen des Eingangsvektors mit den flankierenden attB-Sequenzen des DNA-Fragments rekombiniert. Im darauffolgenden Ansatz mit dem LR Clonase™ II Plus Enzyme Mix (Int, IHF, XIS) wird das aus der BP-Reaktion gewonnene Produkt als Substrat für die sog. LR-Reaktion (Abb. 3-2) verwendet. Dabei werden die attL-flankierten DNA-Fragmente im Eingangsvektor und die attR1-flankierte ccdB-Kassette (engl. *control of cell death*) für den Zielvektor (in dieser Arbeit pMX-DEST) rekombiniert. Im Ziel- bzw. Expressionsvektor liegen die DNA-Fragmente dann attB-flankiert (ccdB-Kassette im Eingangsvektor attP-flankiert) vor. Die ccdB-Kassette ist ein Selbstmordgen, welches bei Expression die bakterielle Gyrase hemmt und damit die negative Selektion aller Bakterien ermöglicht, in denen das Fragment nicht korrekt integriert wurde. Die positive Selektion erfolgt über die Kanamycin- und Ampicillinresistenzgene, die im Eingangsvektor (Kanamycinresistenz) bzw. im Zielvektor (Ampicillinresistenz) vorliegen.

Für die BP-Rekombination wurden 150 ng von pDONR™221 und 150 ng des von attB-Sequenzen flankierten DNA-Fragments mit 1 µl des Enzyms BP-Klonase in insgesamt 5 µl (RV mit TE aufgefüllt) angesetzt und bei 25 °C für 2 h inkubiert. Nach Inkubation wurden 1 µl (2 µg) der Proteinase K für 10 min bei 37 °C hinzugefügt. Anschließend wurde 3 µl des BP-Rekombinationsansatzes in NEB®DH10-beta Bakterien transformiert. Die auf Kanamycin-haltigen Agarplatten gewachsenen Bakterienkolonien wurden einzeln mit Ösen gepickt, eine O-PCR durchgeführt und das Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen.

Zur Durchführung der LR-Rekombination wurde 150 ng von pMX-DEST und 150 ng des Produkts der BP-Rekombination mit 1 µl des Enzyms LR-Klonase angesetzt und bei 25 °C für 2 h inkubiert. Nach Inkubation wurde 1 µl der Proteinase K für 10 min bei 37 °C hinzugefügt. Abermals wurden 3 µl des Produkts der LR-Rekombination in NEB®DH10-beta Bakterien transformiert. Mithilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kits

wurde die Plasmid-DNA aus in 5 ml LB-Amp-Medium gewachsenen Bakterienkulturen isoliert. Nach Messung der optischen Dichte der DNA wurde diese durch PCR amplifiziert und zur Verifizierung des Rekombinationserfolgs auf Agarosegel aufgetragen und sequenziert.

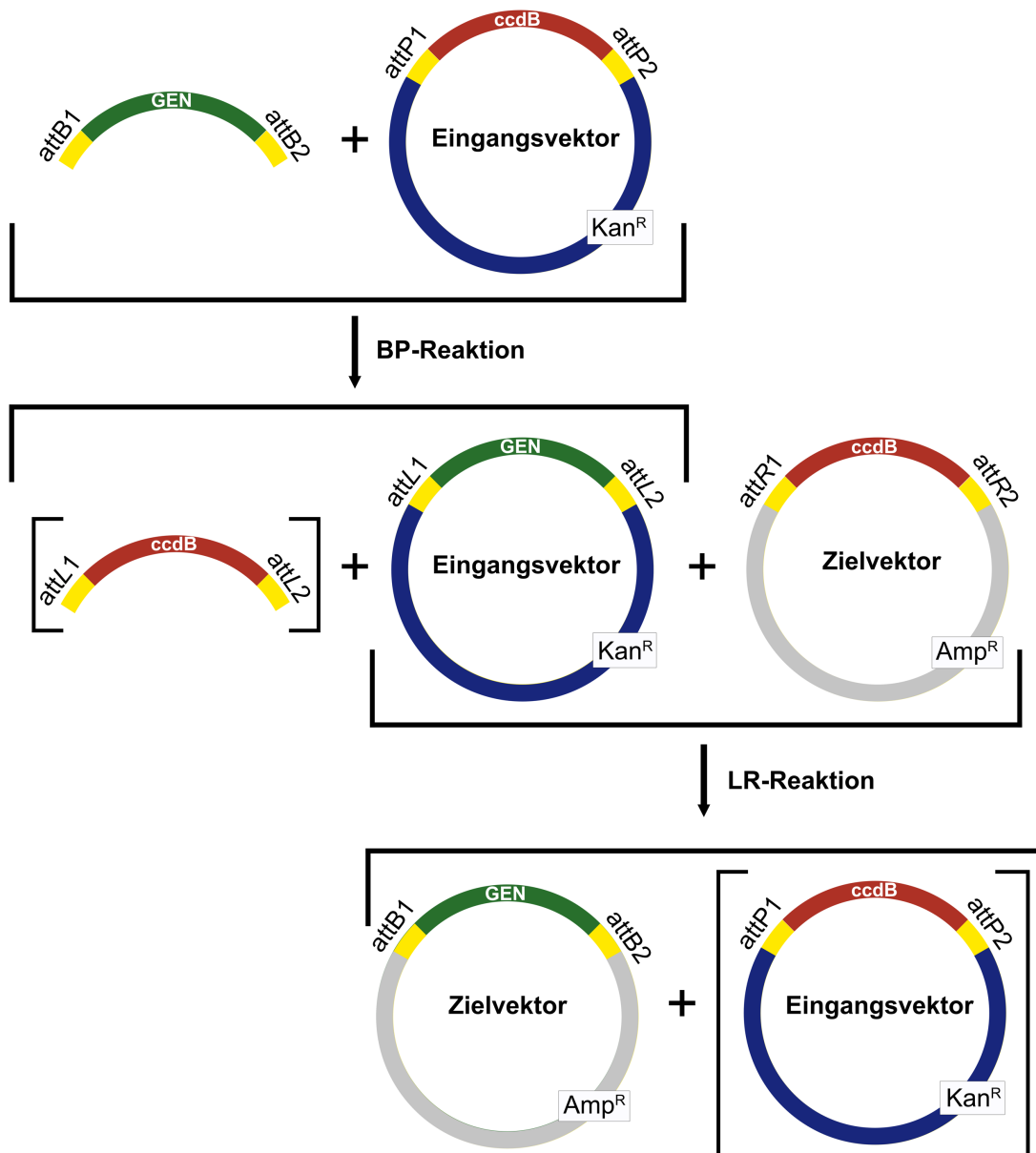


Abb. 3-2: Schematische Darstellung der Gateway®-Cloning-Technologie. In der BP-Reaktion wird durch Rekombination des mit attB-Sequenzen (gelb) ausgestatteten DNA-Fragments (dunkelgrün) und des mit attP-Sequenzen ausgestatteten Eingangsvektors (pDONR™221) das Fragment in den Eingangsvektor integriert. Als "Abfallprodukt" entsteht dabei die attR-flankierte ccdB-Kassette ohne Vektor. Aus der BP-Reaktion gehen attL-Sequenzen hervor, die wiederum bei der LR-Reaktion mit attR-Sequenzen rekombiniert werden, wonach das DNA-Fragment nun im Zielvektor (in dieser Arbeit pMX-DEST) vorliegt. Als "Abfallprodukt" der LR-Reaktion entsteht die attP-flankierte ccdB-Kassette im Eingangvektor. Bei jeder Reaktion wird das Fragment mit der ccdB-Kassette (dunkelrot) substituiert und das Nebenprodukt damit negativ selektioniert. Die positive Selektion erfolgt mithilfe der Kanamycin- und Ampicillinresistenzgene. Modifiziert nach Katzen *et al.*, 2007 ^[100].

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Zellkultur

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden, mit Ausnahme der Zellzählung und dem Mikroskopieren der Zellen, sämtliche zellbiologische Methoden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden alle verwendeten Zelllinien (Abschnitt 3.1.6.3) im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit gelagert.

Die adhärenente Zelllinien Ma-Mel-86a, -86b_ko^{CIITA}, 293T_Dko^{CIITA+B2M}, B78H1, B78H1-hTRP2 und 397-Mel wurde in 25 ml RPMI* in 175 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert und je nach Zellzahl in regelmäßigen Abständen passagiert. Nach Durchspülen mit 10 ml PBS wurden die adhärenenten Zellen mit 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,01 %) inkubiert. Nach 5-minütigem Trypsin-Verdau wurde die Reaktion durch Zugabe von RPMI* angehalten und die Zellen wurden bei 1500 rpm für 5 min bei Raumtemperatur (RT) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde, je nach gewünschter Zelldichte, in RPMI* resuspendiert, gezählt und entsprechend verdünnt. In einer 175 cm²-Zellkulturflasche wurden 1x10⁶ Melanomzellen bzw. 0,8 x10⁶ HEK 293T_Dko^{CIITA+B2M} ausgesät. B78H1-hTRP2-Zellen wurden mit G418 (1 mg/ml) selektioniert. Die Kultivierung erfolgte, wie oben beschrieben.

Die adhärenente Zelllinie Phoenix-Ampho (PA) wurde vier Tage vor der Transfektion aufgetaut und 1x10⁶ Zellen wurden in 15 ml DMEM* in 75 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert.

Die Suspensionszelllinie Jurkat 76 wurde zweimal pro Woche subkultiviert. Dabei wurden jeweils 0,5x10⁶ Zellen in 25 ml RPMI* in 175 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert.

3.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 30 µl einer Zellsuspension je nach Zelldichte im Verhältnis 1:2 -1:10 mit Trypanblau versetzt und in die Fuchs-Rosenthal-Zählkammer überführt. Trypanblau färbt geschädigte und tote Zellen an und ermöglicht somit die Zählung vitaler Zellen. Dabei wurden 4 Großquadrate ausgezählt und davon ein Mittelwert gebildet.

Um nun die Zellzahl zu berechnen, wurde folgende Formel angewendet:

$$\frac{\text{Anzahl der gezählten vitalen Zellen}}{\text{ausgezählte Großquadrate} \times \text{Kammertiefe (0,2 mm)}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

3.2.2.3 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Zelllinien können durch Kryokonservierung in Stickstofftanks lange gelagert werden. Dazu wird dem Einfriermedium 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugefügt, welches die Eiskristallbildung in Zellen vermindert. DMSO ist bei RT toxisch, sodass darauf geachtet wurde, alle nötigen Schritte im Einfrier- und Auftauprozess möglichst zügig durchzuführen. Zur Lagerung der Zellen wurden je 1 ml der Suspension in Kryoröhrchen überführt und diese, um ein möglichst zellschonendes Einfrieren zu gewähren, in Isopropanol-gefüllte Kryoboxen gelagert und dort schrittweise (ca. um 1 °C / min) auf -80 °C abgekühlt. Nach 24 Stunden bei -80 °C wurden die Zellen in die Stickstoffbank überführt. Zum Auftauen der Zellen wurden diese bei 37 °C im Wasserbad angetaut und mittels Zugabe von PBS und Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 min zweimal gewaschen. Nach der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen in Kultur genommen.

3.2.2.4 Isolierung humaner peripherer Blutlymphozyten aus *Buffy Coats*

Buffy Coats sind Nebenprodukte, die bei der Verarbeitung von Vollblutspenden entstehen und hauptsächlich aus Leukozyten und Thrombozyten zusammengesetzt sind. PBMCs wurden aus dem *Buffy Coat* durch Histopaque-gestützte Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Dazu wurde der *Buffy Coat* zunächst 1:2 mit PBS verdünnt und zur Zentrifugation auf 50 ml-Röhrchen, die jeweils 15 ml Histopaque enthielten, aufgeteilt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 2500 rpm ohne Bremse kamen die PBMC in einer weiß-trüben Interphase zwischen Plasma und Histopaqueschicht zu liegen. Diese Interphase wurde mit einer sterilen Pipette vorsichtig aufgenommen und zweimal mit PBS bei 1800 rpm für 10 min mit Bremse gewaschen. Die so gewonnenen PBMCs wurden nach Bestimmung der Zellzahl sowohl kryokonserviert als auch direkt zur retroviralen Transduktion verwendet.

3.2.2.5 Magnetische Zellseparation

Die MACS-Technologie (engl. *magnetic activated cell sorting*) wird zur Isolation gewünschter Zell-Subpopulationen angewendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden CD8⁺ und CD4⁺ Responderlymphozyten aus den mit verschiedenen TCR-Konstrukten transduzierten PBMCs am Tag 11 nach Transduktion isoliert. Dafür wurden die transduzierten PBMCs aufgeteilt und 15 µl anti-CD8 bzw. anti-CD4-MicroBeads pro 1 x 10⁷ PBMCs hinzugefügt.

Die Magnetische Zellseparation wurde nach dem MACS-Protokoll von Miltenyi Biotec mit einer Magnetsäule durchgeführt. Die Reinheit der separierten CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellpopulationen wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.2.2.6 Transfektion von Phoenix-Ampho-Zellen

Phoenix-Ampho (PA) -Zellen wurden zunächst mit Helferplasmiden (pHIT60 und pCOLT-GALV) und mit verschiedenen TCR- und Leervektorkonstrukten ko-transfiziert. pHIT60 enthielt die MLV (Murines Leukämievirus) -Gene *gag* und *pol*, die für bestimmte virale Enzyme (Integrase, Reverse Transkriptase) und Strukturproteine (Kapsid) kodieren. Das Helferplasmid pCOLT-GALV enthielt *env*, welches für Hüllproteine (Envelope) des Gibbonaffen-Leukämievirus (GALV) kodiert.

Am Morgen des Transfektionstags wurde zunächst das DMEM-Medium der PA-Zellen mit 8 ml frischem DMEM*-Medium erneuert und 4 Stunden später erfolgte der Transfektionsvorgang. Dafür wurde pro Ansatz 800 µl DMEM* mit 35 µl FUGENE® 6 versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden jeweils 5 µg der Helferplasmide (pHIT60 und pCOLT-GALV) und für jeden Ansatz 10 µg des zu transfizierenden Konstrukts hinzugegeben, vorsichtig vermischt und bei RT 20 min inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz unter vorsichtigem Schwenken gleichmäßig auf die PA-Zellen verteilt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumaustausch mit 8 ml huRPMI.

3.2.2.7 Retrovirale Transduktion humaner PBMC und Jurkat 76-Zellen

Zwei Tage nach der Transfektion der PA-Zellen wurde der virushaltige Überstand entnommen und für 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Mit OKT3 stimulierte PBMCs bzw. Jurkat 76-Zellen (Abschnitt 3.2.2.9) wurden bei 1800 rpm für 5 min zentrifugiert und in 0,5 ml des virushaltigen Überstands pro 1×10^6 PBMCs bzw. Jurkat 76-Zellen resuspendiert. Anschließend wurde 4 µg/ml Polybrene und zusätzlich 600 U/ml rIL-2 zu den PBMCs hinzugefügt. Polybrene erhöht die Transduktionseffizienz, indem es die Adsorption des Retrovirus an die Zellmembran der Zielzellen begünstigt ^[101]. Jeder Ansatz wurde im Anschluss mit 0,5 ml pro Well auf 24-Well-Multiwellplatten verteilt und diese zur Verdichtung von PBMCs bzw. Jurkat 76-Zellen und Retroviren ohne Bremse zentrifugiert (2000 rpm/ 32 °C/ 90 min) und nach Zentrifugation über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die transduzierten PBMCs wurden durch Zentrifugation pelletiert. Je $1-2 \times 10^6$ Zellen wurden dann in 2 ml frischem AIMV*-Medium mit 600 U/ml rIL-2 ausgesät.

Die transduzierten Jurkat 76-Zellen wurden pelletiert und in 5 ml frischem RPMI-Medium, einer Konzentration von 2×10^5 /ml entsprechend, in T25-Zellkulturflaschen weiterkultiviert. An Tag 1 nach erfolgter Transduktion wurden die PBMCs mit anti-CD3/CD28-MicroBeads in einem "beads-to-cell"-Verhältnis von 1:1 und an Tag 4 und 12 nach Transduktion mit bestrahlten Ma-Mel-86b_ko^{CIITA} stimuliert (Abschnitt 3.2.2.10).

3.2.2.8 Transiente Transfektion von HEK 293T_Dko^{CIITA+B2M} mit LipofectamineTM2000

HEK 293T_Dko^{CIITA+B2M} (Abschnitt 3.1.6.3), die in der vorliegenden Arbeit als Targetzellen für den ELISpot-Assay verwendet wurden, wurden mittels LipofectamineTM2000 mit hTRP2 im Vektor pcDNA 3.1 transient transfiziert. Die Transfektion erfolgte dabei direkt in der ELISpot-Platte. Dazu wurden jeweils 2×10^4 Zellen pro Testeinheit (TE) in 120 μ l RPMI^E ausgesät. In einer separaten 96-Well-Rundbodenplatte wurde je Well 0,25-0,5 μ l LipofectamineTM2000 in 21 μ l RPMI^Ø gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Dazu wurden je Well 300 ng hTRP2-kodierendes Plasmid in 12 μ l RPMI^Ø/TE hinzugefügt und für 20 min bei RT inkubiert. Nach Inkubation wurden 30 μ l der Suspension pro TE zu den HEK 293T_Dko^{CIITA+B2M} hinzugegeben, vermischt, und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde 100 μ l des Überstands verworfen und die Effektorzellen in 70 μ l RPMI* mit 250 U/ml rIL-2 dazugegeben.

3.2.2.9 Stimulation der PBMCs vor Transduktion

Zeitgleich zur Transfektion der PA-Zellen wurden die PBMCs mit 2×10^6 Zellen pro Well in einer 24-Well-Multiwellplatte in 2 ml AIMV* ausgesät. Darüber hinaus wurden OKT3 (30 ng/ml) und Interleukin-2 (rIL-2) (600 U/ml) hinzugegeben. OKT3 ist ein monoklonaler Antikörper, der an die ϵ -Untereinheit des CD3-Rezeptors bindet und eine kurzfristige Mitogenese induziert ^[102]. rIL-2 wird von aktivierten T-Zellen ausgeschüttet und steigert Wachstum und Persistenz von T-Zellen ^[103].

3.2.2.10 Stimulation der PBMCs nach Transduktion

Am Tag 1 nach Transduktion wurden die PBMCs mit anti-CD3/CD28-MicroBeads und an Tag 4 und 12 nach Transduktion mit bestrahlten Ma-Mel-86b_ko^{CIITA}-Zellen stimuliert. Zunächst wurden die transduzierten PBMCs gezählt und abzentrifugiert (1800 rpm, 5 min, RT). Bei der Stimulation mit MicroBeads wurden 1×10^6 PBMCs in 2

ml AIMV* pro Well resuspendiert. Dazu wurden 25 µl anti-CD3/CD28-MicroBeads (*beads-to-cell-ratio* 1:1) und 600 U/ml rIL-2 hinzugegeben. Zur Restimulation der transduzierten PBMCs mit bestrahlten Ma-Mel-86b_ko^{CIITA}-Zellen wurden 1x10⁶ PBMCs in 1 ml AIMV* pro Well resuspendiert. Dazu wurden jeweils 0,5x10⁶ bestrahlte Ma-Mel-86b_ko^{CIITA}-Zellen und 600 U/ml rIL-2 in 1 ml AIMV* gegeben.

3.2.2.11 ⁵¹Cr-Freisetzungstest

Der ⁵¹Cr-Freisetzungstest wird zur Analyse des lytischen Potentials von Effektorzellen, in der vorliegenden Arbeit T-Lymphozyten, gegenüber Targetzellen verwendet. Als Targetzellen wurden murine B78H1- oder B78H1-hTRP2 Zellen (Abschnitt 3.1.6.3) eingesetzt. Dazu wurden 0,5 x 10⁶ Targetzellen nach Abzentrifugieren 100 µl radioaktivem Natriumchromat (Na₂⁵¹CrO₄, abgekürzt ⁵¹Cr) (100 µCi, 3,7 MBq) hinzugefügt und für 1,5 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nicht gebundene Radionuklide wurden nach Inkubation durch dreimaliges Waschen mit RPMI* entfernt und mit 10 ml farblosen RPMI mit 10 % FCS auf 5x10⁴ Zellen/ml eingestellt.

Zunächst wurden 1000 Targetzellen in 100 µl pro TE in eine 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Die Effektorzellen wurden dann in gleichem Volumen in einem Effektor-zu-Target (E:T) -Verhältnis von 0,2 bis 60:1 hinzugefügt. Um die Spontan- und die Maximalfreisetzung von ⁵¹Cr zu ermitteln, wurden in jeweils 8-12 TEs der Platte 1000 Targetzellen in 100 µl farblosem RPMI mit 10 % FCS ausgesät. In einen Teil der TEs wurden zur Ermittlung der Maximalfreisetzung zusätzlich jeweils 100 µl farbloses RPMI mit 2 % Triton-X100 und 10 % FCS zugegeben. Nach 4 h Inkubation bei 37 °C und in einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ wurden die Platten für 9 min bei 1300 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Aus jeder TE wurden 80 µl Überstand aufgenommen, in Lumaplatten gegeben und über Nacht bei RT getrocknet. Die Messung und Auswertung der Platten erfolgte im γ-Plattenzähler. Die prozentuale spezifische Lyse wurde nach folgender Formel berechnet:

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

* Mittelwerte von Doppelwerten; ** Mittelwerte von Vier- bis Sechsfach-Werten

3.2.2.12 Durchflusszytometrie (FACS™)

Um die Expression transduzierter TCR in Jurkat 76 und PBMCs zu verifizieren, wurde die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie angewendet. Dabei werden die zu analysierenden Zellen mit Antikörpern, die an immunphänotypische Oberflächenmarker binden und an die ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, beladen. Um die simultane Expression verschiedener Oberflächenmarker zu erkennen, wurden mehrere Farbstoffe verwendet [Allophycocyanin (APC), Fluorescein-Isothiocyanate (FITC), Phycoerythrin (PE)].

Jeweils $0,2 \times 10^6$ Zellen wurden in Durchflusszytometrie-Röhrchen überführt und zweimal bei 1800 rpm für 5 min gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, die Zellpellets wurden mit den jeweiligen Antikörpern versetzt und dann im Dunkeln für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen jeweils mit 2 ml Durchflusszytometrie-Puffer gewaschen, bei 1800 rpm für 5 min abzentrifugiert und in 200 µl Fixierungslösung aufgenommen. Bis zur Messung wurden die Zellen bei 4 °C im Dunkeln verwahrt. Mithilfe des BD FACS Canto™ II und der dazugehörigen Software BD FACS Diva, wurde das durch Laserlicht induzierte, von Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht gemessen. Zudem konnten die Zellen durch Messung des Streulichts nach Größe und Granularität unterschieden werden. Die Rohdaten wurden mit der Software FlowJo 7.6.5 weiterverarbeitet und als "Dot Plot" dargestellt.

3.2.2.13 Interferon-γ-ELISpot-Assay

Der IFN-γ-ELISpot-Assay (engl. *enzyme-linked immunosorbent spot assay*) ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung antigenspezifischer T-Zellen auf Einzelzellebene und basiert auf der Freisetzung des Zytokins IFN-γ durch T-Lymphozyten bei Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen ^[104]. Für diesen Test wurden spezielle CELLSTAR® 96-Well-Flachboden-Platten verwendet. Die Böden ihrer TE bestehen aus einer Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF). Diese Membranen werden zunächst mit dem Primärantikörper beschichtet, dessen variable Domäne IFN-γ bindet. Nach Ablauf der Reaktion und dem Abwaschen der Testzellen wird ein biotinylierter Sekundärantikörper dazugegeben, dessen variable Domäne gegen ein anderes Epitop von IFN-γ gerichtet ist. Wird dann die Avidin-gekoppelte Peroxidase hinzugegeben, bindet diese an das Biotin und setzt das Substrat 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) zu einem Produkt mit rötlicher Farbe um, wodurch sich dann auf

der Platte an den Stellen Punkte (engl. *spots*) bilden, wo eine antigenspezifische T-Zelle lag.

Der ELISpot-Assay wurde in der vorliegenden Arbeit mit genau festgelegter Anzahl von Target- und Effektorzellen durchgeführt. Zunächst wurden die ELISpot-Platten mit 15 µl Ethanol (35 %) aktiviert und dreimalig mit 150 µl PBS gewaschen. Dann wurde jede Platte mit 0,5 µg des Primärantikörpers beschichtet und in 50 µl PBS über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Inkubation wurden nicht gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit 150 µl PBS entfernt. Um unspezifische Bindung durch IFN-γ auf der Membran zu verhindern, wurden die Platten für 30 min bei 37 °C mit RPMI* blockiert. Nun erfolgte die Transfektion von HEK 293T_Dko^{CIITA+B2M} (Abschnitt 3.2.2.8) mit humanem TRP2 durch Lipofectamine™2000. Nach 20 Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde eine festgelegte Anzahl an Effektorzellen (T-Lymphozyten, 4-6 Tage nach Restimulation) in jeweils 70 µl Medium hinzugefügt. Unbehandelte Targetzellen wurden je TE in einer Konzentration von 5 x 10⁴ Zellen in 50 µl mit 50 µl der festgelegten Anzahl an Effektorzellen ausplattiert. Nach 20-stündiger Koinkubation der Target- und Effektorzellen bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Platten entwickelt. Dafür wurden diese sechsmal mit ELISpot-Waschlösung gewaschen, in 60 µl PBS mit 2 µg/ml Sekundärantikörper hinzugefügt und für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Dann wurden die Platten erneut sechsmal gewaschen, 100 µl/TE eines Komplexes aus Avidin- und Biotin-gekoppelter Peroxidase (VECTASTAIN® Elite® ABC HRP Kits) in PBS mit 0,1 % Tween und für 1 h in Dunkelheit bei RT inkubiert. Um ungebundene Peroxidase zu entfernen, wurden die Platten zunächst jeweils dreimal mit ELISpot-Waschlösung und mit PBS gewaschen und für 10 min 100 µl Peroxidase-Substrat-Lsg. hinzugefügt. Die Reaktion wurde durch Spülen mit H₂O gestoppt und die Platten zum Trocknen gelagert. Die Anzahl der "Spots" wurde schließlich mithilfe des CTL-ImmunoSpot® S6 Micro Analyzer der CTL Europe GmbH (Bonn) semiautomatisch quantifiziert.

4 Ergebnisse

4.1 Generierung des scTCR_αTRP2-Konstrukts im Zielvektor pMX-DEST

Zum besseren Verständnis der einzelnen Schritte der Konstruktion des scTCR_αTRP2 in seinen Zielvektoren wurden in **Abb. 4-1** alle generierten Fragmente und verwendeten Primer schematisch mit ihrer Position im finalen scTCR_αTRP2-Konstrukt gekennzeichnet.

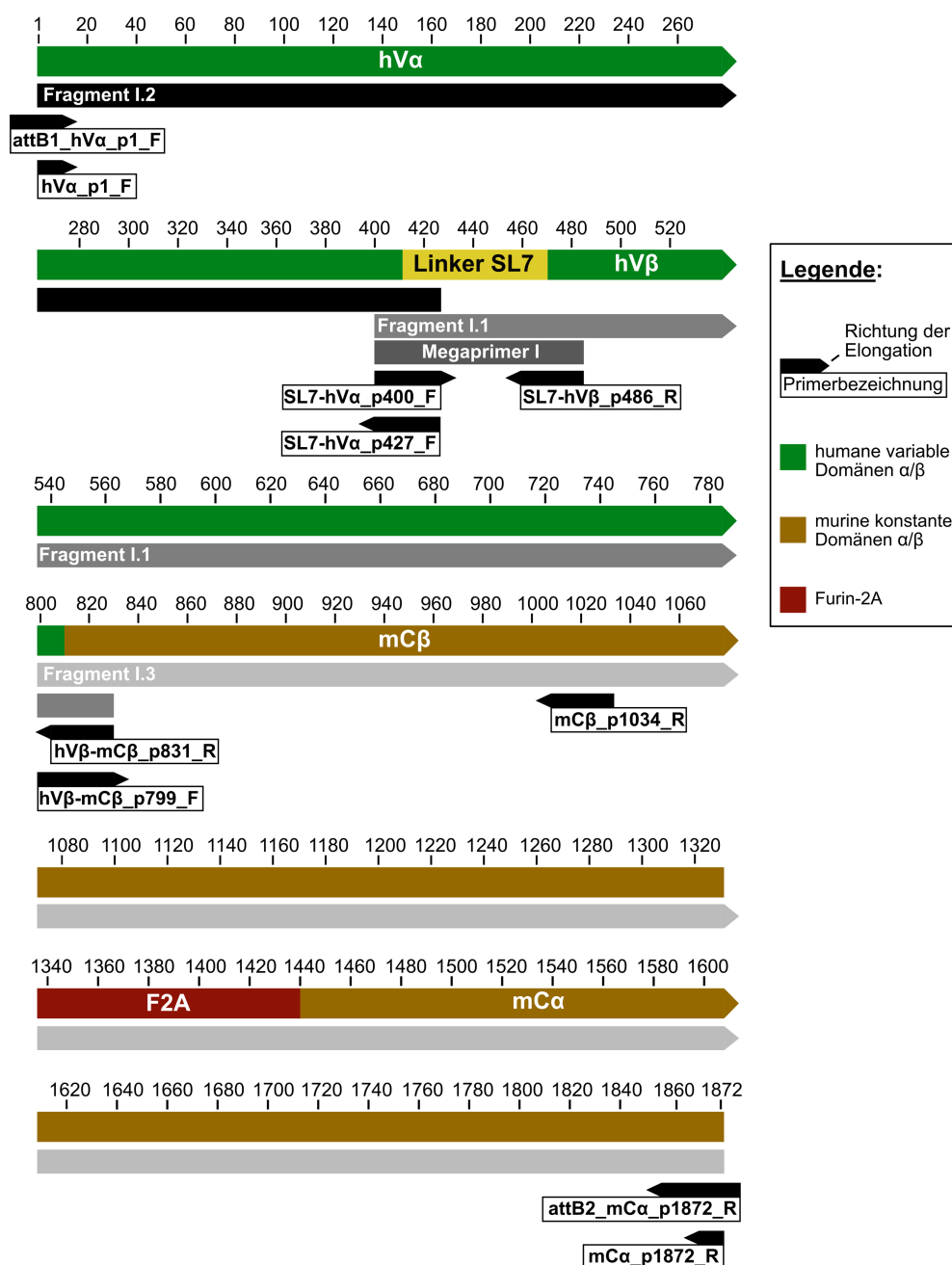


Abb. 4-1: Schematische Darstellung der Fragmente und Primer zur Herstellung des scTCR_αTRP2-Konstrukts. Dargestellt sind die verschiedenen konstruierten Fragmente I.1-I.3

(Grautöne), die mithilfe der ebenfalls dargestellten Primer amplifiziert wurden. att-: Rekombinationssequenz des Bakteriophagen λ ; F2A: Furin-2A-Sequenz; hV α / β : humane variable Domäne α / β des dcTCR_ α TRP2; mC α / β : murine konstante Domäne α / β von pGMP_93.

Schematisch ist in **Abb. 4-2** das auf der Zelloberfläche exprimierte Konstrukt scTCR_ α TRP2 dargestellt.

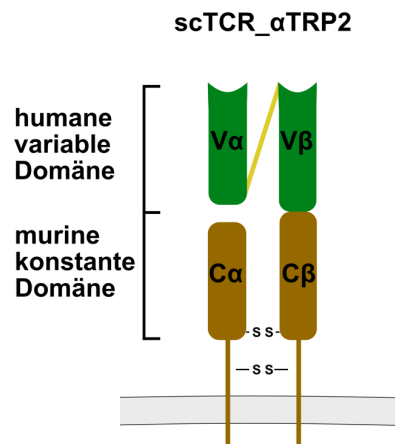


Abb. 4-2: Schematische Darstellung des auf der Zelloberfläche exprimierten Konstrukts scTCR_ α TRP2. V α / β : humane variable Domäne α / β des dcTCR_ α TRP2; C α / β : murine konstante Domäne α / β von pGMP_93.

Zur Generierung von pMX-DEST_scTCR_ α TRP2 wurde zunächst Megaprimer I und die Fragmente I.1-I.3 mittels PCR-Amplifikation konstruiert. Für die einzelnen Konstruktionen wurden eigens designte Primer verwendet (Abschnitt 3.1.5.4.3), die nach ihrer Startposition im scTCR_ α TRP2-Konstrukt benannt wurden und entsprechend die Grenzregionen der Fragmente markierten (Abb. 4-1). Um die Fragmente mittels SOE-PCR (Abschnitt 3.2.1.2.3) zu verknüpfen, wurden die Primer so gewählt, dass zwischen den einzelnen Fragmenten I.1 bis I.3 überlappende Sequenzen entstanden. Als DNA-Polymerase wurde die Q5[®] *High Fidelity* DNA-Polymerase verwendet.

Zunächst wurde Megaprimer I hergestellt, der den Linker SL7 enthielt, welcher die humane variable Domäne α und β des scTCR aneinanderband. Weiterhin wurde Fragment I.1 hergestellt, welches der humanen variablen Domäne β (hV β) des scTCR entsprach. Da Fragment I.2 und I.3 Anfang und Ende des finalen Konstrukts scTCR_ α TRP2 (als Fragment I.5 bezeichnet) determinierten, wurden dort zusätzlich attB-Rekombinationssequenzen angehängt, um die Gateway[®]-Klonierung zu ermöglichen. Fragment I.2 enthielt die humane variable Domäne α (hV α) und Fragment I.3 die über ein F2A-Element (Furin-2A) verbundenen murinen konstanten

Domänen α (mC α) und β (mC β) des scTCR. Um nun Fragment 1.5 und damit das finale Konstrukt scTCR_ α TRP2 herzustellen, wurden die Fragmente I.1 bis I.3 mittels SOE-PCR miteinander verbunden. Zunächst wurde dazu Fragment I.4 aus Fragment I.1 und I.2 mittels SOE-PCR hergestellt. Durch die Verbindung von Fragment I.3 und I.4 durch SOE-PCR wurde dann Fragment I.5 hergestellt.

Um das scTCR_ α TRP2-Konstrukt in den Zielvektor pMX-DEST (Abb. 8-6) zu klonieren, wurde Fragment I.5 anschließend mithilfe der Gateway[®]-Cloning-Technologie (Abschnitt 3.2.1.12) zunächst in den Vektor pDONR[™]221 (Abb. 8-4) und anschließend in den Vektor pMX-DEST rekombiniert. Die folgenden Unterkapitel beschreiben die Konstruktion der einzelnen Fragmente und die Integration des finalen Konstrukts in die Zielvektoren.

4.1.1 Amplifikation des Linker SL7

pGMP_93 (Abb. 8-5) ist ein gegen das Tumorsuppressorprotein p53 gerichteter HLA-restringierter scTCR (bereits im Labor verfügbar), dessen variable Domänen α und β über den Linker SL7 verbunden sind. Dieser Linker wurde mithilfe der Primer SL7-hV α _p400_F und SL7-hV β _p486_R und dem Template pGMP_93 (10 ng) mittels PCR amplifiziert (Abschnitt 3.1.5.4.3). Die Primer wurden so gewählt, dass flankierende überlappende Sequenzen mit den variablen Domänen α und β des dTCR_ α TRP2 entstanden. dTCR_ α TRP2 ist der TCR des Klons CTL2C/417, aus dem die variablen Domänen für das finale Konstrukt scTCR_ α TRP2 bezogen wurden. Dabei band der Primer SL7-hV β _p486_R an die Region nach der Signalsequenz der variablen β -Kette des dTCR_ α TRP2. Das Amplifikat wurde als Megaprimer I bezeichnet (Abb. 4-1). Die Amplifikation fand unter folgenden Reaktionsbedingungen statt: 1 Zyklus (3' 98 °C) - 35 Zyklen (10" 98 °C, 30" 62.6 °C, 45" 72 °C) - 1 Zyklus (5' 72 °C). Nach erfolgter Amplifikation wurde das Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen (**Abb. 4-3**).

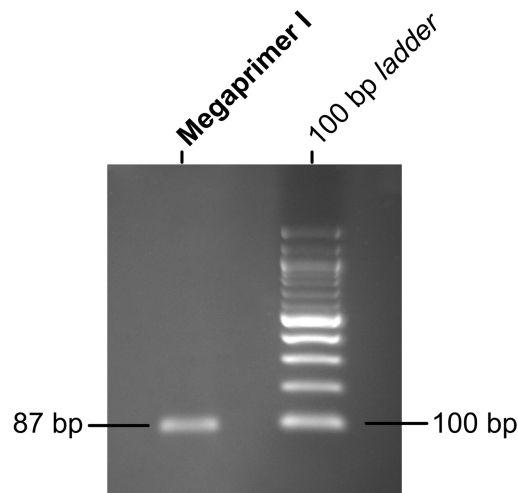


Abb. 4-3: Überprüfung der Fragmentgröße des Megaprimer I auf ein Agarosegel. Megaprimer I wurde mittels Standard-PCR unter Verwendung der Primer SL7-hV α _p400_F und SL7-hV β _p486_R und des Templates pGMP_93 generiert.

4.1.2 Konstruktion von Fragment I.1

Die gesamte variable β -Domäne, ohne Signalsequenz, des dTCR_ α TRP2 wurde mithilfe des Megaprimer I (Abschnitt 4.1.1), des Primers hV β -mC β _p831_R und des Templates *pcDNA3.1_ α TRP2_TRBV28* β 1_hTRPD1*01_hTRBJ1-5*01_hTRBC1*01* (Abschnitt 3.1.5.4.3) vom Klon CTL2C/417 mittels PCR amplifiziert. Der Primer hV β -mC β _p831_R wurde so gewählt, dass eine 3'-flankierende überlappende Sequenz mit der murinen konstanten Domäne β entstand. Das Amplifikat wurde als Fragment I.1 bezeichnet (Abb. 4-1). Die Amplifikation fand unter folgenden Reaktionsbedingungen statt: 1 Zyklus (5' 98 °C) - 3 Zyklen (10" 98 °C, 30" 42 °C, 1' 72 °C) - 30 Zyklen (10" 98 °C, 30" 70 °C, 1' 72 °C) - 1 Zyklus (5' 72 °C). Nach erfolgter Amplifikation wurde das Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen. Die DNA-Bande wurde daraufhin extrahiert und mit 10 μ l d. H₂O eluiert. Da für die folgende Konstruktion von Fragment I.2 zu wenig Produkt gewonnen wurde, wurde die extrahierte DNA für 20 Zyklen und unter sonst gleichen Bedingungen reamplifiziert und das Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen (**Abb. 4-4**). Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung verifiziert.

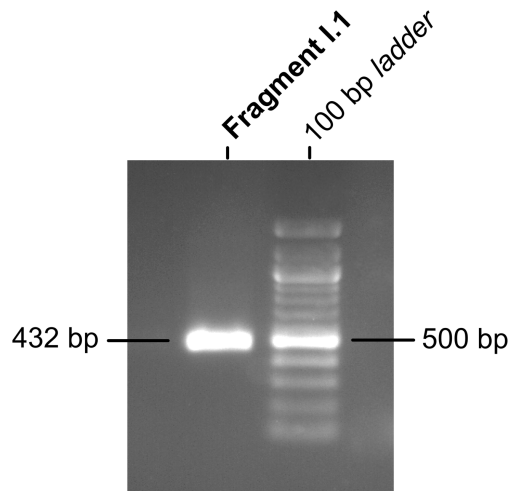


Abb. 4-4: Überprüfung der Größe von Fragment I.1 auf ein Agarosegel. Mittels Standard-PCR wurde Fragment I.1 mithilfe des Megaprimer I, des Primers hV β -mC β _p831_R und des Templates *pcDNA3.1- α TRP2_TRBV28* β 1_hTRPD1*01_hTRBJ1-5*01_hTRBC1*01* (vom Klon CTL2C/417) generiert. Fragment I.1 entsprach der erwarteten Fragmentgröße (Abb. 4-1).

4.1.3 Konstruktion von Fragment I.2

Die gesamte variable α -Domäne, inklusive Signalsequenz, des dTCR_ α TRP2 wurde mithilfe der Primer attB1_hV α _p1_F und SL7-hV α _p427_R und des Templates *pcDNA3.1-hTRAV3*01_TRAJ10*01_TRAC*01* (Abschnitt 3.1.5.4.3) vom Klon CTL2C/417 mittels PCR amplifiziert. Der Primer attB1_hV α _p1_F band an die Signalsequenz der variablen α -Kette und addierte eine attB1-Rekombinationssequenz an das 5'-Ende des PCR-Produkts. Der Primer SL7-hV α _p427_R wurde so gewählt, dass eine 3'-flankierende überlappende Sequenz mit dem Linker SL7 entstand. Das Amplifikat wurde als Fragment I.2 bezeichnet (Abb. 4-1). Die Amplifikation fand unter folgenden Reaktionsbedingungen statt: 1 Zyklus (5' 98 °C) - 3 Zyklen (10" 98 °C, 30" 63 °C, 1' 72 °C) - 30 Zyklen (10" 98 °C, 1' 72 °C) - 1 Zyklus (5' 72 °C).

Nach erfolgter Amplifikation wurde das Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen (**Abb. 4-5**), aus dem Gel extrahiert und, um mehr Produkt zu erhalten, unter gleichen Bedingungen für 20 Zyklen reamplifiziert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung verifiziert.

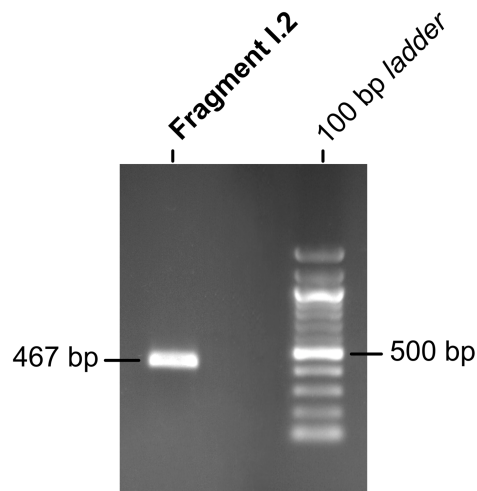


Abb. 4-5: Überprüfung der Größe von Fragment I.2 auf ein Agarosegel. Mittels Standard-PCR wurde Fragment I.2 unter Verwendung der Primer attB1_hV α _p1_F und SL7-hV α _p427_R und des Templates *pcDNA3.1-hTRAV3*01_TRAJ10*01_TRAC*01* (von Klon CTL2C/417) generiert. Fragment I.2 entsprach der erwarteten Fragmentgröße [inklusive attB1-Rekombinationssequenz (40 bp)] (Abb. 4-1).

4.1.4 Konstruktion von Fragment I.3

Die murinen konstanten Domänen der α - und β -TCR-Kette des dTCR_ α TRP2 wurden mithilfe der Primer attB2_mC α _p1872_R und hV β -mC β _p799_F (Abschnitt 3.1.5.4.3) amplifiziert. Als Template wurde das scTCR-Konstrukt pGMP_93 (Abb. 8-5) verwendet, in dem die murinen konstanten Regionen α und β über ein "self-cleaving" F2A-Element in der Reihenfolge mC β -F2A-mC α verbunden waren. Mit dem Primer attB2_mC α _p1872_R wurde eine attB2-Rekombinationssequenz an das 3'-Ende des PCR-Produkts addiert. Mit dem Primer hV β -mC β _p799_F wurde ein flankierender überlappender Sequenzabschnitt addiert, der spezifisch an das 3'-Ende der humanen variablen Region β des dTCR_ α TRP2 band. Das Amplifikat wurde als Fragment I.3 bezeichnet (Abb. 4-1). Die Amplifikation fand unter folgenden Reaktionsbedingungen statt: 1 Zyklus (5' 98 °C) - 3 Zyklen (10" 98 °C, 30" 66 °C, 2' 72 °C) - 30 Zyklen (10" 98 °C, 2' 72 °C) - 1 Zyklus (5' 72 °C).

Nach erfolgter Amplifikation wurde das Produkt auf ein Agarosegel (**Abb. 4-6**) aufgetragen, aus dem Gel extrahiert und für 20 Zyklen reamplifiziert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung verifiziert.

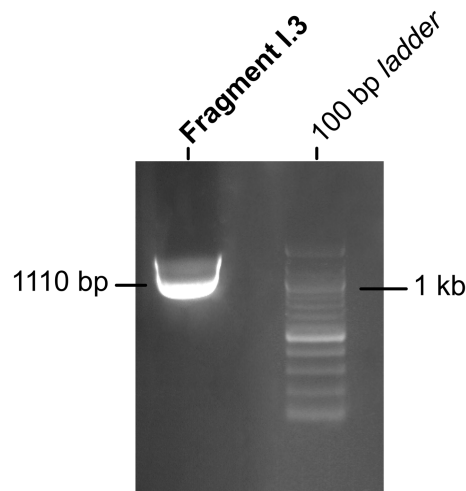


Abb. 4-6: Überprüfung der Größe von Fragment I.3 auf ein Agarosegel. Mittels Standard-PCR wurde Fragment I.3 unter Verwendung der Primer attB2_mC α _p1872_R und hV β -mC β _p799_F und des Templates pGMP_93 generiert. Fragment I.3 entsprach der erwarteten Fragmentgröße [inklusive attB2-Rekombinationssequenz (36 bp)] (Abb. 4-1).

4.1.5 Konstruktion von Fragment I.4

Fragment I.4 wurde mittels SOE-PCR (Abschnitt 3.2.1.2.3) durch Verbindung der Fragmente I.1 und I.2 hergestellt (Abb. 4-1). Da die Fragmente (Fragment I.1 und I.2) zur Generierung von Fragment I.4 bereits mit überlappenden Sequenzen ausgestattet wurden, musste der erste Schritt der SOE-PCR hier nicht mehr durchgeführt werden. Im zweiten Schritt der SOE-PCR wurden als Templates Fragment I.1 und I.2 eingesetzt. Die DNA-Stränge wurden bei 98 °C getrennt und hybridisierten an den überlappenden hV α -SL7-Sequenzabschnitten. Anschließend kam es zur Extension beider DNA-Stränge. Die Reaktion fand unter folgenden Reaktionsbedingungen statt: 1 Zyklus (5' 98 °C) - 15 Zyklen (10" 98 °C, 30" 60 °C, 45" 72 °C) - 1 Zyklus (5' 72 °C). Die Hybridisierung und Extension der DNA-Stränge entspricht dabei dem zweiten Schritt der SOE-PCR. Im dritten Schritt der SOE-PCR wurden die aus dem zweiten Schritt entstandenen DNA-Stränge mit den Primern attB1_hV α _p1_F und hV β -mC β _p831_R (Abschnitt 3.1.5.4.3) amplifiziert. Die Reaktion fand unter folgenden Bedingungen statt: 20 Zyklen (10" 98 °C, 1' 30" 72 °C) - 1 Zyklus (3' 72 °C). Nach erfolgter Amplifikation wurde das Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen (**Abb. 4-7**), aus dem Gel extrahiert und, um mehr Produkt zu erhalten, unter gleichen Bedingungen für 20 Zyklen reamplifiziert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung verifiziert.

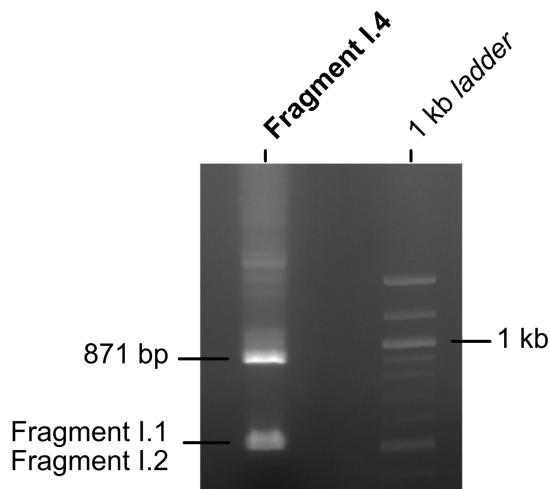


Abb. 4-7: Überprüfung der Größe von Fragment I.4 auf ein Agarosegel. Mittels SOE-PCR wurde Fragment I.4 mithilfe der Templates Fragment I.1 und I.2 (für Schritt 2 der SOE-PCR) und der Primer attB1_hV α _p1_F und hV β -mC β _p831_R (für Schritt 3 der SOE-PCR) generiert. Bei etwa 430 bp sind die nicht hybridisierten Fragmente I.1 und I.2 als Banden sichtbar. Fragment I.4 entspricht der erwarteten Fragmentgröße [inklusive attB1-Rekombinationssequenz (40 bp)] (Abb. 4-1).

4.1.6 Konstruktion von Fragment I.5

Fragment 1.5 und damit das gesamte scTCR_ α TRP2-Konstrukt, mit den Sequenzabschnitten attB1-hV α -SL7-hV β -mC β -F2A-mC α -attB2, wurde mittels SOE-PCR durch Verbindung der Fragmente I.3 und I.4 hergestellt (Abb. 4-1). Auch hier waren die als Templates verwendeten Fragmente (Fragmente I.3 und I.4) zur Generierung von Fragment I.5 bereits mit überlappenden Sequenzen ausgestattet, sodass der erste Schritt der SOE-PCR nicht mehr durchgeführt werden musste. Im zweiten Schritt der SOE-PCR, bei dem als Templates Fragment I.3 und Fragment I.4 eingesetzt wurden, hybridisierten beide DNA-Stränge am Übergang der hV β -mC β -Sequenzabschnitte. Die Hybridisierung und Extension fand unter folgenden Reaktionsbedingungen statt: 1 Zyklus (5' 98 °C) - 15 Zyklen (10" 98 °C, 30" 60 °C, 1' 72 °C) - 1 Zyklus (3' 72 °C). Fragment I.5 wurde im dritten Schritt der SOE-PCR mithilfe der Primer attB1_hV α _p1_F und attB2_mC α _p1872_R (Abschnitt 3.1.5.4.3) hergestellt. Die Reaktion fand unter folgenden Bedingungen statt: 20 Zyklen (10" 98 °C, 1' 30" 72 °C) - 1 Zyklus (3' 72 °C). Nach erfolgter SOE-PCR wurde das Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen (**Abb. 4-8**), aus dem Gel extrahiert und für 20 Zyklen reamplifiziert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung verifiziert.

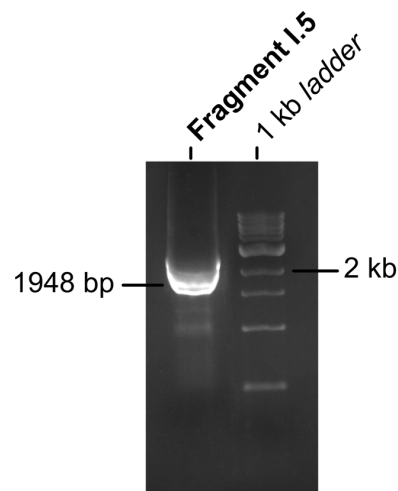


Abb. 4-8: Überprüfung der Größe von Fragment I.5 auf ein Agarosegel. Mittels SOE-PCR wurde Fragment I.5 mithilfe der Templates Fragment I.3 und I.4 (für Schritt 2 der SOE-PCR) und der Primer attB1_hV α _p1_F und attB2_mC α _p1872_R (für Schritt 3 der SOE-PCR) generiert. Das Fragment I.5 entsprach dabei der erwarteten Fragmentgröße [inklusive attB1- und attB2-Rekombinationssequenz (40 bp und 36 bp)] (Abb. 4-1).

4.1.7 Klonierung von Fragment I.5 in den Zielvektor pMX-DEST

Zur Klonierung von Fragment I.5 in den Zielvektor pMX-DEST wurde die Gateway[®]-Cloning-Technologie eingesetzt. Dazu wurde sowohl die BP- als auch die LR-Rekombination nach Anleitung durchgeführt.

In der BP-Reaktion wurde das von attB1/B2-flankierte Fragment I.5 in den Vektor pDONR[™]221 (Abb. 8-4) rekombiniert. Das Produkt der BP-Rekombination wurde in NEB[®]DH10-beta Bakterien transformiert. Nach Wachstum der Bakterienkolonien auf Kanamycin-Agarplatten wurden 12 Kolonien gepickt und, um den Erfolg der BP-Rekombination zu verifizieren, eine O-PCR (Abschnitt 3.2.1.2.2) unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: 1 Zyklus (5' 98 °C) - 30 Zyklen (10" 98 °C, 30" 62 °C, 2' 72 °C) - 1 Zyklus (5' 72 °C). Als Primer wurden attB1_hV α _p1_F und attB2_mC α _p1872_R eingesetzt. Das Produkt der O-PCR wurde auf ein Agarosegel aufgetragen (**Abb. 4-9: A**). Die obere Bande entsprach der Größe von Fragment I.5, wie auch in Abb. 4-8 zu sehen ist. Die PCR-Produkte der Bakterienkolonien 2 und 3 wurden aus dem Gel extrahiert und mithilfe der Primer M13_F und mC α _p1872_R sequenziert, wobei der BP-Rekombinationserfolg von Klon 2 (pDONR[™]221_scTCR_ α TRP2-Klon 2) durch Sequenzierung verifiziert wurde. Klon 3 wies keine Übereinstimmung mit der Sequenz von Fragment I.5 auf.

Das Fragment I.5-Insert von pDONR[™]221_scTCR_ α TRP2-Klon 2 wurde mittels einer LR-Reaktion in den Vektor pMX-DEST (Abb. 8-6) kloniert. pMX-DEST_scTCR_ α TRP2

wurde wiederum in NEB®DH10-beta Bakterien transformiert und Plasmid-DNA aus zwei der auf Ampicillin-Agarplatten gewachsenen Bakterienkolonien gewonnen. Zur Verifizierung des LR-Rekombinationserfolgs wurde die Plasmid-DNA mittels PCR amplifiziert und auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 4-9: B). Für die PCR wurden die Primer Se206_F und mCα_p1872_R und folgende Reaktionsbedingungen eingesetzt: (5' 98 °C) - 30 Zyklen (10" 98 °C, 30" 62 °C, 2' 72 °C) - 1 Zyklus (5' 72 °C). Zur Verifizierung der Sequenz der Fragmente wurde Klon 1 mit internen Primern sequenziert. Um mehr DNA für die später erfolgte Transduktion zu gewinnen, wurde von Klon 1 eine 100 ml LB-Ampicillin-Kultur angesetzt und mittels Maxi-Prep Plasmid-DNA gewonnen.

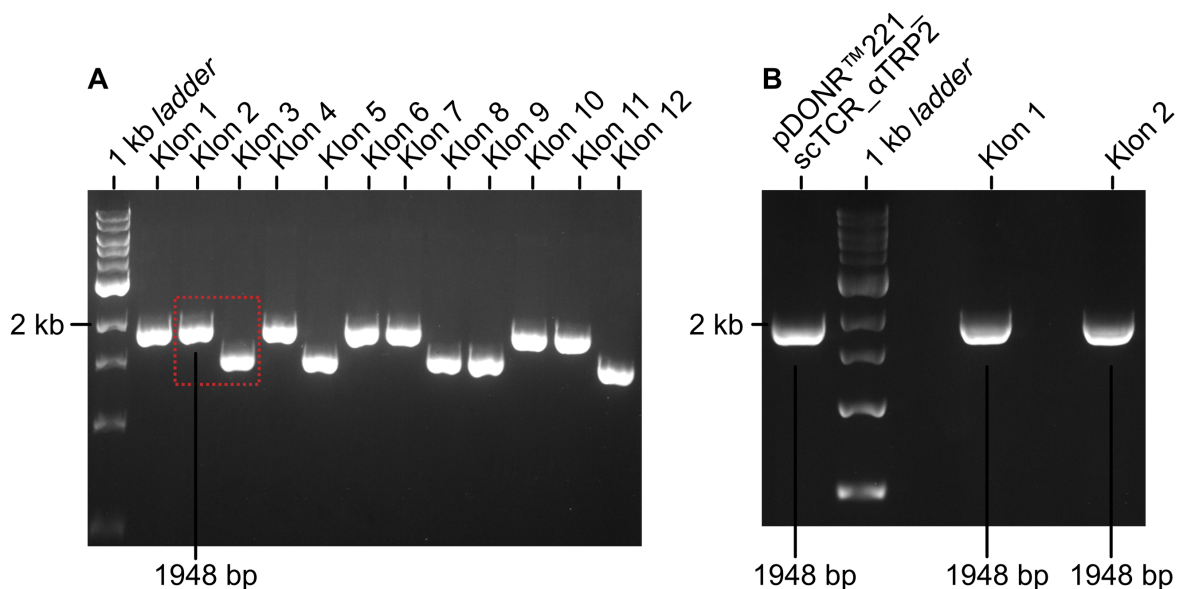


Abb. 4-9: Überprüfung des Rekombinationserfolgs von Fragment I.5 in den Vektor pDONR™221 (A) und in den Vektor pMX-DEST (B). Mithilfe der Gateway®-Cloning-Technologie wurde zunächst in der BP-Reaktion Fragment I.5 in den Vektor pDONR™221 kloniert. Der Erfolg der Klonierung wurde mittels O-PCR (A) unter Verwendung der Primer hVα_p1_F und mCα_p1872_R verifiziert. Klon 2 wurde zusammen mit Klon 3 (Bande nicht definierbar) sequenziert und zeigte das richtig orientierte und vollständige Fragment I.5. In der LR-Reaktion wurde Fragment I.5 im pDONR™221_scTCR_αTRP2-Klon 2 in den Vektor pMX-DEST rekombiniert. (B) Klon 1 und 2 zeigten die erwartete Größe. Als Positivkontrolle wurde das gewonnene Produkt pDONR™221_scTCR_αTRP2 aus der BP-Reaktion verwendet.

4.2 Expression des scTCR_αTRP2 in Jurkat 76-CD8^{hi} und humanen PBMCs

4.2.1 Expression des scTCR_αTRP2 in Jurkat 76-CD8^{hi}

Um zu überprüfen, ob der scTCR auf der Zelloberfläche exprimiert wird, wurden Jurkat 76-CD8^{hi} transduziert und mittels Durchflusszytometrie auf die Expression des scTCR getestet. Jurkat 76-CD8^{hi} exprimieren keine endogenen TCR-Ketten. Sie sind daher gut für die Transduktion mit exogenen TCR-Konstrukten geeignet. Zur Durchführung der Durchflusszytometrie wurden Jurkat 76-CD8^{hi} mit Farbstoff-gekoppelten gegen CD8 und α/β C gerichteten Antikörpern gefärbt, da die murinen konstanten Regionen α und β des dcTCR- α TRP2 in dem scTCR_ α TRP2 enthalten sind.

Zunächst wurden Phoenix-Ampho-Zellen mit dem Konstrukt pMX-DEST_scTCR_αTRP2 und den Helferplasmiden (Abschnitt 8.3.3) transfiziert. Als Positivkontrolle für dieses Experiment wurde das Konstrukt pMX-DEST_dcTCR_αTRP2 mit den Helferplasmiden transfiziert. Aus den verschiedenen Ansätze wurden retrovirale Überstände gewonnen, die zur Transduktion der Jurkat 76-CD8^{hi} verwendet wurden. Mittels Durchflusszytometrie wurde am Tag 6 nach Transduktion die Expression des dcTCR_αTRP2 und scTCR_αTRP2 in Jurkat 76-CD8^{hi} unter Verwendung der Antikörper CD8-PE, CD3-PE und α/β C-TCR-FITC ermittelt (**Abb. 4-10**). Die numerischen Ergebnisse der Durchflusszytometrie sind **Tab. 4-1** zu entnehmen. Mit pMX-DEST_scTCR_αTRP2 transduzierte Jurkat 76-CD8^{hi} exprimierten den scTCR. Als Negativkontrolle wurden nicht-transduzierte Jurkat 76-CD8^{hi} verwendet, die an Tag 6 nach Transduktion 0,05 % Vβ3-Expression aufwiesen.

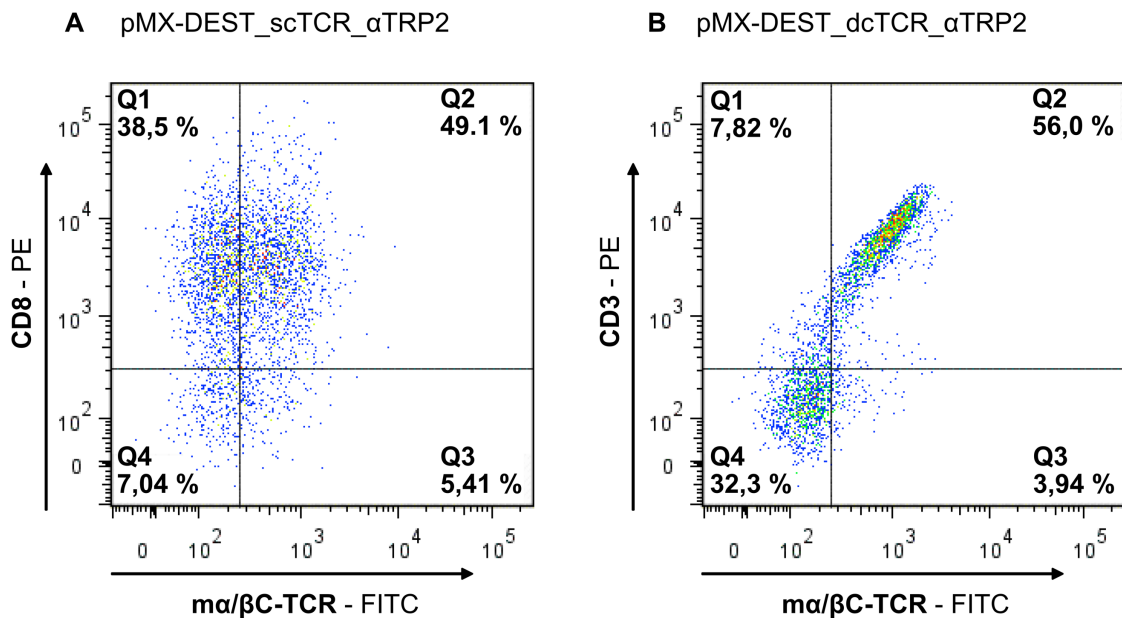


Abb. 4-10: scTCR_αTRP2- und dcTCR_αTRP2- Expression retroviral transduzierter Jurkat 76-CD8^{hi} (Tag 6 nach Transduktion). Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurde die ma/βC-TCR- und damit die scTCR_αTRP2-Expression von pMX-DEST_scTCR_αTRP2-transgenen Jurkat 76-CD8^{hi} (A) und als Positivkontrolle die dcTCR_αTRP2-Expression von pMX-DEST_dcTCR_αTRP2-transgenen Jurkat 76-CD8^{hi} (B) ermittelt.

Konstrukt	ma/βC-TCR-Expression (in %)
scTCR	54,51 %
dcTCR	59,94 %

Tab. 4-1: Durchflusszytometrisch ermittelte ma/βC-TCR-Expression (in %), der mit den Konstrukten scTCR und dcTCR transduzierten Jurkat 76-CD8^{hi} (Tag 6 nach Transduktion; Auswertung der Daten in Abb. 4-10)

4.2.2 Expression des scTCR_αTRP2 in PBMCs

Um die Expression des scTCR_αTRP2 in PBMCs und im Weiteren dessen Funktionalität zu testen, wurde er retroviral in PBMCs transduziert. Die Transduktionseffizienz wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zum Vergleich wurde mit dem dcTCR_αTRP2 analog verfahren. Die Funktionalität des scTCR wurde später im Interferon-γ-ELISpot-Assay und ⁵¹Cr-Freisetzungstest ermittelt.

Aus zwei gesunden Spendern wurden PBMCs isoliert und mit OKT3 (30 ng/ml) und rIL-2 (600 U/ml) zwei Tage vor der Transduktion stimuliert. Wie auch schon für die Transduktion der Jurkat 76-CD8^{hi} wurden zunächst Phoenix-Ampho-Zellen mit dem Konstrukt pMX-DEST_scTCR_αTRP2 und als Positivkontrolle mit pMX-DEST_dcTCR_αTRP2 transfiziert. Die vorstimulierten PBMCs wurden retroviral transduziert und einen Tag später mit CD3/CD28-Microbeads in einem "beads-to-cell"-

Verhältnis von 1:1 und rIL-2 (600 U/ml) unspezifisch stimuliert. An Tag 4 nach Transduktion und ab dann einmal wöchentlich wurden die Responderlymphozyten mit Ma-Mel-86b_ko^{CIITA}CD80-83^{hi} (Abschnitt 3.1.6.3) und rIL-2 (600 U/ml) spezifisch restimuliert. Die Expression der Konstrukte scTCR_αTRP2 und dcTCR_αTRP2 in PBMCs wurde unter Verwendung der Antikörper CD4-FITC, mα/βC-TCR-PE und Vβ3-FITC durchflusszytometrisch ermittelt (**Abb. 4-11**). In **Tab. 4-2** sind die durchflusszytometrischen Ergebnisse der mit den Konstrukten pMX-DEST_scTCR_αTRP2 und pMX-DEST_dcTCR_αTRP2 transduzierten PBMCs numerisch dargestellt. Die als Negativkontrolle verwendeten nicht-transduzierten PBMCs wiesen an Tag 1 und 11 nach Transduktion eine Vβ3-Expression zwischen 1,4-1,7 % auf. Mit pMX-DEST_dcTCR_αTRP2 transduzierte PBMCs wiesen an allen gemessenen Tagen nach Transduktion eine annähernd doppelt so hohe Expression ihres Konstrukts auf als mit pMX-DEST_scTCR_αTRP2 transduzierte PBMCs.

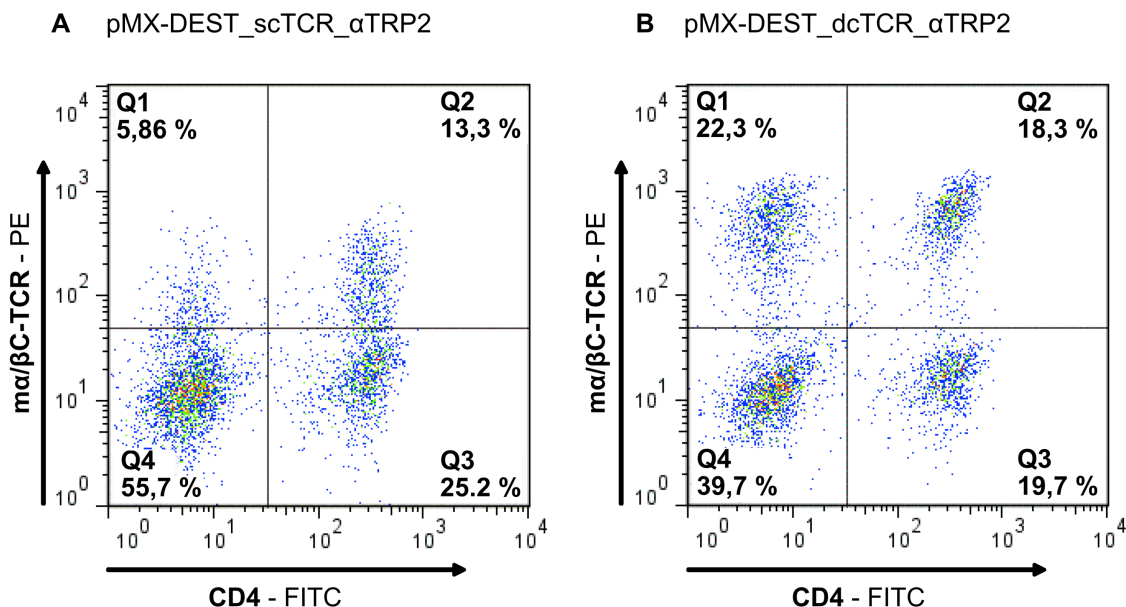


Abb. 4-11: scTCR_αTRP2- und dcTCR_αTRP2-Expression retroviral transduzierter PBMCs (Tag 4-6 nach Transduktion). Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurde die mα/βC-TCR- und damit die scTCR_αTRP2-Expression von pMX-DEST_scTCR_αTRP2-transgenen PBMCs (**A**) und im Vergleich die dcTCR_αTRP2-Expression von pMX-DEST_dcTCR_αTRP2-transgenen PBMCs (**B**) ermittelt (s. auch Tab. 4-2).

Konstrukt	Tag nach Transduktion	im Vektor pMX-DEST α/β C-TCR-Expression (in %)
scTCR	1.	3,2 %
	4.-6.	19,16 %
	11.-12.	24,3 %
dcTCR	1.	6,82 %
	4.-6.	40,6 %
	11.-12.	48,9 %

Tab. 4-2: Durchflusszytometrisch ermittelte α/β C-TCR-Expression (in %) der mit den scTCR- und dcTCR-Konstrukten transduzierten PBMCs.

4.3 Nachweis der Funktionalität des scTCR_ α TRP2

Die Funktionalität des scTCR_ α TRP2 wurde mittels eines Interferon- γ -ELISpot-Assays und eines ^{51}Cr -Freisetzungstests überprüft. Da Jurkat 76-CD8^{hi}-Zellen kein IFN- γ freisetzen und sich somit von vorneherein nicht für einen Einsatz im Interferon- γ -ELISpot-Assay eignen, wurden für beide Testsysteme scTCR_ α TRP2-transgene PBMCs als Effektoren eingesetzt.

4.3.1 MHC-unabhängige Erkennung von hTRP2 durch scTCR_ α TRP2-transgene PBMCs

Um die MHC-unabhängige Erkennung von humanem TRP2 durch den scTCR_ α TRP2 zu überprüfen, wurde an Tag 11 nach Transduktion ein IFN- γ -ELISpot-Assay durchgeführt. Als Effektorzellen wurden pro TE 3×10^4 mit pMX-DEST_scTCR_ α TRP2 transduzierte PBMCs (24,3 % α/β C-TCR⁺) eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden mit pMX-DEST_dcTCR_ α TRP2 transduzierte PBMCs (48,9 % α/β C-TCR⁺) eingesetzt. Targetzellen waren Ma-Mel-86a, Ma-Mel-86b_ko^{CIITA}, B78H1, B78H1-hTRP2, B78H1-mTRP2, HEK 293T_Dko^{CIITA+B2M} und 397-Mel (Abschnitt 3.1.6.3). Zusätzlich wurden als Targetzellen mit hTRP2 transient transfizierte HEK 293T_Dko^{CIITA+B2M} eingesetzt. Ma-Mel-86a ist defizient bezüglich melanosomaler Proteine, exprimiert daher kein hTRP2 und eignete sich somit als Negativkontrolle im ELISpot-Assay. Ma-Mel-86b_ko^{CIITA} und 397-Mel exprimieren hTRP2. Die murine Melanomzelllinie B78H1 exprimiert schwach murines TRP2 (mTRP2). Ma-Mel-86b_ko^{CIITA} wurde zudem vor dem Erkennungstest für 24 Stunden mit dem gegen CD3 gerichteten Antikörper OKT3 (30 ng/ml) koinkubiert. Die Blockade von CD3 wurde durchgeführt, um eine T-Zellrezeptor-abhängige Erkennung von hTRP2 zu

demonstrieren. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die Erkennung von hTRP2 durch scTCR_αTRP2- und dcTCR_αTRP2-transgene PBMCs war vergleichbar (**Abb. 4-12**). Eine etwas stärker erscheinende Erkennung von hTRP2 durch dcTCR_αTRP2-transgene PBMCs ist vereinbar mit dem Einsatz einer höheren Effektorzahl, da für den Test eine starre Effektorzellzahl von 3×10^4 pro TE gewählt und nicht bzgl. des Anteils erfolgreich transduzierter T-Zellen (s. oben) kompensiert wurde. Es wurde aufgrund der hohen Anzahl an eingesetzten Effektorzellen eine zwar sichtbare, aber nur inkomplette Blockade der Erkennung von hTRP2 durch den gegen CD3 gerichteten Antikörper OKT3 beobachtet. Zudem war zu berücksichtigen, dass OKT3 neben einer Blockade auch zur Stimulation von T-Zellen und damit zu einer vermehrten IFN-γ-Spotformation führen kann.

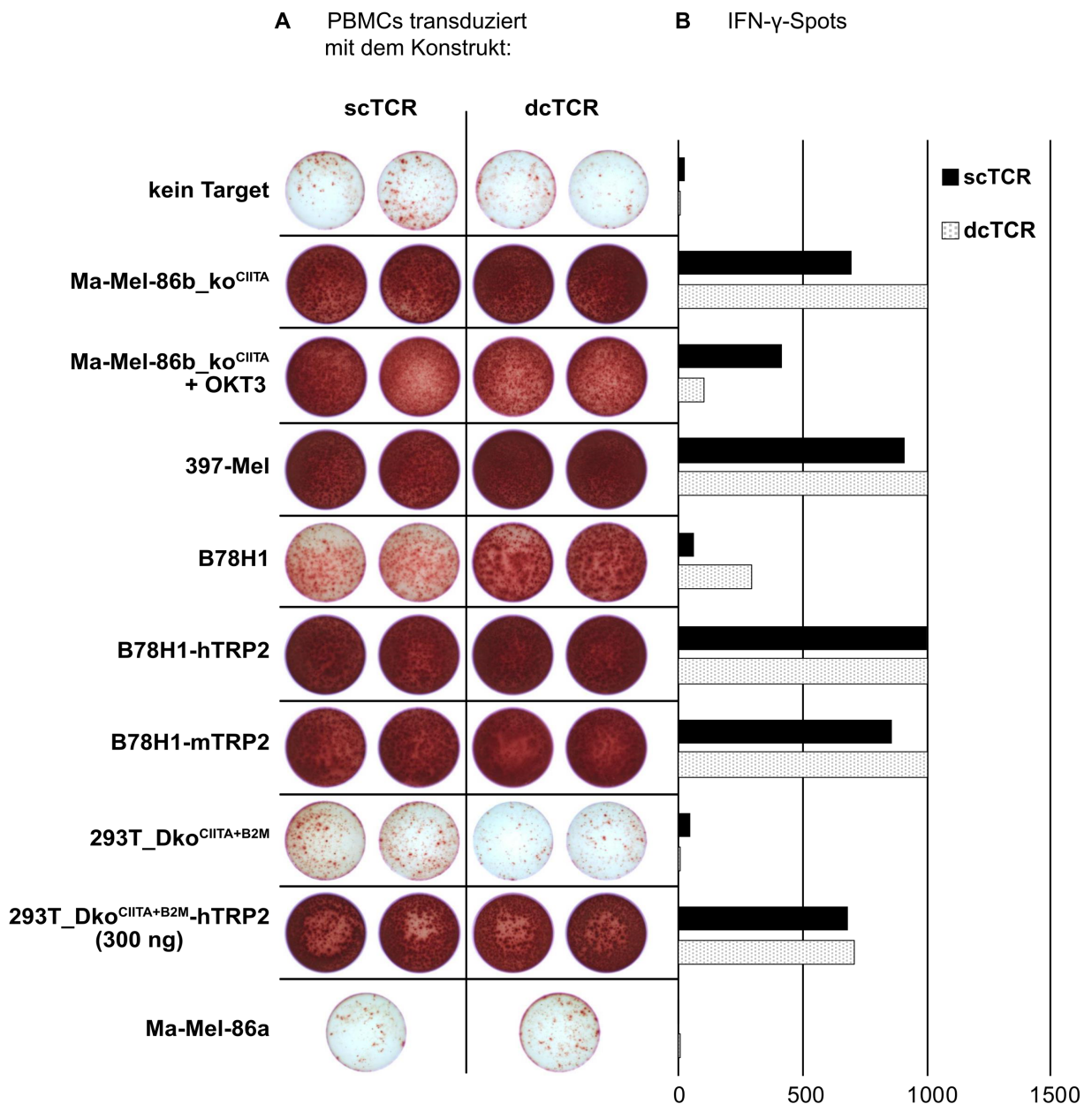


Abb. 4-12: Erkennung von Targetzellen durch den scTCR_ α TRP2 nach retroviraler Transduktion humaner PBMCs. PBMCs wurden retroviral mit pMX_DEST_scTCR_ α TRP2 und pMX_DEST_dcTCR_ α TRP2 transduziert. An Tag 6 nach Stimulation (Tag 11 nach Transduktion) mit bestrahlten Ma-Mel-86b_ko^{CIITA} und rIL-2 wurden pro TE 3×10^4 Effektorzellen (48,9 % dcTCR_ α TRP2⁺ bzw. 24,3 % scTCR_ α TRP2⁺) eingesetzt. Als Targetzellen wurden jeweils 5×10^4 Ma-Mel-86a, Ma-Mel-86b_ko^{CIITA}, B78H1, B78H1-hTRP2, B78H1-mTRP2 und 397-Mel verwendet. Ma-Mel-86b_ko^{CIITA} wurde zudem vorab für 24 Stunden mit dem gegen CD3 gerichteten Antikörper OKT3 (30 ng/ml) koinkubiert. Zusätzlich wurden 2×10^4 MOCK-transfizierte und mit hTRP2 transient-transfizierte 293T_Dko^{CIITA+B2M} als Targetzellen pro TE eingesetzt. **A** zeigt die ELISpot-Filter. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. **B** zeigt ein zugehöriges Balkendiagramm mit den Mittelwerten der IFN- γ -Spots, die als Mittelwerte aus Doppelansätzen berechnet wurden. Die IFN- γ -Spots wurden mithilfe der ImmunoSpot[®]-Software ausgelesen. Dabei wurden alle Spotzahlen über 1000/TE wegen fehlender technischer Auswertbarkeit auf 1000/TE begrenzt.

4.3.2 Vergleich der Erkennung von hTRP2 durch CD4⁺ und CD8⁺ scTCR_αTRP2-transgene PBMCs

Im gleichen Interferon-γ-ELISpot-Assay (Abschnitt 4.3.1) wurden separierte CD4⁺ und CD8⁺ Populationen scTCR_αTRP2-transgener PBMCs auf eine potentiell unterschiedliche Erkennung von hTRP2 getestet. Dabei wurden ebenfalls retroviral mit den Konstrukten pMX-DEST_scTCR_αTRP2 und pMX-DEST_dcTCR_αTRP2 transduzierte PBMCs als Effektorzellen verwendet. Diese wurden, wie bereits im Vorkapitel beschrieben, einen Tag nach Transduktion unspezifisch mit CD3/CD28-Microbeads und rIL-2 stimuliert und am Tag 4 nach Transduktion spezifisch mit Ma-Mel-86b_ko^{CIITA} und rIL-2 restimuliert. An Tag 11 nach Transduktion wurden die Responderlymphozyten unter Verwendung von anti-CD8- und anti-CD4-Microbeads mittels MACS-Technologie in CD4⁺ und CD8⁺ Populationen separiert. Die Reinheit der Populationen wurde mittels Durchflusszytometrie verifiziert. In **Tab. 4-3** ist die durchflusszytometrisch ermittelte α/βC-TCR-Expression und damit die prozentualen Anteile der doppelpositiven scTCR_αTRP2⁺ bzw. dcTCR_αTRP2⁺ und CD4⁺ bzw. CD8⁺ Populationen der pMX-DEST_scTCR_αTRP2-transgenen bzw. pMX-DEST_dcTCR_αTRP2-transgenen PBMCs gekennzeichnet. Als Effektorzellen wurden pro TE jeweils 6x10³ doppelpositive scTCR_αTRP2⁺ und CD4⁺ bzw. CD8⁺ PBMCs eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden 6x10³ doppelpositive dcTCR_αTRP2⁺ und CD4⁺ bzw. CD8⁺ PBMCs eingesetzt. Als Targetzellen wurden HEK 293T_Dko^{CIITA+B2M} verwendet, die in den Titrationsstufen von 0 ng - 300 ng mit hTRP2 im Doppelwert transient transfiziert wurden.

Es zeigte sich, dass CD4⁺ und CD8⁺ pMX-DEST_scTCR_αTRP2-transgene PBMCs gleichermaßen hTRP2 erkennen (**Abb. 4-13**).

α/βC-TCR-Expression (in %)	CD4 ⁺ Population	CD8 ⁺ Population
- der pMX-DEST_scTCR_αTRP2-transgenen PBMCs	80 %	98 %
- der pMX-DEST_dcTCR_αTRP2-transgenen PBMCs	62 %	60 %

Tab. 4-3: Durchflusszytometrisch ermittelte α/βC-TCR-Expression (in %) und damit der Anteil der doppelpositiven scTCR_αTRP2⁺ bzw. dcTCR_αTRP2⁺ und CD4⁺ bzw. CD8⁺ Populationen pMX-DEST_scTCR_αTRP2- bzw. pMX-DEST_dcTCR_αTRP2-transgener PBMCs.

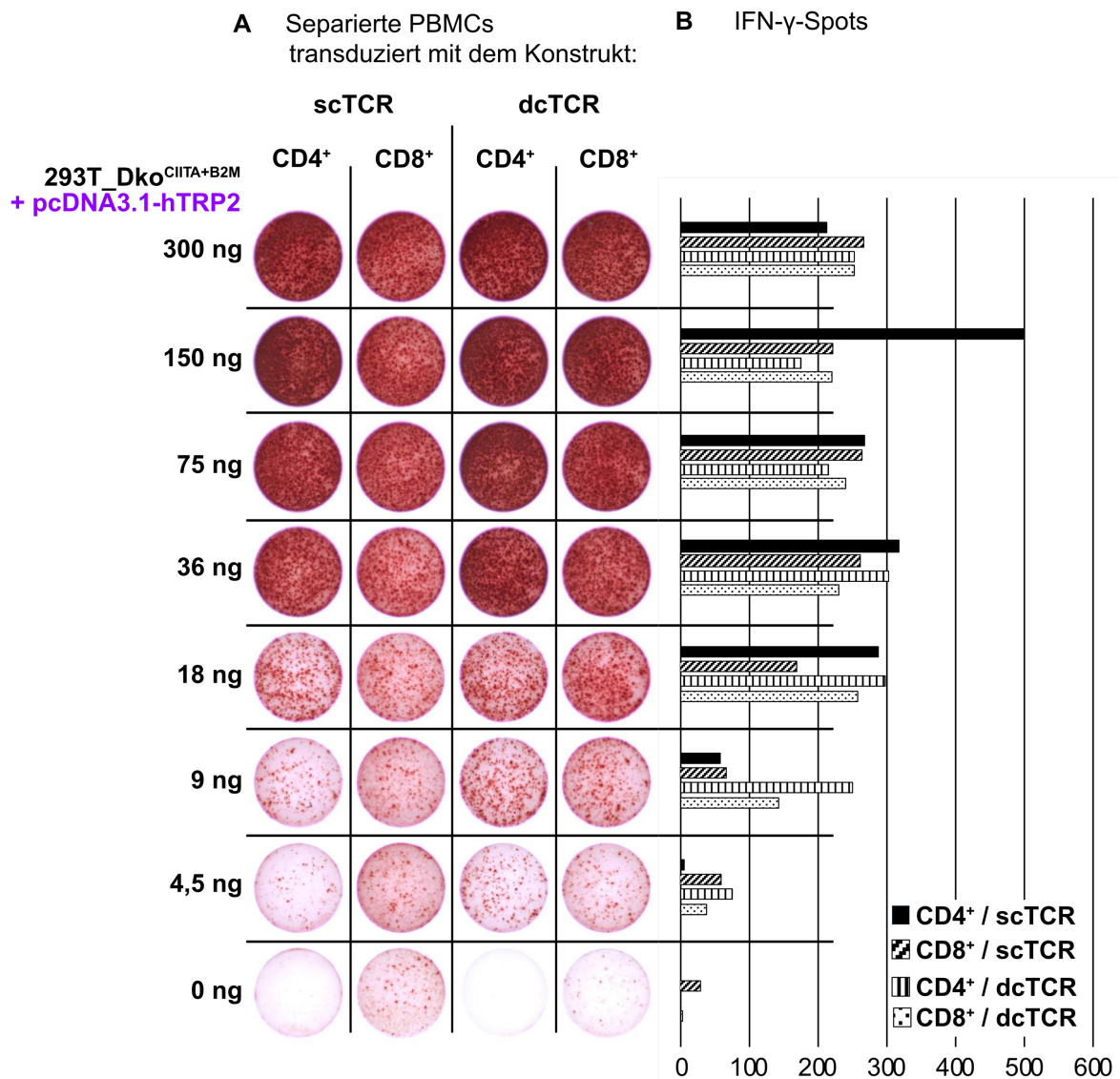


Abb. 4-13: Erkennung der Targetzellen durch scTCR_ α TRP2-transgene CD4⁺ und CD8⁺ PBMCs. Aus mit pMX-DEST_scTCR_ α TRP2 und pMX-DEST_dcTCR_ α TRP2 transduzierten PBMCs wurden mittels MACS-Technologie CD4⁺ und CD8⁺ Populationen angereichert. Pro TE wurden 6×10^3 CD4⁺ scTCR_ α TRP2⁺ bzw. CD8⁺ scTCR_ α TRP2⁺ oder CD4⁺ dcTCR_ α TRP2⁺ bzw. CD8⁺ dcTCR_ α TRP2⁺ Effektorzellen eingesetzt. Als Targetzellen wurden jeweils 2×10^4 mit hTRP2 transient transfizierte 293T_Dko^{CIITA+B2M} verwendet. Dabei wurde die transiente Transfektion mit einem hTRP2-kodierenden Expressionsplasmid in Titrationsstufen von 0 ng - 300 ng durchgeführt. **A** zeigt die ELISpot-Filter. **B** zeigt ein zugehöriges Balkendiagramm mit den Mittelwerten der IFN- γ -Spots, die aus Doppelansätzen berechnet wurden. Die IFN- γ -Spots wurden mithilfe der ImmunoSpot[®]-Software ausgelesen. Dabei wurden alle Spotzahlen über 500/TE wegen fehlender technischer Auswertbarkeit auf 500/TE begrenzt.

4.3.3 Evaluierung der lytischen Kapazität scTCR_αTRP2-transgener PBMCs

Die lytische Kapazität der scTCR_αTRP2-transgenen PBMCs wurde mithilfe eines ⁵¹Cr-Freisetzungstests ermittelt und mit der lytischen Kapazität dcTCR_αTRP2-transgener PBMCs verglichen. Mit ⁵¹Cr markierte B78H1- und B78H1-hTRP2-Zellen (Abschnitt 3.1.6.3) wurden als Targetzellen eingesetzt. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass B78H1-Zellen nur gering murines TRP2 exprimieren und schwach lysiert werden (Daten nicht gezeigt). B78H1 wurde daher als Negativkontrolle verwendet. Nach 4-stündiger Koinkubation der Effektor- und Targetzellen bei den angegebenen Effektor-zu-Target (E:T) -Verhältnissen wurde das freigesetzte ⁵¹Cr im Überstand gemessen. Sowohl bei scTCR_αTRP2-transgenen PBMCs, als auch bei dcTCR_αTRP2-transgenen PBMCs wurde eine ähnliche lytische Kapazität beobachtet (Abb. 4-14).

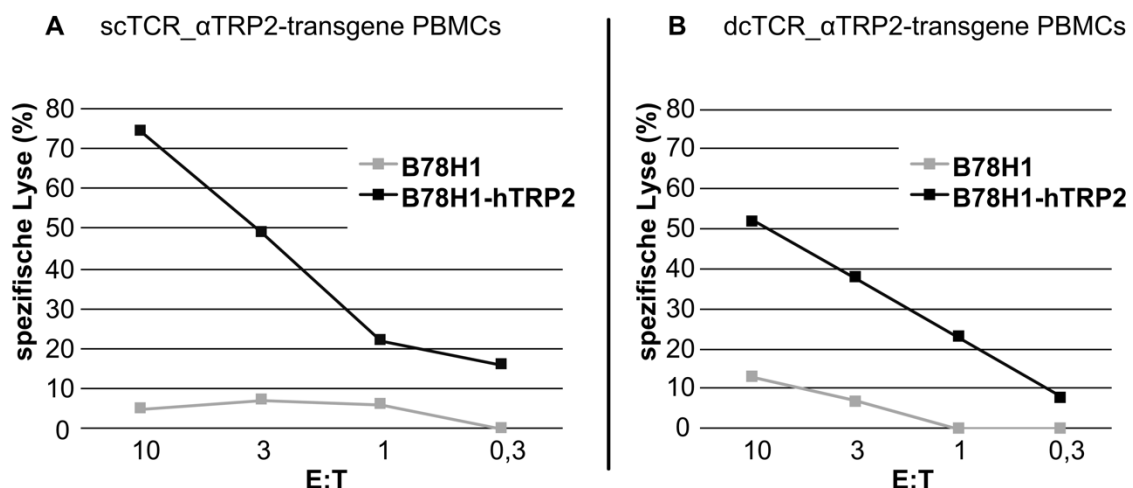


Abb. 4-14: Überprüfung der lytischen Kapazität retroviral transduzierter PBMCs mittels eines ⁵¹Cr-Freisetzungstests. Die lytische Kapazität scTCR_αTRP2-transgener PBMCs (A) wurde im Vergleich mit dcTCR_αTRP2-transgenen PBMCs (B) im Rahmen eines ⁵¹Cr-Freisetzungstests ermittelt. Die Responderlymphozyten waren am Tag 11 nach Transduktion zu 24,3 % scTCR_αTRP2⁺ bzw. zu 48,9 % dcTCR_αTRP2⁺. Als Targetzellen wurden B78H1 und B78H1-hTRP2 verwendet. Pro TE wurden 1.000 Targetzellen eingesetzt und Effektorzellen (Tag 11 nach Transduktion) wurden in E:T-Verhältnissen von 0,3 - 10:1 hinzugegeben.

4.3.4 Evaluierung der lytischen Kapazität CD4⁺ scTCR_αTRP2-transgener PBMCs

In Vorversuchen mit dcTCR_αTRP2-transgenen PBMCs war beobachtet worden, dass nicht nur CD8⁺ PBMCs, sondern auch CD4⁺ PBMCs in der Lage waren TRP2-exprimierende Targetzellen zu erkennen und zu lysieren (Daten nicht gezeigt). Parallel zum Vergleich der Erkennung von TRP2 mittels des Interferon-γ-ELISpot-Assays

(Abschnitt 4.3.2) wurde daher in einem ^{51}Cr -Freisetzungstest die lytische Aktivität CD4^+ scTCR_αTRP2-transgener PBMCs mit der lytischen Aktivität CD4^+ dcTCR_αTRP2-transgener PBMCs verglichen. Dabei wurden die PBMCs einen Tag nach Transduktion mit CD3/CD28-Microbeads und rIL-2 unspezifisch stimuliert und am Tag 4 nach Transduktion mit Ma-Mel-86b_ko^{CIITA} und rIL-2 unspezifisch restimuliert. An Tag 11 nach Transduktion wurden die CD4^+ Responderlymphozyten unter Verwendung von anti-CD8- und anti-CD4-Microbeads mittels MACS-Technologie in CD4^+ und CD8^+ Populationen separiert. Die Reinheit der CD4^+ und CD8^+ Populationen wurde mittels Durchflusszytometrie verifiziert. Die CD4^+ T-Zellpopulationen, die ebenfalls im ELISpot-Assay auf ihre Erkennung von TRP2 getestet wurden (Abb. 4-13), wurden an Tag 11 nach Transduktion mittels ^{51}Cr -Freisetzungstest auch auf ihre lytische Aktivität getestet.

Als Targetzellen wurden, wie auch bereits im ^{51}Cr -Freisetzungstest mit unseparierten scTCR_αTRP2- und dcTCR_αTRP2-transgenen PBMCs (Abschnitt 4.3.3), mit radioaktivem ^{51}Cr markierte B78H1- und B78H1-hTRP2-Zellen verwendet. Als Effektorzellen wurden CD4^+ scTCR_αTRP2-transgene und zum Vergleich CD4^+ dcTCR_αTRP2-transgene PBMCs eingesetzt. Bei beiden Effektorpopulationen wurde eine vergleichbare lytische Aktivität beobachtet (**Abb. 4-15**).

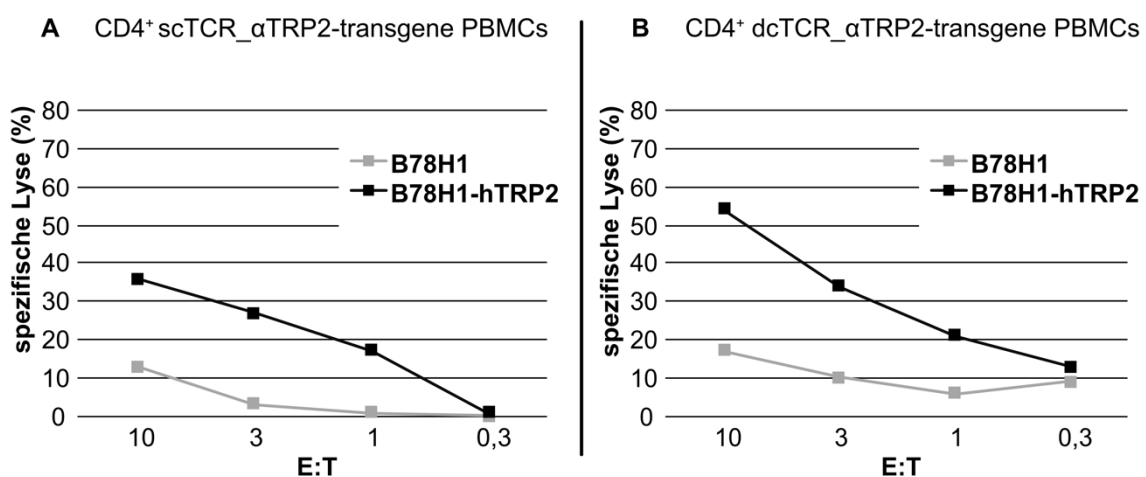


Abb. 4-15: Überprüfung der lytischen Kapazität CD4^+ retroviral transduzierter PBMCs mittels eines ^{51}Cr -Freisetzungstests. Die lytische Kapazität CD4^+ scTCR_αTRP2-transgener PBMCs (**A**) im Vergleich mit CD4^+ dcTCR_αTRP2-transgenen PBMCs (**B**) wurde in einem ^{51}Cr -Freisetzungstest ermittelt. Als Targetzellen wurden mit ^{51}Cr markierte B78H1- und B78H1-hTRP2-Zellen verwendet. Pro TE wurden 1.000 Targetzellen eingesetzt und Effektorzellen (Tag 11 nach Transduktion) wurden in E:T-Verhältnissen von 0,3 - 10:1 hinzugegeben.

4.4 Generierung des TCR-SCS_αTRP2-Konstrukts im Zielvektor pMX-DEST

In einem zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein TCR-SCS (engl. *T cell receptor single-chain signaling*) aus der antigenbindenden Domäne (hVα-Li-hVβ) des zuvor konstruierten scTCR_αTRP2 und der "Scharnier"-, Transmembran- und intrazellulären Signaldomäne eines CAR der zweiten Generation konstruiert, die aus dem Vektor pMK-63.28.z (Abschnitt 3.1.5.3) amplifiziert wurden. Zum besseren Verständnis der einzelnen Schritte zur Generierung des TCR-SCS_αTRP2-Konstrukts sind die konstruierten Fragmente und dafür verwendeten Primer im finalen TCR-SCS_αTRP2-Konstrukt in **Abb. 4-16** wiedergegeben. Die Scharnierdomäne wurde aus einer CD8α-Kette bezogen. Die Transmembran- und die intrazelluläre kostimulatorische Signaldomänen entstammen CD28 und CD3ζ.

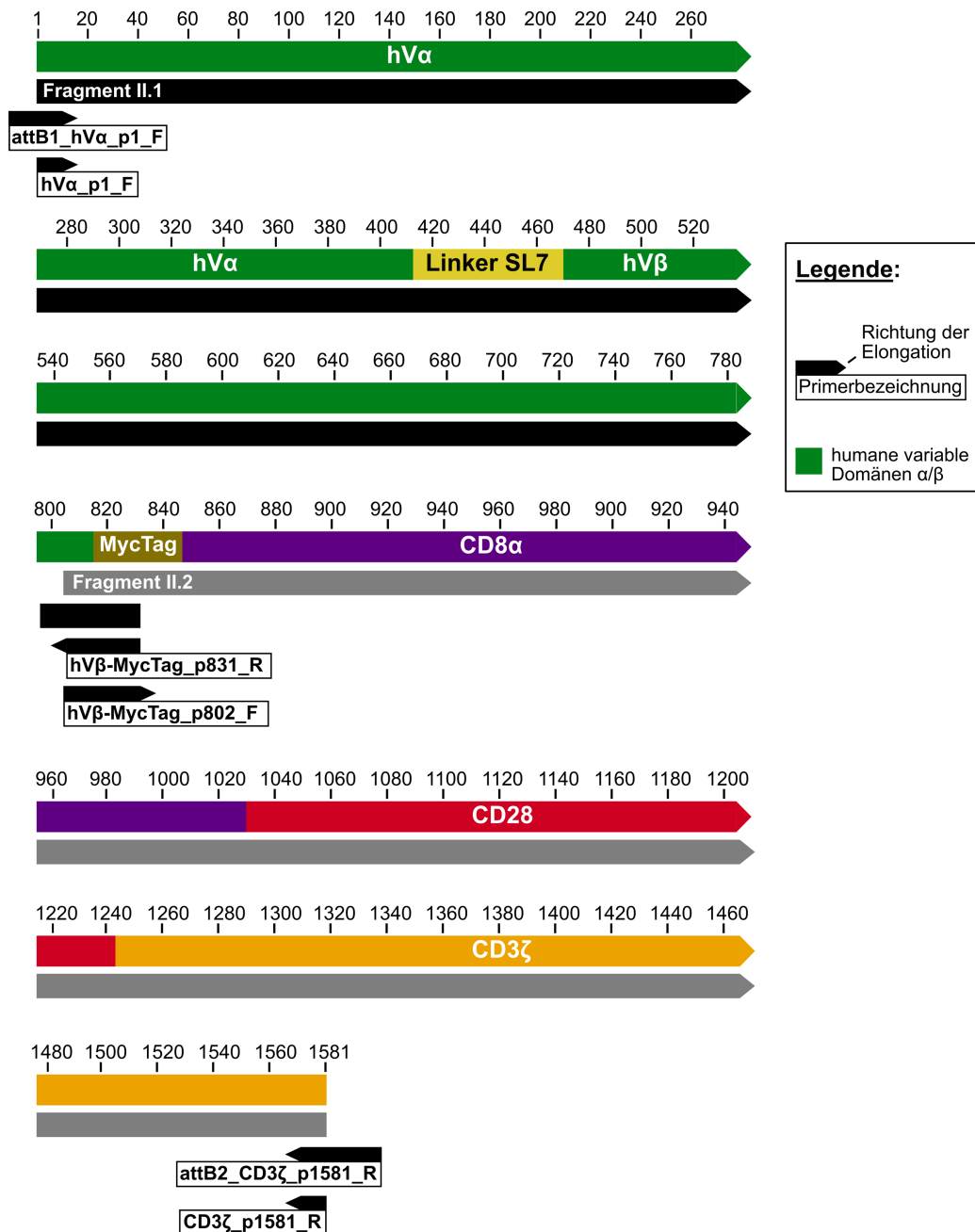


Abb. 4-16: Schematische Darstellung der Fragmente und Primer zur Herstellung des TCR-SCS_αTRP2-Konstrukts. Dargestellt sind die konstruierten Fragmente II.1 und II.2 (Grautöne), die mithilfe der ebenfalls dargestellten Primer amplifiziert wurden. att-: Rekombinationssequenz des Bakteriophagen λ ; hV α / β : humane variable Domäne α/β .

Schematisch ist in **Abb. 4-17** das auf der Zelloberfläche exprimierte Konstrukt TCR-SCS_αTRP2 dargestellt.

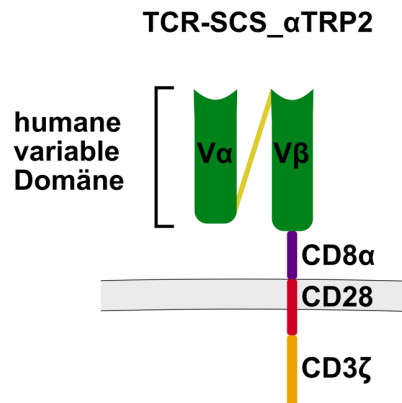


Abb. 4-17: Schematische Darstellung des auf der Zelloberfläche exprimierten Konstrukts TCR-SCS_αTRP2. Vα/β: humane variable Domäne α/β des dcTCR_αTRP2. CD8α, CD28 und CD3ζ aus pMK-63.28.z.

Zur Generierung des TCR-SCS_αTRP2 im Vektor pMX-DEST wurden zunächst die Fragmente II.1 und II.2 mittels PCR-Amplifikation konstruiert. Als DNA-Polymerase wurde die Q5[®] *High Fidelity* DNA-Polymerase verwendet. Für die Herstellung der Fragmente wurden die in Abschnitt 3.1.5.4.3 angegebenen Primer eingesetzt, die nach ihrer Position im fertigen TCR-SCS_αTRP2-Konstrukt benannt wurden und entsprechend die Grenzregionen der Fragmente markieren (Abb. 4-16). Um die Fragmente mittels SOE-PCR zu verknüpfen, wurden die Primer so gewählt, dass zwischen den Fragmenten II.1 und II.2 überlappende Sequenzen entstanden. Um die Gateway[®]-Klonierung zu ermöglichen, wurden an den Anfang von Fragment II.1 und an das Ende von Fragment II.2 attB-Rekombinationssequenzen hinzugefügt. Zur Konstruktion von Fragment II.3 wurden die Fragmente II.1 und II.2 mittels SOE-PCR miteinander verknüpft. Mithilfe der Gateway[®]-Klonierung wurde das Konstrukt pMX-DEST_TCR-SCS_αTRP2 hergestellt, indem Fragment II.3 zunächst in den Eingangsvektor pDONR[™]221 und schließlich in den Zielvektor pMX-DEST kloniert wurde.

4.4.1 Konstruktion von Fragment II.1

Die gesamte antigenbindende variable Region (hVα-Li-hVβ) des scTCR_αTRP2 wurde mithilfe der Primer attB1_hVα_p1_F und hVβ-MycTag_p831_R und des Templates pMX-DEST_scTCR_αTRP2 (5 ng) mittels PCR amplifiziert (Abschnitt 3.1.5.4.3). Der Primer hVβ-MycTag_p831_R wurde dabei so gewählt, dass eine 3'-flankierende überlappende Sequenz mit der MycTag-Region entstand. Das Amplifikat wurde als Fragment II.1 bezeichnet (Abb. 4-16). Die PCR fand unter folgenden Reaktionsbedingungen statt: 1 Zyklus (5' 98 °C) - 3 Zyklen (10" 98 °C, 30" 52 °C, 2' 72

°C) - 29 Zyklen (10" 98 °C, 30" 65 °C, 2' 72 °C) - 1 Zyklus (5' 72 °C). Nach erfolgter Amplifikation wurde das PCR-Produkt mittels Gelelektrophorese überprüft (Agarosegel nicht gezeigt). Das Fragment II.1 entsprach der erwarteten Fragmentgröße von 871 bp [inklusive attB1-Rekombinationssequenz (40 bp)].

4.4.2 Konstruktion von Fragment II.2

Fragment II.2 wurde mithilfe der Primer hV β -MycTag_p802_F und attB2_CD3 ζ _p1581_R und des mit SacI (an Position 3528) linearisierten Templates pMK-63.28.z (5 ng) mittels PCR amplifiziert (Abschnitt 3.1.5.4.3). Dabei wurde der Primer hV β -MycTag_p802_F so gewählt, dass eine 3'-flankierende überlappende Sequenz mit der MycTag-Region entstand. Das Amplifikat wurde als Fragment II.2 bezeichnet (Abb. 4-16). Die PCR fand unter folgenden Reaktionsbedingungen statt: 1 Zyklus (5' 98 °C) - 3 Zyklen (10" 98 °C, 30" 52 °C, 2' 72 °C) - 29 Zyklen (10" 98 °C, 30" 65 °C, 2' 72 °C) - 1 Zyklus (5' 72 °C). Nach erfolgter Amplifikation wurde das PCR-Produkt mittels Gelelektrophorese überprüft (Agarosegel nicht gezeigt). Das Fragment II.2 entsprach der erwarteten Fragmentgröße von 816 bp [inklusive attB2-Rekombinationssequenz (36 bp)].

4.4.3 Konstruktion von Fragment II.3

Fragment II.3 wurde aus den Fragmenten II.1 und II.2 mittels SOE-PCR hergestellt (Abb. 4-16). Der erste Schritt der SOE-PCR, die Generierung überlappender Sequenzen, erfolgte bereits bei der Konstruktion von Fragment II.1 und II.2. Die Hybridisierung und Elongation der überlappenden Sequenzen von Fragment II.1 und II.2 (je 400 ng pro Ansatz) erfolgte im zweiten Schritt der SOE-PCR unter folgenden Bedingungen: 1 Zyklus (5' 98 °C) - 15 Zyklen (10" 98 °C, 30" 60 °C, 1' 30" 72 °C) - 1 Zyklus (3' 72 °C).

Im dritten Schritt der SOE-PCR wurde das Fragment II.3 mit den Primern attB1_hV α _p1_F und attB2_CD3 ζ _p1581_R amplifiziert (Abschnitt 3.1.5.4.3). Die Reaktion fand unter folgenden Bedingungen statt: 1 Zyklus (2' 98 °C) - 20 Zyklen (10" 98 °C, 2' 72 °C) - 1 Zyklus (3' 72 °C).

Nach erfolgter SOE-PCR wurde das Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen (Agarosegel nicht gezeigt). Da zwei separate Banden auf dem Agarosegel auftraten, wurde die Bande entsprechend der zu erwartenden Größe des Fragments II.3 (1657

bp) [inklusive attB-Rekombinationssequenzen (40 bp und 36 bp)] extrahiert und aufgereinigt.

4.4.4 Integration von Fragment II.3 in den Zielvektor pMX-DEST

Zur Integration von Fragment II.3 in den Zielvektor pMX-DEST wurde die Gateway[®]-Cloning-Technologie eingesetzt. Dazu wurden sowohl die BP- als auch die LR-Rekombination durchgeführt. In der BP-Reaktion wurde das attB- flankierte Fragment II.3 in den Vektor pDONR[™]221 rekombiniert. Das Produkt der BP-Rekombination wurde in NEB[®]DH10-beta Bakterien transformiert. Nach Wachstum der Bakterienkolonien auf Kanamycin-Agarplatten wurden 5 Kolonien gepickt und, um den Erfolg der BP-Rekombination zu verifizieren, eine O-PCR mit den Primern hV α _p1_F und CD3 ζ _p1581_R unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: 1 Zyklus (5' 98 °C) - 30 Zyklen (10" 98 °C, 30" 60 °C, 2' 72 °C) - 1 Zyklus (5' 72 °C). Das Produkt der O-PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (**Abb. 4-18: A**).

In den Klonen 1 und 3 konnte eine DNA-Bande, die der erwarteten Größe von Fragment II.3 (1657 bp) entsprach, nachgewiesen werden (Abb. 4-18: A). Plasmid-DNA aus pDONR[™]221_TCR-SCS_ α TRP2-Klon 3 wurde durch Sequenzierung mit den Primern M13_F und M13_R überprüft und in der LR-Reaktion mit dem Vektor pMX-DEST rekombiniert. Das Produkt der LR-Rekombination wurde wiederum in NEB[®]DH10-beta Bakterien transformiert. Acht der auf Agarplatten gewachsenen Bakterienkolonien wurden gepickt und daraus Plasmid-DNA mittels Miniprep isoliert. Zur Verifizierung des LR-Rekombinationserfolgs wurde die DNA mit dem Restriktionsenzym BsrGI gespalten und auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 4-18: B). BsrGI hatte jeweils eine Schnittstelle in der attB1- und attB2-Sequenz, im Vektor pMX-DEST und im Fragment II.3. Die Klone 6,7 und 8 zeigten eine DNA-Bande bei 1330 bp, die der erwarteten Größe von Fragment II.3 nach Spaltung durch BsrGI entsprach. Klon 6 wurde zur Verifizierung der Sequenz des Fragments mit internen Primern sequenziert. Um mehr DNA für die später erfolgte Transduktion zu gewinnen, wurde von Klon 6 eine 100 ml LB-Ampicillin-Kultur angesetzt und ein Maxi-Prep durchgeführt.

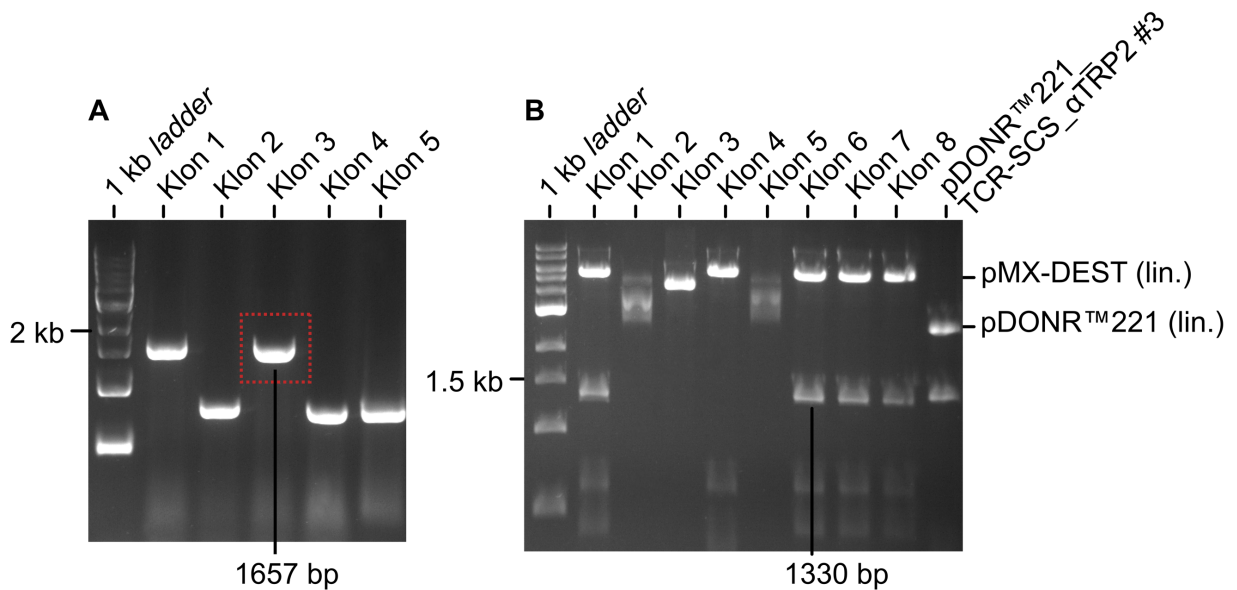


Abb. 4-18: Überprüfung der Rekombination von Fragment II.3 in den Vektor pDONR™221 (A) und in den Zielvektor pMX-DEST (B). Mithilfe der Gateway®-Cloning-Technologie wurde Fragment II.3 zunächst in der BP-Reaktion in den Vektor pDONR™221 rekombiniert. In **A** wurde mittels O-PCR der Erfolg der Klonierung unter Verwendung der Primer hVα_p1_F und CD3ζ_p1581_R verifiziert. Da Klon 3 der erwarteten Größe entsprach, wurde dieser für die LR-Rekombination in den Zielvektor pMX-DEST verwendet. **B** zeigt die BsrGI-Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA, die aus 8 Bakterienkolonien nach LR-Rekombination isoliert wurde. BsrGI hatte jeweils eine Schnittstelle in der attB1- und attB2-Sequenz, im Vektor pMX-DEST und im Fragment II.3. Die Klone 6, 7 und 8 zeigten die erwartete Größe. Als Positivkontrolle wurde der ebenfalls mit BsrGI gesplante pDONR™221_TCR-SCS_αTRP2-Klon 3 aufgetragen. Klon 6 wurde im Anschluss zur Verifizierung der Sequenz mit internen Primern sequenziert.

4.5 Expression des TCR-SCS_αTRP2 in Jurkat 76-CD8^{hi} und humanen PBMCs

Um die Expression des TCR-SCS_αTRP2 zu überprüfen, wurde pMX-DEST_TCR-SCS_αTRP2 retroviral in Jurkat 76-CD8^{hi} und in PBMCs transduziert. Als Positivkontrolle wurden zeitgleich die Konstrukte dcTCR_αTRP2 und scTCR_αTRP2 im Vektor pMX-DEST in Jurkat 76-CD8^{hi} und in PBMCs transduziert.

Zunächst wurden PA-Zellen mit pMX-DEST_TCR-SCS_αTRP2 transfiziert. Dann wurden Jurkat 76-CD8^{hi} und PBMCs mit dem retroviralen Überstand der PA-Zellen transduziert. Die transduzierten Jurkat 76-CD8^{hi} wurden weiter kultiviert. Die PBMCs wurden ein Tag nach der Transduktion mit CD3/CD28-Microbeads und an Tag 4 nach Transduktion mit Ma-Mel-86b_ko^{CIITA} restimuliert. Die Expression des Konstrukts wurde an Tag 6 nach Transduktion unter Verwendung der Antikörper CD8-APC, CD3-PE und Vβ3-FITC durchflusszytometrisch gemessen.

Sowohl transduzierte Jurkat 76-CD8^{hi} (4,18 % Vβ3⁺) als auch PBMCs (2,24 % Vβ3⁺) wiesen nur eine sehr geringe Anfärbung mit dem Antikörper gegen Vβ3 auf, sodass nicht davon auszugehen war, dass das TCR-SCS_αTRP2-Konstrukt im Vektor pMX-DEST signifikant exprimiert wurde (**Abb. 4-19**). Die als Positivkontrolle mit dem Konstrukt scTCR_αTRP2 transduzierten Jurkat-76-CD8^{hi} waren zu 54,51 % Vβ3⁺, die mit dem gleichen Konstrukt transduzierten PBMCs zu 16,54 % Vβ3⁺. Die mit dem Konstrukt dcTCR_αTRP2 transduzierten Jurkat-76-CD8^{hi} waren zu 59,94 % Vβ3⁺, die mit dem dcTCR_αTRP2-Konstrukt transduzierten PBMCs zu 33,08 % Vβ3⁺.

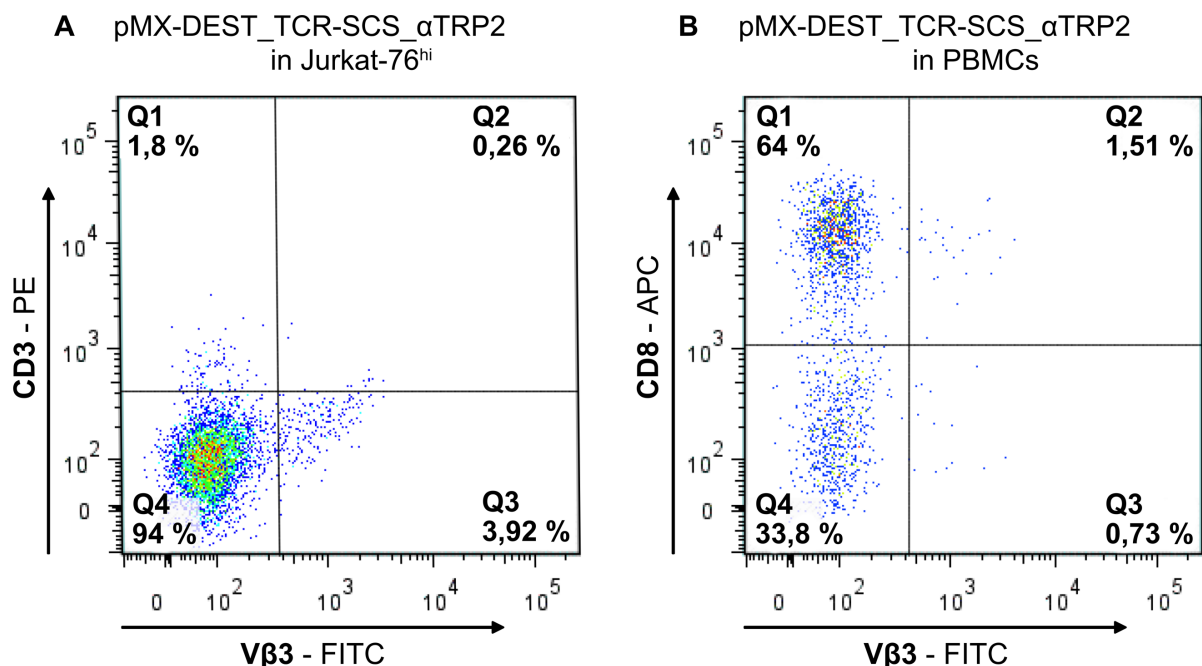


Abb. 4-19: TCR-SCS_αTRP2-Expression retroviral transduzierter Jurkat 76-CD8^{hi} und PBMCs (Tag 6 nach Transduktion). Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurde die Vβ3- und damit die TCR-SCS_αTRP2-Expression von Jurkat 76-CD8^{hi} (A) und PBMCs (B) ermittelt.

4.6 Nachweis der Integration und Transkription von pMX-DEST_TCR-SCS_αTRP2 in Jurkat 76-CD8^{hi}

Aufgrund der fehlenden Expression des TCR-SCS_αTRP2 in Jurkat 76-CD8^{hi} und PBMCs (Abb. 4-19) wurden RNA und genomische DNA aus mit dem TCR-SCS_αTRP2-Konstrukt transduzierten Jurkat 76-CD8^{hi}-Zellen isoliert. Die genomische DNA wurde isoliert, um zu überprüfen, ob das Konstrukt TCR-SCS_αTRP2 in das Genom der transduzierten Jurkat 76-CD8^{hi}-Zellen integriert war. Die RNA wurde isoliert, um festzustellen, ob im Fall einer erfolgten Integration der Konstrukte in das Genom der Zellen eine Transkription der DNA zu RNA stattfand. Als Positivkontrolle

wurden die genomische DNA und die RNA der mit pMX-DEST_scTCR_αTRP2 und pMX-DEST_dcTCR_αTRP2 transduzierten Jurkat 76-CD8^{hi}-Zellen isoliert und analysiert. Als Negativkontrolle wurden nicht-transduzierte Jurkat 76-CD8^{hi} verwendet. Für die Isolierung der genomischen DNA wurden jeweils $1,5 \times 10^5$ der mit den verschiedenen Konstrukten transduzierten Jurkat 76-CD8^{hi}-Zellen eingesetzt. Für die Isolierung der RNA wurden jeweils 5×10^5 transduzierte Jurkat 76-CD8^{hi}-Zellen eingesetzt. Nach Isolierung der RNA wurde diese mittels RT-PCR unter Verwendung des Primers Oligo-dT zu cDNA umgeschrieben.

Um bestimmte Sequenzen und damit die Integration der Konstrukte TCR-SCS_αTRP2, scTCR_αTRP2 und dcTCR_αTRP2 in genomischer DNA und in cDNA nachzuweisen, wurden PCR-Amplifikationen mit den in **Tab. 4-4** gelisteten Primern durchgeführt. Zum besseren Verständnis sind die in Tab. 4-4 aufgeführten Primerpaare und damit amplifizierten Fragmente A-G in einer Fragmentkarte (**Abb. 8-3**) schematisch wiedergegeben. Als Positivkontrolle wurden die Konstrukte TCR-SCS_αTRP2, scTCR_αTRP2 und dcTCR_αTRP2 im Vektor pMX-DEST mit den jeweils in den Konstrukten bindenden Primerpaaren amplifiziert. Als Negativkontrolle wurde die genomische DNA und cDNA nicht-transduzierter Jurkat 76-CD8^{hi}-Zellen unter Verwendung der gleichen Primerpaare (Tab. 4-4) eingesetzt. Die PCR-Reaktionen fanden unter Standardbedingungen statt. Als Annealing-Temperatur wurde für jede Amplifikation 62 °C gewählt.

Die Integration und Transkription der Konstrukte TCR-SCS_αTRP2, scTCR_αTRP2 und dcTCR_αTRP2 im Vektor pMX_DEST in den damit transduzierten Jurkat 76-CD8^{hi} wurde aufgrund der erfolgreichen Amplifikation Konstrukt-spezifischer DNA-Sequenzen bestätigt (**Abb. 4-20**).

Primerpaar-bezeichnung	Primer	scTCR	dcTCR	TCR-SCS
1	hVα_p1_F mCβ_p1034_R	Fragment B	Fragment C	
2	hVα_p1_F mCα_p1872_R	Fragment A	Fragment D	
3	hVα_p1_F CD3ζ_p1581_R			Fragment E
4	hVβ-MycTag_p802_F CD3ζ_p1581_R			Fragment F
5	hVα_p1_F hVβ-MycTag_p831_R			Fragment G

Tab. 4-4. Kennzeichnung der mit den Primerpaaren 1-5 amplifizierten Fragmente A-G (vgl. auch Abb. 8-3).

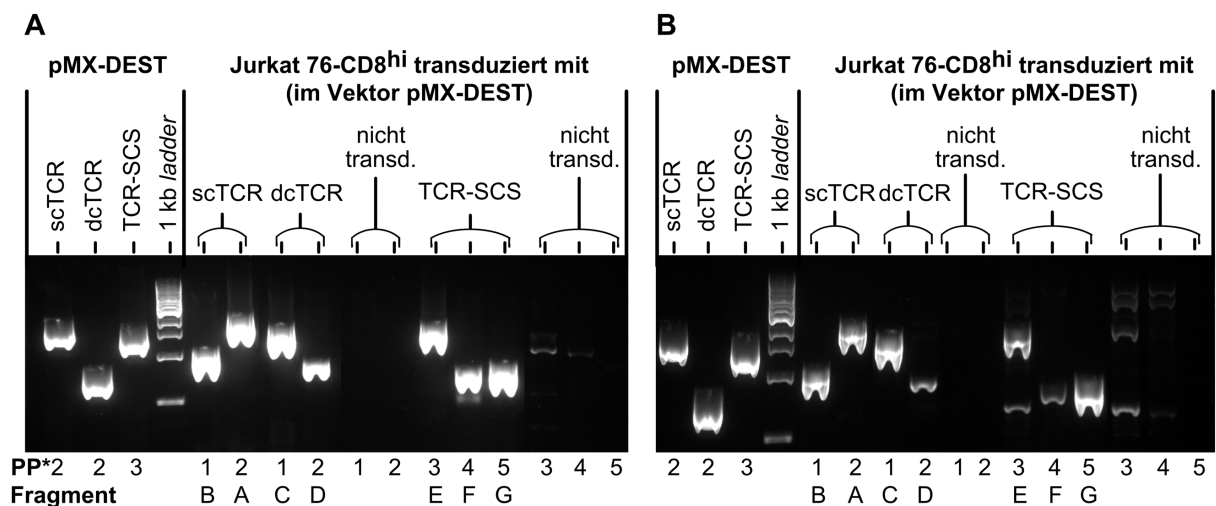


Abb. 4-20: Überprüfung der Integration und Transkription von pMX-DEST_TCR-SCS_αTRP2 in Jurkat 76-CD8^{hi}-Zellen. (A) PCR-Amplifikation von cDNA nach RT-PCR. (B) PCR-Amplifikation aus genomischer DNA. Für die Amplifikation aus genomischer DNA und cDNA wurden analoge Primerpaare (PP*) (vgl. Tab. 4-4) mit unterschiedlichen Bindungsstellen (vgl. Abb. 8-3) verwendet. Als Positivkontrolle wurden die Konstrukte im Vektor pMX-DEST mit den angegebenen Primerpaaren amplifiziert (jeweils in den linken drei Spalten im Agarosegel aufgetragen). Als Negativkontrolle wurde DNA bzw. cDNA aus nicht-transduzierten Jurkat 76-CD8^{hi} verwendet.

5 Diskussion

In Vorarbeiten war aus dem Blut der Patientin Ma-Mel-86 der CTL-Klon 2C/417 isoliert worden, der auf der Zelloberfläche autologer Tumorzellen das Antigen TRP2 erkannte. Aus diesem CTL-Klon war ein dcTCR kloniert worden. TRP2 als Zielantigen und die Unabhängigkeit von MHC bei der Erkennung durch den TCR verspricht im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung eine Reihe von Vorteilen, die in Abschnitt 2.5 zusammengefasst wurden. Beim Einbringen von exogenen TCR-Ketten in T-Zellen wurde zumindest in Mausmodellen ein "*Mispairing*" mit endogenen TCR-Ketten beobachtet, das zu letalen GvH-Reaktionen führen kann [50, 51, 105]. Um die Sicherheit und die potentielle therapeutische Effizienz des gegen TRP2 gerichteten dcTCR für den Einsatz im adoptiven T-Zelltransfer zu erhöhen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein optimierter scTCR konstruiert. Der scTCR_αTRP2 wurde in den Vektor pMX-DEST integriert und zur Überprüfung der Expression und Funktionalität in Jurkat 76-CD8^{hi} und humane PBMCs transduziert. Um die Expression und Funktionalität des TCR-Konstrukts vergleichen zu können, wurde auch der in Vorarbeiten generierte dcTCR in den Vektor pMX-DEST integriert und ebenfalls sowohl in Jurkat 76-CD8^{hi} als auch in humane PBMCs transduziert.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschreibt die Konstruktion eines TCR-SCS (engl. *T cell receptor single-chain signaling*) aus den variablen Domänen des zuvor konstruierten scTCR_αTRP2 und einer transmembranären und intrazellulären Domäne eines CAR (engl. *chimeric antigen receptor*). Im Anschluss wurde das Konstrukt in Jurkat-CD8^{hi}-Zellen und humane PBMCs transduziert und diese wurden durchflusszytometrisch auf die Expression des Konstrukts überprüft.

5.1 Konstruktion, Expression und Funktionalität des MHC-unabhängigen scTCR_αTRP2

5.1.1 Die Konstruktion des MHC-unabhängigen scTCR_αTRP2

Erste scTCRs wurden als 3-Domänen-Konstrukte (Vα-Li-Vβ-Cβ) mit einer zusätzlichen intrazellulären CD3ζ-Domäne entworfen [106]. Bei diesen 3-Domänen-Konstrukten wurde dennoch in verschiedenen Studien ein "*Mispairing*" von exogenen und endogenen TCR-Ketten in T-Zellen nachgewiesen [62, 107]. Von Voss *et al.* wurden verschiedene Optimierungen an dem ursprünglichen scTCR-Konstrukt vorgenommen und optimierte scTCRs, die gegen verschiedene Antigene gerichtet waren, mit

"konventionellen" scTCRs verglichen, die als 3-Domänen-Konstrukte mit intrazellulärer Signaldomäne konstruiert waren. An Optimierungen erfolgte eine Murinisierung der konstanten Domäne β und damit eine Chimärisierung des scTCR-Konstrukts. Zusätzlich wurde die konstante Domäne einer murinen TCR α -Kette koexprimiert, die bevorzugt die murine konstante TCR β -Domäne des scTCR binden, ein "Mispairing" somit reduzieren und die Expression auf der Zelloberfläche erhöhen sollte [61]. Zur Verbesserung der Stabilität des Konstrukts wurde eine Disulfidbrücke mittels Cystein-Resten zwischen den beiden konstanten Domänen eingefügt. Eine Hypothese von Voss *et al.* war, dass das scTCR-Konstrukt, durch die Koexpression einer konstanten TCR α -Domäne, dem Aufbau eines natürlichen TCR näherkommen und bei Bindung des Antigens durch den scTCR eine physiologischere Signalkaskade auslösen würde. In einer darauf aufbauenden Arbeit wurde die murine konstante TCR α -Domäne über ein F2A-Element mit der murinen konstanten Domäne β des scTCR auf einem einzelnen Plasmid retroviral transduziert, um eine Bindung der beiden konstanten Domänen zusätzlich zu fördern [62]. Durch diese Veränderungen wurden eine erhöhte Expression und verbesserte lytische Kapazität der scTCR-Konstrukte erreicht. Außerdem wurde gezeigt, dass dadurch ein residuelles "Mispairing" mit endogenen TCR-Ketten reduziert wird [62]. Aus diesen Gründen wurde der im Rahmen dieser Arbeit konstruierte MHC-unabhängige scTCR_ α TRP2 nach dem von Voss *et al.* publizierten Vorgehen konstruiert [61, 62]. Zwischenzeitlich wurde berichtet, dass bei *In vivo*-Anwendung eines analogen Konstrukts keine "off target"-Reaktionen auftraten [51].

5.1.2 Evaluation der Expression des MHC-unabhängigen scTCR_ α TRP2

Im Vektor pMX-DEST wurde der scTCR_ α TRP2 in Jurkat-CD8^{hi} zu 54,51 % und in PBMCs zu 19,16 % exprimiert (Abb. 4-10 und Abb. 4-11). Der als Vergleich transduzierte dcTCR_ α TRP2 im Vektor pMX-DEST zeigte eine Expression von 59,94 % in Jurkat 76-CD8^{hi}- Zellen und 40,6 % in PBMCs (Abb. 4-10 und Abb. 4-11). Auffällig ist hier die deutlich geringere Expression des scTCR (19,16 %) gegenüber dem dcTCR (40,6 %) auf PBMCs. Die Expression kann mit der des gegen p53 gerichteten, über ein F2A-Element mit einer murinen konstanten Domäne α verbundenen murinen scTCR von Knies *et al.* verglichen werden, da dieser scTCR in seinem Aufbau genau dem in dieser Arbeit konstruierten scTCR entspricht [62]. Der zu vergleichende scTCR wurde mit 65,1 % deutlich stärker als der scTCR_ α TRP2 (19,16 %) auf PBMCs

exprimiert ^[62]. Dabei ist anzumerken, dass der von Knies *et al.* konstruierte gegen p53 gerichtete murine scTCR im Vektor pBullet-IRESpuro in PBMCs transduziert und diese im Verlauf mittels Puromycin selektioniert wurden ^[62]. Die Möglichkeit der Anreicherung durch Selektion kann sich durchflusszytometrisch in deutlich höheren Expressionsraten äußern und war bei pMX-DEST_scTCR_αTRP2-transgenen PBMCs nicht möglich. In nachfolgenden Arbeiten wurde der scTCR_αTRP2 im Vektor pMX-puro-DEST in PBMCs transduziert. Nach Selektion wurde durchflusszytometrisch eine deutlich höhere Expressionsrate beobachtet (persönliche Mitteilung XXXXXXXXXX) (Daten nicht gezeigt). Auch ein residuelles "Mispairing" mit endogenen TCR-Ketten, einhergehend mit einer Veränderung der antigenbindenden Domäne, kann hier einen Faktor für die geringere Expression des scTCR_αTRP2 darstellen.

Einen weiteren Faktor für die schwache Expression könnte die Konkurrenz der endogenen TCRs der PBMCs und des scTCR_αTRP2 um endogene CD3-Komplexe sein. CD3 ist für die Expression auf der Zelloberfläche notwendig und kann aufgrund der begrenzten Anzahl einen limitierenden Faktor für die Expression exogener TCR darstellen ^[56]. Allerdings wurde von Cohen *et al.* beobachtet, dass murine konstante Domänen eine höhere Affinität zu humanen CD3-Komplexen haben als humane konstante Domänen ^[108]. Somit wären sowohl der scTCR_αTRP2 als auch der dcTCR_αTRP2 hinsichtlich der Bindung von endogenen CD3-Komplexen gegenüber endogenen TCR im Vorteil.

Auch eine intrazelluläre Fehlfaltung oder intrinsische Instabilität des scTCR-Konstrukts könnte zu verminderten Expressionsraten führen. Von Heemskerk *et al.* wurde beschrieben, dass die intrinsische Stabilität von T-Zellrezeptoren vor allem von der Affinität zwischen den variablen Domänen bestimmt wird und dass dabei auch die Zusammensetzung der CDR3-Region eine wichtige Rolle spielt ^[109]. Unklar ist noch, wie sich der Linker SL7 zwischen den variablen Domänen des scTCR auf die Affinität der variablen Domänen und damit die Stabilität des gesamten Konstrukts auswirkt.

Von Eyquem *et al.* wurde das Einbringen eines CAR-Konstrukts in den TRAC-Lokus mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methode beschrieben. Dieser Genabschnitt kodiert für die konstante Domäne der α-Kette des endogenen TCR und wurde durch CRISPR/Cas9 ausgeschaltet. Gleichzeitig war das CAR-Konstrukt unter Kontrolle des Promotors der endogenen α-Kette des TCR stärker und konsistenter exprimiert. Außerdem wurden dadurch die Lebensdauer und *In vivo*-Wirksamkeit der CAR-T-Zellen gesteigert ^[110].

Eine Anwendung dieser Methode wurde ebenfalls für den Genlocus der konstanten Domäne der β -Kette des endogenen TCR (TRBC) beschrieben [111]. Ein solches Vorgehen könnte möglicherweise zu einer stärkeren und konsistenteren Expression des scTCR_ α TRP2 führen und wäre somit für dessen Anwendung von Vorteil.

5.1.3 Evaluation der Funktionalität des MHC-unabhängigen scTCR_ α TRP2

Die Funktionalität von scTCR_ α TRP2- im Vergleich zu dcTCR_ α TRP2-transgenen PBMCs wurde mit Interferon- γ -ELISpot- und ^{51}Cr -Freisetzungs-Tests analysiert. Im Interferon- γ -ELISpot-Assay zeigten scTCR_ α TRP2- und dcTCR_ α TRP2-transgene PBMCs insgesamt eine vergleichbare Erkennung der Targetzellen (Abb. 4-12). Bei den Targetzellen Ma-Mel-86b_ko^{CIITA}, 397-Mel und B78H1-mTRP2 wurde eine geringfügig bessere Erkennung von humanem und murinem TRP2 durch den dcTCR_ α TRP2 festgestellt. Dies kann jedoch auch auf die fehlende Kompensation der eingesetzten Effektorzellen zurückgeführt werden, die beide Konstrukte unterschiedlich stark exprimierten (Tab. 4-2). Auch mit murinem TRP2 transfizierte B78H1-Zellen wurden von beiden Konstrukten erkannt (Abb. 4-12). Die Erkennung von murinem TRP2 wurde von [REDACTED], mit dem in Vorarbeiten klonierten dcTCR_ α TRP2 beobachtet und ist im Hinblick auf zukünftige *In vivo*-Experimente im Mausmodell bedeutend [73]. Die Erkennung der hTRP2 exprimierenden MHC-I- und MHC-II-defizienten Ma-Mel-86b_ko^{CIITA} beweist die MHC-Unabhängigkeit beider Rezeptoren (Abb. 4-12).

Die Ergebnisse der Antigenerkennung und lytischen Kapazität des scTCR_ α TRP2 stehen in Einklang mit den Ergebnissen von Voss *et al.* und Knies *et al.* mit vergleichbaren scTCR-Konstrukten [61, 62]. Dabei zeigten zum Beispiel mit dem gegen gp100 gerichteten scTCR (mit zusätzlich koexprimierter muriner konstanter α -Domäne) transduzierte CD8⁺ PBMCs keine Unterlegenheit hinsichtlich der Lyse der verschiedenen Targetzellen im Vergleich zu CD8⁺ PBMCs, die mit dem gegen gp100 gerichteten WT TCR/ dcTCR transduziert wurden [61]. T-Zellen, die mit diesem scTCR transduziert wurden, kontrollierten zudem im *In vivo*-Mausmodell das Wachstum einer gp100⁺ Melanomzelllinie am effektivsten und führten zu einer signifikanten Reduktion der Tumormasse [61]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zumindest *in vitro* gezeigt, dass der scTCR_ α TRP2 dem dcTCR_ α TRP2 in seiner Funktionalität nicht unterlegen ist. Zudem sind auch die Ergebnisse von Voss *et al.* hinsichtlich der Funktionalität von

optimierten scTCR-Konstrukten im *In vivo*-Mausmodell vielversprechend im Hinblick auf den *In vivo*-Einsatz des scTCR_αTRP2.

5.1.4 Die MHC-unabhängige Erkennung des scTCR_αTRP2

Ein bekannter Immunevasionsmechanismus des fortgeschrittenen malignen Melanoms ist der Verlust von MHC-Klasse I-Molekülen und damit das Fehlen jeglicher Präsentation von MHC-Klasse I-abhängigen Antigenen, die relevante Zielstrukturen der immunologischen Tumorabwehr darstellen ^[112]. Der in dieser Arbeit entstandene scTCR erkennt, ebenso wie der dcTCR_αTRP2 ^[73], das in Melanomzellen exprimierte TRP2 MHC-unabhängig, wie mit den in Abb. 4-12 gezeigten Ergebnissen belegt wurde. Die funktionelle Relevanz von TRP2 als Zielstruktur für die zelluläre Immuntherapie wurde in Abschnitt 2.5 bereits erläutert. In Mausexperimenten wurde gezeigt, dass bei kombinierter Checkpoint-Blockade und Vakzinierung mit Melanomzellen eine präferentielle T-Zellantwort gegen TRP2 induziert wird ^[87]. Aktuell werden Therapiestrategien zur Verstärkung oder Auslösung von antitumoralen T-Zellantworten gegen TRP2 bei Patienten entwickelt ^[113, 114]. Bei malignen Gliomen wurde gezeigt, dass unter dem Einfluss von TRP2-reaktiven T-Zellen Tumorzellen sensitiver gegenüber Chemotherapie werden ^[115]. Bei alledem handelte es sich jedoch um MHC-abhängige T-Zellantworten gegen TRP2. Die MHC-unabhängige TRP2-Erkennung, wie sie durch den hier entwickelten scTCR vermittelt wird, würde neue Perspektiven zur Behandlung MHC-negativer, TRP2-tragender Malignome eröffnen.

5.1.5 Die lytische Kapazität CD4⁺ scTCR_αTRP2-transgener PBMCs

Um mögliche Unterschiede in der Erkennung und lytischen Kapazität von TRP2-reaktiven scTCR-transgenen CD8⁺ und CD4⁺ PBMCs zu erfassen, wurden die PBMCs nach Transduktion mittels MACS-Technologie aufgetrennt. Zur Überprüfung der Erkennung von TRP2 und der lytischen Kapazität der isolierten CD8⁺ und CD4⁺ Subpopulationen wurden ein Interferon-γ-ELISpot-Assay und ein ⁵¹Cr-Freisetzungstest durchgeführt. Im Interferon-γ-ELISpot-Assay wurde beobachtet, dass scTCR-transgene CD8⁺ und CD4⁺ PBMCs eine vergleichbar effiziente Targetzellerkennung bewirkten (Abb. 4-13). Zudem wurden B78H1-hTRP2-Zellen durch scTCR-transgene CD4⁺ PBMCs lysiert (Abb. 4-15). Auch Voss *et al.* beobachteten eine Targeterkennung durch p53-reaktive scTCR-transgene CD4⁺ PBMCs im Interferon-γ-ELISpot-Assay ^[61].

Bei CD4⁺ T-Zellen, in der Vergangenheit als Zellen mit einer eher immunregulatorischen Funktion betrachtet, wurde bereits in mehreren Studien zytotoxische Aktivität beobachtet [116-119]. In diesen Studien, wie zum Beispiel in einer Studie von Muranski *et al.* zum adoptiven Transfer von TRP1-reaktiven (engl. *tyrosinase-related protein 1*), TCR-transgenen CD4⁺ T-Zellen, erfolgte die Erkennung und Lyse der Targetzellen jedoch MHC-Klasse-II vermittelt [117]. In der vorliegenden Arbeit wurde demgegenüber eine MHC-unabhängige Erkennung und Lyse von Targetzellen durch CD4⁺ T-Zellen demonstriert. Eine MHC-unabhängige und TCR-vermittelte Lyse wurde auch für CD4⁺ T-Zellen gegen den TRAIL-DR4-Komplex berichtet [24].

CD4⁺ tumorreaktive T-Zellen tragen wesentlich zu immunologischer Tumorkontrolle bei [120, 121]. Es gilt als sehr sicher, dass die Qualität von adoptiv transferierten Zelltherapieprodukten von der Präsenz von CD4⁺ T-Zellen bestimmt wird [122].

Bei einer *In vivo*-Anwendung von scTCR_αTRP2-transgenen T-Zellen wäre sicherlich die Präsenz multifunktionaler TCR-transgener CD4⁺ T-Zellen im Transplantat von Vorteil. Es wird dabei zu überprüfen sein, ob CD4⁺ und CD8⁺ Subpopulationen separat transduziert und vor Anwendung im definierten Verhältnis gemischt werden sollten, oder ob es ausreicht, unseparierte T-Zellpopulationen zu transduzieren. Generell ist neben dem CD4:CD8-Verhältnis auch ein hohes Proliferationspotential von Bedeutung. Letzteres weisen vor allem T-Zellen vom naiven und "central memory" - Phänotyp auf [122].

5.2 Konstruktion und Expression des MHC-unabhängigen TCR-SCS_αTRP2

5.2.1 Konstruktion des MHC-unabhängigen TCR-SCS_αTRP2

Einen zweiten Teil dieser Arbeit bildete die Konstruktion eines TCR-SCS, wie er erstmals von Stone *et al.* als neuer Ansatz für den adoptiven Transfer gentechnisch modifizierter T-Zellen entwickelt wurde (Abschnitt 2.3.2.3) [71]. Ursprünglich sollte dieses Konstrukt die Vorteile von T-Zellrezeptoren und CARs vereinen [71]. In verschiedenen klinischen Studien zum adoptiven Transfer von mit CARs ausgestatteten T-Zellen wurde das große Potenzial und die Wirksamkeit von CARs vor allem bei malignen hämatologischen Erkrankungen bestätigt [123]. Es wird daher

intensiv versucht, zumindest vergleichbare Erfolge mit CAR-Konstrukten oder CAR-ähnlichen Konstrukten bei soliden Tumoren zu erzielen ^[123].

Der im Rahmen dieser Arbeit konstruierte TCR-SCS_αTRP2 wurde nach dem Ansatz von Stone *et al.* konstruiert. Die antigenbindende Domäne des TCR-SCS_αTRP2 bestand aus den über einen Linker verbundenen variablen Domänen des scTCR_αTRP2 (Abb. 4-17). Die "Scharnier"-Domäne sowie der transmembranäre und der intrazelluläre Anteil eines CAR der zweiten Generation entstammten dem Vektor pMK-63.28.z (Abschnitt 3.1.5.3). CD3ζ ist ein fester Bestandteil der intrazellulären Signaldomäne des CAR und bewirkt, dass die Expression des Konstrukts in keiner Weise von endogenem CD3 abhängt. Zudem findet kein "Mispairing" statt, da nur die variablen, jedoch nicht die konstanten Domänen des TCR im TCR-SCS vorhanden sind, an denen es bevorzugt zu Fehlpaarungen mit endogenen TCR-Ketten kommen kann. Ein weiterer Vorteil von CARs und damit auch von TCR-SCS-Konstrukten ist, dass diese nicht nur in T-Zellen, sondern auch in NK-Zellen exprimiert werden können. Dies würde eine beträchtliche Erweiterung des Spektrums genmodifizierbarer Effektor-Subtypen erlauben ^[124].

5.2.2 Evaluation der Expression des MHC-unabhängigen TCR-SCS_αTRP2

Der TCR-SCS_αTRP2 wurde in den Vektor pMX-DEST integriert und zur Überprüfung der Expression retroviral in Jurkat 76-CD8^{hi} und PBMCs transduziert. Durchflusszytometrisch ließ sich in Jurkat 76-CD8^{hi} und in PBMCs jedoch nur eine geringfügige Expression des Transgens nachweisen (4,18 % bzw. 2,24 %, s. Abb. 4-19). Auf DNA- und RNA-Ebene wurde in Jurkat 76-CD8^{hi} die Integration und Transkription des Konstrukts untersucht und nachgewiesen (Abb. 4-20). Eine Evaluation der Funktionalität des hier konstruierten TCR-SCS konnte aufgrund der zu geringen Expression nicht erfolgen.

Der von Stone *et al.* konstruierte TCR-SCS mit hoch-affinen variablen Domänen gegen das Protein SIY, aber ansonsten identischem Aufbau verglichen mit dem TCR-SCS_αTRP2, wurde deutlich stärker auf PBMCs exprimiert. Zudem überstieg die Expression des TCR-SCS von Stone *et al.* auf PBMCs die Expression eines ebenfalls gegen das Protein SIY gerichteten dcTCR um ein Vielfaches. ^[71]

Die Gründe, weshalb für TCR-SCS_αTRP2 eine derart geringe Expression in Jurkat 76-CD8^{hi} und PBMCs erzielt wurde, können vielfältig sein. Eine Ursache dafür könnte in Veränderungen des pMX-Vektors im Rahmen der Transduktion liegen. Um dies zu

überprüfen, wurde der TCR-SCS_αTRP2 in weiterer Arbeit im Vektor pMX-neo in PBMCs transduziert. Dies führte jedoch nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Expression (persönliche Mitteilung [REDACTED], [REDACTED]) (Daten nicht gezeigt). Auch die Transduktion des TCR-SCS_αTRP2 in PBMCs, die aus dem "Buffy Coat" eines zweiten Spenders isoliert wurden, führte nicht zu einer Erhöhung der Expression des Konstrukts (persönliche Mitteilung [REDACTED], [REDACTED]) (Daten nicht gezeigt).

Möglichweise ist die unzureichende Expression des Konstrukts auf eine Instabilität des davon kodierten Konstrukts zurückzuführen. In zahlreichen Studien wurde die Stabilität und hohe Expressionsraten von CAR-Konstrukten bestätigt. Der Vektor pMK-63.28.z, aus dem die in diesem Konstrukt verwendeten CAR-Domänen stammen, trägt den CAR 63.28.z. Bei mit dem CAR 63.28.z transduzierten T-Zellen wurde eine hohe Expression des CAR beobachtet ^[125]. Um herauszufinden, ob durch das Einfügen der variablen TCR-Domänen gegen TRP2 ein instabiles Fusionsprotein generiert wird, ist nur durch proteinchemische Untersuchungen zu klären, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht begonnen wurden.

5.3 Überlegungen zur Immunogenität artifizieller Rezeptoren

Artifizielle Rezeptoren, wie der hier vorgestellte scTCR, können potentiell immunogene Neoepitope enthalten. Durch dagegen gerichtete Immunantworten kann die Persistenz und damit das Wirkungspotential von rezeptormodifizierten Effektoren u.U. stark eingeschränkt werden. Bislang wurden z.B. zelluläre und humorale Immunreaktionen gegen Vektoren, Antibiotikaresistenzgene und Suiziddomänen beschrieben ^[126]. Darüber hinaus ist es denkbar, dass Linkerdomänen und xenogene Domänen im Transgenprodukt selbst relevante Immunantworten auslösen. Es ist davon auszugehen, dass scTCR gegenüber dcTCR generell durch den höheren Anteil an artifiziellen Sequenzen ein erhöhtes Immunogenitätsrisiko aufweist. Das vorliegende Konstrukt enthält neben Linkersequenzen zwischen der humanen variablen TCR α- und β-Domäne murine konstante Regionen, aus denen theoretisch immunogene Peptide prozessiert werden können.

Rezeptormodifizierte Effektoren, die gegen Differenzierungsantigene von Malignomen der Lymphopoese gerichtet sind, wie z.B. CAR-T-Zellen gegen CD19, reduzieren durch Destruktion immunologischer Mediatoren die Wahrscheinlichkeit Rezeptor-

spezifischer Immunantworten. Dies würde für scTCR gegen TRP2 nicht zutreffen. Die potentielle Immunogenität von scTCR gegen TRP2 ließe sich durch vektorfreie Integration mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Technologie [127] und durch komplette Humanisierung des scTCR verringern.

5.4 Ausblick

Trotz der im Rahmen dieser Arbeit nach Voss *et al.* vorgenommenen Optimierungen am scTCR_αTRP2 wurde von Knies *et al.* bei scTCR-Konstrukten mit identischem Aufbau ein residuelles "Mispairing" beobachtet [61, 62]. Durch das Einfügen einer zusätzlichen Disulfidbrücke mittels Cystein-Resten zwischen der variablen Domäne α und dem C-terminalen Ende des Linkers wurde erstmals keinerlei "Mispairing" bei scTCR-Konstrukten beobachtet, sodass dies eine weitere mögliche Optimierung für den hier konstruierten scTCR_αTRP2 darstellt [62].

Die Ergebnisse der Expression und Funktionalität des scTCR_αTRP2 sind vielversprechend, sodass im nächsten Schritt die Funktionalität und auch ein mögliches verbleibendes "Mispairing" des Konstrukts im *In vivo*-Mausmodell in weiterer Arbeit analysiert werden kann. Hierfür bietet sich der immundefiziente Mausstamm NOD/SCID/IL-2Rgamma(null) an, welcher mit der HLA-Klasse I/II-defizienten Melanomzelllinie Ma-Mel-86b_ko^{CIITA}, die humanes TRP2 endogen exprimiert, xenotransplantiert werden kann. Darüber hinaus könnte als syngenes Tumor-Maus-Modell der Mausstamm C67BL/6 nach Transplantation von syngenem B78H1-Tumorzellen, die murines TRP2 exprimieren, zum Einsatz kommen. Bei letzterem Modell würden autologe murine PBMCs mit dem Konstrukt scTCR_αTRP2 transduziert werden. Mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems könnte die Expression endogener TCR-Ketten in humanen PBMCs, für den Mausstamm NOD/SCID/IL-2Rgamma(null), und in murinen PBMCs, für den Mausstamm C57BL/6, unterdrückt und diese mit dem Konstrukt scTCR_αTRP2 transduziert werden. In einem Vergleich mit nicht mit der CRISPR/Cas9-Methode behandelten und ebenfalls mit dem scTCR_αTRP2-Konstrukt transduzierten PBMCs wäre im Tumor-Maus-Modell eine Überprüfung der durch potentiell "Mispairing" verursachten "off-target/off-tumor"-Toxizität möglich.

Des Weiteren gibt es im Hinblick auf die therapeutische Anwendung im Menschen die Möglichkeit, statt vollständig murinen, minimal murinisierte konstante Domänen zu

verwenden, um das Risiko möglicher Xenoreaktivität weiter zu reduzieren^[128]. Um die Sicherheit des scTCR_αTRP2 bei *In vivo*-Experimenten weiter zu erhöhen, besteht auch die Möglichkeit in scTCR_αTRP2-transgene T-Zellen Suizidgene zu transduzieren, um diese, beim Auftreten von Autoimmunreaktionen, selektiv eliminieren zu können. Hierfür gibt es unterschiedliche Ansätze^[129].

Um die fehlende Expression der TCR-SCS_αTRP2-transgenen Jurkat 76-CD8^{hi} und PBMCs zu analysieren, wird in weiterer Arbeit eine intrazelluläre Durchflusszytometrie erfolgen. Um weiter die Struktur und Stabilität des Konstrukts zu analysieren, wurde zudem die Möglichkeit einer Proteinkristallisation diskutiert.

6 Zusammenfassung

Im Blut der Melanompatientin Ma-Mel-86 mit HLA-negativer Erkrankung wurden in Vorarbeiten CD8⁺ zytotoxische T-Zellen entdeckt, die α/β -T-Zellrezeptoren (TCR) trugen und autologe Melanomzellen HLA-unabhängig lysierten. Ein Teil von ihnen erkannte TRP2 (engl. *tyrosinase-related protein 2*) als intaktes Molekül auf der Zellmembran. Die α - und die β -Kette des TCR eines der TRP2-reaktiven T-Zellklone, CTL2C/417, wurden in einen bicistronischen retroviralen Vektor kloniert. Dieser dcTCR (engl. *double-chain T cell receptor*) reagierte mit humanem und murinem TRP2. Beim adoptiven Transfer von dcTCR-modifizierten T-Lymphozyten wurden in der Vergangenheit Fehlpaarungen mit endogenen TCR-Ketten beobachtet, die zu "off-target/off-tumor"-Toxizität und damit potentiell zu Autoimmunreaktionen führten. Um die Gefahr eines solchen "Mispairing" weitestgehend zu reduzieren, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit analog zu dem von Voss *et al.* [61] und Knies *et al.* [62] beschriebenen Vorgehen ein gegen TRP2 gerichteter scTCR (engl. *single-chain T cell receptor*) generiert. Er besteht aus den humanen variablen Domänen (hV) des originalen dcTCR, die über einen 19 Aminosäuren langen, Glycin/Serin-reichen Linker (Li) mit kodonoptimierten murinen konstanten α - und β -Domänen (mC) kovalent verbunden sind. In die mC-Regionen wurden Cystein-Moleküle für eine zweite stabilisierende Disulfidbrücke eingebaut. Das fertige scTCR-Konstrukt hV α -Li-hV β -mC β -F2A-mC α wurde in den retroviralen Vektor pMX-DEST kloniert. Jurkat 76-CD8^{hi}-Zellen und PBMCs (engl. *peripheral blood mononuclear cells*) gesunder Spender wurden mit dem scTCR und dem dcTCR gegen TRP2 transduziert. Die Expression beider Rezeptoren wurde durchflusszytometrisch verifiziert. Erfolgreich transduzierte Blutlymphozyten wurden durch Stimulation mit TRP2⁺ Tumorzellen expandiert. Rezeptortragende CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen erkannten in IFN γ -ELISPOT-Assays TRP2⁺ autologe und allogene Melanomzellen sowie humanes und murines TRP2 nach Transfektion in allogene und xenogene Zellen. Der scTCR erwies sich hinsichtlich seiner Funktionalität dem dcTCR sowohl in ELISPOT- als auch in Zytotoxizitäts-Assays als ebenbürtig. Im Weiteren soll der gegen TRP2 gerichtete scTCR in präklinischen Mausmodellen auf seine Funktionalität und Toxizität überprüft werden.

7 Literaturverzeichnis

1. McCourt, C., O. Dolan, and G. Gormley, *Malignant melanoma: a pictorial review*. *Ulster Med J*, 2014. **83**(2): p. 103-10.
2. Farma, J.M., N. Kulkarni, and C. Hsu, *Surgical management of primary and recurrent melanoma*. *Surg Oncol Clin N Am*, 2015. **24**(2): p. 239-47.
3. Bandarchi, B., et al., *Molecular biology of normal melanocytes and melanoma cells*. *J Clin Pathol*, 2013. **66**(8): p. 644-8.
4. Zivot, M.L. and I.O. Kanat, *Malignant melanoma. A clinical and surgical review. Part I: Introduction and general discussion*. *J Am Podiatr Med Assoc*, 1989. **79**(8): p. 367-74.
5. Herzberg, B. and D.E. Fisher, *Metastatic melanoma and immunotherapy*. *Clin Immunol*, 2016.
6. Miller, J.F. and M. Sadelain, *The journey from discoveries in fundamental immunology to cancer immunotherapy*. *Cancer Cell*, 2015. **27**(4): p. 439-49.
7. Dudley, M.E., et al., *Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes*. *Science*, 2002. **298**(5594): p. 850-4.
8. Murphy, K. and C. Weaver, *Janeway's immunobiology*. 9th edition. ed. 2016, New York, NY: Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC. xx, 904 pages.
9. Dzhagalov, I. and H. Phee, *How to find your way through the thymus: a practical guide for aspiring T cells*. *Cell Mol Life Sci*, 2012. **69**(5): p. 663-82.
10. Lawand, M., J. Dechanet-Merville, and M.C. Dieu-Nosjean, *Key Features of Gamma-Delta T-Cell Subsets in Human Diseases and Their Immunotherapeutic Implications*. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 761.
11. Garcia, K.C., L. Teyton, and I.A. Wilson, *Structural basis of T cell recognition*. *Annu Rev Immunol*, 1999. **17**: p. 369-97.
12. Lefranc, M.P., *Immunoinformatics of the V, C, and G domains: IMGT(R) definitive system for IG, TR and IgSF, MH, and MhSF*. *Methods Mol Biol*, 2014. **1184**: p. 59-107.
13. Vohr, H.-W., *Encyclopedia of Immunotoxicology*. 2015: p. 208-209.
14. Call, M.E., et al., *The structure of the zeta-zeta transmembrane dimer reveals features essential for its assembly with the T cell receptor*. *Cell*, 2006. **127**(2): p. 355-68.
15. van der Merwe, P.A. and O. Dushek, *Mechanisms for T cell receptor triggering*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(1): p. 47-55.
16. Esensten, J.H., et al., *CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy*. *Immunity*, 2016. **44**(5): p. 973-88.
17. Murphy, K.M., *Janeway's Immunobiology, Eighth Edition*. 2012. 888.
18. Goldberg, A.C. and L.V. Rizzo, *MHC structure and function - antigen presentation. Part 1*. Einstein (Sao Paulo), 2015. **13**(1): p. 153-6.
19. Goldberg, A.C. and L.V. Rizzo, *MHC structure and function - antigen presentation. Part 2*. Einstein (Sao Paulo), 2015. **13**(1): p. 157-62.
20. Tikhonova, A.N., et al., *alphabeta T cell receptors that do not undergo major histocompatibility complex-specific thymic selection possess antibody-like recognition specificities*. *Immunity*, 2012. **36**(1): p. 79-91.
21. Sponaas, A.M., B. Loveland, and E. Simpson, *MHC-unrestricted T-cell cytotoxicity against tumour cells*. *Immunology*, 1988. **63**(2): p. 233-9.

22. Barnd, D.L., et al., *Specific, major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(18): p. 7159-63.
23. Wang, Q.J., K. Hanada, and J.C. Yang, *Characterization of a novel nonclassical T cell clone with broad reactivity against human renal cell carcinomas*. J Immunol, 2008. **181**(6): p. 3769-76.
24. Hanada, K., et al., *Molecular identification of an MHC-independent ligand recognized by a human $\{\alpha\}/\{\beta\}$ T-cell receptor*. Blood, 2011. **117**(18): p. 4816-25.
25. Coulie, P.G., et al., *Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(2): p. 135-46.
26. Tran, E., et al., *T-Cell Transfer Therapy Targeting Mutant KRAS in Cancer*. N Engl J Med, 2016. **375**(23): p. 2255-2262.
27. Joyce, J.A. and D.T. Fearon, *T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment*. Science, 2015. **348**(6230): p. 74-80.
28. Garrido, F., et al., *Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours*. Immunol Today, 1997. **18**(2): p. 89-95.
29. McGranahan, N., et al., *Allele-Specific HLA Loss and Immune Escape in Lung Cancer Evolution*. Cell, 2017. **171**(6): p. 1259-1271 e11.
30. Chen, D.S. and I. Mellman, *Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle*. Immunity, 2013. **39**(1): p. 1-10.
31. Ribas, A. and J.D. Wolchok, *Cancer immunotherapy using checkpoint blockade*. Science, 2018. **359**(6382): p. 1350-1355.
32. Chen, D.S. and I. Mellman, *Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point*. Nature, 2017. **541**(7637): p. 321-330.
33. Blank, C.U., et al., *CANCER IMMUNOLOGY. The "cancer immunogram"*. Science, 2016. **352**(6286): p. 658-60.
34. Cogdill, A.P., M.C. Andrews, and J.A. Wargo, *Hallmarks of response to immune checkpoint blockade*. Br J Cancer, 2017. **117**(1): p. 1-7.
35. Fousek, K. and N. Ahmed, *The Evolution of T-cell Therapies for Solid Malignancies*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(15): p. 3384-92.
36. Tran, E., et al., *Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer*. Science, 2014. **344**(6184): p. 641-5.
37. Shen, X., et al., *Persistence of tumor infiltrating lymphocytes in adoptive immunotherapy correlates with telomere length*. J Immunother, 2007. **30**(1): p. 123-9.
38. Houot, R., et al., *T-cell-based Immunotherapy: Adoptive Cell Transfer and Checkpoint Inhibition*. Cancer Immunol Res, 2015. **3**(10): p. 1115-22.
39. Morgan, R.A., et al., *Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes*. Science, 2006. **314**(5796): p. 126-9.
40. Johnson, L.A., et al., *Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen*. Blood, 2009. **114**(3): p. 535-46.
41. Linette, G.P., et al., *Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma*. Blood, 2013. **122**(6): p. 863-71.
42. Morgan, R.A., et al., *Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy*. J Immunother, 2013. **36**(2): p. 133-51.
43. Robbins, P.F., et al., *A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(5): p. 1019-27.

44. Rapoport, A.P., et al., *NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma*. *Nat Med*, 2015. **21**(8): p. 914-921.
45. D'Angelo, S.P., et al., *Antitumor Activity Associated with Prolonged Persistence of Adoptively Transferred NY-ESO-1 (c259)T Cells in Synovial Sarcoma*. *Cancer Discov*, 2018. **8**(8): p. 944-957.
46. Center, J.C.C. *Gene-Modified T Cells, Vaccine Therapy, and Nivolumab in Treating Patients With Stage IV or Locally Advanced Solid Tumors Expressing NY-ESO-1 (NYM)*, Identifier: NCT02775292. 2016; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02775292>.
47. University Health Network, T.I.N. *Study of TBI-1301 (NY-ESO-1 Specific TCR Gene Transduced Autologous T Lymphocytes) in Patients With Solid Tumors*. 2016; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02869217>.
48. Kite, A.G.C., *Safety and Efficacy of MAGE-A3/A6 T Cell Receptor Engineered T Cells (KITE-718) in HLA-DPB1*04:01 Positive Adults With Advanced Cancers; Identifier: NCT03139370*. 2017.
49. Bendle, G.M., et al., *Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy*. *Nat Med*, 2010. **16**(5): p. 565-70, 1p following 570.
50. van Loenen, M.M., et al., *Mixed T cell receptor dimers harbor potentially harmful neoreactivity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(24): p. 10972-7.
51. Echchannaoui, H., et al., *A Potent Tumor-Reactive p53-Specific Single-Chain TCR without On- or Off-Target Autoimmunity In Vivo*. *Mol Ther*, 2019. **27**(1): p. 261-271.
52. Scholten, K.B., et al., *Codon modification of T cell receptors allows enhanced functional expression in transgenic human T cells*. *Clin Immunol*, 2006. **119**(2): p. 135-45.
53. Banu, N., et al., *Building and optimizing a virus-specific T cell receptor library for targeted immunotherapy in viral infections*. *Sci Rep*, 2014. **4**: p. 4166.
54. Chng, J., et al., *Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells*. *MAbs*, 2015. **7**(2): p. 403-12.
55. Szymczak, A.L., et al., *Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector*. *Nat Biotechnol*, 2004. **22**(5): p. 589-94.
56. Essand, M. and A.S. Loskog, *Genetically engineered T cells for the treatment of cancer*. *J Intern Med*, 2013. **273**(2): p. 166-81.
57. Spear, T.T., K. Nagato, and M.I. Nishimura, *Strategies to genetically engineer T cells for cancer immunotherapy*. *Cancer Immunol Immunother*, 2016. **65**(6): p. 631-49.
58. Kuball, J., et al., *Facilitating matched pairing and expression of TCR chains introduced into human T cells*. *Blood*, 2007. **109**(6): p. 2331-8.
59. Willemsen, R.A., et al., *Grafting primary human T lymphocytes with cancer-specific chimeric single chain and two chain TCR*. *Gene Ther*, 2000. **7**(16): p. 1369-77.
60. Hoo, W.F., et al., *Characterization of a single-chain T-cell receptor expressed in Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(10): p. 4759-63.
61. Voss, R.H., et al., *Coexpression of the T-cell receptor constant alpha domain triggers tumor reactivity of single-chain TCR-transduced human T cells*. *Blood*, 2010. **115**(25): p. 5154-63.

62. Knies, D., et al., *An optimized single chain TCR scaffold relying on the assembly with the native CD3-complex prevents residual mispairing with endogenous TCRs in human T-cells*. *Oncotarget*, 2016. **7**(16): p. 21199-221.
63. Abate-Daga, D. and M.L. Davila, *CAR models: next-generation CAR modifications for enhanced T-cell function*. *Mol Ther Oncolytics*, 2016. **3**: p. 16014.
64. Dai, H., et al., *Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy*. *J Natl Cancer Inst*, 2016. **108**(7).
65. Echchannaoui H, D.K., Theobald M, *Adoptiver Immuntransfer und CAR-T-Zellen bei malignen Erkrankungen*. *Der Onkologe*, 2017.
66. Yu, W.L. and Z.C. Hua, *Chimeric Antigen Receptor T-cell (CAR T) Therapy for Hematologic and Solid Malignancies: Efficacy and Safety-A Systematic Review with Meta-Analysis*. *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(1).
67. Morgan, R.A., et al., *Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2*. *Mol Ther*, 2010. **18**(4): p. 843-51.
68. Lamers, C.H., et al., *Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity*. *Mol Ther*, 2013. **21**(4): p. 904-12.
69. D'Aloia, M.M., et al., *CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors*. *Cell Death Dis*, 2018. **9**(3): p. 282.
70. Klebanoff, C.A., S.A. Rosenberg, and N.P. Restifo, *Prospects for gene-engineered T cell immunotherapy for solid cancers*. *Nat Med*, 2016. **22**(1): p. 26-36.
71. Stone, J.D., et al., *A novel T cell receptor single-chain signaling complex mediates antigen-specific T cell activity and tumor control*. *Cancer Immunol Immunother*, 2014. **63**(11): p. 1163-76.
72. Schrors, B., et al., *HLA class I loss in metachronous metastases prevents continuous T cell recognition of mutated neoantigens in a human melanoma model*. *Oncotarget*, 2017. **8**(17): p. 28312-28327.
73. Lübcke, S., *Identifizierung und Charakterisierung T-zellerkannter Tumorantigene im Melanommodell MA-MEL-86*, in *Fachbereich Biologie*. 2012, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. p. 163.
74. Meyer, L., *Optimierung des HLA-unabhängigen Tyrosinase-Related-Protein 2 (TRP-2)-spezifischen T-Zellrezeptors*, in *Fachbereich 04: Universitätsmedizin, Institut für Molekulare Medizin*. 2015, Johannes Gutenberg-Universität Mainz: Mainz. p. 90.
75. Olivares, C. and F. Solano, *New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins*. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2009. **22**(6): p. 750-60.
76. Wang, R.F., et al., *Identification of TRP-2 as a human tumor antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes*. *J Exp Med*, 1996. **184**(6): p. 2207-16.
77. Negroiu, G., R.A. Dwek, and S.M. Petrescu, *Tyrosinase-related protein-2 and -1 are trafficked on distinct routes in B16 melanoma cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **328**(4): p. 914-21.
78. del Marmol, V. and F. Beermann, *Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation*. *FEBS Lett*, 1996. **381**(3): p. 165-8.
79. Nishioka, E., et al., *Expression of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in ultraviolet-irradiated human melanomas and melanocytes: TRP-2 protects melanoma cells from ultraviolet B induced apoptosis*. *Melanoma Res*, 1999. **9**(5): p. 433-43.

80. Negroiu, G., R.A. Dwek, and S.M. Petrescu, *The inhibition of early N-glycan processing targets TRP-2 to degradation in B16 melanoma cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(29): p. 27035-42.
81. Tsukamoto, K., et al., *A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase*. EMBO J, 1992. **11**(2): p. 519-26.
82. Cassady, J.L. and R.A. Sturm, *Sequence of the human dopachrome tautomerase-encoding TRP-2 cDNA*. Gene, 1994. **143**(2): p. 295-8.
83. Sendoel, A., et al., *HIF-1 antagonizes p53-mediated apoptosis through a secreted neuronal tyrosinase*. Nature, 2010. **465**(7298): p. 577-83.
84. Chu, W., et al., *Tyrosinase-related protein 2 as a mediator of melanoma specific resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II): therapeutic implications*. Oncogene, 2000. **19**(3): p. 395-402.
85. Pak, B.J., et al., *Radiation resistance of human melanoma analysed by retroviral insertional mutagenesis reveals a possible role for dopachrome tautomerase*. Oncogene, 2004. **23**(1): p. 30-8.
86. Bouchard, B., et al., *Molecular characterization of a human tyrosinase-related-protein-2 cDNA. Patterns of expression in melanocytic cells*. Eur J Biochem, 1994. **219**(1-2): p. 127-34.
87. van Elsas, A., et al., *Elucidating the autoimmune and antitumor effector mechanisms of a treatment based on cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade in combination with a B16 melanoma vaccine: comparison of prophylaxis and therapy*. J Exp Med, 2001. **194**(4): p. 481-9.
88. Paschen, A., et al., *Detection of spontaneous CD4+ T-cell responses in melanoma patients against a tyrosinase-related protein-2-derived epitope identified in HLA-DRB1*0301 transgenic mice*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(14): p. 5241-7.
89. Parham, P., C.J. Barnstable, and W.F. Bodmer, *Use of a monoclonal antibody (W6/32) in structural studies of HLA-A,B,C, antigens*. J Immunol, 1979. **123**(1): p. 342-9.
90. Weijtens, M.E., et al., *A retroviral vector system 'STITCH' in combination with an optimized single chain antibody chimeric receptor gene structure allows efficient gene transduction and expression in human T lymphocytes*. Gene Ther, 1998. **5**(9): p. 1195-203.
91. Kuemmerle, H.P., et al., *Fosmidomycin: a new phosphonic acid antibiotic. Part I: Phase I tolerance studies*. Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol, 1985. **23**(10): p. 515-20.
92. Graf, L.H., Jr., P. Kaplan, and S. Silagi, *Efficient DNA-mediated transfer of selectable genes and unselected sequences into differentiated and undifferentiated mouse melanoma clones*. Somat Cell Mol Genet, 1984. **10**(2): p. 139-51.
93. Chiang, E.Y., M. Henson, and I. Stroynowski, *Correction of defects responsible for impaired Qa-2 class Ib MHC expression on melanoma cells protects mice from tumor growth*. J Immunol, 2003. **170**(9): p. 4515-23.
94. Nanni, P., et al., *Interleukin 12 gene therapy of MHC-negative murine melanoma metastases*. Cancer Res, 1998. **58**(6): p. 1225-30.
95. Schneider, U., H.U. Schwenk, and G. Bornkamm, *Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma*. Int J Cancer, 1977. **19**(5): p. 621-6.

96. Heemskerk, M.H., et al., *Redirection of antileukemic reactivity of peripheral T lymphocytes using gene transfer of minor histocompatibility antigen HA-2-specific T-cell receptor complexes expressing a conserved alpha joining region*. Blood, 2003. **102**(10): p. 3530-40.
97. Derigs, P., *Erfassung HLA-unabhängiger, antitumoraler T-Zellantworten durch Stimulation mit menschlichen HLA I/II-negativen Tumorzelllinien im Blut von Melanompatienten*. 2018, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. p. 155.
98. G.P., N. *Phoenix helper-free retrovirus producer lines*. Available from: http://web.stanford.edu/group/nolan/_OldWebsite/retroviral_systems/phx.html.
99. Luo, W.G., et al., *Simultaneous splicing of multiple DNA fragments in one PCR reaction*. Biol Proced Online, 2013. **15**(1): p. 9.
100. Katzen, F., *Gateway® recombinational cloning: a biological operating system*. Expert Opinion on Drug Discovery, 2007. **2**(4): p. 571-589.
101. Davis, H.E., J.R. Morgan, and M.L. Yarmush, *Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes*. Biophys Chem, 2002. **97**(2-3): p. 159-72.
102. Tsoukas, C.D., et al., *Lymphocyte mitogenesis induced by monoclonal antibodies to the T3 complex. Differential modulation by human IgG*. Cell Immunol, 1984. **89**(1): p. 66-74.
103. Smith, K.A., *Interleukin-2: inception, impact, and implications*. Science, 1988. **240**(4856): p. 1169-76.
104. Czerkinsky, C., et al., *Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells*. J Immunol Methods, 1988. **110**(1): p. 29-36.
105. Schumacher, T.N., *T-cell-receptor gene therapy*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(7): p. 512-9.
106. Chung, S., et al., *Functional three-domain single-chain T-cell receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(26): p. 12654-8.
107. Aggen, D.H., et al., *Single-chain ValphaVbeta T-cell receptors function without mispairing with endogenous TCR chains*. Gene Ther, 2012. **19**(4): p. 365-74.
108. Cohen, C.J., et al., *Enhanced antitumor activity of murine-human hybrid T-cell receptor (TCR) in human lymphocytes is associated with improved pairing and TCR/CD3 stability*. Cancer Res, 2006. **66**(17): p. 8878-86.
109. Heemskerk, M.H., et al., *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*. Blood, 2007. **109**(1): p. 235-43.
110. Eyquem, J., et al., *Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection*. Nature, 2017. **543**(7643): p. 113-117.
111. Knipping, F., et al., *Genome-wide Specificity of Highly Efficient TALENs and CRISPR/Cas9 for T Cell Receptor Modification*. Molecular therapy. Methods & clinical development, 2017. **4**: p. 213-224.
112. Ferrone, S. and F.M. Marincola, *Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance*. Immunol Today, 1995. **16**(10): p. 487-94.
113. Patel, P.M., et al., *Targeting gp100 and TRP-2 with a DNA vaccine: Incorporating T cell epitopes with a human IgG1 antibody induces potent T cell responses that are associated with favourable clinical outcome in a phase I/II trial*. Oncoimmunology, 2018. **7**(6): p. e1433516.

114. Grees, M., et al., *Optimized dendritic cell vaccination induces potent CD8 T cell responses and anti-tumor effects in transgenic mouse melanoma models*. Oncoimmunology, 2018. **7**(7): p. e1445457.
115. Liu, G., et al., *Cytotoxic T cell targeting of TRP-2 sensitizes human malignant glioma to chemotherapy*. Oncogene, 2005. **24**(33): p. 5226-34.
116. Quezada, S.A., et al., *Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts*. J Exp Med, 2010. **207**(3): p. 637-50.
117. Muranski, P., et al., *Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma*. Blood, 2008. **112**(2): p. 362-73.
118. Fujiwara, H., et al., *The role of tumor-specific Lyt-1+2- T cells in eradicating tumor cells in vivo. I. Lyt-1+2- T cells do not necessarily require recruitment of host's cytotoxic T cell precursors for implementation of in vivo immunity*. J Immunol, 1984. **133**(3): p. 1671-6.
119. Xie, Y., et al., *Naive tumor-specific CD4(+) T cells differentiated in vivo eradicate established melanoma*. J Exp Med, 2010. **207**(3): p. 651-67.
120. Matsuzaki, J., et al., *Direct tumor recognition by a human CD4(+) T-cell subset potently mediates tumor growth inhibition and orchestrates anti-tumor immune responses*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 14896.
121. Ostroumov, D., et al., *CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2018. **75**(4): p. 689-713.
122. Sommermeyer, D., et al., *Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo*. Leukemia, 2016. **30**(2): p. 492-500.
123. June, C.H., et al., *CAR T cell immunotherapy for human cancer*. Science, 2018. **359**(6382): p. 1361-1365.
124. Mehta, R.S. and K. Rezvani, *Chimeric Antigen Receptor Expressing Natural Killer Cells for the Immunotherapy of Cancer*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 283.
125. Oelsner, S., et al., *Chimeric antigen receptor-engineered cytokine-induced killer cells overcome treatment resistance of pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia and enhance survival*. International Journal of Cancer, 2016. **139**(8): p. 1799-1809.
126. Davda, J., et al., *Immunogenicity of immunomodulatory, antibody-based, oncology therapeutics*. J Immunother Cancer, 2019. **7**(1): p. 105.
127. Roth, T.L., et al., *Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting*. Nature, 2018. **559**(7714): p. 405-409.
128. Sommermeyer, D. and W. Uckert, *Minimal amino acid exchange in human TCR constant regions fosters improved function of TCR gene-modified T cells*. J Immunol, 2010. **184**(11): p. 6223-31.
129. Jones, B.S., et al., *Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer*. Front Pharmacol, 2014. **5**: p. 254.
130. InvitrogenTM. *pDONRTM221*. Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/vectors/pdonr221_pdonr221_map.pdf.
131. Soneoka, Y., et al., *A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(4): p. 628-33.

8 Anhang

8.1 cDNA- und Aminosäuresequenzen der TCR-Konstrukte

8.1.1 cDNA- und Aminosäuresequenz des scTCR_αTRP2-Konstrukts

cDNA-Sequenz scTCR_αTRP2

```

hVα ———|ATGGCCTCTGCACCCATCTCGATGCTTGCATGCTCTTCACATTGAGTGGGCTGAGA
          GCTCAGTCAGTGGCTCAGCCGGAAGATCAGGTCAACGTTGCTGAAGGGAATCCTCT
          GACTGTGAAATGCACCTATTAGTCTCTGGAAACCCTTATCTTTTTGGTATGTTCAAT
          ACCCAACCGAGGCCTCCAGTTCTTCTGAAATACATCACAGGGGATAACCTGGTTA
          AAGGCAGCTATGGCTTTGAAGCTGAATTTAACAAGAGCCAAACCTCCTTCCACCTGA
          AGAAACCATCTGCCCTTGTGAGCGACTCCGCTTTGTACTTCTGTGCTGTGAGAGACA
          TGATAGAGGGAGGAGAAACAAACTCACCTTTGGGACAGGCACCTAGCTAAAAGTG
Linker ———|GAACTCAATATCCAG|GCACCCAGCGGCAGCAGCGGCTCTGGCAGCGGCGGAAGCGG
SL7 ———|CAGCGGAGGGGGCGGA|GTAGATGTGAAAGTAACCCAGAGCTCGAGATATCTAGTCA
hVβ ———|AAAGGACGGGAGAGAAAGTTTTTCTGGAATGTGTCCAGGATATGGACCATGAAAATA
          TGTCTGGTATCGACAAGACCCAGGTCTGGGGCTACGGCTGATCTATTTCTCATATG
          ATGTTAAAATGAAAGAAAAAGGAGATATTCCTGAGGGGTACAGTGTCTCTAGAGAGA
          AGAAGGAGCGCTTCTCCCTGATTCTGGAGTCCGCCAGCACCAACCAGACATCTATGT
          ACCTCTGTGCCAGCAGTCGACAGGGGGCGGTCCGGCAGCCCCAGCATTGTTGGTGTG
          GGGACTCGACTCTCCATCCTA|GAGGACCTGCGGAACGTGACCCCCCAAGGTGTC
mCβ ———|CCTGTTTCGAGCCCAGCAAGGCCGAGATCGCCAACAAGCAGAAA GCCACCCCTGGTGT
          GCCTGGCCAGGGGCTTCTTCCCCGACCACGTGGAGCTGTCTTG GTGGGTGAACGG
          CAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCTGCACCCAGCCCCAGGCCTACAAAGAGAGCAACT
          ACAGTACTGCCTGTCTCCCGGCTGCGGGTGTCCGCCACCTTCTGGCACAACCCC
          CGGAACCACTTCCGGTGCCAGGTGCAGTTCCACGGCCTGAGCGAAGAGGACAAGTG
          GCCCGAGGGCAGCCCCAAGCCCGTGACCCAGAACATCTCCGCCGAGGCCTGGGGC
          AGAGCCGACTGCGGCATCACCAGCGCCAGCTACCACCAGGGC GTGCTGTCTGCCA
          CCATCCTGTACGAGATCCTGTGTTGGCAAGGCCACACTGTACGCCGTGCTGGTGTCC
          GGCCTGGTGTGATGGCCATGGTGAAGAAAAAAGAAATTCTG|TGAACAGACTTTGAAT
F2A ———|TTTGACCTTCTCAAGTTGGCCGGAGAGCTGGAGTCCAACCCC GGGCC|ATGGAGCG
mCα ———|GCTGCTGTGCAGCCTGCTGGCCTGCTGTGTGCACCCAGGTGTGC TGGGTGAAAGGC
          CAGAATCCTGAACCTGCCGTGTATCAGCTGAAAGATCCCCGGTCCCAGGATCCACA
          CTGTGTCTGTTTACCGATTTTGATTCCCAGATTAATGTGCCTAAAA CAATGGAATCCG
          GGACCTTTATCACCGACAAATGTGTGCTGGATATGAAAGCCATGGATTCCAAGAGCA
          ATGGGGCCATTGCCCTGTAATCAGACATCCTTACATGCCAGGATATCTTTAAAGA
          AACCAATGCCACATACCCCTCCTCCGATGTGCCCTGTGAT GCCACACTGACAGAAAA
          GTCCTTCGAAACCGATATGAATCTGAATTTTCAGAATCTGTCTG TGATGGGGCTGCG
          GATTCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGGTTAATCTGCTGATGACACTGAGACTGTGGAG
          CAGCTGA

```

Aminosäure-Sequenz scTCR_αTRP2

```

hVα ———|MASAPISMLAMFLTSLGLRAQSVAPEDQVNVAEGNPLTVKCTYSVSGNPYLFWY
          VQYPNRGLQFLLYITGDNLVKGSYGFEEFNKQTSFHLKKSALVSDSALYFCA
Linker SL7 ———|VRDMIEGGGNKLTFGTGTQLKVELNIQ|GTSGSSGSGSGSGSGSGGGG|VDVKVTQS
hVβ ———|SRYLVKRTGEKVFLECVQDMHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIP
          EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSRQGAVGQPQHFGDGLRSLI|ED
mCβ ———|LRNVTTPKVSLEFPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVC
          TDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPVPRNHFRQVQFHGLSEEDKWPEGSP
          KPVTQNISAEAWGRADCGITSASYHQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSGLVLMAM
F2A ———|VKKKNS|VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP|MERLLCSLLGLLCTQVCWVK GQNPEP
mCα ———|AVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNQAI
          AWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLFQNLVSMGLRIL
          LLKVAGFNLLMTLRLWSS

```

Abb. 8-1: cDNA- und Aminosäuresequenz des scTCR_αTRP2-Konstrukts. F2A: Furin-2A-Sequenz; hVα/β: humane variable Domäne α/β des dcTCR_αTRP2; mCα/β: murine konstante Domäne α/β von pGMP_93.

8.1.2 cDNA- und Aminosäuresequenz des TCR-SCS_αTRP2-Konstrukts

cDNA-Sequenz TCR-SCS_αTRP2

```

hVa ———|ATGGCCTCTGCACCCATCTCGATGCTTGCATGCTCTTCACATTGAGTGGGCTGAGA
          GCTCAGTCAGTGGCTCAGCCGGAAGATCAGGTCAACGTTGCTGAAGGGAATCCTCT
          GACTGTGAAATGCACCTATTAGTCTCTGAAACCCTTATCTTTTTTGGTATGTTCAAT
          ACCCCAACCGAGGCCTCCAGTTCTTCTGAAATACATCACAGGGGATAACCTGGTTA
          AAGGCAGCTATGGCTTTGAAGCTGAATTTAAACAAGAGCCAAACCTCCTTCCACCTGA
          AGAAACCATCTGCCCTTGTGAGCGACTCCGCTTTGTACTTCTGTGCTGTGAGAGACA
          TGATAGGGGAGGAGAAACAACACTACCTTTGGGACAGGCCTCAGCTAAAAGTG
Linker ———|GAATCAATATCCAGGCACCCAGCGGCAGCAGCGGCTCTGGCAGCGGCGGAAGCGG
SL7 ———|CAGCGGAGGGGGCGGAGTAGATGTGAAAGTAACCCAGAGCTCGAGATATCTAGTCA
hVβ ———|AAAGGACGGGAGAGAAAGTTTTTCTGGAATGTGTCCAGGATATGGACCATGAAAATA
          TGTTCTGGTATCGACAAGACCCAGGTCTGGGGCTACGGCTGATCTATTTCTCATATG
          ATGTTAAAATGAAAGAAAAAGGAGATATTCCTGAGGGGTACAGTGTCTCTAGAGAGA
          AGAAGGAGCGCTTCTCCCTGATTCTGGAGTCCGCCAGCACCAACAGACATCTATGT
          ACCTCTGTGCCAGCAGTCGACAGGGGGCGGTCGGGCAGCCCCAGCATTGTTGGTGTAT
          GGGACTCGACTCTCCATCCTAGAGCAGAAGCTGATCTCCGAAGAGGACCTGGCCCT
MycTag ———|GAGCAACAGCATCATGTACTTCAGCCACTTCGTGCCCGTGTTCCTGCCCGCAAGCC
          TACCACAACCCCTGCCCTAGACCTCCTACCCAGCCCCTACAATCGCCAGCCAGC
CD8α ———|CTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGACCTGCTGCTGGCGGAGCTGTGCATACC
          AGGGGCTGGAGCAGCCCTTCTGGGTGCTGGTCTGGTCTGGCGGAGTGTGTCCT
CD28 ———|GTTACAGCCTGCTGGTCACCGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTCCGCAGCAAGCGGA
          GCCGGCTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCAAGGCGGCCAGGCCCCAC
          CCGGAAGCACTACCAGCCCTATGCCCTCCTAGGGACTTCGCCCGCTACCGGTCCGA
CD3ζ ———|GAGTGAAGTTCAGCCGCAGCGCCGACGCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCA
          GCTGTACAACGAGCTGAACCTGGCGAGCGGGAGGAATACGACGTGCTGGACAAG
          CGCAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCAGGCGGAAGAACCCCCAGG
          AAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATC
          GGCATGAAGGGCGAGCGGCGACGCGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTACCAGGGC
          CTGTCCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCACC
          TAGATAA
  
```

Aminosäure-Sequenz TCR-SCS_αTRP2

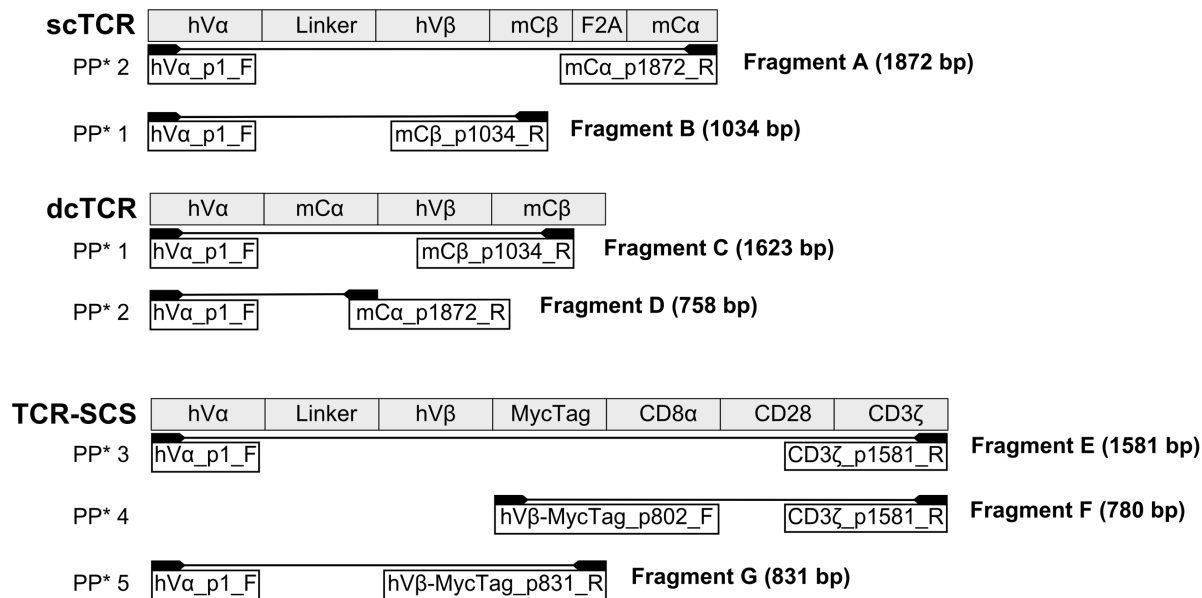
```

hVa ———|MASAPISMLAMLF T L SGLRAQSV AQPEDQVNVAEGNPLTVKCTYSVSGNPYLFWY
          VQYPNRGLQFLLKYITGDNLVKGSYGF EAEFNK SQT SFHLK KPSALVSDSALYFCA
Linker SL7 ———|VRDMIEGGGNK L FGTGTQLKVELNIQ C T S G S S G S G S G S G S G G C V D V K V T Q S
hVβ ———|SRYLVKRTGEKVFLECVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKDIP
          EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSRQGAVGQPQHFGDGTRLSILF EQ
MycTag ———|KLISEEDL ALSNSIMYF SHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEASRP
CD8α ———|AAGGAVHTRGLD K PFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKR S RLLHSDYMN
CD28 ———|MTPRRPGPTRKH Y QPYAPPRDF AAYRS R V K F S R S A D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G
CD3ζ ———|RREEYDVL D K R R G R D P E M G G K P R R K N P Q E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I G M K G E R
          R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q A L P P R
  
```

Abb. 8-2: cDNA- und Aminosäuresequenz des TCR-SCS_αTRP2-Konstrukts. hVa/β: humane variable Domäne α/β des dcTCR_αTRP2.

8.2 Fragmentkarten

8.2.1 cDNA-Fragmente der RT-PCR und DNA-Fragmente der PCR-Amplifikation genomischer DNA



* PP = Primerpaar

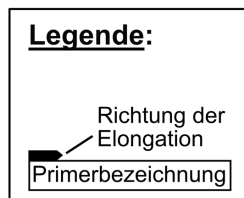


Abb. 8-3: cDNA-Fragmente der RT-PCR und DNA-Fragmente der PCR-Amplifikation genomischer DNA. F2A: Furin-2A-Sequenz; hVα/β: humane variable Domäne α/β des dcTCR_αTRP2; mCα/β: murine konstante Domäne α/β von pGMP_93.

8.3 Vektorkarten

8.3.1 pDONRTM221 attP1/-P2

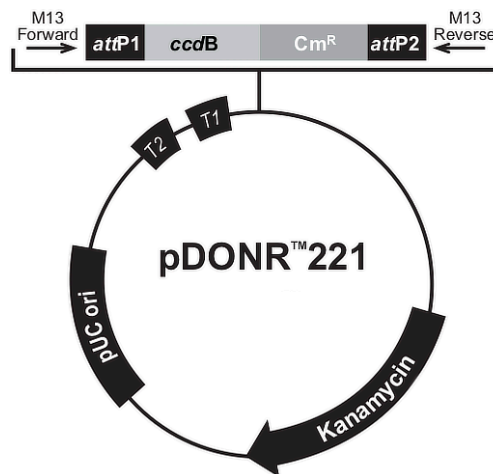


Abb. 8-4: Vektorkarte pDONRTM221 attP1/-P2. att-: Rekombinationssequenzen des Bakteriophagen λ ; ccdB: Toxigen des ccd-Toxin-Antitoxin-Systems (engl. *control of cell death*); Cm^R: Chloramphenicol-Resistenzgen; Kanamycin: Kanamycin-Resistenzgen; M13: Sequenz des Sequenzierungsprimers des Bakteriophagen M13; pUC ori: Ursprung der pUC-Plasmid-Replikation (engl. *origin of replication*); T1/T2: T1- und T2-Transkriptionsterminatoren des ribosomalen rRNA-Operons (*rrnB*) aus *E. coli*. Adaptiert von ThermoFisher Scientific Inc. [130].

8.3.2 pGMP_93

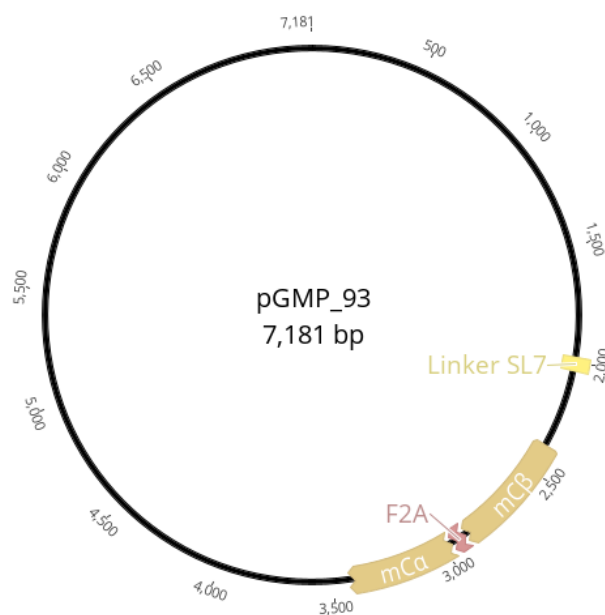


Abb. 8-5: Vektorkarte pGMP₉₃. F2A: Gen kodierend für ein Furin-2A-Element; mCa/ β : Gen kodierend für die murine konstante Domäne α/β .

8.3.3 pHIT-60 und pCOLT-GALV

Die Eigenschaften von pHIT-60, einem Verpackungsplasmid für die retroviralen *gag*- & *pol*-Gene des Maus-Leukämie-Virus (MLV), sind von Soneoka *et al.* beschrieben [131]. Die Eigenschaften von pCOLT-GALV, einem Verpackungsplasmid für das retrovirale *env*-Gen des Gibbonaffen-Leukämie-Virus, sind von Weijtens *et al.* beschrieben [90].

8.3.4 pMX-DEST

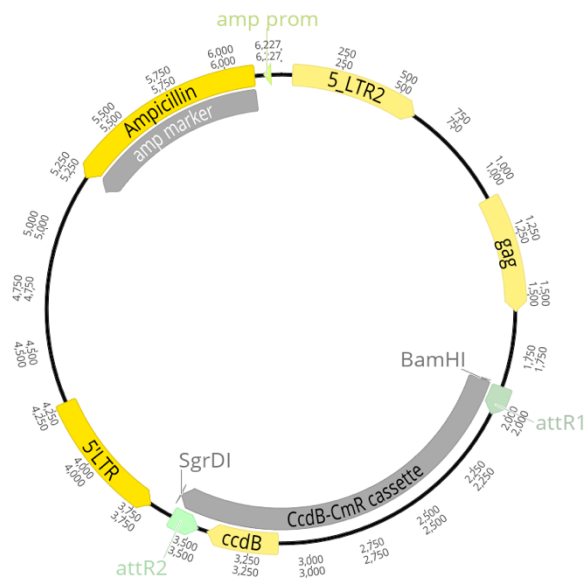


Abb. 8-6: Vektorkarte pMX-DEST. Ampicillin: Ampicillin-Resistenzgen; att-: Rekombinationssequenzen des Bakteriophagen λ ; BamHI: Schnittstelle für das Restriktionsenzym BamHI; ccdB: Toxigen des ccd-Toxin-Antitoxin-Systems (engl. *control of cell death*); Cm^R: Chloramphenicol-Resistenzgen; gag: Gen für ein retrovirales Strukturprotein (engl. *group-specific-antigen*); LTR: retrovirale Rekombinationssequenzen (engl. *long terminal repeats*); SgrDI: Schnittstelle für das Restriktionsenzym SgrDI.

Aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version nicht veröffentlicht.

Aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version nicht veröffentlicht.