

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

Charakterisierung der Funktion der $\Delta 133p53\beta$ Isoform in humanen
zytotoxischen T-Zellen

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

Vorgelegt von

Antonios Chamoun
aus Wiesbaden

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. M. Theobald

2. Gutachterin: Univ.-Prof. Dr. med. D. S. Krause

Tag der Promotion: 08. April 2026

Nachnutzung unter der Lizenz: CC-BY-ND-4.0

Für meine Eltern, Manya und Camille, in Dankbarkeit und Liebe.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
2 Literaturdiskussion	4
2.1 Maligne Tumoren	4
2.2 Epigenetik in Krebserkrankungen	7
2.3 Immuntherapie maligner Tumoren und adoptiver T-Zell-Transfer	10
2.4 T-Zell-Dysfunktion und Seneszenz	14
2.5 p53 und p53-Isoformen	17
2.6 $\Delta 133p53\beta$	22
3 Material und Methoden.....	24
3.1 Geräte	24
3.2 Verbrauchsmaterialien	25
3.3 Chemikalien und Reagenzien	26
3.4 Zellkulturmedien.....	28
3.5 Molekularbiologische Materialien (Kits, Enzyme, Primer, Plasmide).....	29
3.6 Zelllinien.....	30
3.7 Antibiotika	31
3.8 Antikörper.....	31
3.9 Humanes IFN γ ELISA Kit.....	33
3.10 Peptide.....	34
3.11 Programme	34
3.12 Methoden	34

3.12.1 Klonierung von $\Delta 133p53\beta$ in einen retroviralen Vektor	34
3.12.1.1 Vektoren.....	34
3.12.1.2 Restriktionsverdau	34
3.12.1.3 Agarose-Gelelektrophorese	35
3.12.1.4 Reinigung der DNA	36
3.12.1.5 DNA-Ligation.....	36
3.12.1.6 Transformation.....	36
3.12.1.7 Übernacht Kultur für die Maxi-Prep.....	37
3.12.1.8 Maxi Prep für die Plasmid DNA Purifikation	37
3.12.1.9 DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Photometer	38
3.12.1.10 Sequenzierung der $\Delta 133p53\beta$ _pMx_IRES_puro DNA (nach der Purifikation von gepickten Klonen).....	38
3.12.2 Isolierung von PBMCs	39
3.12.3 Transduktion humaner T-Zellen.....	39
3.12.4 Selektion nach Transduktion	41
3.12.5 Peptidspezifische Restimulation humaner T-Zellen.....	42
3.12.6 Zellzählung und Population doubling level (PDL)	42
3.12.7 FACS-Färbung	43
3.12.8 Colony-forming assay (CFA)	43
3.12.9 Western Blot.....	44
3.12.10 qPCR.....	47
3.12.11 IFN γ und Granzyme B FACS-Färbung	49
3.12.12 IFN γ ELISA.....	50
3.12.13 CD107a Degranulations-Assay	51
3.12.14 Thymidin-Assay	52
3.12.15 Chromium-Freisetzungs-Versuch.....	52
3.12.16 Extrazellulärer Flux Assay	53
3.12.17 Statistische Analyse	54
4 Ergebnisse	55
4.1 Transduzierte humane T-Zellen überexprimieren die $\Delta 133p53\beta$ Isoform	55
4.2 $\Delta 133p53\beta$ beeinflusst den Phänotyp von humanen T-Zellen.....	56
4.2.1 Einfluss auf den Subtyp und die TCR Expression	56

4.2.2 $\Delta 133p53\beta$ beeinflusst die Zusammensetzung von CD28/CD57 Subpopulationen in CD8 ⁺ T-Zellen	59
4.2.3 $\Delta 133p53\beta$ transduzierte CD8 ⁺ T-Zellen regulieren PD-1 und TIGIT hoch	60
4.3 Überexpression von $\Delta 133p53\beta$ schwächt die Kapazität von T-Zellen zur Tumorlyse	66
4.4 $\Delta 133p53\beta$ transduzierte T-Zellen sezernieren weniger IFN γ nach Antigenkontakt	70
4.5 $\Delta 133p53\beta$ beeinflusst die Proliferationskapazität von T-Zellen negativ	74
4.6 $\Delta 133p53\beta$ beeinflusst nicht die metabolischen Eigenschaften von T-Zellen...	76
5 Diskussion	78
5.1 $\Delta 133p53\beta$ und der Einfluss auf den Phänotyp von CD8 ⁺ T-Zellen.....	79
5.2 Verminderte Zytotoxizität der $\Delta 133p53\beta$ überexprimierenden CD8 ⁺ T-Zellen.	79
5.3 Einfluss der $\Delta 133p53\beta$ Isoform auf Seneszenz in T-Zellen.....	82
5.4 Klinische Bedeutung und Implikationen	84
5.5 Offene Fragen und Ausblick.....	87
6 Zusammenfassung	88
7 Literaturverzeichnis.....	90
8 Anhang	100
9 Danksagung	101
10 Lebenslauf.....	102

Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC-Gen	Adenomatous-polyposis-coli-Gen
ATM	engl. <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATR	engl. <i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
BAX	engl. <i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bcl-2	engl. <i>B-cell-lymphoma-2</i>
BCMA	engl. <i>B-Cell Maturation Antigen</i>
BRAF	engl. <i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
BRCA	engl. <i>BReast CAncer</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CAF	engl. <i>Cancer-associated fibroblast</i>
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CAR	engl. <i>Chimeric Antigen Receptor</i>
CCL2	engl. <i>CC-chemokine ligand 2</i>
CD	engl. <i>Cluster of differentiation</i>
CDK	engl. <i>Cyclin-dependent kinase</i>
CDKN1A	engl. <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
CFA	engl. <i>Colony-forming assay</i>
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CSC	engl. <i>Cancer stem cell</i>
CSF1R	engl. <i>Colony stimulating factor 1 receptor</i>
CTLA-4	engl. <i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
DRAM	engl. <i>DNA Damage-regulated Autophagy Modulator</i>

EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
ELISA	engl. <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
FACS	engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
GAPDH	Glycerinaldehy-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
GvHD	engl. <i>Graft versus Host Disease</i>
Gy	Gray
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HDAC	Histon-Deacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
HER2	engl. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HLA	engl. <i>human leukocyte antigen</i>
HPV	Humanes Papilloma-Virus
HTLV-1	Humanes T-lymphotropes Virus 1
ICAM-1	engl. <i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN	Interferon
IGF	engl. <i>Insulin-like growth factor</i>
IL	Interleukin
KLRG-1	engl. <i>Killer cell Lectin-like Receptor G1</i>
KMT2D	Histon-Lysin-N-Methyltransferase 2D
KRAS	engl. <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
KRK	Kolorektales Karzinom
LAG-3	engl. <i>Lymphocyte-activation gene 3</i>
LB	engl. <i>Lysogeny broth</i>

MAP-Kinase	engl. <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MART-1	engl. <i>Melanoma antigen recognized by T cells 1</i>
MCF-7	engl. <i>Michigan Cancer Foundation - 7</i>
MDM2/4	engl. <i>Mouse double minute 2/4 homolog</i>
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MDSC	engl. <i>Myeloid-derived suppressor cell</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	engl. <i>Major histocompatibility complex</i>
miRNA	MicroRNA
MM	Multiples Myelom
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
NY-ESO-1	engl. <i>New York esophageal squamous cell carcinoma-1</i>
OKT-3	Muromonab (Orthoclone Okt-3®), anti-CD3 Antikörper
PAI-1	engl. <i>Plasminogen activator inhibitor-1</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>
PD-L1	engl. <i>Programmed cell death 1 ligand 1</i>
PDL	engl. <i>population doubling level</i>
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PUMA	engl. <i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
RB-1	Retinoblastom-Protein
ROS	engl. <i>Reactive oxygen species</i>
Rpm	engl. <i>revolutions per minute</i>
RPMI	engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SASP	engl. <i>senescence-associated secretory phenotype</i>
SCC	engl. <i>Squamous Cell Carcinoma</i>

scFv	engl. <i>single chain variable fragment</i>
SCO2	engl. <i>Synthesis of Cytochrome c Oxidase 2</i>
scTCR	engl. <i>single chain TCR</i>
SDS	engl. <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SMS	engl. <i>Senescence-messaging secretome</i>
sog.	sogenannt
STAT	engl. <i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TAE	Tris-acetate EDTA
TAM	engl. <i>Tumor-associated macrophages</i>
TCR	engl. <i>T-cell receptor</i>
TERT	engl. <i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TET	Ten-Eleven-Translokations-Dioxygenase
TGF	engl. <i>Transforming growth factor</i>
THBS1	Thrombospondin-1
TIGAR	engl. <i>TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator</i>
TIGIT	engl. <i>T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i>
TIL	engl. <i>Tumor-infiltrating lymphocyte</i>
TIM-3	engl. <i>T cell immunoglobulin and mucin domain containing-3</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TME	engl. <i>Tumor microenvironment</i>
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
WIF-1	Wnt-inhibierender Faktor 1
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die „Hallmarks of Cancer“	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines TCR und eines CAR	14
Abbildung 3: Schematische Darstellung der zwölf p53 Isoformen	19
Abbildung 4: Überexpression der $\Delta 133p53\beta$ Isoform in transduzierten humanen T-Zellen.....	55
Abbildung 5: Nachweis der Überexpression in der qPCR nach Transduktion	56
Abbildung 6: Durchflusszytometrische Expression von CD8, CD4 und TCR.....	57
Abbildung 7: Durchflusszytometrische Expression von CD28 und CD57	59
Abbildung 8: Durchflusszytometrische Expression der Immuncheckpoint-Proteine TIGIT und PD-1	61
Abbildung 9: Durchflusszytometrische Expression der Immuncheckpoint-Proteine TIM-3 und LAG-3.....	63
Abbildung 10: Expression von TIGIT und TIGIT ⁺ /PD-1 ⁺ in transduzierten CD8 ⁺ T-Zellen nach drei konsekutiven Runden im Kokultur Experiment mit Saos2/143	65
Abbildung 11: Beispiel der TIGIT/PD-1 Expression ohne Antigenkontakt in T-Zellen eines Spenders.....	65
Abbildung 12: TIGIT/PD-1 Expression desselben Spenders nach drei Runden Kokultur mit Saos2/143.....	66
Abbildung 13: Optische Dichte der Kristallviolett färbung verschiedener Konditionen nach drei Runden Kokultur	67
Abbildung 14: Photographie der Wells der verschiedenen Konditionen des koloniebildenden Assays nach Kristallviolett färbung	68
Abbildung 15: Quantitative Analyse der Koloniebildung	69
Abbildung 16: Resultat des Chromium-Assays mit einem Spender.....	70
Abbildung 17: Im ELISA ermittelte IFN γ Sekretion nach 72 Stunden Kokultur mit Saos2 und Saos2/143 plus/minus Nivolumab	71
Abbildung 18: Quantifizierung der IFN γ Sekretion nach 72 Stunden Kokultur mit Saos2/143	72
Abbildung 19: Durchflusszytometrisch ermittelte Freisetzung von Granzyme B und Expression von CD107a	73
Abbildung 20: Darstellung des kumulativen „Population Doubling Level“ (PDL).....	74
Abbildung 21: Thymidin Assay zur Erfassung der Proliferationskapazität	76
Abbildung 22: Extrazellulärer Flux Versuch	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	24
Tabelle 2: Verwendete Materialien	25
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien	26
Tabelle 4: Verwendete Puffer und Zellkulturmedien	28
Tabelle 5: Verwendete molekularbiologische Kits und Enzyme/Puffer	29
Tabelle 6: PCR Primer	30
Tabelle 7: Verwendete Antibiotika	31
Tabelle 8: FACS-Antikörper	31
Tabelle 9: Verwendete Primärantikörper für den Western Blot	44
Tabelle 10: Verwendete Sekundärantikörper für den Western Blot	45
Tabelle 11: Lösungen und Puffer des IFN γ ELISA	50

1 Einleitung

In Deutschland stellt, nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs die häufigste Todesursache dar (1).

In den letzten Jahren kam es zu einem signifikanten Fortschritt der therapeutischen Möglichkeiten in allen Bereichen der Hämatologie und Onkologie, insbesondere im Bereich der Immuntherapien, was zu der wachsenden Zahl an Zulassungen zahlreicher neuer, auf dieser Form basierender Substanzklassen und Therapieverfahren führte. Heute gehören mehrere dieser Anwendungen zu etablierten Standardtherapien und werden in den Leitlinien empfohlen, wie beispielsweise die Behandlung mit spezifischen gegen Tumorantigene gerichtete Antikörper, Immuncheckpoint-Inhibitoren oder der adoptive T-Zell-Transfer, welcher z.B. tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) oder sog. „Chimeric Antigen Receptor“ T-Zellen (CAR-T-Zellen) umfasst. Letzteres umfasst das Isolieren von T-Zellen des Patienten, welche *ex vivo* in einer Zellkultur gentechnisch verändert werden, um sie mithilfe spezifischer immunologischer Eigenschaften zur Eliminierung maligner Zellen umzuprogrammieren. In den meisten Fällen sind diese T-Zellen autologen Ursprungs (vom Patienten selbst), nur in seltenen Fällen werden allogene Quellen (von einem Spender) genutzt (2).

Die Möglichkeiten des adoptiven T-Zell-Transfers werden u.a. durch verschiedene Faktoren der Immunevasion wie z.B. Hochregulierung von inhibitorischen Rezeptoren, metabolische Dysfunktion, Nährstoffmangel etc. begrenzt (3). Zu diesen Faktoren, welche eine Limitation der T-Zellen bedingen, gehört auch die sog. T-Zell-Dysfunktion, zu welcher die Anergie, Exhaustion (ein Erschöpfungszustand der Zellen) und Seneszenz gehören (4).

In diesem Kontext existiert ein Ansatz, der das Ziel verfolgt, durch gentechnische Modifikation die Seneszenz von zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8⁺ CTLs) rückgängig zu machen bzw. diese zu verlangsamen. Bei Seneszenz handelt es sich um einen „dysfunktionalen“ Zustand von T-Zellen, der im Rahmen von Alterungsprozessen, DNA-Schäden oder chronischen viralen Infektionen beobachtet wird, aber auch im Tumormikromilieu (TME) auftreten kann (5). Dieser Zustand wird u.a. charakterisiert durch einen vollständigen Zellzyklusarrest mit hierdurch bedingtem Proliferationsstopp, eine verminderte Effektorfunktion, Veränderungen des Metabolismus und eine spezifische Komposition an sezernierten Zytokinen wie z.B. IL-6, TNF- α oder IFN- γ , welche unter dem Begriff SASP (engl. *senescence-associated*

secretory phenotype) zusammengefasst werden. Die SASP-Zytokine können chronische Inflammation verursachen und stellen den Goldstandard des Zytokin Profils seneszenten Zellen dar (5-8). Dies ist neben weiteren Faktoren mit ein Grund für eine unzureichende Antitumor-Antwort der CD8⁺ T-Zellen, was wiederum in einem Tumorprogress resultiert.

In verschiedenen Publikationen wurde auf den Einfluss des Proteins p53 auf zelluläre Seneszenz und Alterungsprozesse verwiesen, wobei insbesondere die p53/MDM2 Interaktion als relevante Schaltstelle ausgemacht wurde (9, 10). Es zeigte sich im Rahmen von Arbeiten zu den Isoformen des Transkriptionsfaktors p53, auf welche in der folgenden Literatordiskussion näher eingegangen werden soll, dass auch bestimmte Isoformen wie $\Delta 133p53$ und p53 β selbst durch komplexe Interaktionen einen Einfluss auf replikative Seneszenz in T-Lymphozyten haben (11). Insbesondere die Isoform $\Delta 133p53\alpha$ stellt ein regulatorisches Protein dar, das in weniger differenzierten T-Zellen wie naiven T-Zellen in höherem Maße exprimiert wird. Diese Erkenntnis wurde in unserer Arbeitsgruppe weiter untersucht, um die Eigenschaften von CD8⁺ T-Zellen insbesondere im Hinblick auf Seneszenz zu bestimmen, wenn die $\Delta 133p53\alpha$ Isoform durch gentechnische Manipulation überexprimiert wird. Die Ergebnisse ergaben, dass die $\Delta 133p53\alpha$ überexprimierenden CD8⁺ T-Zellen weniger Eigenschaften von Seneszenz aufweisen als Kontrollzellen (12).

Ziel der Arbeit

Andererseits wurde gezeigt, dass $\Delta 133p53\beta$ die Formation von Krebs-Stammzellen (CSCs) in Mamma- und kolorektalen Karzinomzellen *in vitro* positiv beeinflusst (13, 14).

Auch für das Prostatakarzinom konnte $\Delta 133p53\beta$ als prognostischer Faktor für aggressive Formen identifiziert werden, wobei in solchen Karzinomen mit erhöhten $\Delta 133p53\beta$ Spiegeln ein vermehrt immunsuppressives Umfeld mit mehr PD-1 (engl. *Programmed cell death protein-1*), PD-L1 (engl. *Programmed death-ligand 1*) und CSF1R (engl. *Colony stimulating factor 1 receptor*) positiven Zellen festgestellt wurde (15). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein großer Teil cerebraler Metastasen von Primärtumoren aus Lunge, Kolon bzw. Rektum, Melanom und Mamma $\Delta 133p53\beta$ exprimiert. Hierbei weisen Metastasen mit einer $\Delta 133p53\beta$ Expression eine frühere Metastasierung auf als Metastasen ohne $\Delta 133p53\beta$ (16).

Jedoch wurde die Rolle dieser Isoform in T-Zellen noch nicht erforscht. Daher stellen wir die Frage, wie sich eine gentechnische Modifikation von CD8⁺ T-Zellen, die eine Überexpression der $\Delta 133p53\beta$ Isoform zur Folge hat, auf die funktionale Aktivität und Eigenschaften der T-Zellen im Hinblick auf ihre Seneszenz auswirken würde.

Somit besteht das Ziel der vorliegenden Arbeit darin, die biologische Funktion der $\Delta 133p53\beta$ Isoform in humanen CD8⁺ T-Zellen im Hinblick auf die Seneszenz sowie Phänotyp, Zytotoxizität, Sekretion von Zytokinen, Proliferation und metabolische Aktivität zu untersuchen. Die Ergebnisse sollen im Kontext des aktuellen wissenschaftlichen Stands diskutiert werden. Daraus sollen sich dann Implikationen im Hinblick auf die Anwendungen zum adoptiven T-Zell-Transfer ergeben.

2 Literaturdiskussion

2.1 Maligne Tumoren

Krebs wird definiert als eine Erkrankung, bei der Zellen des menschlichen Körpers unkontrolliert proliferieren, d.h. das Gleichgewicht zwischen Zelltod und Zellwachstum ist gestört. Die Fähigkeit zur Metastasierung, also die Streuung der entarteten Zellen vom Entstehungsort in andere Regionen des Körpers, charakterisiert hierbei neben weiteren Eigenschaften wie lokal destruierendes Wachstum und Entdifferenzierung die Malignität des Tumors (17). Zellen maligner Tumoren unterscheiden sich strukturell und in ihrer Funktion maßgeblich von gesunden Zellen, was im Folgenden weiter ausgeführt wird.

Der aktuelle wissenschaftliche Konsens hinsichtlich der Karzinogenese besagt, dass ein mehrstufiger Prozess, bestehend aus Initiation, Promotion und Progression, der Entstehung maligner Tumoren zugrunde liegt. Da dem ersten Schritt dieses Prozesses die Schädigung der DNA zugrunde liegt, kann man Krebs auf der fundamentalen Ebene auch als eine genetische Erkrankung betrachten (18). Im Rahmen der Veränderungen, welche durch den oben erwähnten mehrstufigen Prozess entstehen, erwerben Tumorzellen sechs charakteristische biologische Eigenschaften, nämlich (i) die Aufrechterhaltung des Proliferationssignals, (ii) das Umgehen wachstumshemmender Signale, (iii) die Resistenz gegenüber dem Zelltod, (iv) die fortgehende Replikation, (v) Angiogenese sowie (vi) Invasion und Metastasierung (19). Etwa ein Jahrzehnt nach der Formulierung dieser Prinzipien wurden diese aufgrund neuer Forschungsergebnisse zunächst um zwei weitere Kennzeichen der malignen Tumoren erweitert, nämlich Charakteristika eines (vii) veränderten Metabolismus und die Eigenschaft zur (viii) Entwicklung von Mechanismen der Immunevasion (20). 2022 wurden als zusätzliche Kennzeichen (ix) die phänotypische Plastizität und (x) zelluläre Seneszenz publiziert (21) (Abbildung 1).

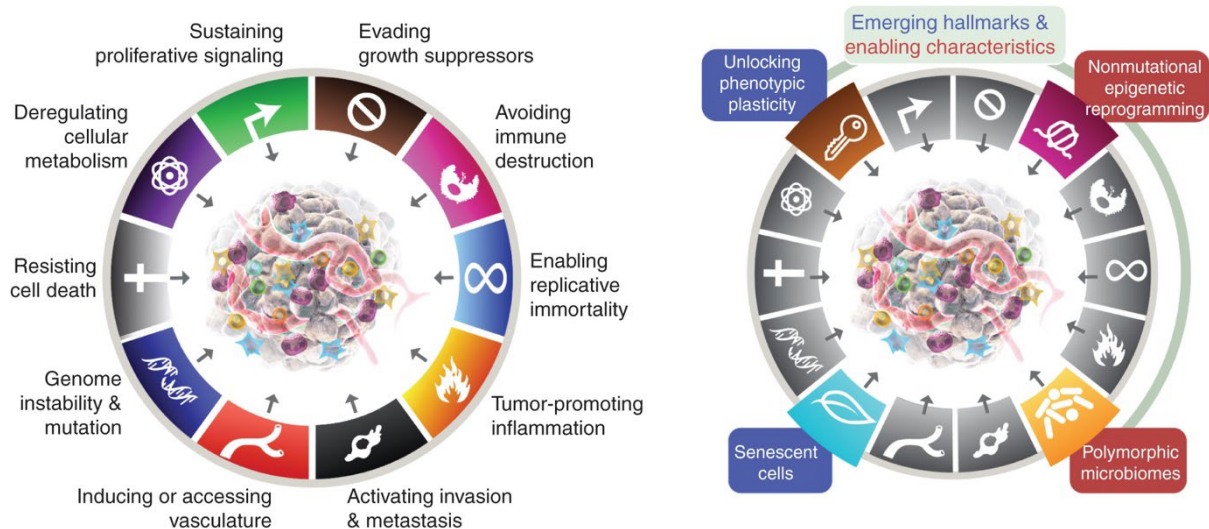


Abbildung 1: Die „Hallmarks of Cancer“

Links: Abbildung der charakteristischen Eigenschaften („Hallmarks“) maligner Tumoren in ihrer Fassung aus dem Jahr 2011.

Rechts: Ergänzung um zwei weitere Eigenschaften sowie zwei sog. ermöglichende Charakteristika im Jahr 2022.

Der Nachdruck erfolgte mit freundlicher Genehmigung der American Association for Cancer Research © (21)

Die Ursachen einer DNA-Schädigung sind vielfältig und verschiedener Natur. Sie können beispielsweise spontan auftreten, aber auch Folge physikalischer oder chemischer Einflüsse sein (22). So führen *in vivo* auftretende chemische Reaktionen wie Hydrolyse oder Oxidation zu einer Instabilität der DNA, was wiederum die Karzinogenese begünstigt (23). Aber auch durch eigene Stoffwechselprozesse entstehende Metabolite wirken sich schädigend auf die Erbsubstanz aus, beispielsweise reaktive Sauerstoffspezies (ROS), endogene reaktive Substanzen wie Aldehyde und weitere (24). Dass energiereiche elektromagnetische Strahlung zu Mutationen des Erbguts führt, ist bereits ein seit langem bekannter Sachverhalt (25). Neben den physikalischen Einflüssen erwiesen sich auch chemische Substanzen als kanzerogen, so wurde der Zusammenhang zwischen Rauchen und Lungenkrebs schon früh beschrieben (26). Weiterhin erwiesen sich verschiedene Viren (z.B. EBV, HBV, HTLV-1 oder HPV) als onkogen, indem sie entweder ebenfalls die DNA ihrer Wirtszelle derart verändern, dass sog. Onkogene aktiviert werden, oder Immunsuppression induzieren (27). Damit eine genetische Veränderung die Karzinogenese induzieren kann, müssen bestimmte Gene, die Onkogene und Tumorsuppressorgene, betroffen sein (20). Das wohl bekannteste Tumorsuppressorgen, häufig als „Wächter des Genoms“ bezeichnet, ist TP53, welches, wenn mutiert, nicht mehr den Zellzyklusarrest induzieren kann (28). Dies wird

im Abschnitt 2.5 genauer diskutiert. Weitere bekannte Tumorsuppressorgene sind das sog. „Adenomatous-polyposis-coli“-Gen (APC-Gen), welches bei familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) mutiert ist und ein nahezu hundertprozentiges Darmkrebs-Risiko bedingt (29), oder das BRCA-Gen (engl. *BR*east *CA*ncer), das beim familiären Mammakarzinom mutiert ist (30). Unter den Onkogenen spielt KRAS als eines der am häufigsten mutierten Gene in vielen Krebsentitäten eine zentrale Rolle, u.a. ist es in Adenokarzinomen der Lunge, des Pankreas und des Kolons bzw. Rektums mutiert (31). Als weiteres Beispiel ist das BRAF-Gen zu nennen, das bei einem Großteil maligner Melanome Mutationen aufweist (32).

Wie bereits beschrieben, kann es im weiteren Verlauf einer malignen Tumorerkrankung zu einer Metastasierung kommen, also der Absiedelung von Tochtergeschwülsten in anderen Regionen des Körpers. Mechanismen, die hier eine zentrale Rolle spielen, sind u.a. der Verlust der E-Cadherine Funktion, einem Zelladhäsionsmolekül, (33) die Transition vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp (EMT) (34) und die Angiogenese, die Bildung neuer Blutgefäße (35).

Nachdem sich ein maligner Tumor entwickelt hat, beeinflusst dieser auch seine Umgebung und schafft das sogenannte TME, das seinerseits wiederum mit beispielsweise Immunzellen interagiert (20). Das TME ist ein komplexes Netzwerk verschiedener Zellen, das durch verschiedene Mechanismen den Tumorprogress fördert. Einer dieser Mechanismen ist die Aktivität von myeloiden Suppressorzellen (MDSCs), welche u.a. die Antigenpräsentation durch dendritische Zellen und die Aktivierung von T-Zellen stören. Dies wiederum ermöglicht dem malignen Tumor, der Erkennung und Zerstörung durch das körpereigene Immunsystem zu entkommen und wird als Immunevasion bezeichnet (36). Auch Makrophagen, die Tumoren infiltrieren und dann als Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) bezeichnet werden, beeinflussen je nach ihrer weiteren Differenzierung in M1 oder M2 Makrophagen das Tumorstadium entweder negativ oder positiv, indem sie über Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Chemokine mit dem TME interagieren (37). Neben diesen existieren auch die Krebs-assoziierten Fibroblasten (CAF) als Akteure im TME. Auch diese werden in verschiedene Subtypen klassifiziert, nämlich CAF mit myelofibroblastischen Eigenschaften (myCAF), mit inflammatorischen Eigenschaften (iCAF) und mit antigenpräsentierenden Eigenschaften (apCAF). Auch die CAF beeinflussen Tumoren durch direkte und indirekte Interaktionen mit anderen Teilen des TME, u.a. durch Hemmung zytotoxischer Immunzellen, Aktivierung Tumor-fördernder Immunzellen,

Veränderungen der extrazellulären Matrix und Förderung der Angiogenese sowie der Proliferation durch Einfluss auf die EMT (38). Zuletzt seien auch die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) genannt, die neben ihrer Rolle im Gleichgewicht zwischen Immunsuppression und Autoimmunität auch durch Interaktionen mit dem TME die Dynamik von Tumoren beeinflussen. Ihre Wechselwirkungen sind vielseitig, ein primärer Aspekt besteht jedoch in der Hemmung der T-Zell-Aktivierung im TME (39). Die Komplexität der an der Karzinogenese und dem Progress maligner Erkrankungen beteiligten Mechanismen ergibt die Notwendigkeit von entsprechend angepassten therapeutischen Strategien. Im folgenden Abschnitt 2.3 wird die Immuntherapie maligner Tumoren mit besonderem Fokus auf T-Zellen diskutiert.

2.2 Epigenetik in Krebserkrankungen

Die menschliche DNA ist auf verschiedenen Ebenen organisiert, aufgewickelt auf Histonen bildet sich das Nukleosom, welches wiederum mit anderen Proteinen das Chromatin bildet. Modifikationen des Erbguts auf diesen verschiedenen Ebenen, die die Genexpression beeinflussen, fallen unter den Begriff der Epigenetik (40, 41). Zu diesen Modifikationen gehören beispielsweise die DNA-Methylierung, die kovalente Modifikation von Histonen, die Nukleosomenpositionierung und miRNAs (42).

Die DNA-Methylierung, bei der durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs) eine Methylgruppe auf Cytosin übertragen wird, findet gehäuft im Bereich sog. CpG-Inseln (Cytosin-Guanin) statt. Die DNA-Demethylierung erfolgt als aktiver Prozess durch Ten-Eleven-Translokations-Dioxygenasen (TET) (43).

Die Verbindung zwischen Epigenetik und Karzinogenese konnte hergestellt werden, da in verschiedenen Tumorentitäten sowohl Mutationen in Genen, die an epigenetischen Prozessen involviert sind, als auch Veränderungen in Methylierungsmustern nachgewiesen wurden. So konnten beispielsweise in einem großen Teil Follikulärer Lymphome Mutationen in der Histon-Lysin-N-Methyltransferase 2D (KMT2D) nachgewiesen werden (44). Zudem weist ein signifikanter Anteil von Nierenzellkarzinomen eine Hypermethylierung einer CpG-Insel in der 5'-Region auf, welche zur Inaktivierung des VHL-Gens führt (45). Es konnte nachgewiesen werden, dass epigenetische Mechanismen häufig frühe Stadien der Karzinogenese beeinflussen, oft noch bevor genetische Veränderungen auftreten (46). Auch diese epigenetischen Mechanismen, die die Karzinogenese beeinflussen, werden durch Aspekte gekennzeichnet, welche als sog. „Epigenetic Hallmarks of

Cancer“ bezeichnet werden. Diese Kennzeichen umfassen (i) die gezielte DNA-Hypermethylierung von Regionen der Genregulation, (ii) die DNA-Hypomethylierung auf globalem Genom Level, (iii) Veränderungen von Modifikationsmustern der Histone, (iv) den Erhalt einer neuen 3D Chromatin-Architektur, (v) die epigenetische Flexibilität und (vi) die wechselseitige Beeinflussung von Genetik und Epigenetik (47).

Die Relevanz der DNA-Hypermethylierung wird erkenntlich an der Anzahl der hiervon betroffenen Proteine. U.a. ist der Promotor des BRCA1-Gens in zwei Subtypen, die in BRCA1-Familien auftreten, in besonderem Maße methyliert (48). Auch der Tumorsuppressor p16 wird in humanen Neoplasien durch Methylierung an einer 5'-CpG-Insel weniger transkribiert (49). Von Hypermethylierung sind neben Genabschnitten, die für Proteine codieren, auch nicht codierende Abschnitte wie z.B. für miRNA betroffen. So konnte die durch Hypermethylierung von CpG-Inseln im Promotorbereich verursachte Mindereexpression von miR-124a in verschiedenen Lungenkrebs-Zelllinien nachgewiesen werden. Diese epigenetische Stummschaltung von miR-124a wiederum ist mit der Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinase 6 (CDK6) und der Inaktivierung des Retinoblastom-Proteins (Rb) assoziiert (50). Posttranslationale Modifikationen der Histone wie z.B. Acetylierung und Methylierung, die bereits als eines der Kennzeichen der epigenetischen Veränderungen in Krebserkrankungen benannt wurden, werden maßgeblich durch Enzyme verursacht, die als „Writers“ und „Erasers“ bezeichnet werden. Mutationen in diesen Enzymen gehören mit zu den häufigsten, die sich in Tumorzellen nachweisen lassen (51). Besondere Relevanz hat der Aspekt der Flexibilität der epigenetischen Einflüsse auf Tumorzellen vor dem Hintergrund eines dynamischen Milieus, in dem sich diese befinden. Hier bedienen sich Tumorzellen verschiedener Mechanismen. Zwei Beispiele seien an dieser Stelle genannt. Zum einen können Tumorzellen durch Promotor-Hypermethylierung antiangiogenetische Gene wie Thrombospondin-1 (THBS1) und Wnt-inhibierenden Faktor 1 (WIF-1) stilllegen und damit Angiogenese fördern. Und zum anderen kann in Mamma- und kolorektalem Karzinom eine Hypermethylierung von CpG-Inseln im Promotorbereich von Genen der miR-200-Familie die EMT verstärken (47). Neben diesen Faktoren wurde auch ein Einfluss epigenetischer Mechanismen auf die Wirksamkeit adoptiver Zelltherapien publiziert. Beispielsweise zeigte sich, dass die Wirksamkeit von, gegen CD19 gerichtete, CAR-T-Zellen auch durch das DNA-Methylierungsprofil beeinflusst wird (52). Weiterhin

konnte durch Deletion der DNMT3A in CAR-T-Zellen deren Proliferationskapazität sowie Fähigkeit zur Tumorlyse verstärkt werden (53).

In Zusammenschau der weitreichenden Auswirkungen der Epigenetik auf Krebserkrankungen gibt es Bestrebungen in der Forschung, entsprechende Therapien zu entwickeln, die an diesen Schaltstellen angreifen. Diverse Medikamente, die auf epigenetischer Ebene wirken, wurden bereits von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassen. Zu diesen gehört beispielsweise das 5-Azacytidin, welches für die Behandlung des Myelodysplastischen Syndroms (MDS) zugelassen ist. 5-Azacytidin gehört zu den DNMT-Inhibitoren (DNMTi) und bewirkt die Hemmung der DNA-Methylierung, was, durch Methylierung stillgeschaltete, Gene wieder aktiviert (54). Ein anderes Beispiel ist Vorinostat, welches als Histon-Deacetylase-Inhibitor (HDACi) wirkt und für die Therapie des kutanen T-Zell-Lymphoms zugelassen ist (54).

Wie bereits beschrieben, spielt die epigenetische Stummschaltung bestimmter miRNAs eine wichtige Rolle in der Karzinogenese. Aus diesem Grund besteht ein weiterer therapeutischer Ansatz darin, diese miRNA durch Chromatin modifizierende Medikamente zu aktivieren, wie es am Beispiel der Expression von miR-127 in T24 Prostatakarzinomzellen beschrieben wurde (55). Weiterhin wurde in Studien die Kombination von verschiedenen epigenetischen Medikamenten getestet, beispielsweise eine Behandlung von HL-60 Zellen (akute promyelozytäre Leukämie) mit Decitabin (ein DNMTi) und 3-Deazaneplanocin (einem Histon-Lysin-N-Methyltransferase EZH2 Inhibitor), was zu einer verminderten Klonogenität im Kolonieassay führte, verglichen zu einer Behandlung mit nur einer Substanz (56). Auch eine Kombination von epigenetischen Medikamenten mit anderen Therapeutika wurde getestet, z.B. eine Kombination von Vorinostat (HDACi) und Bevacizumab beim klarzelligen Nierenzellkarzinom (57).

Abschließend sei noch erwähnt, dass auch eine Kombination von epigenetischer Therapie und Immuntherapie, welche im folgenden Kapitel besprochen wird, einen vielversprechender Therapieansatz darstellt. Exemplarisch kann hier aufgeführt werden, dass eine Behandlung von durch chronisch viraler Infektion erschöpften CD8⁺ T-Zellen mit einem HDACi zu einer Verbesserung des dysfunktionalen Zustandes führte (58) oder dass im murinen Melanom Modell B16F10 eine Kombinationstherapie von HDACi und PD-1-Inhibitoren zu einem langsameren Tumorwachstum führte, was auf einer durch HDACi induzierten Hochregulierung von PD-L1 beruhte (59).

2.3 Immuntherapie maligner Tumoren und adoptiver T-Zell-Transfer

Bereits im Jahr 1909 formulierte Paul Ehrlich die Hypothese, dass das körpereigene Immunsystem das Wachstum von Tumoren kontrolliert (60). Aufbauend darauf wurde von Frank Macfarlane Burnet das Konzept der sog. Immunüberwachung (engl. *immunosurveillance*) entwickelt, welches besagt, dass sich das Immunsystem in einem ständigen Prozess der Identifizierung und Kontrolle von malignen Zellen befindet (61, 62). Mit der zunehmenden Erkenntnis über die Funktionen des Immunsystems und der Biologie maligner Tumore entwickelte sich die Hypothese des sog. Immunoediting, welches die Interaktion von Tumoren und Immunsystem in drei Phasen unterteilt. In der ersten Phase, der Eliminierungsphase, kommt es zur Aktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Am letzten Schritt dieser Phase steht die Infiltration und Destruktion der malignen Zellen durch Tumorantigen-spezifische T-Zellen. Im Verlauf kommt es zur Gleichgewichts- und schließlich zur Escape-Phase, bei welcher sich die Tumorzellen durch Mechanismen der Immunevasion der Erkennung des Immunsystems entziehen (63). Mit diesem Wissen begannen die Bemühungen, Therapien zu entwickeln, die die Fähigkeit des Immunsystems zur Erkennung und Destruktion maligner Tumorzellen verbessern sollen (64). Der Gedanke, dass durch Therapeutika, die das Immunsystem aktivieren, Tumoren behandelt werden können, ist nicht neu. Das erste in der Literatur erwähnte Immuntherapeutikum wurde 1891 von William B. Coley entwickelt und später als „Coley's Toxin“ bezeichnet. Hierbei handelte es sich um eine Mischung aus abgetöteten *Streptococcus pyogenes* und *Serratia marcescens* Bakterien samt Endotoxinen, die in den Tumor injiziert wurde, um das Immunsystem zu stimulieren (65). Die moderne Krebsimmuntherapie unterscheidet drei grundlegende Strategien. Es gibt die Möglichkeit, Zytokine wie IL-2 oder IFN- α einzusetzen, welche das Immunsystem des Patienten stimulieren. Zum anderen haben sich die sog. Immuncheckpoint-Inhibitoren insbesondere die Anti-CTLA-4- (engl. *Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4*), Anti-PD-L1- und Anti-PD-1-Antikörper etabliert, die hemmenden Signalen auf T-Zellen entgegenwirken. Und zuletzt existieren zellbasierte Therapien, zu denen die auf dendritischen Zellen basierenden Impfungen und der adoptive T-Zell-Transfer gehören. Das Prinzip der dendritischen Impfstoffe besteht darin, den Patienten dendritische Vorläuferzellen zu entnehmen, diese mit Zytokinen zu unreifen dendritischen Zellen zu kultivieren und dann mithilfe von Tumorantigenen zu reifen dendritischen Zellen zu entwickeln. Diese können dann den Patienten

rückinfundiert werden, um eine Immunantwort zu induzieren. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass eine Kombination von Immuntherapien, zum Beispiel von Immuncheckpoint-Inhibitoren, insbesondere beim fortgeschrittenen malignen Melanom eine größere therapeutische Antwort zeigt. (66-68). Andere Formen von Impfstoffen umfassen Peptid-, DNA- oder mRNA-basierte Formate (69, 70).

Der bereits erwähnte adoptive T-Zell-Transfer fasst drei Prinzipien zusammen, nämlich TILs, T-Zell-Rezeptor (TCR)- sowie chimäre Antigenrezeptor (CAR)-modifizierte T-Zellen (Abbildung 2). Das maligne Melanom hat die besondere Eigenschaft, zur Akkumulation einer vergleichsweise großen Anzahl an TIL zu führen (71). Aus diesem Grund konnten die ersten Studien zum adoptiven T-Zell-Transfer mit TILs an Melanom Patienten durchgeführt werden, da aus deren Tumoren T-Zellen isoliert und *ex vivo* expandiert werden konnten. 1988 wurden erstmals Patienten mit metastasiertem Melanom mit TILs und IL-2 behandelt, wobei sich bei 60 % der zuvor nicht mit IL-2 behandelten Patienten ein messbarer Tumorregress zeigte (72). Es zeigt sich jedoch, dass TILs häufig durch eine lange *in vitro* Kultur zu Exhaustion (siehe Abschnitt 2.4) neigen und dadurch eine kurzlebige Persistenz haben, wenn sie dem Patienten rückinfundiert werden (73). Weitere Herausforderungen umfassen Effizienz und Qualität der Erholung von TILs, Mechanismen der Immunevasion sowie die hemmenden Einflüsse des TME, welche die Wirksamkeit der TIL-Therapie beeinflussen (74). Im Jahr 2006 wurde der erste klinische Nachweis über die Wirksamkeit von Antigenrezeptor-modifizierten T-Zellen publiziert. Es handelte sich hierbei um einen TCR, welcher sich gegen MART-1 (engl. *Melanoma antigen recognized by T cells 1*) richtete. Dieses Antigen wird von einem Großteil der malignen Melanome exprimiert (75). In den folgenden Jahren wurden weitere Antigene als Ziel einer solchen Therapie genutzt, so z.B. auch NY-ESO-1 (engl. *New York esophageal squamous cell carcinoma-1*), wobei sich bereits bessere Regressraten als in der zuvor durchgeführten Studie zeigten (76). Um diese TCR-modifizierten T-Zellen zu generieren, müssen die α - und β -Ketten eines spezifische TCR in retrovirale oder lentivirale Vektoren geklont werden. Über ein geeignetes Gentransfersystem wie einem retroviralen Vektor können aus dem peripheren Patientenblut gewonnene T-Zellen mit diesen Vektoren transduziert werden, wodurch sie dann den spezifischen Antigenrezeptor stabil exprimieren (77). Die Einschränkung hierbei ist, dass diese TCR-modifizierten T-Zellen ihre Antigene über MHC-Moleküle (engl. *Major histocompatibility complex*) erkennen, was deren Funktion im Kontext einer

Herunterregulierung oder eines Verlustes dieser Antigen-präsentierenden Moleküle als Strategie der Tumorevasion limitiert (78). Ein weiteres Problem stellt die Gefahr von „Graft-versus-Host-Reaktionen“ (GvHD) dar, bedingt durch die hohe Affinität der TCR-modifizierten T-Zellen (79). Hierbei unterscheidet man verschiedene Formen der Reaktionen, die mit einer solchen Therapie einhergehen. So gibt es z.B. die sog. „On-target off tumor risks“, bei welchen das Antigen von gesunden Zellen exprimiert wird, was wiederum eine Immunreaktion gegenüber dem gesunden Gewebe hervorruft. Zum anderen gibt es sog. „On target risks“. Hierbei kommt es entweder zu einer derart starken Lyse der Zielzellen, wodurch es zum sog. Tumorlyse-Syndrom kommt, oder zu einem Übermaß an Zytokin Ausschüttung, was ein sog. Zytokin-Freisetzungssyndrom hervorruft. Von „Off-target risks“ spricht man, wenn es zu einer Kreuzreaktivität zwischen Antigenen gesunden Gewebes und den TCR-modifizierten T-Zellen kommt (80). Einige der Nachteile von TCR-modifizierten T-Zellen, insbesondere die MHC-Abhängigkeit, werden in der dritten Form des adoptiven T-Zelltransfers, nämlich den CAR-T-Zellen umgangen. In CAR-T-Zellen werden die antigenspezifischen Domänen von Antikörpern in Form des „single-chain variablen Fragments“ (scFv) mit der Signaldomäne des TCR, nämlich der ζ -Kette, verknüpft. Dieser Fall stellt die Erstgeneration CAR-T-Zellen dar. In der zweiten Generation werden die intrazellulären Domänen von einem und in der dritten Generation zwei kostimulatorischen Molekülen wie CD28 oder OX40 mit der ζ -Kette verknüpft (81). Diese Form der Therapie ist insbesondere in Malignomen der B-Zell Reihe effektiv. So zeigten sich z.B. tiefe Remissionen in Patienten mit einer Chemotherapie refraktären akuten lymphoblastischen B-Zell Leukämie (ALL) unter CAR-Therapie, welche sich gegen CD19 als Ziel richtet (82). Auch bei Patienten mit Multiplem Myelom (MM) und Rezidiv oder refraktärer Erkrankung konnte unter Anti-BCMA (engl. *B-Cell Maturation Antigen*) -CAR-Therapie ein effektives klinisches Ansprechen beobachtet werden (83). Der Erfolg dieser Therapie wird durch verschiedene Faktoren begrenzt. Zu diesen gehört z.B. die sog. „Antigenflucht“ (engl. *Antigen escape*). Hierbei regulieren die malignen Zellen das Oberflächenmolekül, über welches sie erkannt werden, herunter und entziehen sich damit der Erkennung durch die CAR-T-Zellen (84). Die Auswahl des Zielantigens ist von entscheidender Bedeutung, da viele Tumoren dieselben Antigene exprimieren wie normales Gewebe. Hierdurch kann es zu den bereits erwähnten sog. „On-target off-tumor effects“ kommen. Weiterhin beeinflusst das immunsuppressive TME auch die CAR-T-Zellen durch Interaktion mit Zytokinen oder

Immuncheckpoints wie PD-1 und CTLA-4 sowie weiteren Faktoren wie Metabolite, Hypoxie, immunsuppressive Zellen etc. (84). Neben den Einflüssen des immunsuppressiven TME, welche bereits zu einer verminderten Fitness der TCR- und CAR-modifizierten T-Zellen führen, spielt auch die Exhaustion der infundierten T-Zellen eine wichtige Rolle für das Therapieversagen. Letztlich führt die persistierende, tonische TCR-Signalübertragung durch Antigene zu dem Erschöpfungszustand der Exhaustion, auf welche im folgenden Kapitel näher eingegangen wird. Diese ist u.a. durch die Hochregulierung der inhibitorischen Oberflächenrezeptoren PD-1, TIM-3 (engl. *T cell immunoglobulin and mucin domain containing-3*), LAG-3 (engl. *Lymphocyte-activation gene 3*) und TIGIT (engl. *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*) assoziiert (85, 86). Zuletzt sei noch erwähnt, dass die CAR-Therapie von soliden Tumoren vor einigen Herausforderungen steht. Diese resultieren zum einen aus der Heterogenität der Antigene solider Tumoren, welche wiederum zu einem Mangel geeigneter Zielantigene führt und die antigengesteuerte Detektion der Krebszellen durch CAR-T-Zellen erschwert (87). Zum anderen ist im Vergleich zu hämatologischen Malignomen die Infiltration der CAR-T-Zellen in soliden Tumoren erschwert. Auch hier spielen verschiedene Faktoren des TME eine Rolle. So führt z.B. die durch Überexpression von Endothelin B Rezeptoren seitens der Tumorzellen induzierte Herunterregulierung von ICAM-1 (engl. *intercellular adhesion molecule 1*) zu einer erschwerten Diapedese und einer verminderten Expression gewisser Chemokine in soliden Tumoren, resultierend in einer eingeschränkten Migration der CAR-T-Zellen (88).

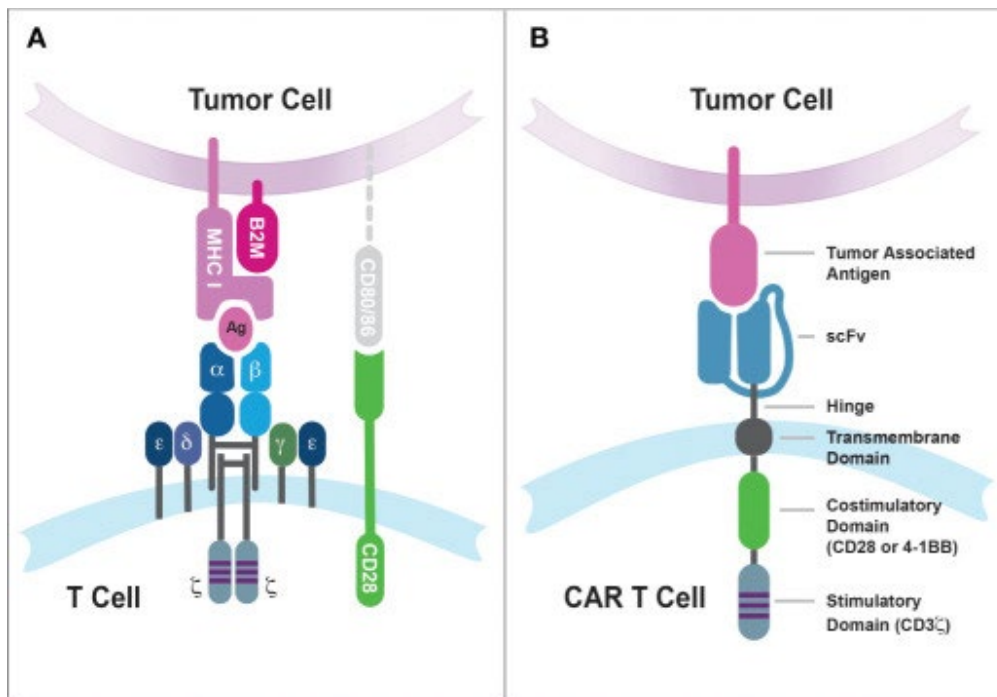


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines TCR und eines CAR

(A) MHC-restringierte Antigenpräsentation einer Tumorzelle an den TCR, mit abgebildet ist die Kostimulation über CD28 als zweites Signal.

(B) Erkennung eines Tumor-assoziierten Antigens durch einen CAR über das scFv, welches über die ζ-Kette mit der kostimulatorischen Domäne und der Signaldomäne verbunden ist.

Copyright © 2023 Mitra, Barua, Huang, Ganguly, Feng and He (89).

2.4 T-Zell-Dysfunktion und Seneszenz

Wie im Abschnitt 2.1 beschrieben, besitzen maligne Tumoren die Fähigkeit der Immunevasion, indem sie ein immunsuppressives TME schaffen, welches wiederum maßgeblich zur sog. „Dysfunktion“ von T-Zellen führt (36). Es handelt sich hierbei um einen Zustand, welcher in der frühen Phase der Tumorgenese beginnt und v.a. Antigen-gesteuert ist (90). T-Zell-Dysfunktion lässt sich in drei Hauptmechanismen klassifizieren, die sich in ihrer Genese unterscheiden und zu unterschiedlichen Eigenschaften der dysfunktionalen T-Zellen führen. Bei diesen Mechanismen handelt es sich um die Anergie, die Erschöpfung, auch „Exhaustion“ genannt, und die Seneszenz (4, 91). **Anergie** entsteht aufgrund einer inadäquaten Stimulation der Zellen, beispielsweise durch verminderte kostimulatorische Signale vermittelt durch CD28 oder durch vermehrte koinhibitorische Signale wie sie durch das Molekül CTLA-4 vermittelt werden. Dies führt in der Konsequenz zu einer reduzierten Proliferationskapazität und zu verminderter Funktion (92, 93).

Exhaustion wiederum ist ein Zustand, den T-Zellen aufgrund von chronischer Überstimulation mit einem Antigen erreichen und der insbesondere durch eine stark herabgesetzte Effektorfunktion sowie eine Überexpression von inhibitorischen

Rezeptormolekülen gekennzeichnet ist (7, 94). Zunächst wurde dieser dysfunktionale Zustand der Exhaustion im Kontext von chronisch viralen Infektionen beschrieben (95), später publizierte man auch das Vorkommen von Exhaustion der T-Zellen in malignen Tumoren (96). Zu den inhibitorischen Rezeptoren, die mit dem Phänotyp der Exhaustion assoziiert sind, gehören u.a. PD-1, CTLA-4, LAG-3, KLRG1 (engl. *Killer cell Lectin-like Receptor G1*) oder TIM-3 (97, 98). Insbesondere die Interaktion zwischen PD-1 (CD279) und dessen Liganden PD-L1 (B7-H1 bzw. CD274) wurde in verschiedenen Malignomen, wie z.B. dem hepatozellulärem Karzinom (HCC) als Treiber der Exhaustion von CD8⁺ T-Zellen beschrieben (99). Aus diesem Grund wurde die PD-1/PD-L1-Interaktion als Ziel in der Immuntherapie betrachtet, um hiergegen beispielsweise Antikörper zu entwickeln (100). Die Mechanismen, die zur Induktion von Exhaustion führen, sind komplex und vielfältig. Am Beispiel der PD-1 Interaktion kann man sehen, dass nachgeschaltete Signalwege involviert sind, wobei insbesondere die Phosphorylierung von ZAP70, einem durch TCR-Aktivierung rekrutierten Protein, verhindert wird (101). Die Auswirkungen des PD-1 Signalwegs haben vielfältige Auswirkungen auf T-Zellen. Hierzu gehören u.a. die vermehrte Apoptose in T-Zellen (102), die reduzierte zytotoxische Kapazität sowie die Hemmung der Sekretion bestimmter Zytokine (103).

Zelluläre **Seneszenz** ist zunächst ein natürlicher Prozess, der zu einer Abnahme der Zellteilung führt und welcher eines der neun Kennzeichen des Alterungsprozesses ist, neben Telomerverkürzung und weiteren (104). Bereits im Jahr 1961 beschrieb Leonard Hayflick, dass humane diploide Fibroblasten sich zwischen 40 und 60 Mal in einer *in vitro* Zellkultur teilen, bis sie den Zustand der Seneszenz erreichen und sich nicht mehr teilen (105). Auch T-Zellen sind von Seneszenz betroffen, wobei diese neben dem Alterungsprozess auch im Rahmen von malignen Tumorerkrankungen auftritt. Das TME spielt bei der Induktion dieser eine entscheidende Rolle. Insbesondere scheinen ein gesteigerter Verbrauch von Glukose durch tumorinduzierte regulatorische T-Zellen (T_{reg}) und eine wiederholte Stimulation durch Tumorantigene von besonderer Bedeutung zu sein. Aber auch die im TME vorkommenden Metabolite wie cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) und proinflammatorischen Zytokine wie IL-6 oder TNF- α begünstigen die Induktion von Seneszenz (106). Wie auch bei der Entstehung von Exhaustion sind die nachgeschalteten Signalwege, die zur Entstehung von Seneszenz in T-Zellen führen, komplex und noch nicht endgültig geklärt. Einer der Hauptakteure hierbei ist die MAP-Kinase (engl. *mitogen-activated protein kinase*) p38,

welche zum einen über Hemmung des Enzyms TERT (engl. *telomerase reverse transcriptase*) DNA-Schädigungen hervorruft, zum anderen über die Transkriptionsfaktoren STAT 1/3 (engl. *signal transducer and activator of transcription*) die Hochregulierung der Zellzyklusproteine p16, p21 und p53 begünstigt und schließlich durch Hemmung von Autophagie die mitochondriale Dysfunktion induziert (7). Dies führt zu charakteristischen Veränderungen der T-Zellen, die insbesondere den Phänotyp, die Effektorfunktion sowie Proliferation und Metabolismus betreffen. Phänotypisch weisen seneszente T-Zellen u.a. eine Herabregulierung von CD28 und CD27 bei gleichzeitiger Hochregulierung von CD57 und TIGIT vor (107, 108). In ihrer lytischen Kapazität bzw. Effektorfunktion sind sie eingeschränkt, genauso in ihrer proliferativen Kapazität. Seneszente T-Zellen zeigen ein spezifisches Profil an Zytokinsekretion, welches als SASP bezeichnet wird und Zytokine wie IL-6, TNF- α und IFN- γ einschließt. Aufgrund der bereits beschriebenen Mechanismen zeigen seneszente T-Zellen weiterhin eine reduzierte mitochondriale Funktion bei gleichzeitiger vermehrter Bildung von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (107). Zur genaueren Charakterisierung seneszenten Zellen konnten Saul D et al. einen Satz von 125 Genen identifizieren, welche mit Seneszenz assoziiert sind. Es zeigte sich zudem eine Reduktion dieses Gensatzes in humanem Fettgewebe nach der pharmakologischen Beseitigung seneszenten Zellen und in murinem Knochengewebe nach der gentechnischen Beseitigung seneszenten Zellen (109).

Aufgrund der zentralen Rolle des Proteins p38 im Kontext der Seneszenz wurde dieses als potenzielles therapeutisches Ziel betrachtet, um Seneszenz in T-Zellen zu verhindern. So zeigte sich beispielsweise, dass die Inhibition der MAP-Kinase p38 mit einer erhöhten Zytotoxizität und einer verstärkten Anti-Tumor Immunität einhergeht (110). Andere Ansätze verfolgen u.a. das Ziel, über Signalwege von T_{reg} die Induktion von Seneszenz zu verhindern (111) oder mithilfe von IL-15 beispielsweise die Hemmung der Zellzyklusproteine p16, p21 und p53 in CD8⁺ T-Zellen zu bewirken (112). Ein neuer Ansatz zur Reduktion von Seneszenz in T-Zellen wurde von unserer Forschungsgruppe durch Überexpression einer Isoform des Proteins p53, der $\Delta 133p53\alpha$ Isoform, demonstriert (12). Auf die Isoformen des Proteins p53 wird im Abschnitt 2.5 genauer eingegangen. Unsere Studie zeigte, dass die gentechnische Modifikation von T-Zellen, welche zur Überexpression von $\Delta 133p53\alpha$ führte, in hochproliferativen Zellen und stärkerer Zytokin Freisetzung resultiert sowie eine Herabregulierung einiger Seneszenz-typischer Marker bewirkt (12).

2.5 p53 und p53-Isoformen

Das Protein p53 spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellzyklus von Zellen mit DNA-Schädigung, bei der Regulation der Genexpression, bei der DNA-Reparatur sowie der Induktion der Apoptose, so dass es in der Literatur im Allgemeinen als „Wächter des Genoms“ bezeichnet wird (28). Die Menge an p53 in einer Zelle wird durch die Rate des Abbaus bestimmt. Unter physiologischen Zuständen unterliegt p53 einer Regulierungsschleife, die zur Degradierung des Proteins führt. Hierbei bindet p53 als Transkriptionsfaktor an das MDM2 Gen (engl. *Mouse double minute 2 homolog*) und führt zu dessen Transkription und Translation. MDM2 wiederum ist ein Protein, welches direkt an die Transaktivierungsdomäne von p53 bindet und somit dessen transkriptionelle Aktivität hemmt. Weiterhin formt es im gemeinsamen Komplex mit MDM4 das Heterodimer der E3-Ubiquitinligase, welche zur Ubiquitin Markierung von p53 und damit dessen proteolytischen Abbau führt, wodurch sich die Schleife schließt (113-115). Kommt es beispielsweise zu zellulärem Stress oder zu DNA-Schädigung, wird p53 durch Enzyme wie ATM-Kinasen (engl. *Ataxia Telangiectasia Mutated*), DNA-abhängige Proteinkinasen oder ATR-Kinasen (engl. *Ataxia telangiectasia and Rad3 related*) enzymatisch modifiziert, sodass es zu einer Stabilisierung und Aktivierung von p53 kommt (113). Auch wird in der Literatur ein möglicher Zusammenhang zwischen der Deregulierung dieser posttranslationalen Modifikationen von p53 und Karzinogenese diskutiert (116). Das nun aktivierte p53 induziert als Transkriptionsfaktor zahlreiche Zielproteine, die vielfältige Einflüsse auf die Biologie der Zelle haben. Zu diesen gehören die Einleitung der Apoptose über Aktivierung von Proteinen wie PUMA (engl. *p53 upregulated modulator of apoptosis*) und BAX (engl. *Bcl-2 associated X protein*), welche zu den proapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie (engl. *B-cell-lymphoma-2*) gehören, und über die Hemmung des antiapoptotischen Bcl-2 selbst (117, 118). Weiterhin gehört zu den Funktionen von p53 die Beeinflussung der Autophagie über z.B. DRAM (engl. *DNA Damage-regulated Autophagy Modulator*) und des Metabolismus über SCO2 (engl. *Synthesis of Cytochrome c Oxidase 2*) oder TIGAR (engl. *TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator*), die Induktion des Zellzyklusarrests hauptsächlich über p21 (CDKN1A als entsprechendes Gen) und die p53 Regulation durch MDM2 (119-121). Darüber hinaus spielt p53 auch eine wichtige Rolle in der Regulierung von Seneszenz. Die durch p53 induzierte Seneszenz findet sich in Zellen, die sowohl von Telomerverkürzung als auch von Onkogen-Aktivierung und oxidativem Stress betroffen sind (122). Das bereits

erwähnte p21, welches durch p53 aktiviert wird, führt zu einem initialen Zellzyklusarrest. Dauert dieser an, wird der CDK-Inhibitor p16^{Ink4a} hochreguliert, welcher seinerseits RB1 (Retinoblastom-Protein) hochreguliert. Dies führt zu einem permanenten Zellzyklusarrest (123). Weitere Zielproteine, die von p53 aktiviert werden, sind PAI-1 (engl. *Plasminogen activator inhibitor-1*), welches die replikative Seneszenz induziert (124), und PML, welches durch Ras hochreguliert wird und seinerseits über Beeinflussung von p53 Seneszenz begünstigt (125). Die durch p53 induzierte zelluläre Seneszenz beeinflusst insbesondere auch die sekretorische Kapazität und Komposition von Zellen, was man als „Senescence-messaging secretome“ (SMS) bezeichnet, wozu u.a. Wnt, Insulin, TGF β , Plasmin, Interleukine etc. gehören (126). Dieses auch unter dem Namen SASP bekannte Sekretionsprofil, beispielsweise freigesetzt durch seneszente Fibroblasten im TME, fördert sowohl *in vivo* eine erhöhte Fähigkeit zur Tumorprogression als auch im Zellmodell eine verstärkte Proliferation und Invasivität der Tumorzellen, was in verschiedenen Entitäten wie Mamma- und Prostatakarzinom oder im Malignen Melanom gezeigt werden konnte (127).

Es ist mittlerweile allgemein anerkannt, dass in humanen Zellen p53 nicht als einzelnes Protein fungiert, sondern vielmehr aus einem komplexen Netzwerk einer Familie von 12 verschiedenen Protein Isoformen bestehen kann. Das humane TP53 Gen kodiert gewebeabhängig 9 verschiedene mRNAs, welche durch die alternative Nutzung zweier Promotoren (P1 und P2) sowie durch das alternative Splicing von Intron-2 und Intron-9 entstehen. Weiterhin erfolgt die Initiation der Translation der von P1 transkribierten mRNA von Codon 1 und/oder 40, während die Initiation der Translation der von P2 transkribierten mRNA von Codon 133 und/oder 160 erfolgt. Das alternative Splicing wiederum führt zur Bildung der α , β und γ Isoformen (128) (Abbildung 3).

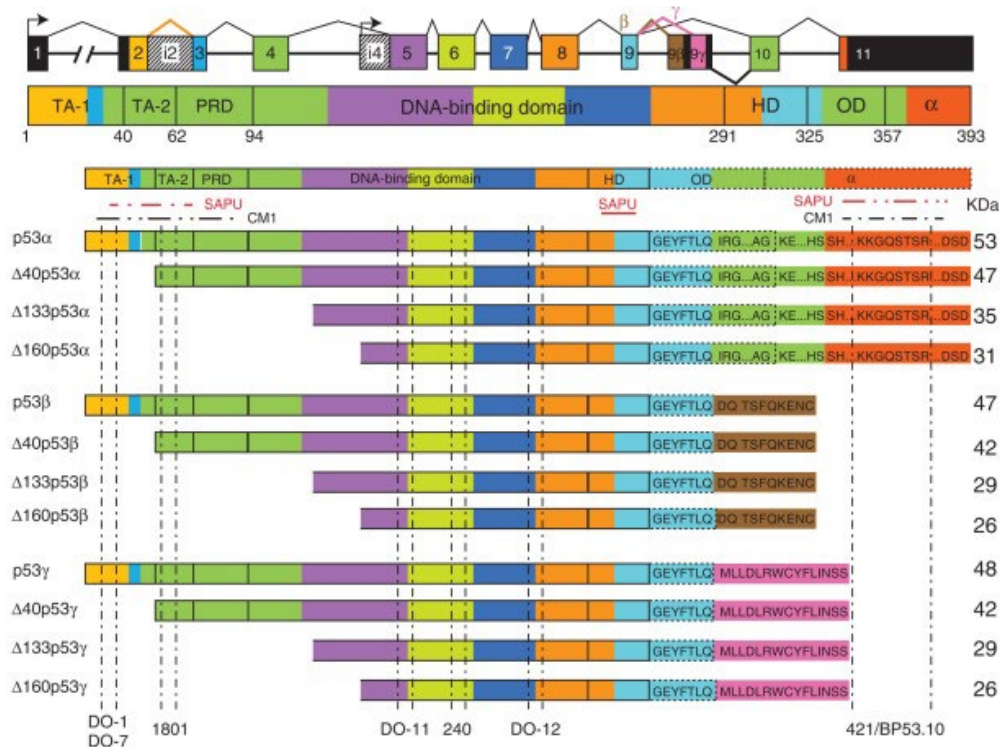


Abbildung 3: Schematische Darstellung der zwölf p53 Isoformen

Die Proteindomänen und entsprechenden Exone sind in derselben Farbe dargestellt. Die $\Delta 40$ Isoformen entstehen durch alternative Translation im Bereich ATG40, während die $\Delta 133$ und $\Delta 160$ Isoformen durch Transkription von P2 ausgehend gebildet werden. Die β und γ Formen am C-Terminus entstehen aufgrund des alternativen Splicings von Intron-9.

Der Nachdruck erfolgte mit freundlicher Genehmigung von Cold Spring Harbor Laboratory Press © (128).

Die Funktion der p53 Isoformen ist komplex und hängt von der Interaktion der Isoformen mit dem „full-length“ FLp53 (p53 α), mit jeweils anderen p53 Isoformen sowie mit anderen Proteinen ab. U.a. beeinflussen p53 Isoformen das Zellverhalten durch Einwirkung auf die transkriptionelle Aktivität von p53, sowohl über den Promotor als auch stressabhängig (129). Zur Veranschaulichung können einige Beispiele erwähnt werden. So kann beispielsweise die $\Delta 40$ p53 α Isoform mit p53 α Hetero-Oligomere bilden und die transkriptionelle Aktivität des IGF1-Rezeptor Promotors beeinflussen, was die entscheidende Rolle von $\Delta 40$ p53 α bei der Regulation der FLp53 Funktion unterstreicht. Die p53 β Isoform hingegen kann durch indirekte Interaktion mit p53 α am BAX-Promotor die Promotor-Aktivität von p53 α beeinflussen. $\Delta 133$ p53 α wiederum kann beispielsweise unabhängig von p53 α durch Interaktion mit dem Protein p73 die DNA-Reparatur initiieren (130). Weiterhin besteht eine potenzielle Verbindung zwischen den p53 Isoformen und dem Alterungsprozess. So zeigte sich in Versuchen mit transgenen Mäusen, die $\Delta 40$ p53 überexprimieren, dass diese einen Alterungs-assoziierten Phänotyp, eine kleinere Körpergröße und eine geringere Knochendichte aufweisen. Die Wirkung von $\Delta 40$ p53 auf den Alterungsprozess fußt zum einen auf

einer direkten Interaktion mit FLp53, was zu dessen proteasomalem Abbau führt, und zum anderen auf einer direkten Beeinflussung des IGF-1-Signalwegs (131). In nahezu seneszenten Fibroblasten von Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom (HGPS) Patienten, die von einer vorzeitigen Alterung betroffen sind, zeigt die wiederhergestellte Expression von $\Delta 133p53$ eine Verzögerung der Seneszenz bei gleichbleibenden Spiegeln an Progerin. Eine verringerte $\Delta 133p53$ Expression oder p53 β Überexpression hingegen beschleunigt das Auftreten der Seneszenz in den Fibroblasten. Auch hier ist die Interaktion der $\Delta 133p53$ Isoform mit FLp53 der entscheidende Mechanismus (132).

Es stellte sich heraus, dass die Rolle der p53 Isoformen in Krebserkrankungen auch von Bedeutung ist. So zeigte sich, dass beim Mammakarzinom die vermehrte Expression von $\Delta 40p53\alpha$ mit einem aggressiveren Subtypen einhergeht, wohingegen die p53 β Expression in dieser Tumorentität mit einem verbesserten krankheitsfreien Überleben verknüpft ist, v.a. bei Patientinnen mit p53 Mutation (133). In anderen Entitäten ist die Expression von p53 Isoformen bei gleichzeitiger p53 Mutation von Relevanz für den Krankheitsverlauf, was die Bedeutung des komplexen Netzwerks von p53 und dessen Isoformen unterstreicht. Exemplarisch kann hier eine Studie zitiert werden, die die Korrelation zwischen $\Delta 133p53$ Expression bei gleichzeitiger p53 Mutation und dem Gesamtüberleben sowie dem rezidivfreien Überleben bei serösem Ovarialkarzinom aufdeckte (134).

Auch beim kolorektalen Karzinom führt die vermehrte Expression von $\Delta 133p53\alpha$ in den Tumorzellen zu einem kürzeren krankheitsfreien Überleben (135). Neben diesen gibt es noch viele weitere Tumorentitäten, bei denen die erhöhte Expression von p53 Isoformen eine Rolle spielt, wie z.B. das Glioblastom (136), das Plattenepithelkarzinom (SCC) von Kopf und Hals (137) oder die akute myeloische Leukämie (AML) (138-140). Im Kontext von Malignomen könnte die genaue Kenntnis und Erforschung der p53 Isoformen und ihrer Funktionen dazu beitragen, prognostische Marker zu formulieren. So zeigten sich verschiedene Isoformen sowohl auf dem mRNA- als auch Proteinlevel als mögliche Marker für das Outcome von verschiedenen Malignomen. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die Expression von $\Delta 40p53\alpha$ als prognostischer Marker für das progressionsfreie Überleben des muzinösen Ovarialkarzinoms herangezogen werden kann. In gleicher Weise sind hohe Expressionslevel von $\Delta 133p53\alpha$ mRNA mit einem besseren Gesamtüberleben beim high-grade serösen Ovarialkarzinom assoziiert (141). Als andere Beispiele dienen das vergleichbar gute Gesamtüberleben

beim Mammakarzinom in den Gruppen mit Expression von p53 γ bzw. „Wildtyp“ p53 α (142) oder die verminderte Rate an Nebenwirkung bei Radiatio von Hirntumoren in der Gruppe mit erhöhter Δ 133p53 α Expression (143). Im Zusammenhang mit dem MM wurde die Assoziation der kurzen und TAp53 β/γ Isoformen mit dem klinischen Outcome der Patienten hergestellt (144). Beim intrahepatischen cholangiozellulären Karzinom korreliert eine hohe Δ 133p53/TAp53 Expression mit einem verkürzten Gesamtüberleben (145).

Gleichzeitig ermöglicht die Erforschung der p53 Isoformen die Etablierung neuer therapeutischer Möglichkeiten, wie z.B. medikamentöse Beeinflussung von p53 Signalwegen oder gentherapeutische Ansätze (146). Neben dem Einfluss auf die Karzinogenese spielen p53 Isoformen auch eine Rolle bei der Induktion von Seneszenz. Abhängig vom Zelltyp induzieren verschiedene Stressoren die Expression bestimmter Isoformen, während andere vermindert exprimiert werden. So konnte gezeigt werden, dass die Δ 40p53 α Isoform zelluläre Seneszenz in HCC-Zellen fördert (147). Ein anderes Beispiel ist die stressinduzierte Überexpression von Δ 40p53 und p53 β bei gleichzeitig verminderter Bildung von Δ 133p53 α , welche an einer reduzierten Proliferationskapazität und verstärkter Sekretion von Zytokinen des sog. SASP beteiligt ist. Diese fördern ihrerseits Tumorprogress und altersbezogene Erkrankungen (131). In diesem Kontext scheinen insbesondere die drei Δ 133p53 Isoformen eine führende Rolle zu spielen. Alle drei dieser Isoformen fördern in den meisten Tumormodellen die Karzinominvasion sowie Metastasierung. Δ 133p53 β bewirkt dies durch Induktion des Phänotyps von Tumorstammzellen sowie chronische Inflammation und ein immunsuppressives Mikromilieu (13, 15). Δ 133p53 α hingegen ermöglicht den Tumorprogress durch die Umgehung von Seneszenz in Tumorzellen (148). Jedoch sollte eine p53 Isoform nicht schlicht als Onkogen oder Tumorsuppressor betrachtet werden oder als „gut“ bzw. „schlecht“ kategorisiert werden. Grund hierfür ist, dass die Funktion der Isoformen sowohl vom Zelltyp als auch von den jeweils zugrunde liegenden biologischen Konditionen abhängt. Somit kann dieselbe p53 Isoform in einem Kontext eine vorteilhafte Funktion ausüben, während in einem anderen Kontext ein nachteilhafter Effekt entstehen kann (149). Diesen Grundsatz unterstützen auch die Forschungsergebnisse, die von unserer Arbeitsgruppe publiziert wurden. Diese zeigten nämlich, dass die bereits erwähnte Δ 133p53 α Isoform, die im Tumormodell zu einem Progress führt, bei Überexpression in TCR-modifizierten T-Zellen stammzellähnliche Eigenschaften der T-Zellen fördert,

was sich wiederum in einer verbesserten Fitness und Funktion der T-Zellen im Maus-Xenograft-Modell niederschlägt (12).

2.6 $\Delta 133p53\beta$

Da die Forschungsfrage dieser Arbeit auf der Beschreibung des Einflusses der $\Delta 133p53\beta$ Isoform in TCR-modifizierten T-Zellen aufbaut, bezieht sich dieses Kapitel gesondert auf die Erkenntnisse über die $\Delta 133p53\beta$ Isoform in der Literatur. An dieser Stelle sei zu erwähnen, dass sich die verfügbare Literatur fast ausschließlich auf den Einfluss dieser Isoform in Tumorzellen bezieht.

Im MCF-7 Zellmodell (engl. *Michigan Cancer Foundation - 7*), einer Mammakarzinom Zelllinie, verstärkt $\Delta 133p53\beta$ das Potenzial zur Bildung von Krebsstammzellen, indem es die Expression der Schlüsselfaktoren der Pluripotenz wie SOX2, OCT3/4 und NANOG stimuliert. Unter der Therapie mit Etoposid erhöht sich zudem die Expression von $\Delta 133p53\beta$, wodurch die Rezidivrate steigt (13). In einer anderen Mammakarzinom Zelllinie, MDA-MB-231, zeigt sich eine erhöhte Expression von $\Delta 133p53\beta$ und damit einhergehend ein verstärktes metastatisches Potenzial. Weiterhin ist in den $\Delta 133p53\beta$ exprimierenden Zellen die CD44⁺/CD24⁻ Subpopulation erhöht, welche eine Assoziation mit dem Krebsstammzellen Phänotyp aufweist (13). Weitere Versuche an Zelllinien des kolorektalen Karzinoms (KRK) konnten nachweisen, dass $\Delta 133p53\beta$ direkt an die GTPase RhoB bindet. Diese Bindung ist spezifisch und beeinflusst die nukleäre Lokalisation von RhoB in diesen Zelllinien. Hierdurch vermindert sich die Aktivität des pro-apoptotisch wirkenden RhoB. Zudem ist das Metastasen-freie Überleben bei KRK Patienten mit hohen mRNA Leveln an $\Delta 133p53\beta$ vermindert (14). Eine weitere Studie konnte wichtige mechanistische Aspekte der $\Delta 133p53\beta$ Aktivität beschreiben (150). Diese wird u.a. über die Bildung von Aggregaten reguliert, bei denen Interaktionen mit der p63 Familie sowie dem CCT-Chaperone-Komplex eine Rolle spielen. Die Depletion von CCT-Chaperone-Komplex führt zur Akkumulation von $\Delta 133p53\beta$ Aggregaten und damit zum Verlust der $\Delta 133p53\beta$ -abhängigen Krebsinvasion. Für die Bindung an den CCT-Komplex spielt insbesondere der N-Terminus der $\Delta 133p53\beta$ die entscheidende Rolle. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Proteine $\Delta Np63\alpha$ und TAp63 α mit CCT3 im Komplex an $\Delta 133p53\beta$ binden und die Aggregat Bildung reduzieren, wodurch der Komplex in den Nukleus gelangt. In MCF-7 Zellen führt der Komplex aus $\Delta 133p53\beta$ und $\Delta Np63\alpha$ oder $\Delta Np63\gamma$ zu synergistischer Verstärkung der EMT (Migration), indem E-Cadherine runter- und N-

Cadherine hochreguliert werden. Zusätzlich beeinflusst $\Delta Np63\alpha$ auch die Kinetik von $\Delta 133p53\beta$, indem es $\Delta 133p53\beta$ aus Aggregaten rekrutiert, wodurch dessen intrazelluläre Mobilität erhöht wird und es seine Funktionen verfügbar macht. Dies wiederum resultiert in Migration und Invasion (150). In einer anderen Publikation wurde beschrieben, dass trotz der Neigung von $\Delta 133p53\beta$ zur Bildung von Aggregaten, eine Bildung stabiler Komplexe mit p53-spezifischer DNA möglich ist. Dies führe zu zwei möglichen Szenarien. Erstens könnte es zu einer Konkurrenz zwischen $\Delta 133p53\beta$ und p53 gegenüber p53 responsiven Elementen kommen. Die zweite Hypothese besagt, dass $\Delta 133p53\beta$ und p53 einen Komplex bilden könnten, der die Bindung an p53 responsive Elemente erlaubt (151). In den weiteren publizierten Arbeiten zu der $\Delta 133p53\beta$ Isoform geht es hauptsächlich um den Effekt auf verschiedene Tumorentitäten. So ist in Luminal-A Mammakarzinomen (WT p53) bei Expression von $\Delta 133p53\beta$ die Rezidivrate um den Faktor 8 und das Sterberisiko um den Faktor 3 erhöht (152). Auch im Glioblastom konnte beobachtet werden, dass diese Isoform die Tumorentwicklung fördert und sich damit negativ auf das Outcome auswirkt. Tumorzellen des Glioblastoms mit erhöhter $\Delta 133p53\beta$ mRNA lagern sich in einem Mikromilieu mit erhöhtem immunsuppressivem Phänotyp zusammen, welcher PD-L1⁺ Zellen mit erhöhter Expression an CCL2 (engl. *CC-chemokine ligand 2*) und CSF1R enthält sowie einen erhöhten Anteil an CD163⁺ Makrophagen aufweist. Womöglich induziert in Glioblastomen Hypoxie zusätzlich die Erhöhung von $\Delta 133p53\beta$, was für eine Migration der Tumorzellen in Richtung Blutgefäße sorgt (153). Und letztlich wurde auch nachgewiesen, dass $\Delta 133p53\beta$ mit einer aggressiven Form des Prostatakarzinoms assoziiert ist. Auch hier scheint Hypoxie ein Trigger für die Expression dieser Isoform zu sein. Zusätzlich geht die erhöhte Expression von $\Delta 133p53\beta$ mit einer erhöhten Infiltration von T-Zellen und tumorfördernden CD163⁺ Makrophagen einher. Insgesamt zeigt sich in dieser Population ein kürzeres progressionsfreies Überleben, ein Gleason-Score von ≥ 7 und ein immunsuppressives Mikromilieu mit hohem Anteil an PD-1⁺, PD-L1⁺ und CSF1R⁺ Zellen (15). Zusammenfassend wurde berichtet, dass die $\Delta 133p53\beta$ Isoform die Entwicklung aggressiverer Tumoren in den untersuchten Entitäten fördert, diese z.T. resistenter gegen Chemotherapeutika macht, Migration induziert und mit einem immunsuppressiven Tumormikromilieu assoziiert ist. Bisher wurde diese Isoform im Kontext einer Überexpression in T-Zellen jedoch nicht erforscht.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	Systec GmbH (Linden, Deutschland)
Bakterienbrutschrank	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Bestrahlungsanlage Gammacell 2000	Mølsgaard Medical (Ganløse, Dänemark)
CO ₂ -Inkubator Heracell	Heraeus (Hanau, Deutschland)
CO ₂ -Inkubator Function line	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Durchflusszytometer BD FACS Canto™ II	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Elektrophorese Netzteil EPS600	Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
Heizblock Thermo Stat plus	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
iBright CL1500 Imaging System	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
iBlot 2 Dry Blotting System	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Microplate Reader MRXC	DYNEX Technologies (Chantilly, USA)
Mikroskop Wilovert	Hund (Wetzlar, Deutschland)
Mikroskop Axiostar	Zeiss (Jena, Deutschland)
Knick 766 pH-Meter	Calimatic (Zweibrücken, Deutschland)
Photometer Ultrospec 1000	Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
Scanner Epson Perfection 2400 Photo	Epson (Suwa, Japan)
Schüttler ORS aero r	Infors AG (Bottmingen, Schweiz)
Stickstofftank	Taylor-Wharton (Baytown, USA)
UV-Transilluminator	Biostep GmbH (Jahnsdorf, Deutschland)
Vortex Schüttler	Scientific Industries (New York, USA)
Wasserbad 1003	Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel, Deutschland)
Wasserbad F12	Julabo Labortechnik GmbH (Seelbach,

	Deutschland)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge Megafuge 3.0R	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge Megafuge 40R	Thermo Scientific (Langenselbold, Deutschland)
Zentrifuge Omnifuge 2.ORS	Heraeus (Hanau, Deutschland)

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Materialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläser	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
ELISA-Platten	Greiner Bio-One (Nürtingen, Deutschland)
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,2/0,5/1,5/2 ml)	Eppendorf (Wesseling, Deutschland)
FACS-Röhrchen (5 ml)	Greiner Bio-One (Nürtingen, Deutschland)
Glas (0,5/1/2 l)	Schott (Mainz, Deutschland)
Kryoröhrchen, 2 ml	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Mini Protein Gels Bolt™ 10 %, Bis-Tris, 1,0 mm	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Nalgene® Cryo Freezing Container	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Petrischale (10 cm)	Starlab GmbH (Hamburg, Deutschland)
Pipette mit Spitze CELLSTAR® (2/5/10/25/50 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Pipettenspitzen TipOne® (10/200/1000 µl)	Starlab GmbH (Hamburg, Deutschland)

Präzisionsküvetten aus Quarzglas SUPRASIL®	Hellma GmbH & Co. KG (Müllheim, Deutschland)
Röhrchen CELLSTAR® (15/50 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Stericup® (500 ml: 0,22 µm/0,45 µm)	Merck Millipore GmbH (Schwalbach, Deutschland)
Zählkammer Fuchs-Rosenthal (0,2 mm Tiefe, 0,0625 cm ²)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Zellkultur Multiwellplatte CELLSTAR® (6- / 24- / 48- / 96-Well)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Zellkulturflaschen CELLSTAR® (25 / 75 / 175 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Zellkulturschale mit Nocken® (∅ 100 mm)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

3.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
2-Propanol (Isopropanol)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
AB-Humanserum	Transfusionszentrale Universitätsmedizin Mainz
BDTF perm wash	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Bolt MES SDS Running buffer (20x)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Brefeldin A	Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
Cell Proliferation Dye eFluor™ 670 (CFSE)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DNA ladder (1 kb)	New England Biolabs (Frankfurt/Main, Deutschland)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Enhanced chemiluminescent (ECL) HRP SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Ethanol, absolut	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ficoll-Paque	STEMCELL Technologies Inc. (Vancouver, Kanada)
FuGENE® 6 Transfektionsreagenz	Promega (Madison, USA)
Gibco™ Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28	Fisher Scientific (Pittsburgh, USA)
Grams Kristallviolettlösung	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
HEPES Puffer	Lonza (Basel, Schweiz)
Humanes IL-2 (Proleukin® S)	Novartis (Basel, Schweiz)
Ionomycin	Cayman Chemical Company (Ann Arbor, USA)
JM-109 Stock-Lösung	New England Biolabs (Frankfurt/Main, Deutschland)
Laemmli Sample Buffer 2x	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, USA)
L-Glutamin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Monensin	eBioscience Inc. (San Diego, USA)
Nuklease-freies Wasser	QIAGEN (Venlo, Niederlande)
OKT3 (Orthoclone Okt-3®)	Janssen-Cilag GmbH (Frankfurt/Main Deutschland)
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
peqGREEN	PEQLAB GmbH (Erlangen, Deutschland)

Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Phosphate-buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Polybrene	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
PowerUp SYBR Green Master Mix	Applied Biosystem (Waltham, USA)
Precision Plus Protein WesternC Blotting Standard	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, USA)
Protein Assay Reagent A, B and S	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, USA)
Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, USA)
RPMI 1640	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Sodium dodecyl sulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Sodium-Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
XL-1 Blue Stock-Lösung	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)

3.4 Zellkulturmedien

Tabelle 4: Verwendete Puffer und Zellkulturmedien

Puffer/Medium	Zusätze
DMEM complete	10 % FCS (hitzeinaktiviert (HI)) 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin 2,5 % HEPES
DMEM only	Ohne Zusätze
Einfríermedium	FCS (HI) + 10 % DMSO
Erythrozyten Lysepuffer	174 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM Na ₂ EDTA

	pH 7,3
LB Ampicillin Agarplatten	1 l LB Medium + 20 g Agar
RPMI	10 % FCS (HI) 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin 2,5 % HEPES
Humanes RPMI (huRPMI)	10 % humanes AB-Serum (HI) 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin 2,5 % HEPES
Laufpuffer 1x	20 ml 20x Bolt MES SDS Running buffer 380 ml VE-Wasser
TAE Puffer 50x	242 g Tris Base 100 ml 0.5 M Na ₂ EDTA pH 8,0 57,1 ml Acetat Mit dH ₂ O auf 1 l aufgefüllt
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20

3.5 Molekularbiologische Materialien (Kits, Enzyme, Primer, Plasmide)

Tabelle 5: Verwendete molekularbiologische Kits und Enzyme/Puffer

Kits	Hersteller
EndoFree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN (Venlo, Niederlande)
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
MiniPrep Kit	QIAGEN (Venlo, Niederlande)
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN (Venlo, Niederlande)
Enzyme und Puffer	Hersteller
Bam H I HF	New England Biolabs (Frankfurt/Main, Deutschland)
Not I HF	New England Biolabs (Frankfurt/Main, Deutschland)

T4 DNA Ligase	New England Biolabs (Frankfurt/Main, Deutschland)
T4 DNA Ligase Reaction Puffer	New England Biolabs (Frankfurt/Main, Deutschland)

Primer für PCR

Tabelle 6: PCR Primer

Primer	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Δ133p53β	ACT CTG TCT CCT TCC TCT TCC TAC AG	TCA TAG AAC CAT TTT CAT GCT CTC TT
GAPDH	GTT TAC ATG TTC CAA TAT GAT TCC AC	TCA TAT TTG GCA GGT TTT TCT AGA C
Sequenzig Primer (SE-206)	TTA CAC AGT CCT GCT GAC CAC C	-

Plasmide

pcDNA 3.1 Δ133p53β (siehe Anhang)

pMx_IRES_puro (pMx_RTV-014) (siehe Anhang)

pColt-Galv

pHIT-60

3.6 Zelllinien

Phoenix-Ampho

Die Phoenix-Ampho Zelllinie, eine epithelähnliche Zelle aus der humanen embryonalen Zelllinie HEK293T/17, wurde an der Stanford Universität (USA) vom Nolan Labor hergestellt. Diese Zelllinie dient der Generierung von Retroviren. Mithilfe von Helferplasmiden können Phoenix-Ampho Zellen transfiziert und anschließend für eine retrovirale Transduktion genutzt werden.

K562_A2_CD80⁺

K562_A2_CD80⁺ ist eine humane chronisch myeloische Leukämie (CML) Zelllinie, welche mit den Vektoren HLA_A*0201 und humanem CD80 transfiziert wurde. Somit können sie als antigenpräsentierende Zellen für eine peptidspezifische Stimulation von antigenspezifischen TCR-modifizierten T-Zellen genutzt werden.

Saos2 und Saos2/143

Saos2 sind eine humane HLA_A*0201⁺ Osteosarkom Zelllinie ohne TP53 Gen. Saos2/143 ist von Saos2 durch Transfektion mit einem Vektor abgeleitet, der für p53 mit der Mutation V143 codiert.

3.7 Antibiotika

Tabelle 7: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller
Ampicillin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Geneticin (G418)	Gibco (Eggenheim, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Puromycin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

3.8 Antikörper

FACS-Antikörper

Tabelle 8: FACS-Antikörper

Antigen	Konjugat-Farbstoff	Klon	Reaktivität	Hersteller	Verdünnung
CD3	APC	UCHT1	Human	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)	1:50
CD4	FITC	RPA-T4	Human	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)	1:50
CD4	APC	RPA-T4	Human	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)	1:50
CD8	FITC	HIT8a	Human	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)	1:50

CD8	PE-Cy7	RPA-T8	Human	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)	1:50
CD8	APC	RPA-T8	Human	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)	1:50
CD28	FITC	CD28.2	Human	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)	1:50
CD28	PE	CD28.2	Human	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)	1:50
CD45RA	PE	HI100	Human	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)	1:25
CD45RA	V450	HI100	Human	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)	1:50
CD57	APC	NK-1	Human	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)	1:50
CD62L	PE-Cy5	DREG56	Human	Beckman Coulter (Brea, USA)	1:25
CD107a	PE-Cy5	H4A3	Human	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)	1:50
CD155	PE	SKII.4	Human	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)	1:50
CD160	PE	BY55	Human	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)	1:50

LAG-3	PerCP	Polyklonal	Human	R&D Systems (Minneapolis, USA)	1:50
TIGIT	PE	REA1004	Human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)	1:50
TIGIT	APC	REA1004	Human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)	1:50
TIM-3	Alexa Fluor 488	344823	Human	R&D Systems (Minneapolis, USA)	1:50
PD-1	FITC	MIH4	Human	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)	1:50
PD-1	APC	EH12.2.H7	Human	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)	1:50
PD-L1	APC	MIH1	Human	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)	1:50
V β 3	PE	REA646	Maus	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)	1:50

3.9 Humanes IFN γ ELISA Kit

Hersteller: BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)

Anti-human IFN γ (Capture-Antikörper)

Biotinyliertes, anti-humanes IFN γ (Detection-Antikörper)

Streptavidin horseradish Peroxidase (Enzym-Reagenz)

Rekombinantes humanes IFN γ (Standard)

Substrat A und B

3.10 Peptide

p53₂₆₄₋₂₇₂ (9-mer) LLGRNSFEV

Biosynthan (Berlin, Deutschland)

3.11 Programme

FlowJo Version 10

TreeStar Inc. (Ashland, USA)

GraphPad Prism 6

GraphPad Software Inc. (LaJolla, USA)

3.12 Methoden

3.12.1 Klonierung von $\Delta 133p53\beta$ in einen retroviralen Vektor

Zur Untersuchung des Einflusses der $\Delta 133p53\beta$ Isoform in humanen CD8⁺ T-Zellen klonierten wir die $\Delta 133p53\beta$ DNA (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Jean-Christophe Bourdon, University of Dundee, Vereinigtes Königreich) in einen geeigneten Vektor für eine stabile Expression. Hierbei bestand der erste Schritt des Klonierungsexperiments im enzymatischen Verdau der einzufügenden $\Delta 133p53\beta$ DNA sowie des Klonierungsvektors. Auf diesen Schritt folgte die Auftrennung der Fragmente in der Agarose-Gelelektrophorese entsprechend der Fragmentgrößen (Insert 643 bps und Vektor 5846 bps). Die zu erwartenden Fragmente konnten als entsprechende Banden isoliert und weiter aufgereinigt werden. Anschließend wurden die so aufgereinigten Fragmente miteinander ligiert und der so entstandene klonierte Vektor wurde dann in kompetente Bakterien transformiert, aus denen ein entsprechender Klon selektiert wurde.

3.12.1.1 Vektoren

In diesem Experiment wurde der retrovirale Vektor pMx_IRES_puro mit einer Puromycinresistenz-Kassette genutzt, in den die $\Delta 133p53\beta$ DNA geklont wurde. Dadurch entstand der Vektor $\Delta 133p53\beta$ _pMx_IRES_puro, der zur retroviralen Transduktion von humanen T-Zellen genutzt wurde.

Die entsprechende Vektormappe findet sich im Anhang.

3.12.1.2 Restriktionsverdau

Es wurden zwei Ansätze vorbereitet für den Restriktionsverdau, einen für die $\Delta 133p53\beta$ Isoform und einen für den pMx_IRES_puro Vektor.

Δ 133p53 β :

Δ 133p53 β DNA:	30 μ l (\cong 600 ng)
BamHI-HF	1 μ l
NotI-HF	1 μ l
CutSmart	3,6 μ l
Bidestilliertes H ₂ O	0,4 μ l

Insgesamt ergab sich ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 36 μ l. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C im Inkubator belassen.

pMx_IRES_puro:

pMx_IRES_puro DNA	1 μ l (\cong 1 μ g)
BamHI-HF	1 μ l
NotI-HF	1 μ l
CutSmart	2 μ l
Bidestilliertes H ₂ O	15 μ l

Insgesamt ergab sich ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 μ l. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C im Inkubator belassen.

3.12.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der DNA der Isoform und des Vektors entsprechend ihrer Fragmentgröße wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

Hierzu wurde 1 % Agarose-Gel erhitzt. Zu dem so verflüssigten Agarose-Gel wurden 1 μ l/ml des Fluoreszenzfarbstoffs peqGREEN hinzugefügt, welcher die Detektion der DNA erlaubte. Das so gegossene Gel wurde in der Kammer bei Raumtemperatur belassen, bis es durch Polymerisation zur Verfestigung kam. Die Kammer wurde dann vollständig mit 1x TAE-Puffer gefüllt. Die Proben wurden vorbereitet, indem sie mit, im Verhältnis 1:6 verdünnten, 6x DNA-Gel-Ladefarbstoff zusammengemischt wurden. Auch die 1 kb DNA-Leiter, die als Referenz zur Darstellung der Größen benötigt wurde, wurde mit 1x DNA-Gel-Ladefarbstoff zusammengemischt. Anschließend wurden sowohl die Leiter als auch die Proben in die Taschen des Gels pipettiert. Die

Elektrophorese wurde mit einer konstanten Spannung von 100 V für 20 Minuten laufen gelassen.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet. Die entsprechenden DNA-Banden wurden aus dem Gel herausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, um die DNA im nächsten Schritt zu reinigen.

3.12.1.4 Reinigung der DNA

Im Anschluss wurde die DNA-Isolierung entsprechend des Hersteller Protokolls des QIAquick Gel Extraction Kits (QIAGEN, Venlo, Niederlande) durchgeführt.

Die Konzentration der DNA konnte daraufhin ermittelt werden (Abschnitt 3.11.1.9).

3.12.1.5 DNA-Ligation

Um die verdaute $\Delta 133p53\beta$ DNA in den pMx_IRES_puro Vektor zu ligieren, wurde folgender Ligationsansatz vorbereitet.

$\Delta 133p53\beta$ DNA	2,9 μ l (\cong 56,11 ng)
pMx_IRES_puro DNA	5,68 μ l (\cong 100 ng)
T4 Ligase Puffer	2 μ l
T4 Ligase	1 μ l
Bidestilliertes H ₂ O	8,42 μ l

Damit ergab sich ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 μ l, welcher über Nacht bei 16 °C im Wasserbad inkubiert wurde. Der Ansatz konnte am nächsten Tag für die Transformation genutzt werden.

3.12.1.6 Transformation

Zur Transformation wurden die zum E. coli Stamm gehörenden XL-1 Blue Bakterien verwendet. Diese chemokompetenten Bakterien lagen im Labor in bereits vorbereiteten Aliquots vor, welche bei -80 °C gelagert wurden.

Aus dem Aliquot wurden 100 μ l der XL-1 Blue Bakterien entnommen und mit 10 μ l aus dem Ligations-Mix des $\Delta 133p53\beta$ _pMx_IRES_puro Konstruktes gemischt. Die Bakterien wurden mit dem DNA-Plasmid zur Inkubation für 30 Minuten auf Eis gelagert. In der Zwischenzeit wurde die LB (engl. *Lysogeny broth*) Agar Platte vorbereitet. Hierzu wurde LB Agar in einer Mikrowelle aufgewärmt, bis es sich verflüssigte. Es wurden 2 Platten mit je 25 ml LB Agar vorbereitet, die jeweils nach

Abkühlen des verflüssigten Agars mit Ampicillin beimpft wurden. Der Stock betrug 100 mg/ml und die genutzte Endkonzentration war 100 µg/ml. Damit ergab sich eine Verdünnung von 1:1000, was 25 µl Ampicillin pro 25 ml LB Agar ergab.

Im Anschluss an die 30-minütige Eislagerung wurde die Bakterien-Plasmid Mischung für 1,5 Minuten bei 42 °C im Wasserbad erwärmt und daraufhin erneut für 3 Minuten auf Eis kühl gelagert.

In ein 15 ml Zentrifugenröhrchen wurde 1 ml des LB Mediums vorgelegt, in welches die Bakterien-Plasmid Mischung überführt wurde. Das Röhrchen mit der Bakterien-Plasmid Mischung wurde daraufhin zur Inkubation für 1 Stunde im Schüttler bei 37 °C und 240 rpm (engl. *revolutions per minute*; „Umdrehungen pro Minute“) geschüttelt. Auf eine der Platten wurde anschließend 200 µl und auf die andere 800 µl der Bakterien-Plasmid Mischung dazugegeben. Die Platten wurden dann bei 37 °C inkubiert.

3.12.1.7 Übernacht Kultur für die Maxi-Prep

In eine Erlenmeyer Flasche wurden 100 ml des LB Mediums vorgelegt. Diese wurde daraufhin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml mit Ampicillin beimpft.

Aus der Bakterienkultur mit der Bakterien-Plasmid Mischung wurde eine Kolonie herausgepickt und in die Erlenmeyer Flasche mit dem selektiven LB Medium hinzugegeben. Die Flasche wurde bei 37 °C und 240 rpm über Nacht in den Schüttler gestellt.

3.12.1.8 Maxi Prep für die Plasmid DNA Purifikation

Nachdem die Erlenmeyer Flasche mit der transformierten Bakterienkolonie über Nacht im Schüttler belassen wurde, wurde das Volumen von 100 ml auf zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt.

Diese Röhrchen wurden bei 3000 rpm für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das bakterielle Zellpellet wurde dann in 10 ml P1 Puffer resuspendiert und mit demselben Volumen wurde auch das zweite Zellpellet aufgenommen. Im nächsten Schritt wurden 10 ml P2 Puffer hinzugefügt, das Zentrifugenröhrchen wurde mehrfach invertiert und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert.

Es wurde anschließend der QIA filter Cartridge vorbereitet. Zu dem Lysat wurden 10 ml gekühlter P3 Puffer hinzugefügt und anschließend erneut mehrfach invertiert. Im Anschluss wurde das Lysat in das Röhrchen des QIA filter Cartridge gegossen. Zu

dem filtrierten Lysat wurden 2,5 ml ER Puffer hinzugefügt. Nach mehrmaligem Invertieren inkubierte das Lysat für 30 Minuten auf Eis.

Das QIAGEN-tip 500 wurde äquilibriert, indem 10 ml QBT Puffer hinzugefügt wurden. Das filtrierte Lysat wurde nach erfolgtem Äquilibrieren in den QIAGEN-tip 500 aufgetragen und durchdrang die Membran der Gravitation folgend. Es erfolgten zwei Waschschriffe mit je 30 ml QC Puffer. Die DNA wurde dann mit 15 ml QN Puffer ausgewaschen, das entsprechende Eluat wurde in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Zu der ausgewaschenen DNA wurden 10,5 ml Raumtemperatur-warmes Isopropanol hinzugefügt. Nach gründlichem Schütteln erfolgte die Zentrifugation für 60 Minuten bei 4000 rpm und 4 °C.

Das DNA Pellet wurde erneut mit 5 ml Raumtemperatur-warmem 70 % Ethanol gewaschen. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 4000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit darin enthaltener DNA für 10 Minuten an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde dann in 200 µl TE Puffer aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

3.12.1.9 DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Photometer

Die Konzentration der purifizierten DNA wurde photometrisch ermittelt. Hierzu wurde das Gesamtvolumen der Küvette von 400 µl aus 392 µl TE Puffer und 8 µl DNA zusammen pipettiert, was einer Verdünnung von 1:50 entsprach.

Als Kontrollreferenz zur Konzentrationsbestimmung wurden 400 µl TE Puffer verwendet. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm gemessen.

Nachdem mittels Photometer die Konzentration ermittelt wurde, wurde durch Hinzugabe des entsprechenden Volumens TE Puffer die Endkonzentration auf 1 mg/ml festgesetzt. Die DNA wurde schließlich bei -20 °C gelagert.

3.12.1.10 Sequenzierung der $\Delta 133p53\beta$ _pMx_IRES_puro DNA (nach der Purifikation von gepickten Klonen)

Zur Sequenzierung der $\Delta 133p53\beta$ _pMx_IRES_puro DNA wurden zwei Reaktionsansätze in 200 µl PCR-Röhrchen vorbereitet, einen für den fw-Primer und einen für den rev-Primer

Erster Ansatz:

0,5 µl Plasmid DNA (=500 ng) + 1 µl SE206 (fw-Primer) + 5,5 µl H₂O

Zweiter Ansatz:

0,5 µl Plasmid DNA (=500 ng) + 1 µl R-pMxRTV014 (rev-Primer) + 5,5 µl H₂O

Die Sequenzierung wurde von dem Unternehmen GENterprise GENOMICS (StarSEQ GmbH, Mainz, Deutschland) durchgeführt.

Die entsprechend genutzten Primer sind in Tabelle 6 aufgelistet.

3.12.2 Isolierung von PBMCs

Zur Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) wurden sog. *Buffy Coats* gesunder HLA.A2⁻ Spender aus der Blutbank der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz bestellt. Beim *Buffy Coat* handelt es sich um ein Produkt, welches aus Vollblut gewonnen wird und das Leukozyten und Thrombozyten enthält. Der *Buffy Coat* wurde in einem Verhältnis von 1:1 mit PBS+EDTA gemischt. Hieraus wurden 35 ml des *Buffy Coat* mit 15 ml Ficoll[®] in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen vermischt. Die Zentrifugenröhrchen wurden dann für 10 Minuten bei 2200 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Es bildete sich daraufhin die charakteristische Schichtung in Plasma, Leukozytenfilm und Erythrozyten. Der Leukozytenfilm konnte nun mit einer Pipette isoliert werden. Dieser wurde dann mit 20 ml Erythrozytenlyse Puffer für 10 Minuten behandelt und anschließend zwei Mal mit je 20 ml PBS+EDTA gewaschen. Abschließend konnten die so gewonnenen PBMCs gezählt werden.

Die Zellen, die nicht direkt genutzt wurden, konnten bei -80 °C und von da im Stickstofftank zur späteren Nutzung gelagert werden. Hierzu wurden 50x10⁶ Zellen in 1 ml FCS + 10 % DMSO resuspendiert.

3.12.3 Transduktion humaner T-Zellen

Ziel der retroviralen Transduktion humaner T-Zellen war es, T-Zellen zu generieren, die das Δ133p53β Gen und als Kontrolle hierzu den leeren pMx_IRES_puro Vektor überexprimieren. Gleichzeitig sollten beide Gruppen den single-chain T-Zell-Rezeptor (scTCR), der spezifisch gegen die Sequenz 264-272 des p53 Peptids (p53₂₆₄₋₂₇₂) gerichtet ist, exprimieren. Dafür mussten aus den PBMCs T-Zellen isoliert werden sowie die Phoenix-Ampho Zellen als Verpackungszelllinie für die Transfektion vorbereitet werden.

Im Folgenden werden die hierzu notwendigen Schritte genauer beschrieben.

Tag 1

Aus dem Stickstofftank wurde ein Aliquot der Phoenix-Ampho Zelllinie entnommen und für etwa 1 Minute im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die Zellen wurden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 5 ml bereits vorgewärmtem Zellmedium überführt. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert und das Zellpellet wurde in 4 ml Zellmedium resuspendiert. Es wurden jeweils 1 ml der Zellsuspension in vier verschiedenen T75 Kulturflaschen mit 14 ml (= 1×10^6 Zellen/Flasche) vorgewärmtem DMEM complete Medium (DMEM + 10 % FCS + 2,5 % HEPES) überführt.

Tag 3

Die adhärenenten Phoenix-Ampho Zellen wurden hierzu mit 2 ml pro Flasche Trypsin-EDTA trypsinisiert. Das Trypsin-EDTA wurde dann, sobald sich die Zellen gelöst hatten, mit 14 ml Medium deaktiviert. Die Zellen konnten daraufhin gezählt und die entsprechende Zellzahl konnte entnommen werden. Das Volumen wurde so angepasst, dass sich eine Konzentration von $1,2 \times 10^6$ Zellen/ml ergab. Dann konnte jeweils 1 ml entsprechend $1,2 \times 10^6$ Zellen in eine Petrischale mit bereits vorgelegten 7 ml Medium überführt werden.

Tag 4

4 Stunden vor Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel für die Phoenix-Ampho Zellen. Ab der Transfektion wurde unter der SII Sicherheitswerkbank gearbeitet. Für jedes DNA Konstrukt wurde eine Petrischale benötigt. Dazu wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 800 µl vorgewärmtes DMEM only vorgelegt. Zu diesen 800 µl wurden 35 µl Fugene 6 (Transfektionsreagenz) gegeben, das Gefäß wurde manuell geschüttelt und für 5 Minuten zum Inkubieren stehen gelassen. Zu jedem Gefäß wurden danach je 5 µg der Helferplasmide pColt-Galv und pHIT60 pipettiert, sowie zu den entsprechenden Gefäßen 10 µg Plasmid DNA des jeweiligen Konstrukts. Erneut wurden die Gefäße geschüttelt und für weitere 15 Minuten belassen. Abschließend wurde der Inhalt der Gefäße auf die entsprechenden Petrischalen pipettiert.

Am selben Tag erfolgte die Aktivierung der PBMCs in Kultur, um T-Zellen zu expandierend. Es wurden 2×10^6 Zellen in einem Well einer 24-Well-Platte in 1 ml ausgesät. Diese wurden mit 30 ng/ml OKT-3 sowie 600 U/ml IL-2 aktiviert.

Tag 5

Am Nachmittag erfolgte ein Mediumwechsel der transfizierten Phoenix-Ampho Zellen. Es wurden 8 ml des für die Transfektion verwendeten Mediums hinzugegeben, z.B. RPMI + 10 % AB-S + HEPES für humane T-Zellen.

Tag 6

Der Virusüberstand wurde in Zentrifugenröhrchen gesammelt und für 10 Minuten bei 2000 rpm und 32 °C zentrifugiert. Die PBMCs wurden geerntet, gezählt und die auszusäende Anzahl vorbereitet. Es mussten 2×10^6 PBMCs pro Well in 0,5 ml in einer 24-Well-Platte ausgesät werden. Hierfür wurden sie für 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet zu selben Anteilen in Virusüberstand des TCR und des $\Delta 133p53\beta_pMx_IRES_puro$ Konstrukts bzw. des pMx_IRES_puro Vektors resuspendiert. Zusätzlich wurde 5 $\mu\text{g/ml}$ Polybrene hinzugefügt. Die PBMCs konnten somit im Virusüberstand ausgesät werden. Die Platte wurde daraufhin für 90 Minuten bei 2000 rpm und 32 °C ohne Bremse zentrifugiert. Die Platte wurde dann über Nacht im Inkubator belassen.

Tag 7

Die neu transduzierten PBMCs wurden im Rahmen der ersten Stimulation polyklonal mit humanen anti-CD3/anti-CD28 Magnetpartikeln stimuliert. Die Zellen wurden hierfür jeweils in Zentrifugenröhrchen geerntet und bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, um verbleibende Virusüberstand-Reste zu beseitigen. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium (RPMI 10 % AB-S + HEPES) aufgenommen, um sie zu zählen. Die Zellen wurden dann so in Medium aufgenommen, dass sie in 24-Well-Platten zu 1×10^6 Zellen/2 ml pro Well ausgesät werden konnten. Zur polyklonalen Stimulation wurden den Zellen 5 μl humane anti-CD3/anti-CD28 Magnetpartikel pro 1×10^6 Zellen hinzugefügt. Zusätzlich wurde den Zellen als Proliferationsreiz IL-2 600 U/ml hinzugefügt.

3.12.4 Selektion nach Transduktion

Die retroviralen Konstrukte enthielten Resistenz-Kassetten eines Antibiotikums, um eine erfolgreiche Selektion nach der Transduktion zu gewährleisten. Die Gensequenz, welche die Selektion erlaubte, lag im pMx_IRES_puro Vektor abwärts der internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES).

Die Neomycin Selektion wurde am Tag der ersten Stimulation mit 800 µg/ml gestartet. Die Puromycin Selektion erfolgte einen Tag vor der zweiten Restimulation, diese wurde mit 5 µg/ml durchgeführt.

3.12.5 Peptidspezifische Restimulation humaner T-Zellen

Um T-Zellen in Kultur zu halten, mussten diese einmal wöchentlich erneut aktiviert werden. Diese Stimulation konnte entweder polyklonal oder peptidspezifisch durchgeführt werden. Im Folgenden wird die peptidspezifische Restimulation beschrieben.

Für diese Form der Restimulation wurden Antigen-präsentierende Zellen (APCs) benötigt. Hierfür wurde die K562_A2⁺_CD80⁺ Zelllinie genutzt, bei welcher es sich um eine CML (chronisch myeloische Leukämie) Zelllinie handelt.

Die K562_A2⁺_CD80⁺ Zellen wurden im Vorhinein mit dem entsprechenden Peptid beladen, in diesem Fall das p53₂₆₄₋₂₇₂. Hierfür wurde die benötigte Anzahl an K562_A2⁺_CD80⁺ aus der Kultur entnommen und nach Zentrifugation sowie Verwerfen des alten Mediums mit 1 µl des Peptides (10 µg/µl, entsprechend einer Molarität von etwa 10 mM) auf das Pellet beladen. Die Zellen wurden dann für 2 Stunden zur Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ in den Inkubator gestellt. Damit die APCs in der Zellkultur nicht proliferierten, mussten sie vor dem Aussäen bestrahlt werden. Hierfür wurden die Zellen nach der Inkubationszeit in 10 ml Medium aufgenommen und dann bei 10.000 Gy bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die APCs zentrifugiert und in RPMI 10 % AB-S + HEPES Medium aufgenommen, sodass sich eine Konzentration von 0,3x10⁶/ml ergab.

Die T -Zellen wurden daraufhin gezählt, die entsprechende Menge entnommen und in frischem huRPMI aufgenommen, sodass sich eine Konzentration von 1x10⁶/ml ergab. Es wurden dann die zu restimulierenden T-Zellen samt APCs in 24-Well-Platten wie folgt ausgesät: 1x10⁶ T-Zellen (±1 ml) + 0,3x10⁶ K562_A2⁺_CD80⁺ (±1 ml) + 600 U/ml IL-2.

3.12.6 Zellzählung und Population doubling level (PDL)

Um Zellen zu zählen und den Anteil viabler Zellen zu ermitteln, wurden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau gemischt, wobei der Farbstoff die geschädigte Zellmembran nicht viabler Zellen durchdringt und diese blau färbt. Anschließend wurden etwa 10 µl der Mischung in die Zählkammer zwischen Deckglas und

Objektträger pipettiert. Unter dem Mikroskop erfolgte dann die Zählung der viablen Zellen.

Nach Ermittlung der Zellzahl am Tag der Restimulation konnte mit der Information über die initial eingesetzte Zellzahl bei der vorangehenden Restimulation der sog. PDL-Wert (engl. *population doubling level*) berechnet werden. Hierfür wurde die folgende Formel benutzt:

$$\frac{\log(\text{finale Zellzahl}) - \log(\text{initiale Zellzahl})}{\log(2)}$$

3.12.7 FACS-Färbung

Mithilfe der Durchflusszytometrie konnte die Expression von Oberflächenmolekülen auf den Zellen quantifiziert werden. Hierzu wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Antikörper genutzt, welche gegen die entsprechenden Oberflächenantigene gerichtet waren.

Für eine Standard FACS-Färbung für Oberflächenmoleküle wurden pro Kondition $0,2 \times 10^6$ Zellen verwendet. Die Zellen wurden in FACS-Reagenzgläser überführt und in diesen mit 1 ml PBS+EDTA gewaschen, indem sie bei 1400 rpm für 2 Minuten zentrifugiert wurden. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt zwei Mal durchgeführt. Anschließend wurde in das verbleibende Restvolumen ($\approx 50 \mu\text{l}$) der Antikörper entsprechend den Herstellerangaben (inklusive Isotyp-Kontrolle als eigene Kondition) auf das Zellpellet gegeben und die Zellen wurden zur besseren Durchmischung mit dem Antikörper geschüttelt. Es erfolgte dann eine Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die nun mit den Antikörpern markierten Zellen wurden gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen und letztlich in $200 \mu\text{l}$ 1 % PFA fixiert. Im fixierten Zustand konnten die Zellen dann am Durchflusszytometer analysiert werden.

3.12.8 Colony-forming assay (CFA)

Mit dem sog. „Colony-forming assay“ („Koloniebildungstest“) konnte die zytotoxische Kapazität bzw. Fähigkeit der T-Zellen zur Tumorzell-Lyse analysiert werden. Hierfür wurden die T-Zellen mit den Zielzellen für mindestens 24 Stunden in Kokultur gebracht. Nachdem die T-Zellen entfernt wurden, konnten die verbliebenen adhärennten Zielzellen mit Kristallviolett gefärbt werden, wodurch die Zellviabilität quantifiziert werden konnte.

In einer 12-Well-Platte wurden $0,1 \times 10^6$ Target-Zellen (z.B. Saos2 und Saos2/143) in 1 ml Medium (RPMI 10 % FCS) ausgesät und für mindestens 4 Stunden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ belassen, sodass sie an die Platten adhären konnten. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und die Responder-Zellen (z.B. transduzierte humane T-Zellen) wurden in 1 ml frischem Medium entsprechend der benötigten Konditionen (also E:T Ratio) auf die adhären Target-Zellen gegeben. Die Kokultur wurde für 24 Stunden im Inkubator belassen. Um nun die Tumorzell-Lyse auszuwerten, musste der Überstand mit den T-Zellen und den in Suspension getöteten Target-Zellen entweder verworfen oder auf eine zweite vorbereitete Platte bei mehrstufigem Versuch (z.B. 48 oder 72 Stunden Versuch) überführt werden. Nachdem der Überstand entfernt wurde, wurden die Wells der Platte mit 1 ml/Well PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen in den Wells fixiert, indem 1 ml 4 % PFA pro Well für 10 Minuten bei Raumtemperatur hinzugegeben wurde. Es erfolgte daraufhin ein weiterer Waschschrift und die Zellen wurden dann mit 500 µl/Well 0,5 % Kristallviolett-Lösung für 15 Minuten gefärbt. Abschließend wurde ein letzter Waschschrift durchgeführt und die Platte konnte dann gescannt werden, sodass die angefärbten Wells visualisiert werden konnten. Um das Ergebnis zu quantifizieren, wurde das Kristallviolett aus den Zellen mit 500 µl/Well 5 % SDS in PBS gelöst. Es wurden Duplikate à 2x 200 µl aus der Lösung in F-Boden 96-Well-Platten überführt. Die Absorption konnte dann an einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 570 nm gemessen werden. Man erhielt so die optische Dichte der Lösung und konnte daraus durch entsprechende Quotientenbildung die relative Tumorzell-Lyse darstellen.

3.12.9 Western Blot

Mithilfe des Western Blots konnte die in den transduzierten T-Zellen überexprimierte $\Delta 133p53\beta$ Isoform mithilfe von Primär- und Sekundärantikörpern auf Proteinebene dargestellt werden. Der hierfür genutzte Antikörper wurde freundlicherweise von Dr. Jean-Christophe Bourdon (University of Dundee, Vereinigtes Königreich) bereitgestellt (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Verwendete Primärantikörper für den Western Blot

Antikörper	Antigen	Klon	Spezies	Detektiert	Hersteller	Verdünnung
KJC12	Pan-p53	-	Schaf	Human	J.C. Bourdon	1:1000

GAPDH	GAPDH	14C10	Hase	Human	Cell Signaling Technology, Cambridge Vereinigtes Königreich	1:2000
-------	-------	-------	------	-------	---	--------

Tabelle 10 zeigt die entsprechend genutzten Sekundärantikörper.

Tabelle 10: Verwendete Sekundärantikörper für den Western Blot

Klon	Spezies	Detektiert	Hersteller	Verdünnung
sc-2005	Ziege	Maus	Santa Cruz, Biotechnology, Dallas, USA	1:2000
ab7111	Hase	Schaf	abcam, Cambridge United Kingdom	1:5000
#7074	Ziege	Hase	Cell Signaling Technology, Cambridge United Kingdom	1:2000

Herstellung von 5 ml Lysepuffer:

5 µl Peps = 2,19 µM

50 µl PMSF = 1 mM

50 µl NaF = 10 mM

50 µl Na-o-van = 10 mM

5 µl Lenpeptin = 2,39 µM

4,84 ml Brij in Tris/HCL (50 mM) = 1 %

Herstellung der Proteinlysate:

Für die Herstellung von Proteinlysaten wurden 5×10^6 Zellen je Kondition benötigt, die nach Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 Minuten in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in diesem mit PBS gewaschen wurden. Zur Lyse wurden 100 µl Lysepuffer pro 5×10^6 Zellen verwendet. Hierin wurde das Zellpellet resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis gelagert. Währenddessen sollte das Lysat regelmäßig geschüttelt werden. Dann wurde das Lysat bei 13000 rpm und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde nun in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und direkt zur Messung verwendet oder bei -20 °C gelagert werden.

Bestimmung der Proteinkonzentration:

Aus einem bekannten Standard mit einer Konzentration von 4000 µg/ml wurde eine Verdünnungsreihe in Lysepuffer hergestellt (4000, 2000, 1000, ... , 62,5 µg/ml). Nun wurden sowohl von jedem Standard als auch von den zu bestimmenden Proben 5 µl als Triplikate in eine F-Boden 96-Well-Platte pipettiert. Nun wurden 1 ml Reagenz A mit 20 µl Reagenz S gemischt und daraus in jedes Well 25 µl gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten im Dunkeln fügte man 200 µl der Lösung B hinzu. Die Proben konnten nun am Mikrotiterplatten-Photometer bei einer Absorption von 690 nm gemessen werden (5 Sekunden schütteln). Aus der Ausgleichsgeraden konnte bei gegebener optischer Dichte die unbekannte Konzentration der Proben ermittelt werden.

Herstellung, Beladung und Starten des Gels:

Die Glasplatten wurden gereinigt, aus welchen dann die Gelkammer zusammengebaut wurde. Das Trenn- und Sammelgel wurden entsprechend ihrer Zusammensetzung vorbereitet. Die Kammer wurde zu $\frac{3}{4}$ mit Trenngel befüllt und das Trenngel mit Isopropanol bedeckt. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol verworfen und die Kammer mit Wasser gespült. Nun wurde das Sammelgel draufgegeben und der Kamm für die Taschen wurde eingefügt. Nachdem das Sammelgel polymerisiert war, konnte der Kamm vorsichtig entfernt werden. Das Endvolumen der Proben sollte min. 30 µl betragen, es setzte sich zusammen aus min. 20 µg Protein, 1x Laemmli-Puffer und Wasser. Hierbei sollte darauf geachtet werden, dass die verschiedenen Konditionen die gleiche Menge an Protein enthielten.

Die Proben wurden für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und kurz zentrifugiert. Vor dem Beladen der Proben wurde das Gel in den Lauf-Tank überführt und mit Lauf-Puffer (1x) aufgefüllt. Nun wurden die Proben in die Taschen pipettiert. Eine Tasche war für die Leiter und wurde mit 5 µl Precision Plus™ Protein Western Ladder™ beladen. Das Gel lief für 15 Minuten an einer Spannung von 85 V und anschließend für 1,5-2 Stunden an 130 V Spannung.

Blot:

Es wurden zwei Stück Whatman Paper und ein Stück Nitrocellulose Membran an die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Auf eine Schicht Whatman Paper kam das Gel, darauf folgte die Membran und anschließend ein zweites Stück Whatman Paper. Die Blotting Kammer wurde dann geschlossen und in den Blotting Tank überführt. Dieser wurde mit Blotting-Puffer befüllt. Der Tank wurde nun über Nacht bei 4 °C an eine Spannung von 40 V angeschlossen. So konnte der Transfer der aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgen.

Nach dem Transfer wurde die Membran mit TBST bedeckt und auf dem Schüttler gewaschen. Daraufhin wurde diese in 5 % Milch in 10 ml TBST für 1 Stunde geblockt. Es schloss sich ein dreimaliger Waschvorgang in TBST für je 5 Minuten an. Die Membran wurde dann mit dem primären Antikörper in 10 ml TBST + 5 % Milch bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal für je 10 Minuten in TBST gewaschen. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper in TBST + 5 % Milch für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Erneut wurde die Membran drei Mal für je 10 Minuten in TBST gewaschen.

Die Detektion erfolgte mittels ECL Lösung, die in einem Verhältnis von 1:1 gemischt wurde. Die Membran wurde auf eine flache Unterlage überführt und 1 ml der ECL Lösung wurde so auf die Membran pipettiert, dass diese vollständig benetzt war. Nach 1,5 Minuten Inkubationszeit konnte die Chemilumineszenz am iBright Gerät detektiert werden. Als interne Kontrolle konnte zusätzlich die Lumineszenz von z.B. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) detektiert werden, man nutzte hierfür Primär- und Sekundärantikörper wie bereits beschrieben.

3.12.10 qPCR

Für die Isolation von RNA zur Durchführung der sog. quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurden pro Kondition 5×10^6 Zellen verwendet. Nach einem

Waschschrift wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet entsprechend des RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Niederlande) lysiert. Im letzten Schritt wurde die RNA in 35 µl RNase freiem Wasser gelöst und 1:50 verdünnt, um anschließend die Konzentration photometrisch zu bestimmen.

Zur reversen Transkription von RNA zu cDNA (engl. *complementary DNA*) wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFischer Scientific) verwendet. Die hierfür genutzten Primer sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet:

10X RT Puffer	2 µl
25X dNTPN mix (100 mM)	0,8 µl
10X RT Random Primer	2 µl
Multi Scribe RT	0,5 µl
RNA	500 ng
H ₂ O	auffüllen bis 20 µl Gesamtvolumen

Die reverse Transkription wurde mit dem folgenden PCR-Programm durchgeführt:

25 °C	10 Minuten
37 °C	60 Minuten
85 °C	5 Minuten

Für die Quantifizierung der so synthetisierten cDNA wurde das PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) verwendet. Folgender Ansatz wurde für die qPCR verwendet:

SYBR Green Master Mix	10 µl
Primer Mix (je 10 µM)	je 1 µl
cDNA Template	1 µl
Nuklease freies Wasser	7 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Derselbe Ansatz wurde für GAPDH als Referenzgen mit den entsprechenden Primern vorbereitet. Für die Quantifizierung wurden in eine 96-Well-Platte 20 µl der Ansätze

als Duplikate verwendet. Die qPCR wurde mit einem Standardkurven Programm des Quantstudio3 Real-Time-PCR-System (Applied Biosystems) mit einer Annealing-Temperatur von 60 °C durchgeführt. Der Unterschied in der mRNA-Expression wurde mit der $\Delta\Delta C_t$ Methode berechnet, nachdem eine Standardisierung zu der GAPDH Expression erfolgte.

3.12.11 IFN γ und Granzyme B FACS-Färbung

Für den Versuch wurden $0,2 \times 10^6$ T-Zellen sowie $0,4 \times 10^6$ Zielzellen (Saos2 bzw. Saos2/143) in 200 μ l Volumen pro Well in U-Boden 96-Well-Platten ausgesät. Für beide T-Zell Konditionen ($\Delta 133p53\beta$ vs. pMx_IRES_puro Kontrolle) wurden drei Kombinationen vorbereitet, nämlich Saos2, Saos2/143 und Ionomycin/PMA (Positivkontrolle). Zu jeder Kondition wurden 10 μ g/ml Brefeldin A (BFA) hinzugegeben, welches den Proteintransport zum Golgi-Apparat blockiert und zu einer Ansammlung von Proteinen intrazellulär führt, was wiederum die Erkennung der genannten Zytokine begünstigt. Ionomycin wurde in der entsprechenden Kondition zu 1 μ g/ml und PMA zu 50 ng/ml hinzugegeben. Die so ausgesäten Konditionen wurden für 5 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ in den Inkubator gestellt. Anschließend wurde die Platte für 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Es erfolgte ein Waschvorgang in 100 μ l FACS-Puffer (PBS 0,5 % BSA). Nach einem erneuten Waschvorgang wurden die Zellen für CD8 mit 1 μ l/Well des FITC-konjugierten Antikörpers gefärbt, die Inkubationszeit betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden erneut gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben mit 100 μ l/Well 4 % PFA fixiert für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Die Platte wurde daraufhin für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und anschließend zwei Mal in FACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 200 μ l FACS-Puffer resuspendiert und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt.

Am nächsten Tag wurde die Platte für 3 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden dann gewaschen. Anschließend erfolgte eine Permeabilisation für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 200 μ l/Well Perm/wash (BDTF Perm/wash 5x), welches 1:5 in H₂O verdünnt wurde. Nach einer erneuten Zentrifugation der Platte wurden die Zellen mit 2 μ l/Well auf IFN γ mittels APC-konjugiertem Antikörper bzw. auf Granzyme B (auch APC-konjugierter Antikörper) für 30 Minuten im Kühlschrank gefärbt. Abschließend erfolgten zwei Waschschrte in Perm/wash und die Zellen konnten dann in 200 μ l PBS aufgenommen und analysiert werden.

3.12.12 IFN γ ELISA

Der „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) wurde neben der Durchflusszytometrie als weitere Methode zur Erfassung der IFN γ Sekretion genutzt. Für diesen mehrschrittigen Versuch wurden zunächst die ELISA-Platten mit 100 μ l/Well des in Coating-Puffer (Tabelle 11) verdünnten „Capture-Antikörpers“ beschichtet. Die ELISA-Platten wurden dann zum Inkubieren über Nacht bei 4°C gelagert. Es folgten dann fünf Waschschriffe mit mindestens 250 μ l des Waschpuffers. Die Wells wurden anschließend mit 200 μ l/Well des 1:5 verdünntem „Assay Diluent“ (Tabelle 11) geblockt, die Inkubationszeit hierfür betrug 1 Stunde. Es erfolgten erneut fünf Waschschriffe. Daraufhin wurden die Standards vorbereitet zur Erstellung der Standardkurve und die auszuwertenden Proben mit 100 μ l/Well entsprechend pipettiert, die Inkubationszeit betrug hierbei 2 Stunden bei Raumtemperatur. Bei diesem Versuch handelte es sich bei den Proben um den Überstand aus der Kokultur von Δ 133p53 β - und pMx_IRES_puro transduzierten T-Zellen mit jeweils „Saos2“, „Saos2/143“ und „Saos2/143 + Nivolumab“. Bei Nivolumab handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, welcher an PD-1 auf T-Zellen bindet und hierdurch die von Tumorzellen über die PD-1/PD-L1 Interaktion hervorgerufene Inhibition von T-Zellen blockiert (154). Nivolumab wurde in diesem Versuch benutzt, um einen möglichen Einfluss auf die IFN γ Sekretion bzw. einen Unterschied dieser zwischen den beiden Versuchskonditionen zu untersuchen. Anschließend erfolgten erneut fünf Waschschriffe. Nach dem letzten Waschschriff wurde der im 1X „Assay Diluent“ verdünnte „Detection-Antikörper“ mit 100 μ l/Well hinzugegeben. Nach erneutem Waschen wurden dann 100 μ l/Well der in 1X „Assay Diluent“ verdünnten Avidin/HRP hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem mehrfachem Waschen wurde anschließend die Substratlösung mit 100 μ l/Well hinzugegeben, die Inkubationszeit hierfür betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Zugabe der Stopplösung wurde die Platte im Mikrotiterplatten-Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm analysiert.

Tabelle 11: Lösungen und Puffer des IFN γ ELISA

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Assay Diluent	DPBS Hitzeninaktiviertes FCS (10%)
Coating-Puffer	7,13 g NaHCO ₃

	1,59 g Na ₂ CO ₃ 1 l dest. H ₂ O pH = 9,5 mit 1 N Natronlauge einzustellen
Waschpuffer	DPBS 0,05 % TWEEN®20

3.12.13 CD107a Degranulations-Assay

Mittels des Degranulations-Assays konnte die Expression von CD107a gemessen werden. Dieses Protein findet sich an der Membran von Granula, welche z.B. Granzyme enthalten. Um diese zytolytischen Substanzen freizusetzen, verschmelzen die Granula mit der Zellmembran der T-Zellen. Nach diesem Prozess kann CD107a an der Zellmembran der T-Zellen nachgewiesen werden und dient als ein Parameter für die zytotoxische Kapazität der T-Zellen.

Für die durchflusszytometrische CD107a Färbung wurden $0,2 \times 10^6$ T-Zellen und $0,4 \times 10^6$ Zielzellen (Saos2 bzw. Saos2/143) benötigt, welche in einem Endvolumen von 200 µl/Well in U-Boden 96-Well-Platten ausgesät wurden. Wie bei der IFN γ FACS-Färbung wurden auch bei der CD107a Färbung für jede T-Zell Kondition drei Subkonditionen mit Saos2, Saos2/143 und Ionomycin/PMA ausgesät. Nachdem die T-Zellen zunächst mit PBS gewaschen wurden, erfolgte die Färbung mit 5 µl/ 1×10^6 Zellen des CD107a Antikörpers für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde den T-Zellen Monensin 1:1000 hinzugegeben, woraufhin diese in die entsprechenden Konditionen ausgesät wurden. Wie Brefeldin A sorgt auch Monensin für eine Blockade des Proteintransports zum Golgi-Apparat und somit zu einer Ansammlung von Proteinen intrazellulär und deren bessere Nachweisbarkeit. Zu der Ionomycin/PMA-Kondition wurden 1 µg/ml Ionomycin und 50 ng/ml PMA hinzugegeben. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden bei 37 °C. Während dieser Inkubationszeit erfolgte kein Auswaschen des Antikörpers. Am darauffolgenden Tag wurde die Platte gewaschen und die Zellen wurden mit 1 µl/Well mit dem FITC-konjugierten CD8 Antikörper für 15 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Nach einem abschließenden Waschschrift wurden die Zellen in FACS-Reagenzgläser überführt und in 1 % PFA fixiert, um sie am Durchflusszytometer zu analysieren.

3.12.14 Thymidin-Assay

Mithilfe des Thymidin-Assays ließ sich die Proliferationskapazität von Zellen quantifizieren, indem der radioaktive Einbau des ^3H -Thymidin Isotops in die DNA der sich teilenden Zellen während der Mitose gemessen wurde.

Für den Versuch wurden für jede Kondition als Triplets 50.000 T-Zellen in 200 μl Medium in eine 96-Well-Platte mit U-Boden ausgesät. Die T-Zellen wurden im Vorhinein antigenspezifisch stimuliert. Aus dem ^3H -Thymidin Stock von 1 mCi/ml wurde ein entsprechendes Volumen zu den T-Zellen hinzugefügt, sodass die Gesamtmenge der Radioaktivität 1 $\mu\text{Ci/Well}$ betrug. Es erfolgte eine Inkubationszeit von 16 Stunden im Brutschrank. Daraufhin wurde die Platte im Isotopenlabor eingefroren, sodass die Zellen aufplatzten und das ^3H -Thymidin gemessen werden konnte. Zur endgültigen Messung wurde die Platte wieder aufgetaut und die Proben wurden am Harvester gemessen. Dabei wurden die Szintillationen der Betastrahlung pro Minute erfasst und quantifiziert. Das abschließende Ergebnis konnte schließlich graphisch dargestellt werden.

3.12.15 Chromium-Freisetzungs-Versuch

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um die lytische Kapazität der T-Zellen zu testen. Hierfür wurden $0,5 \times 10^6$ der Zielzellen mit dem Radionuklid $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ für 90 Minuten bei 37°C und 5 % CO_2 markiert. Die Effektorzellen wurden gezählt und entsprechend in 100 μl RPMI Medium als Duplikate in einer 96-Well-Platte mit U-Boden in den für den Versuch vorgesehenen E:T-Quotienten (30:1, 10:1, 3:1, 1:1, 0,3:1) ausgesät. Nach der Markierung der Zielzellen wurden diese gewaschen und in 10 ml RPMI resuspendiert. Die Zielzellen wurden dann mit 100 $\mu\text{l/Well}$ zu den Effektorzellen gegeben, die Platte wurde dann für 5,5 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Zur Erfassung der zytotoxischen Kapazität der Effektorzellen wurden die maximale und die spontane Freisetzung des Chromium erfasst, indem für das Maximum der Überstand frisch markierter Zielzellen und für die Spontanfreisetzung der Überstand von Zielzellen ohne Effektorzellen verwendet wurden. Nach der Inkubationszeit wurde die 96-Well-Platte zentrifugiert und 100 μl des Überstandes wurde in Röhrchen zur Auswertung im Gammacounter transferiert. Die prozentuale spezifische Lyse wurde mit der folgenden Formel ausgerechnet:

$$\frac{\text{Experimentelle Chromiumfreisetzung} - \text{Spontane Chromiumfreisetzung}}{\text{Maximale Chromiumfreisetzung} - \text{Spontane Chromiumfreisetzung}} \times 100 = \text{Spezifische Lyse (\%)}$$

3.12.16 Extrazellulärer Flux Assay

Zur Vorbereitung wurden am Vortag des eigentlichen Versuchs die Wells der Sensorplatte mit 200 µl sowie die Seitentaschen mit 400µl sterilem Wasser gefüllt. Die Sensorplatte wurde über Nacht in den Inkubator bei 37 °C ohne CO₂ gestellt. Der XFp-Calibrant wurde im Inkubator vorgewärmt. Vor Beginn des Versuchs sollte zudem der XFp Analyzer für 5 Stunden vorgewärmt werden. Im nächsten Schritt wurde die Zellkulturplatte mit 50 µl/Well Poly-D-Lysin behandelt. Das Poly-D-Lysin diente dazu, die Zelladhäsion der T-Zellen an die Zellkulturplatte zu verstärken. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur und einem Waschschrift wurde die Platte für 30 Minuten getrocknet. Aus der Sensorplatte wurde anschließend das sterile Wasser entfernt und in jedes Well wurden 200 µl und in jede Seitentasche 400 µl XFp-Calibrant pipettiert. Die Platte wurde dann für eine Stunde im Inkubator ohne CO₂ belassen. In die Zellkulturplatte wurde dann das Assay Medium hinzugegeben, dieses bestand aus Seahorse XFRPMI Medium, 10 mM Glukoselösung, 1 mM Pyruvatlösung und 2 mM Glutaminlösung. In jedes Well wurden 80 µl dieses Mediums pipettiert, es folgte eine Inkubationszeit von 30-60 Minuten bei 37 °C ohne CO₂. Für den Versuch wurden 150.000 T-Zellen pro Well verwendet. Für jede Kondition wurden Triplets verwendet. Die T-Zellen wurden dann in 50 µl Assay Medium in die Wells gegeben, in zwei Wells wurde reines Assay Medium als Hintergrundkontrolle gegeben. Es folgte eine Zentrifugation für 1 Minute bei 300 g ohne Bremse. Nach Sicherstellung einer ausreichenden Zellkonfluenz unter dem Mikroskop erfolgte eine erneute Inkubation bei 37 °C ohne CO₂ für 15 Minuten. Die Wells wurden dann mit zusätzlichen 130 µl Assay Medium befüllt, sodass ein Gesamtvolumen von 180 µl erreicht wurde. Es wurden dann 320 µl XFp Calibrant in die Seitentaschen pipettiert. Dann wurde die Platte erneut für 46-60 Minuten bei 37 °C ohne CO₂ inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde die Sensorkartusche vorbereitet inklusive einer Kalibrierungszeit von 20 Minuten. Hierfür wurden die entsprechenden Ports befüllt. Oligomycin wurde mit einer Endkonzentration von 1,5 µM/Well, FCCP mit 2 µM/Well und Rot./AA mit 0,5 µM/Well hinzugegeben. Abschließend konnte das Programm des sog. „Mito Stress Tests“ mit den entsprechenden Einstellungen begonnen werden. Die Analyse der Ergebnisse erfolgte dann mit der Software Wave (Agilent).

3.12.17 Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde das Programm GraphPad Prism 6 benutzt. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz zwischen den beiden Versuchsgruppen wurde ein zweiseitiger Student's t-Test durchgeführt.

Ergebnisse, die einen p-Wert $< 0,05$ erreichten, wurden als signifikant bezeichnet und mit einem Stern (*) markiert. Betrug der p-Wert $< 0,01$ war dieser sehr signifikant (**) und ab einem p-Wert $< 0,001$ handelte es sich um eine hohe Signifikanz (***). Erreichte der p-Wert das Signifikanzniveau nicht ($p \geq 0,05$), wurde das Ergebnis als nicht signifikant bezeichnet (ns).

4 Ergebnisse

4.1 Transduzierte humane T-Zellen überexprimieren die $\Delta 133p53\beta$ Isoform

Die Bedeutung der p53 Isoformen wurde bislang im Kontext von Tumorzellen untersucht, wobei insbesondere die biologische Funktion der $\Delta 133p53\beta$ Isoform in T-Zellen noch unbekannt ist. Um zum besseren Verständnis dieser Isoform in T-Zellen beizutragen, wurden T-Zellen von gesunden HLA.A2⁻ Blutspendern sowohl mit der $\Delta 133p53\beta$ Isoform als auch mit einem antigenspezifischen TCR, bei dem es sich um einen scTCR gegen die Sequenz 264-272 von p53 handelt, retroviral transduziert. Um sicherzustellen, dass nur die entsprechenden Konstrukte exprimiert wurden, wurden die transduzierten T-Zellen mit den Antibiotika Neomycin und Puromycin selektiert. Die erfolgreiche Überexpression der $\Delta 133p53\beta$ Isoform wurde zuerst mittels Western Blot Analyse überprüft (Abbildung 4). In der Kondition, welche mit der $\Delta 133p53\beta$ Isoform transduziert wurde, kommt eine deutliche Bande zur Darstellung. Diese deckt sich mit der Größe des $\Delta 133p53\beta$ Proteins, welche 28kDa beträgt.

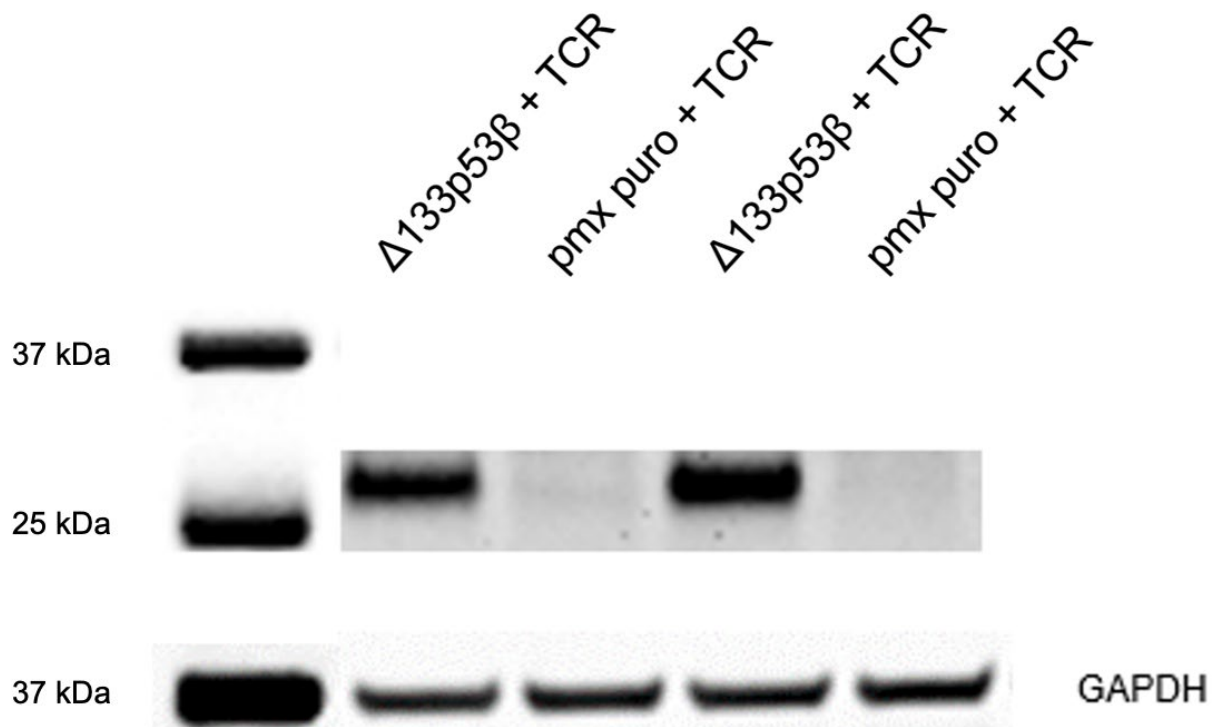


Abbildung 4: Überexpression der $\Delta 133p53\beta$ Isoform in transduzierten humanen T-Zellen

Das Ergebnis der Analyse der Expression der p53 Isoform im Western Blot mittels KJC12 Antikörper (hier exemplarisch n=2 von insgesamt n=6 biologischen Replikaten dargestellt) zeigt eine klare Bande, die der zu erwartenden Proteingröße (28 kDa) der $\Delta 133p53\beta$ Kondition entspricht. Als Lade-Kontrolle wurde das Protein GAPDH mituntersucht.

Darüber hinaus wurde als weitere Nachweismethode zum Nachweis der Überexpression der $\Delta 133p53\beta$ Isoform auf der Ebene der Transkription die quantitative PCR herangezogen, die exemplarisch mit den Proben eines Transduktionsversuchs durchgeführt wurde. Die Abbildung 5 zeigt die zur Negativkontrolle in Relation gesetzte Expression der mit der Isoform transduzierten Zellen. Hierbei wurde die sogenannte „Double Delta Ct Analyse“ verwendet. Das Verhältnis erreicht fast einen Wert von 4 und bedeutet, dass in der $\Delta 133p53\beta$ Kondition fast 400% mehr Expression des entsprechenden Gens stattfindet als in der Kontrolle.

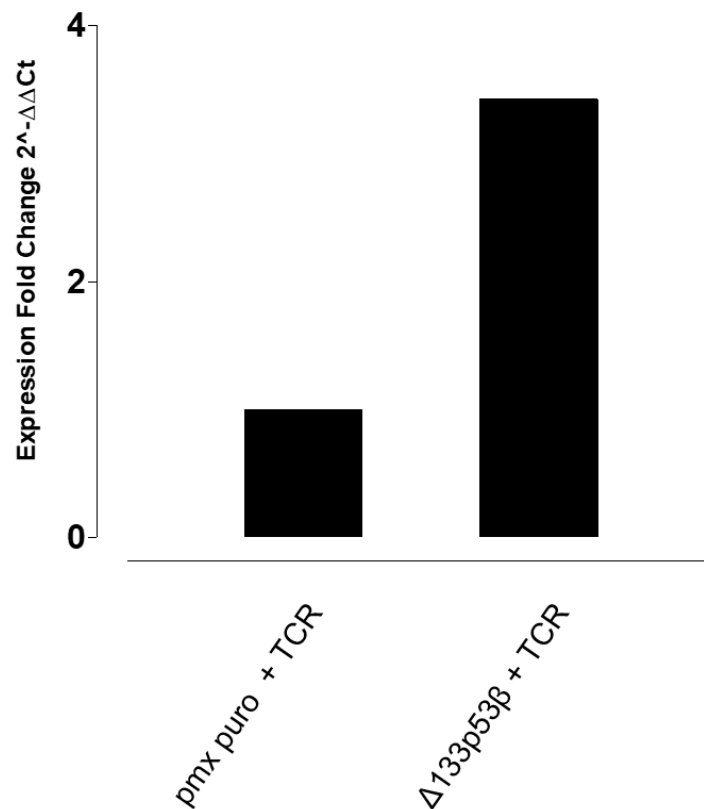


Abbildung 5: Nachweis der Überexpression in der qPCR nach Transduktion

In dieser Abbildung ist das Ergebnis der qPCR (4 Wochen nach Transduktion) dargestellt, welches das Verhältnis der Ct-Werte der beiden Konditionen zum Ausdruck bringt. Das Experiment wurde mit einem biologischen Replikat (n=1) durchgeführt.

4.2 $\Delta 133p53\beta$ beeinflusst den Phänotyp von humanen T-Zellen

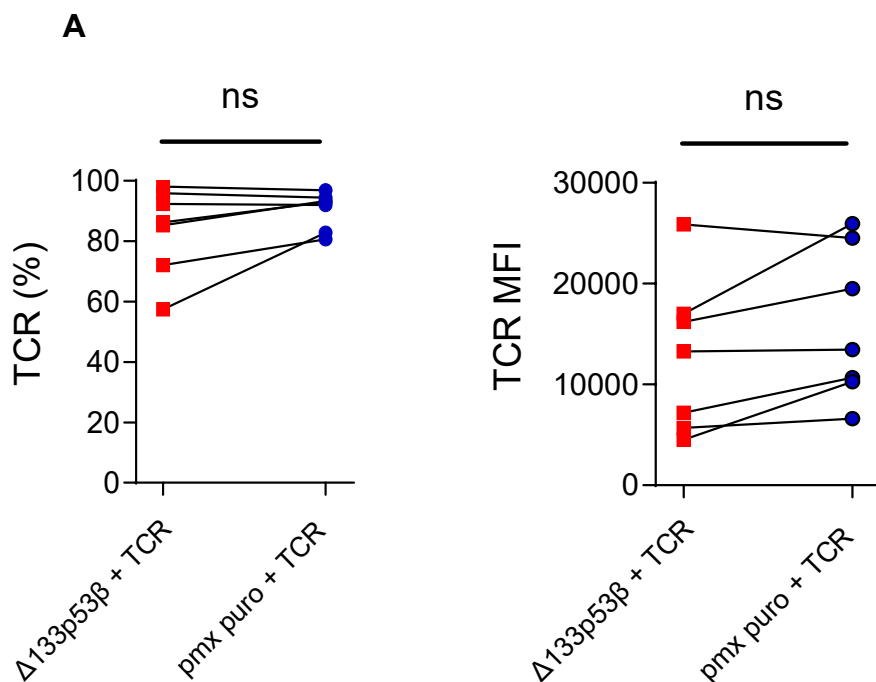
Zur Untersuchung des Phänotyps der transduzierten T-Zellen wurde die Durchflusszytometrie (FACS) verwendet, mit Hilfe derer sich die Expression von Oberflächenmolekülen auf Zellen analysieren lässt.

4.2.1 Einfluss auf den Subtyp und die TCR Expression

Wie Abbildung 6 zeigt, hat $\Delta 133p53\beta$ keinen Einfluss auf das Verhältnis von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen. Es zeigen sich interindividuelle Unterschiede der verschiedenen

Spender in der Expression, insgesamt besteht jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,2664$ für die $CD8^+$ und $p=0,2898$ für die $CD4^+$ T-Zellen, Abbildung 6, C).

Bezüglich der Expression des TCR ergibt sich gesamt betrachtet in den $CD3^+$ T-Zellen ebenfalls kein signifikanter Unterschied ($p=0,1179$), jedoch zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität eine tendenzielle Erhöhung zugunsten der pMx_IRES_puro + TCR Kondition ($p=0,0608$, Abbildung 6, A). Damit wäre anzunehmen, dass in der Kontrollkondition auf den einzelnen Zellen die Dichte des TCR höher ist als auf den $\Delta 133p53\beta$ transduzierten Zellen, wengleich der Unterschied statistisch nicht signifikant ist. Betrachtet man die TCR Expression in den jeweiligen Subpopulationen für CD4 und CD8, so lässt sich auch hier kein Unterschied (CD8: $p=0,126$, CD4: $p=0,248$) zwischen der $\Delta 133p53\beta$ Kondition und den Kontroll-T-Zellen nachweisen (Abbildung 6, B)



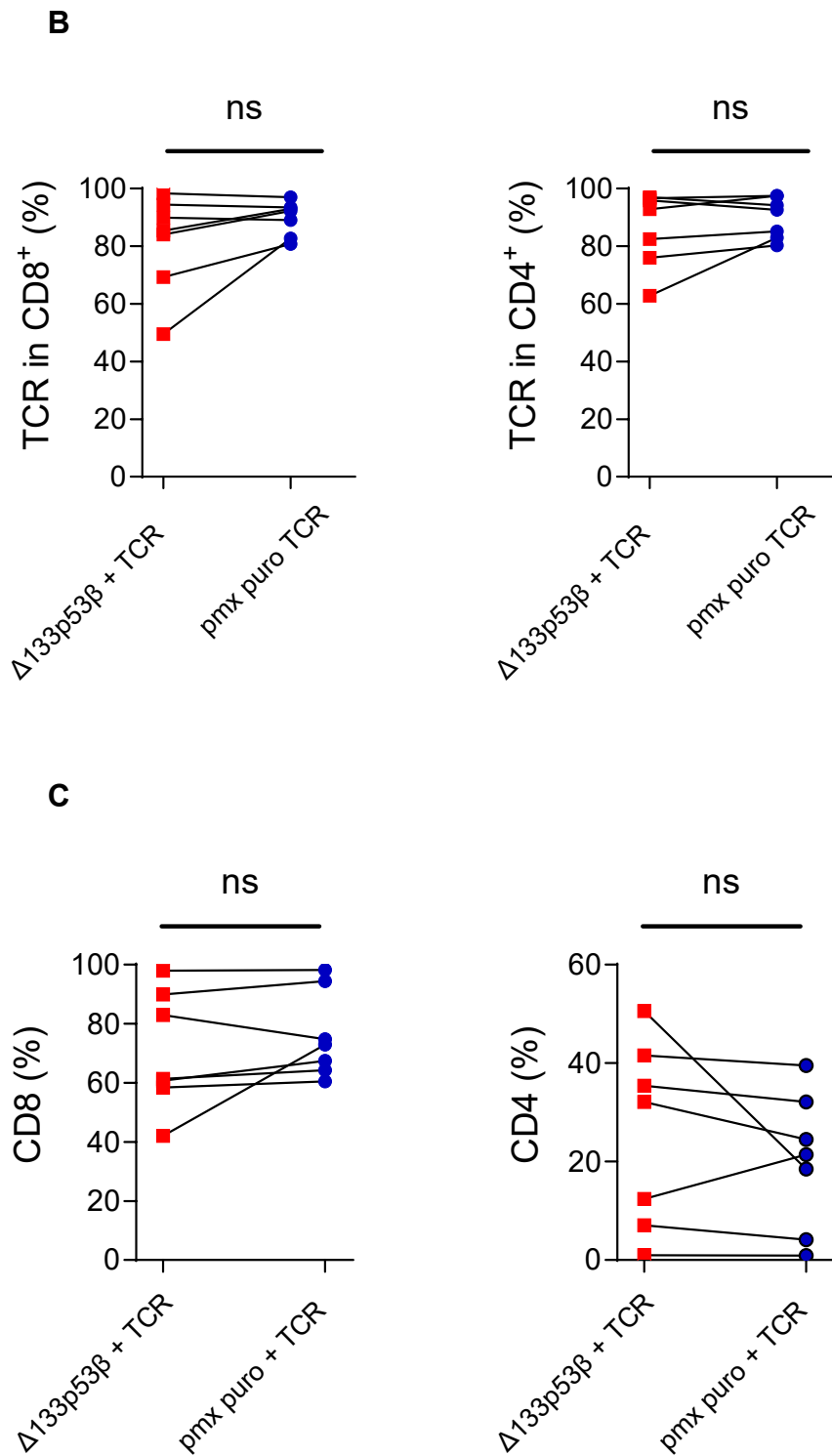


Abbildung 6: Durchflusszytometrische Expression von CD8, CD4 und TCR

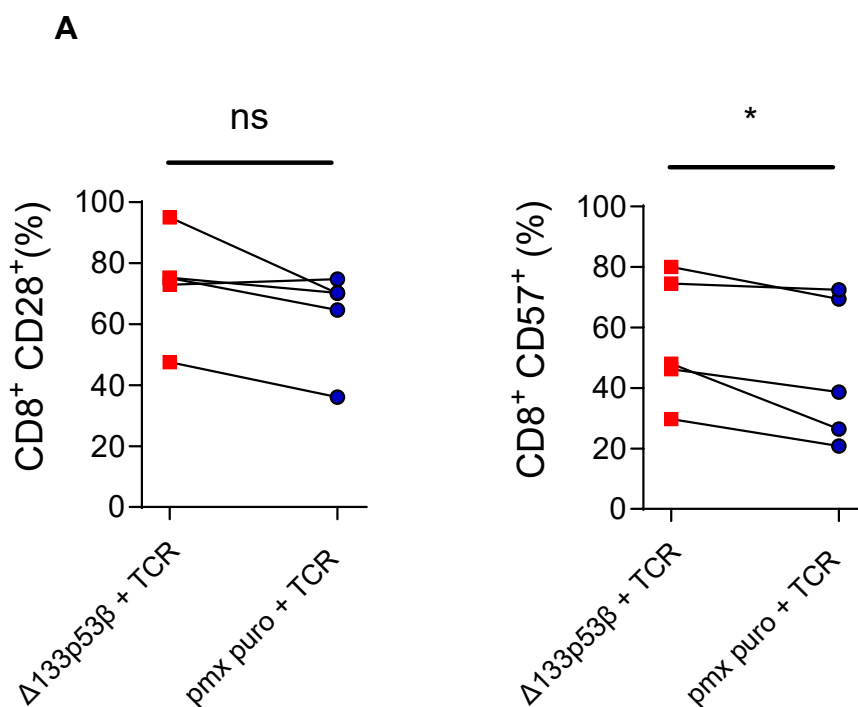
(A) Bezüglich des TCR ist, insbesondere bei Betrachtung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI), ein Trend zur Reduktion der TCR Dichte auf den $\Delta 133p53\beta$ Zellen zu erkennen (n=7 biologische Replikate). Das Ergebnis ist jedoch nicht statistisch signifikant. (B) Differenzierte Darstellung der TCR Expression innerhalb der CD8 und CD4 Fraktion für beide experimentelle Konditionen. (C) Die $\Delta 133p53\beta$ verändert in T-Zellen nicht das Verhältnis von CD8 und CD4.

*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ns (nicht signifikant)

4.2.2 $\Delta 133p53\beta$ beeinflusst die Zusammensetzung von CD28/CD57

Subpopulationen in CD8⁺ T-Zellen

Zum besseren Verständnis der Funktion und der Subpopulationen innerhalb der Fraktion der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen werden die Oberflächenproteine CD28 und CD57 herangezogen, welche wiederum naive (CD28⁺/CD57⁻) und sog. „senescent-like“ (CD28⁻/CD57⁺) CD8⁺ T-Zellen definieren. Die Expression wurde nach 3 bis 4 Tagen nach der Restimulation der T-Zellen gemessen. Die Abbildung 7 zeigt die Verteilung der entsprechenden Populationen für $\Delta 133p53\beta$ im Vergleich zu dem leeren Vektor, wobei es sich sowohl für CD28 als auch für CD57 um die totale Expression innerhalb der CD8⁺ T-Zellen handelt. Hierbei zeigt sich in Abbildung 7A, dass die Gesamtexpression von CD57, welche durchschnittlich in der $\Delta 133p53\beta$ Kondition 55,71 % und in der pMx_IRES_puro Kondition 45,55 % beträgt, signifikant erhöht ist ($p=0,0346$). Zusätzlich zu der CD57⁺ Fraktion ist auch die doppelpositive CD28⁺/CD57⁺ Fraktion in der $\Delta 133p53\beta$ Kondition mit einem Durchschnitt von 41,48 % im Vergleich zu der pMx_IRES_puro Kondition mit einer durchschnittlichen Expression von 31,42 % deutlich erhöht ($p=0,0193$). Betrachtet man die doppelnegative CD28⁻/CD57⁻ Fraktion so lässt sich hier eine signifikant niedrigere Expression beobachten ($p=0,037$), wobei die durchschnittliche Expression in der $\Delta 133p53\beta$ Kondition 13,55 % und in der Kontrollgruppe 24,96 % beträgt (Abbildung 7, B).



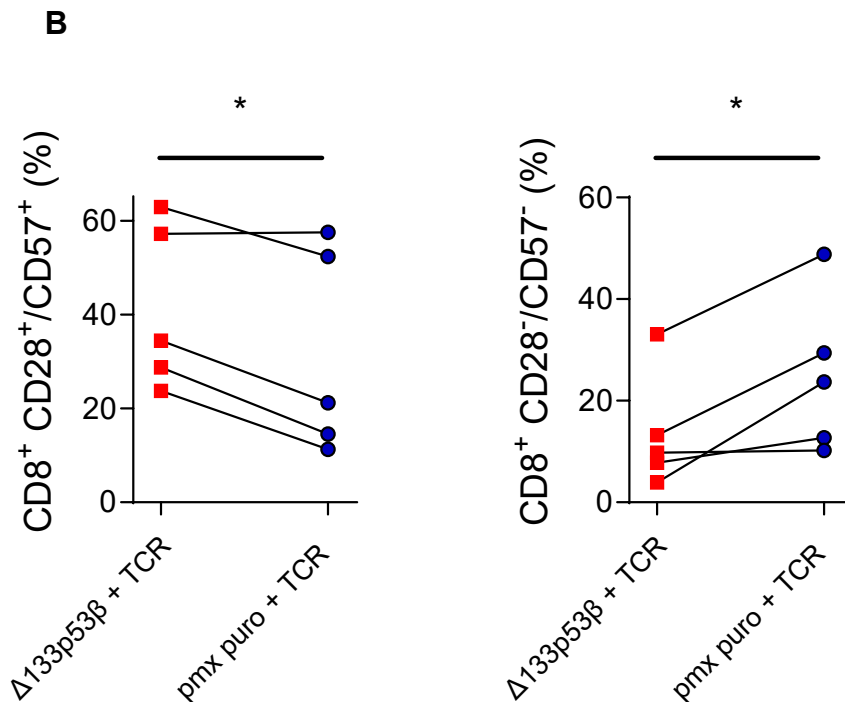


Abbildung 7: Durchflusszytometrische Expression von CD28 und CD57

Die Expression der beiden für die weitere Klassifikation von CD8⁺ T-Zellen relevanten Oberflächenmarker CD28 und CD57 wird durch $\Delta 133p53\beta$ beeinflusst (n=5 biologische Replikate).

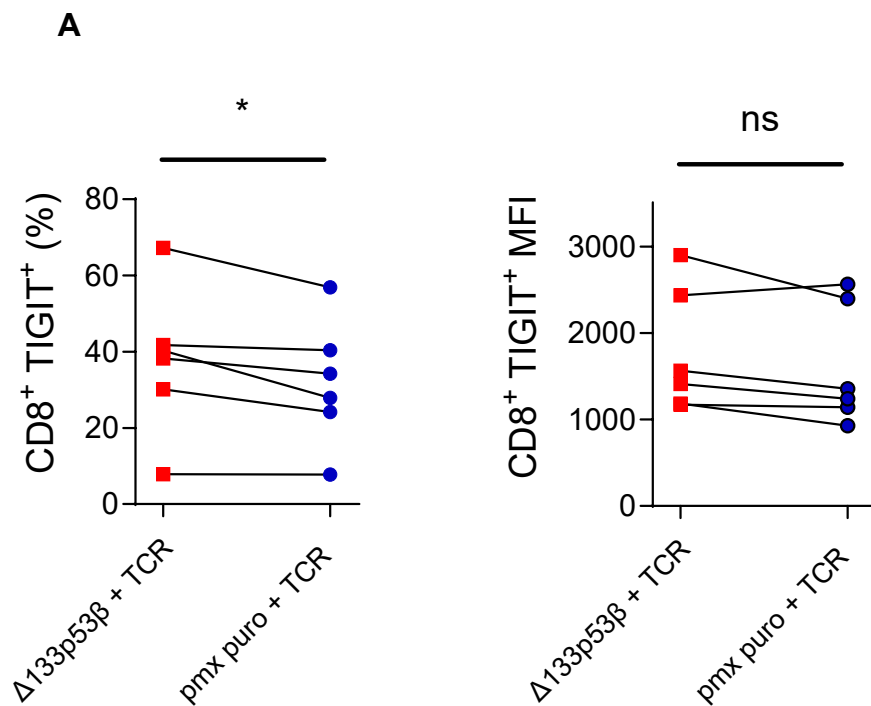
(A) Dargestellt ist jeweils die totale Expression von CD28 und CD57 innerhalb der CD8⁺ T-Zellen 3 bis 4 Tage nach Restimulation der T-Zellen. (B) Zusätzlich ist die Expression sowohl der doppelpositiven CD28⁺/CD57⁺ als auch der doppelnegativen CD28⁻/CD57⁻ Subpopulation innerhalb der CD8⁺ T-Zellen abgebildet.

Insbesondere die CD28⁺/CD57⁺ Population tritt deutlich vermehrt in den Isoform transduzierten Zellen auf. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ns (nicht signifikant)

4.2.3 $\Delta 133p53\beta$ transduzierte CD8⁺ T-Zellen regulieren PD-1 und TIGIT hoch

Die Immuncheckpoint-Proteine PD-1 und TIGIT gehören zu der Gruppe von Oberflächenproteinen, welche ein koinhibitorisches Signal an T-Zellen vermitteln. So werden beispielsweise T-Zellen im TME angeregt, diese Oberflächenproteine hochzuregulieren. Aus diesem Grund ist es für das Gesamtverständnis von $\Delta 133p53\beta$ erforderlich, den Einfluss auf die Expression dieser Proteine zu betrachten. Hierbei wurde ebenfalls die Durchflusszytometrie genutzt, um die Expression quantitativ zu erfassen. Betrachtet man die Subpopulation der zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺) 3 bis 4 Tage nach peptidspezifischer Restimulation mit APCs, so zeigt sich sowohl für TIGIT als auch PD-1 ein Anstieg der Expressionsfrequenz. Die durchschnittliche Expression von TIGIT beträgt für die $\Delta 133p53\beta$ Kondition 37,6 % (vs. 31,9 % für pMx_IRES_puro) (Abbildung 8, A), für PD-1 beträgt diese für $\Delta 133p53\beta$ 28,72 % und für pMx_IRES_puro 19,76 % (Abbildung 8, B). Diese ist mit einem p-Wert von p=0,0308 für PD-1 und p=0,0358 für TIGIT statistisch signifikant. Für die doppelpositive

Population TIGIT⁺/PD-1⁺ ergibt sich mit $p=0,0537$ (Mittelwert $\Delta 133p53\beta$ 15,6 % vs. pMx_IRES_puro 9,53 %) eine Tendenz, die in der $\Delta 133p53\beta$ Kondition eine Hochregulierung andeutet (Abbildung 8, C). Auf dem Level der Expression ergibt die Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI TIGIT: $\Delta 133p53\beta$ 1780 vs. pMx_IRES_puro 1605,67, MFI PD-1: $\Delta 133p53\beta$ 2126,17 vs. pMx_IRES_puro 1407, Abbildung 8, A-B), dass die Unterschiede jedoch nicht statistisch signifikant sind (MFI TIGIT $p=0,1032$ und MFI PD-1 $p=0,0854$).



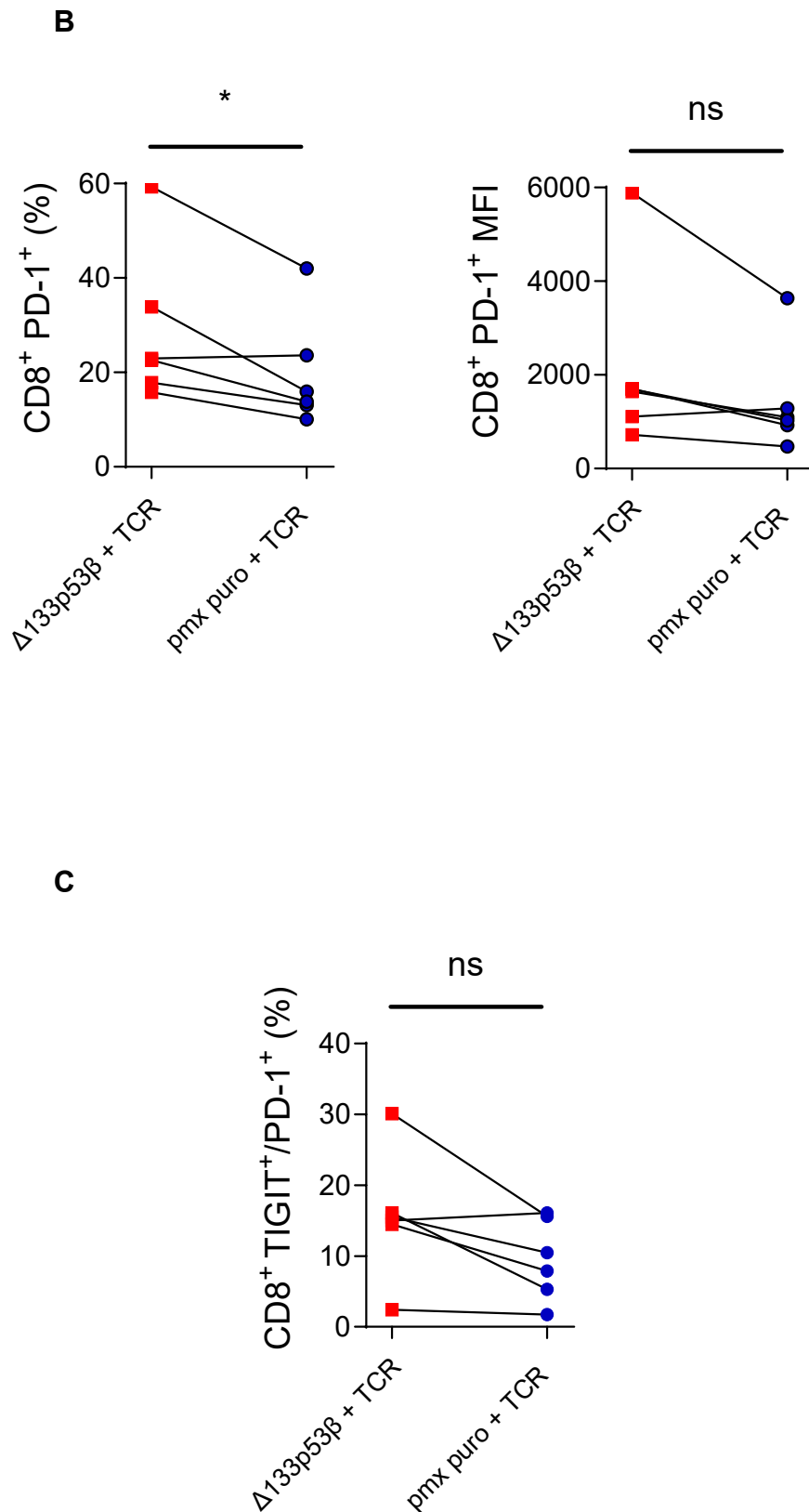


Abbildung 8: Durchflusszytometrische Expression der Immuncheckpoint-Proteine TIGIT und PD-1

Punktdiagramme zur Darstellung der (A) TIGIT und (B) PD-1 Expression in CD8⁺ T-Zellen, gemessen per Durchflusszytometrie (% und MFI). (C) Expression von CD8⁺ PD-1⁺/TIGIT⁺ Zellen. n=6 biologische Replikate. *p<0,05 **p<0,01, ***p<0,001, ns (nicht signifikant)

Zwei weitere relevante inhibitorische Immuncheckpoints, nämlich TIM-3 und LAG-3, wurden hinsichtlich ihrer Expression auf den $\Delta 133p53\beta$ transduzierten- sowie den Kontroll-T-Zellen untersucht, jeweils 3 bis 4 Tage nach peptidspezifischer Restimulation in der CD8⁺ Subpopulation. Hier erbrachte die durchflusszytometrische Analyse der T-Zellen eines repräsentativen biologischen Replikats keinen relevanten Unterschied hinsichtlich der Expression, wobei die Zahl biologischer Replikate mit n=1 nicht ausreichend ist für zuverlässige Aussagen. LAG-3 zeigte in beiden Konditionen eine nur geringe Expression von ca. 1-2 %, für TIM-3 wurde eine ähnliche Expression von 45,8 % in der $\Delta 133p53\beta$ Kondition und 41,5 % in der Kontrollkondition ermittelt (Abbildung 9).

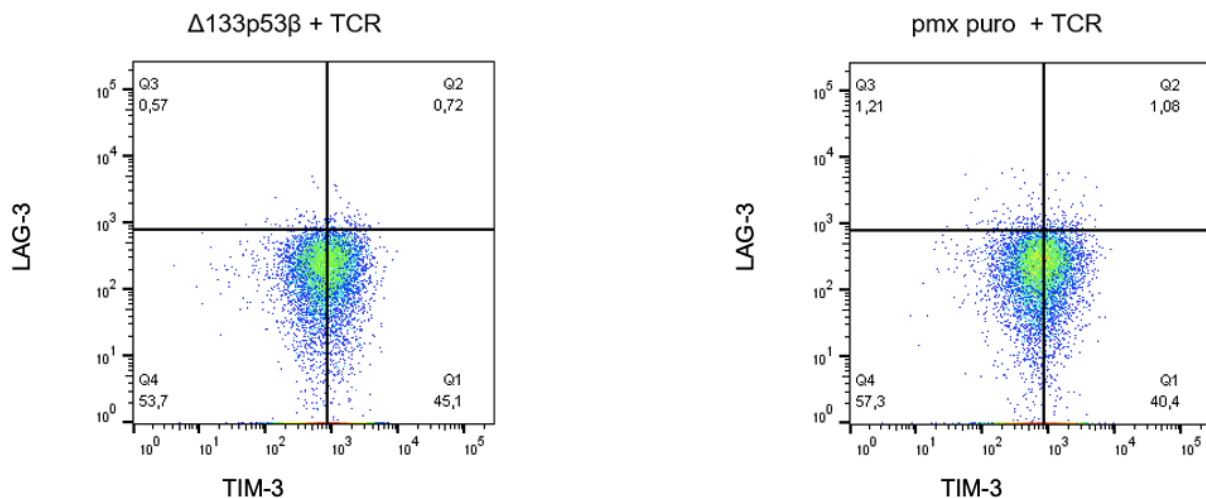


Abbildung 9: Durchflusszytometrische Expression der Immuncheckpoint-Proteine TIM-3 und LAG-3

Die Abbildung stellt die durch Durchflusszytometrie ermittelte Expression der Immuncheckpoints TIM-3 und LAG-3 in CD8⁺ T-Zellen eines Spenders 3 bis 4 Tage nach Restimulation dar.

In einem weiteren Schritt wurden die T-Zellen aus der Zellkultur entnommen und mit Saos2/143 Tumorzellen, die das von dem scTCR erkannte Antigen exprimiert, für drei Runden kokultiviert, um Tumor induzierte Exhaustion zu imitieren. Hierbei wurden die T-Zellen nach jeder Runde geerntet und mit frisch ausgesäten Tumorzellen in Kontakt gebracht. Im Anschluss wurden die T-Zellen erneut auf die Expression von TIGIT und PD-1 analysiert. Vor allem für die Gesamtexpression von TIGIT und die TIGIT⁺/PD-1⁺ Population fällt nach entsprechendem Tumorkontakt über drei Runden eine Hochregulierung auf, welche jedoch beim Vergleich der beiden experimentellen Konditionen untereinander mit p=0,0635 für TIGIT (durchschnittliche Expression $\Delta 133p53\beta$ 43,79 % und pMx_IRES_puro 32,13 %) und p=0,0854 für TIGIT⁺/PD-1⁺

(durchschnittliche Expression $\Delta 133p53\beta$ 26,8 % und pMx_IRES_puro 11,66 %) statistisch nicht signifikant ist (Abbildung 10), wahrscheinlich aufgrund der geringen Anzahl biologischer Replikate (n=3).

In einem biologischen Replikat zeigte sich eine klare Tendenz der $\Delta 133p53\beta$ Isoform auf die Expression von TIGIT und PD-1 in CD8⁺ T-Zellen, die hier beispielhaft nochmal verdeutlicht wird. Abbildung 11 zeigt die durchflusszytometrisch ermittelte Expression von TIGIT und PD-1 von CD8⁺ T-Zellen, welche über drei konsekutive Runden mit irrelevanten Zieltumoren (Saos2) kokultiviert wurden. Die TIGIT Expression in der $\Delta 133p53\beta$ Kondition beträgt 14 % und unterscheidet sich damit nicht von dem Anteil in der pMx_IRES_puro Kontrollkondition mit 14,33 %. Auch die mittlere Fluoreszenzintensität unterscheidet sich nicht, für die Isoform beträgt sie 1714 und für die Kontrolle 1703. Die PD-1 Expression fällt mit 21,41 % in der $\Delta 133p53\beta$ Kondition etwas höher aus als in der Kontrolle, in der diese 14,93 % beträgt. Hier ergeben sich ähnlich wie bei der prozentualen Expression auch für die mittlere Fluoreszenzintensität Unterschiede mit 2321 für die Isoform und 1637 für die Kontrolle. In der doppelpositiven TIGIT⁺/PD-1⁺ Population ist kein Unterschied zu beobachten, hier beträgt die Expression in den Isoform transduzierten Zellen 5,11 % und in den pMx_IRES_puro transduzierten Zellen 3,33 %.

Abbildung 12 wiederum stellt die Ergebnisse der Expression der Zellen dar, welche über drei konsekutive Runden mit dem Tumorantigen (Saos2/143) kokultiviert wurden. Zunächst lässt sich der Abbildung eindeutig entnehmen, dass der Kontakt zum Tumorantigen zu einer Hochregulierung von TIGIT und PD-1 in beiden Konditionen führt. Der Unterschied ist jedoch sehr deutlich, die $\Delta 133p53\beta$ Kondition ist von einem wesentlich größeren Anstieg betroffen. Die TIGIT Expression in der $\Delta 133p53\beta$ Kondition beträgt 60 %, was einem Plus von 46 % entspricht. In der Kontrollkondition hingegen kommt es zu einem Anstieg um lediglich 27,87 % auf insgesamt 42,2 %. Auch der Vergleich der MFI verdeutlicht den Unterschied, hier zeigen sich Werte von 8281 ($\Delta 133p53\beta$) vs. 5090 (pMx_IRES_puro). Für die Resultate der PD-1 Expression zeichnet sich ein noch deutlicheres Ergebnis ab. In der $\Delta 133p53\beta$ Kondition beträgt die Expression 59,5 % (entspricht einem Zuwachs von 38,09 %), während diese in der Kontrollkondition 31,7 % beträgt (entsprechend einem Zuwachs von 16,77 %). Betrachtet man die mittlere Fluoreszenzintensität, ist der Wert für die $\Delta 133p53\beta$ transduzierten Zellen mit 10607 mehr als doppelt so groß wie in den pMx_IRES_puro Zellen (MFI=4024). Auch die doppelpositive TIGIT⁺/PD-1⁺ Population ist in den

$\Delta 133p53\beta$ Zellen deutlich größer (43,4 % vs. 18,9 %). Jedoch ist insgesamt die Anzahl an Messungen zu niedrig, um signifikante Werte zu erreichen.

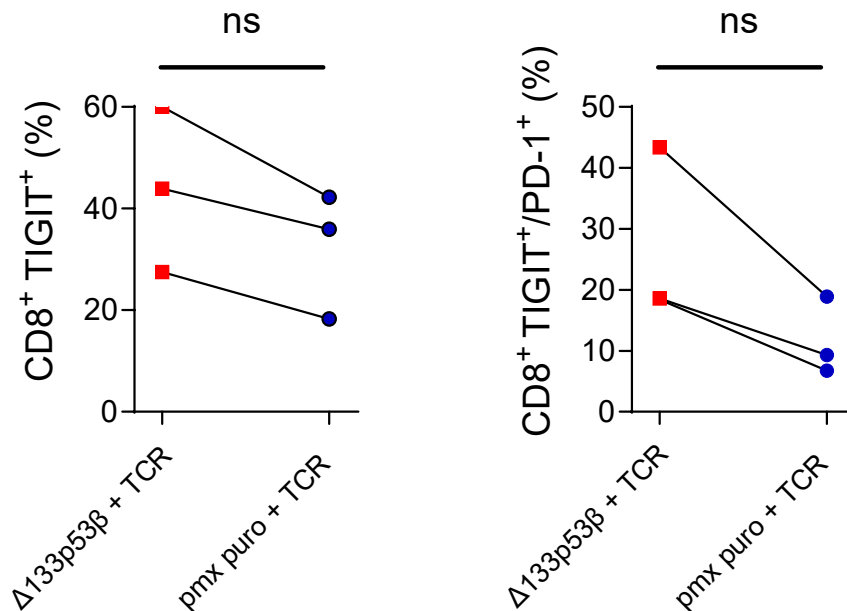


Abbildung 10: Expression von TIGIT und TIGIT+/PD-1+ in transduzierten CD8+ T-Zellen nach drei konsekutiven Runden im Kokultur Experiment mit Saos2/143

In dem Experiment wurden T-Zellen mit Saos2/143 über drei Runden kokultiviert. Anschließend erfolgte die Analyse der Expression von TIGIT und PD-1. Die Abbildung zeigt mittels Punktdiagramm die Expression von TIGIT bzw. der doppelpositiven Population TIGIT/PD-1 innerhalb der CD8+ T-Zellen jeweils für die $\Delta 133p53\beta$ und die pMx_IRES_puro Kondition. n=3 biologische Replikate. *p<0,05 **p<0,01, ***p<0,001, ns (nicht signifikant)

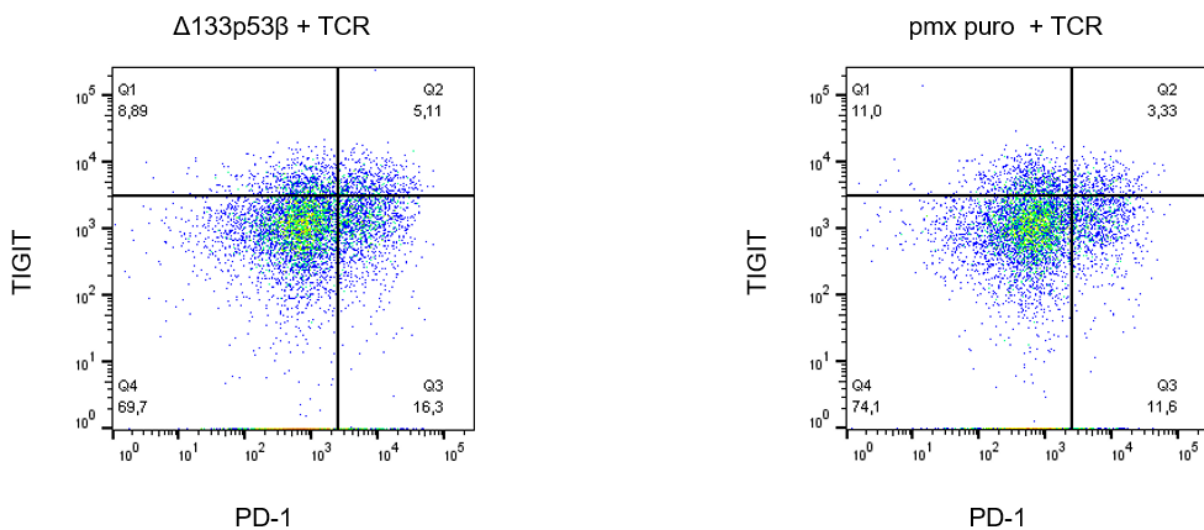


Abbildung 11: Beispiel der TIGIT/PD-1 Expression ohne Antigenkontakt in T-Zellen eines Spenders

Die T-Zellen dieses Spenders wurden über drei Runden mit irrelevanten Zeltumorzellen (Saos2) kokultiviert. Die Ergebnisse zeigen hinsichtlich der Expression von TIGIT keine wesentlichen

Unterschiede zwischen der $\Delta 133p53\beta$ Kondition und der Kontrollgruppe. Lediglich für PD-1 lässt sich bereits eine leichte Erhöhung, sowohl in der prozentualen Expression als auch in der MFI, in der $\Delta 133p53\beta$ Kondition nachweisen.

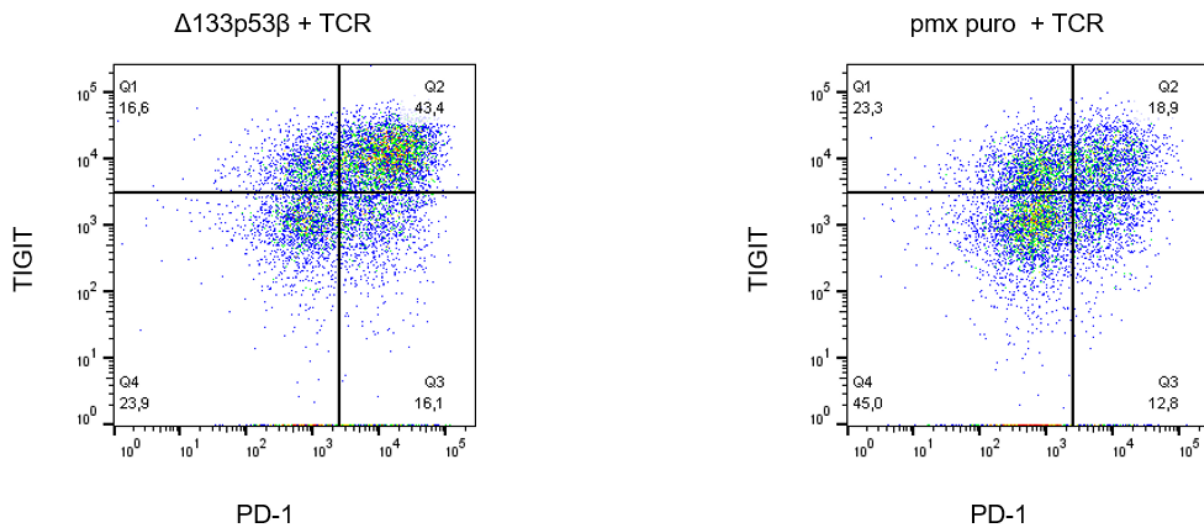


Abbildung 12: TIGIT/PD-1 Expression desselben Spenders nach drei Runden Kokultur mit Saos2/143

Die T-Zellen dieses Spenders wurden über drei Runden mit Saos2/143 Zielzellen kokultiviert. Die Abbildung stellt die durchflusszytometrisch gemessene Expression nach Antigenkontakt für TIGIT und PD-1 in den beiden experimentellen Konditionen dar.

4.3 Überexpression von $\Delta 133p53\beta$ schwächt die Kapazität von T-Zellen zur Tumorlyse

Zur weiteren Charakterisierung der Funktion von T-Zellen, insbesondere derer zytotoxischen Eigenschaften, wurde die Anti-Tumor-Antwort in *in vitro* Versuchen erfasst. Hierzu wurden T-Zellen und Tumorzellen, in diesem Fall Saos2/143, in Kokultur gebracht und ein koloniebildender Assay (Colony-forming assay) wurde durchgeführt. Hierfür wurden die T-Zellen nach 24 Stunden Kontakt mit dem Tumor geerntet und mit frischen Tumorzellen ausgesät, um eine Antigen-bedingte T-Zell-Exhaustion zu induzieren. Insgesamt wurden drei Runden durchgeführt. Es wurden im Vorhinein die Expression von CD8 und des TCR durchflusszytometrisch erfasst, sodass in beiden Konditionen dieselbe Anzahl an CD8⁺/TCR⁺ Zellen ausgesät werden konnte. Die Anti-Tumor-Antwort wurde sichtbar gemacht, indem die Wells der Mikrotiterplatten mit Kristallviolett gefärbt wurden. Anschließend wurde die optische Dichte der einzelnen Wells gemessen, um die Ergebnisse zu quantifizieren. Es zeigte sich, hier beispielhaft an einem Spender verdeutlicht, dass nach 72 Stunden Kokultur mit Zieltumorzellen die Anti-Tumor-Antwort in der $\Delta 133p53\beta$ Kondition abgeschwächt war (Abbildung 13). In der Kontrollkondition konnten die T-Zellen die Saos2/143

deutlich effektiver lysieren. Für die $\Delta 133p53\beta$ Kondition wurde hierbei eine optische Densität von 0,54 und für die pMx_IRES_puro Kondition ein Wert von 0,287 gemessen. Somit ergibt sich eine um den Faktor 1,88 stärkere Tumorlyse zugunsten der Kontrollgruppe. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass sich auch in der Negativkontrolle mit den Saos2 eine gewisse unspezifische Lyse bzw. ein „Background Killing“ beobachten lässt. Die optische Densität beträgt hierbei in der $\Delta 133p53\beta$ Kondition ungefähr 0,75 und in der Kontrollgruppe 0,78, entsprechend kommt es in der Negativkontrolle zu einer unspezifischen Lyse von 22 bzw. 25 % (Abbildung 13).

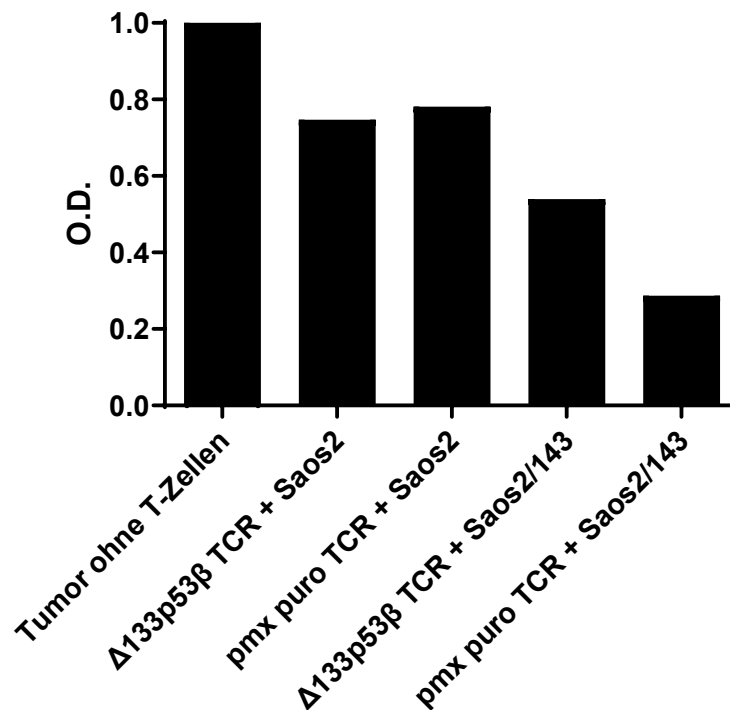


Abbildung 13: Optische Dichte der Kristallviolett färbung verschiedener Konditionen nach drei Runden Kokultur

In dem dargestellten Säulendiagramm ist die optische Dichte des eingelagerten Kristallvioletts in verschiedenen Konditionen des Kokultur Experiments dargestellt. Hier ist beispielhaft das Ergebnis eines Spenders dargestellt. Als Referenz wird die optische Dichte des Tumors ohne T-Zellen verwendet, In Bezug hierzu stehen die Werte für die beiden experimentellen Konditionen ($\Delta 133p53\beta$ und pMx_IRES_puro) jeweils mit Saos2 bzw. Saos2/143 (E:T = 2:1)

Das Ergebnis, dass die T-Zellen der $\Delta 133p53\beta$ Kondition die Saos2/143 weniger lysieren können, lässt sich auch rein optisch darstellen, indem man sich die Kolonie formenden Einheiten der Tumorzellen in den verschiedenen Konditionen nach der Färbung mit Kristallviolett photographisch darstellt (Abbildung 14). Das Well der Saos2/143 Tumorzellen ohne T-Zellen zeigt hierbei eine starke Färbung mit

Kristallviolett als Korrelat eines dichten Zellrasens, in dem keine Tumorzellen lysiert wurden. Im mittleren Well der Abbildung 14 ist für die $\Delta 133p53\beta$ T-Zellen nach drei Runden Tumorkontakt eine mittlere Färbungsintensität erkennbar. Es hat eine Lyse von Tumorzellen sattgefunden, jedoch verbleiben noch in gewissem Ausmaß Tumorzellen. Zuletzt zeigt sich in der pMx_IRES_puro Kondition bei ausgeprägter Lyse der Tumorzellen kaum eine Färbung im Well.

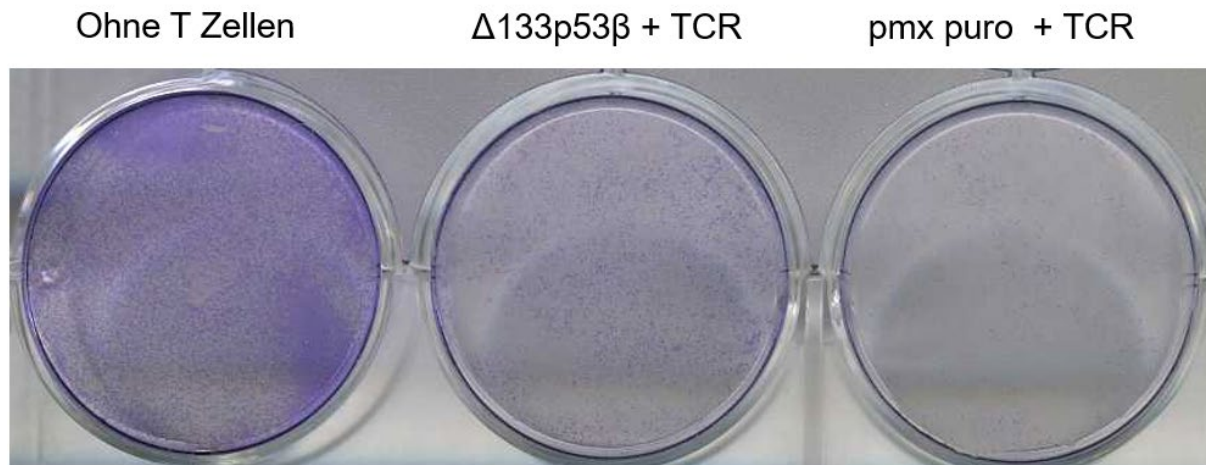


Abbildung 14: Fotografie der Wells der verschiedenen Konditionen des koloniebildenden Assays nach Kristallviolett färbung

Die dargestellte Photographie zeigt an einem Spender exemplarisch den optischen Unterschied hinsichtlich der Kristallviolett färbung nach drei Runden Kokultur von T-Zellen und Saos2/143 Tumorzellen.

Linkes Well: Saos2/143 Tumorzellen ohne T-Zellen

Mittleres Well: Saos2/143 Tumorzellen + $\Delta 133p53\beta$ transduzierte T-Zellen

Rechtes Well: Saos2/143 Tumorzellen + pMx_IRES_puro transduzierte T-Zellen

Das Ergebnis, dass die $\Delta 133p53\beta$ T-Zellen Saos2/143 Tumorzellen in geringerem Ausmaß lysieren können, lässt sich in verschiedenen biologischen Replikaten reproduzieren (n=4). Dieses Resultat ist, wie Abbildung 15 zeigt, mit einem p-Wert von 0,0284 statistisch signifikant.

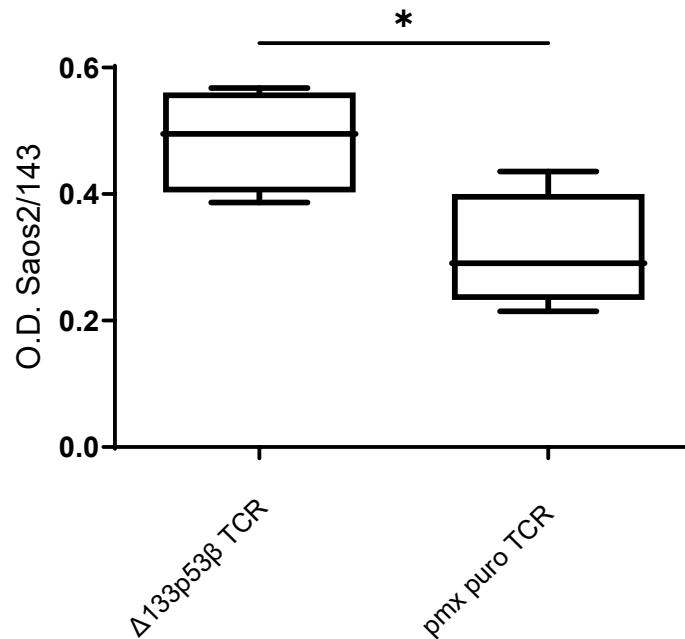


Abbildung 15: Quantitative Analyse der Koloniebildung

Der dargestellte Box-Plot stellt für die Saos2/143 Tumorzellen die optische Densität (O.D.) dar, nachdem diese über drei konsekutive Runden mit den beiden experimentellen Konditionen $\Delta 133p53\beta$ und pmx_IRES_puro kokultiviert wurden. n=4 biologische Replikate. *p<0,05 **p<0,01, ***p<0,001, ns (nicht signifikant)

Zur weiteren Darstellung der verminderten Tumorlysekapazität der mit der $\Delta 133p53\beta$ Isoform transduzierten T-Zellen wurde mit einem biologischen Replikate ein Chromium-Freisetzung-Versuch durchgeführt. Hierfür wurden die T-Zellen im Vorfeld für zwei aufeinanderfolgende Runden mit Saos2/143 kokultiviert. Durch die Messung des freigesetzten radioaktiven Chromium konnte die spezifische Lyse für verschiedenen Effektor-Target-Verhältnisse (E:T) gemessen werden. Die Abbildung 16 zeigt eine Verringerung der zytolytischen Aktivität der $\Delta 133p53\beta$ T-Zellen verglichen mit den Kontroll-T-Zellen, der Unterschied ist jedoch eher gering.

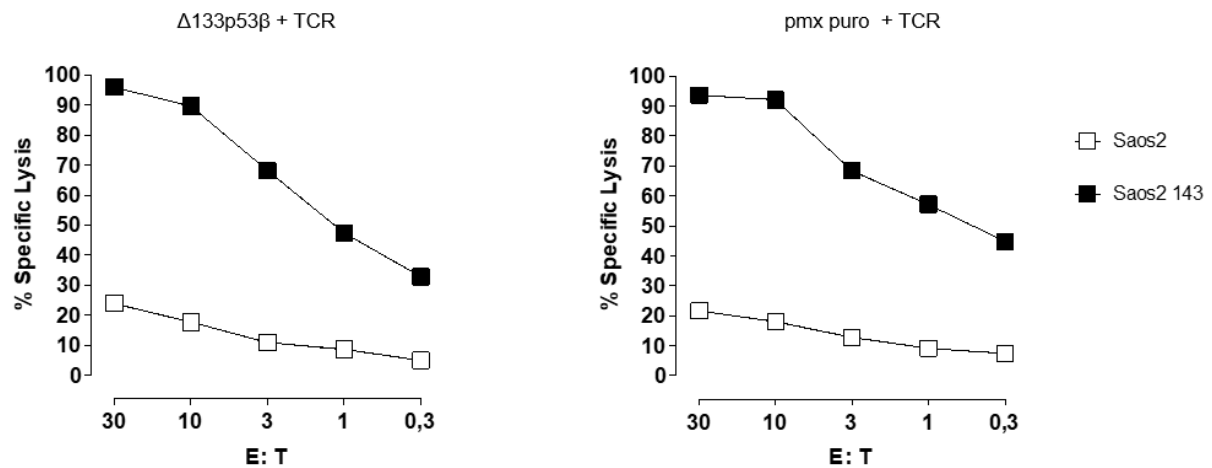


Abbildung 16: Resultat des Chromium-Assays mit einem Spender

Das Liniendiagramm stellt das Ergebnis des Chromium-Assays dar, welches mit n=1 biologischem Replikate durchgeführt wurde. Auf der Y-Achse ist die prozentuale spezifische Lyse von Saos2 und Saos2/143 Zellen mit verschiedenen Effektor-Target-Verhältnissen (E:T) auf der X-Achse dargestellt. Auf dem linken Graphen sind die Ergebnisse für $\Delta 133p53\beta$ und auf dem rechten Graphen für die Kontrollkondition zu sehen.

4.4 $\Delta 133p53\beta$ transduzierte T-Zellen sezernieren weniger $IFN\gamma$ nach

Antigenkontakt

Um die Kapazität zur Sezernierung von Zytokinen zu erfassen, wurden die T-Zellen mit Tumorzellen, die das entsprechende Antigen exprimieren, in Kokultur gebracht. In diesem Fall wurden die Saos2/143 benutzt, als Negativkontrolle dienten die Saos2. Hierzu wurden die T-Zellen, wie im koloniebildenden Assay Experiment, für drei Runden je 24 Stunden in Kontakt mit den Tumorzellen gebracht. Aus dem Überstand, in den die Zytokine sezerniert wurden, wurden die Proben gewonnen, die auf die vorbehandelten ELISA-Platten gegeben wurden. So konnte über einen Primär- und Sekundärantikörper die optische Densität für $IFN\gamma$ bestimmt werden. In Abbildung 17 sieht man die Quantifizierung des sezernierten Zytokins $IFN\gamma$ für drei unabhängige biologische Replikate dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass in allen drei Proben bereits in der Negativkontrolle eine geringfügige Reduktion der $IFN\gamma$ Sekretion in der $\Delta 133p53\beta$ Kondition festgestellt wurde, gemessen anhand der optischen Densität (Vergleich der Mittelwerte: 0,5113 ($\Delta 133p53\beta$) vs. 0,6111 (pmx_IRES_puro)). Sobald die T-Zellen mit den Tumorzellen in Kontakt kamen und dem Antigen ausgesetzt waren, wurde dieser Unterschied deutlicher (Vergleich der Mittelwerte: 1,0911 ($\Delta 133p53\beta$) vs. 1,4617 (pmx_IRES_puro)). Zwar zeigt sich in der statistischen Auswertung mit einem p-Wert von 0,1064 keine Signifikanz (Abbildung 18), dennoch ist ein klarer Trend zu erkennen, dass die $\Delta 133p53\beta$ transduzierten T-Zellen weniger $IFN\gamma$ sezernieren. In einer parallelen Kondition wurden sowohl die $\Delta 133p53\beta$ als auch

die pMx_IRES_puro T-Zellen mit den Saos2/143 und zusätzlich mit dem anti-PD-1 Antikörper Nivolumab kokultiviert. Dieser Versuch wurde vor dem Hintergrund durchgeführt, dass sich in den Experimenten in 4.2.3 eine vermehrte Expression von PD-1 in den $\Delta 133p53\beta$ T-Zellen gezeigt hat, während die Zieltumorzellen (Saos2/143) eine hohe PD-L1 Expression aufweisen. Daher sollte der Einfluss eines anti-PD-1 Antikörpers auf die $IFN\gamma$ Sekretion evaluiert werden. Hier konnte nachgewiesen werden, dass sich unter dem Einfluss des Antikörpers in der $\Delta 133p53\beta$ Konditionen die Sekretion von $IFN\gamma$ steigern ließ. In der pMx_IRES_puro Kondition konnte in einem biologischen Replikat unter dem Einfluss von Nivolumab keine Steigerung beobachtet werden, in den anderen beiden Replikaten fiel diese mit 15 % (vs. 11 %) einmal in der pMx_IRES_puro Kondition und mit 5,6 % (vs. 15 %) einmal in der $\Delta 133p53\beta$ Kondition höher aus. Zusammengefasst zeigte sich also in 2 von 3 Fällen in der $\Delta 133p53\beta$ Kondition unter PD-1-Blockade eine größere Zunahme in der $IFN\gamma$ Sekretion.

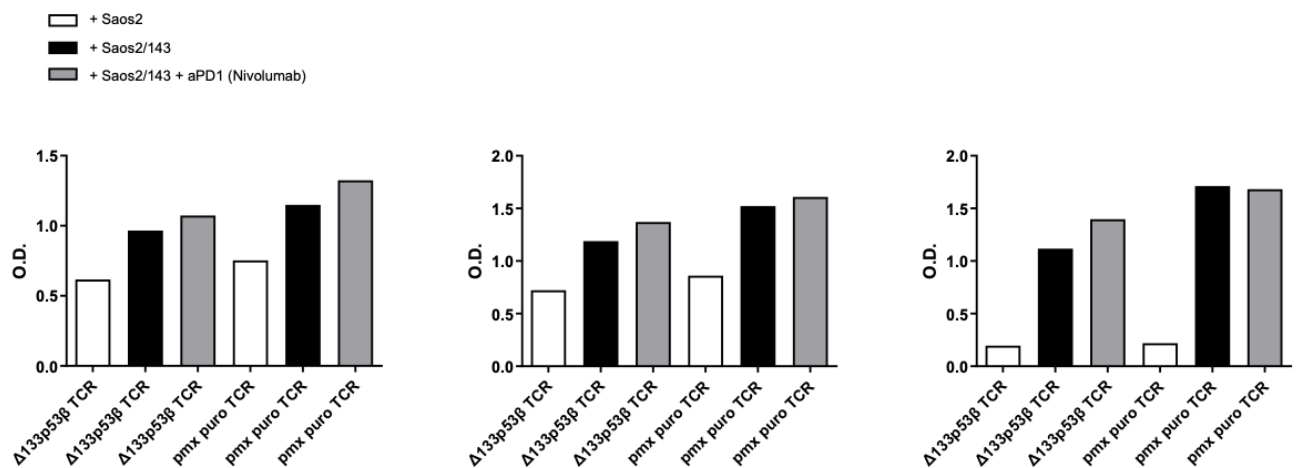


Abbildung 17: Im ELISA ermittelte $IFN\gamma$ Sekretion nach 72 Stunden Kokultur mit Saos2 und Saos2/143 plus/minus Nivolumab

In den drei abgebildeten Säulendiagrammen sieht man die optischen Densitäten der mittels ELISA gemessenen $IFN\gamma$ Sekretion nach 72 Stunden Kokultur für verschiedene Konditionen. Jedes Säulendiagramm repräsentiert einen der n=3 verwendeten Spender. Für jeden Spender wurden jeweils für beide experimentelle Konditionen ($\Delta 133p53\beta$ und pMx_IRES_puro) Kokulturen mit Saos2 bzw. Saos2/143 \pm Nivolumab angelegt.

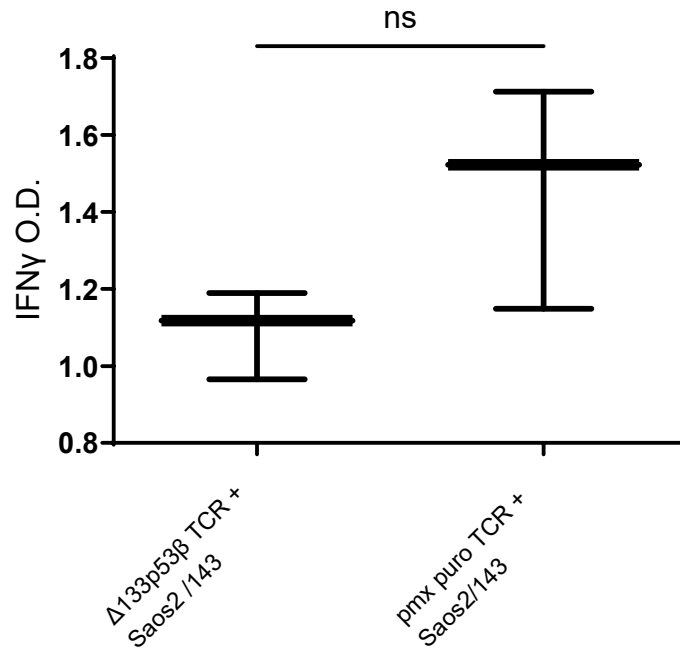


Abbildung 18: Quantifizierung der IFN γ Sekretion nach 72 Stunden Kokultur mit Saos2/143

Dargestellt ist hier die optische Densität der IFN γ Sekretion der $\Delta 133p53\beta$ T-Zellen und Kontroll-T-Zellen nach 72 Stunden Kokultur mit Saos2/143 für n=3 unabhängige biologische Replikate.

Um ein genaueres Bild über den Einfluss von $\Delta 133p53\beta$ auf die Signalwege von zytotoxischen T-Zellen zu gewinnen, wurden neben IFN γ auch das Enzym Granzyme B und der Degranulationsmarker CD107a untersucht. Ähnlich wie die vorausgehende experimentelle Konstellation wurde eine Kokultur mit Saos2 und Saos2/143 durchgeführt. Die anschließende Analyse erfolgte hier durchflusszytometrisch. Jedoch zeigten sich für diese beiden für die zytotoxische Kapazität relevanten Faktoren keine nennenswerten Unterschiede. Dies kann man der Abbildung 19 entnehmen, in der die durchflusszytometrisch erfasste Expression quantifiziert wurde. Hierbei zeigt sich für die prozentuale Granzyme B Expression ein durchschnittlicher Wert von 94,1 % für $\Delta 133p53\beta$ und 93,1 % für die Kontrollgruppe. Hinsichtlich der mittleren Fluoreszenzintensität ergibt sich ein Mittelwert von 1711,5 für $\Delta 133p53\beta$ und 1664,75 für die Kontrollgruppe, wobei ein Wertepaar einen deutlichen Ausreißer darstellt (Abbildung 19, A). Für die prozentuale CD107a Expression ergibt sich für $\Delta 133p53\beta$ 36,97 % und für die Kontrollgruppe 38,53 %, bezüglich der mittleren Fluoreszenzintensität 3302 für $\Delta 133p53\beta$ und 3179 für die Kontrollgruppe (Abbildung 19, B).

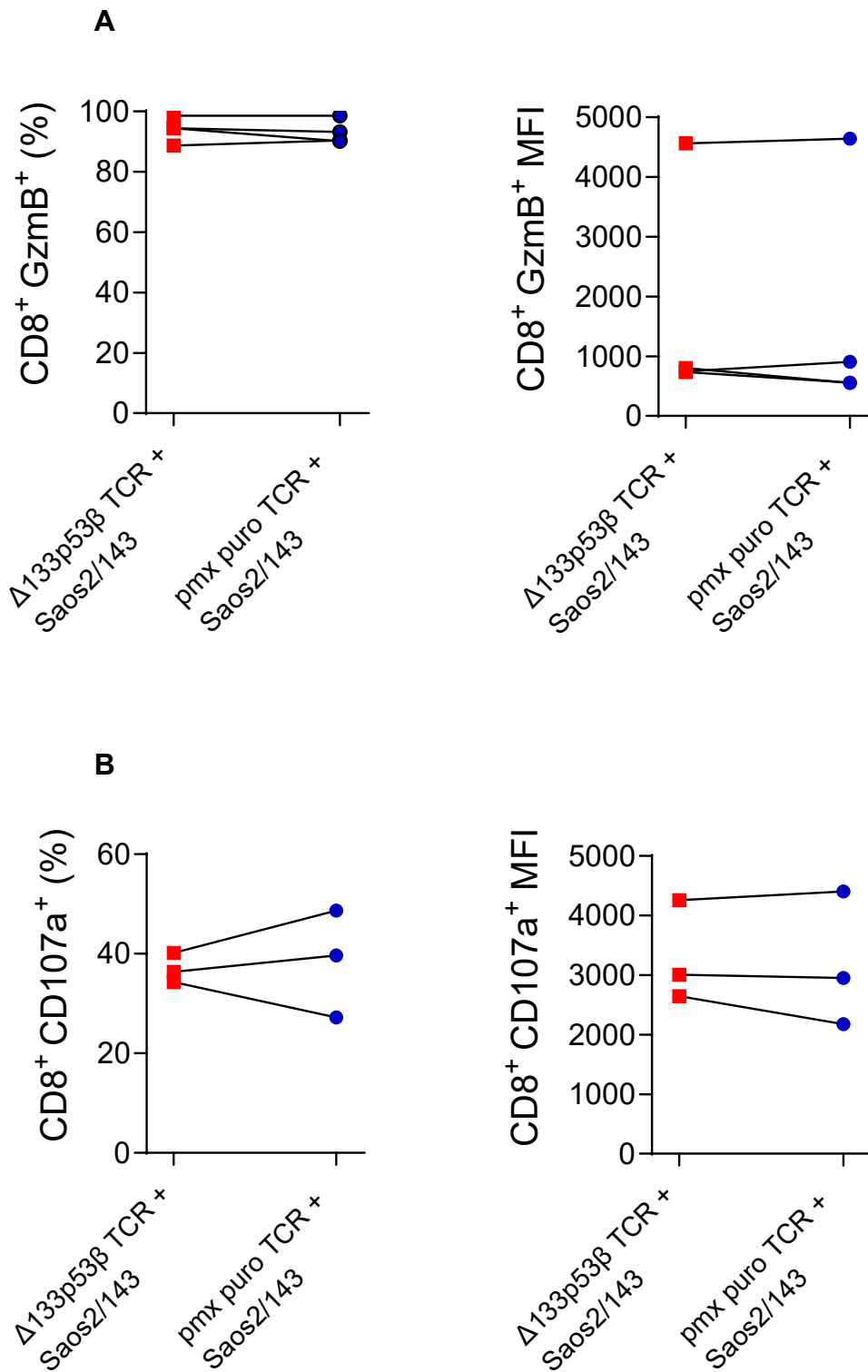
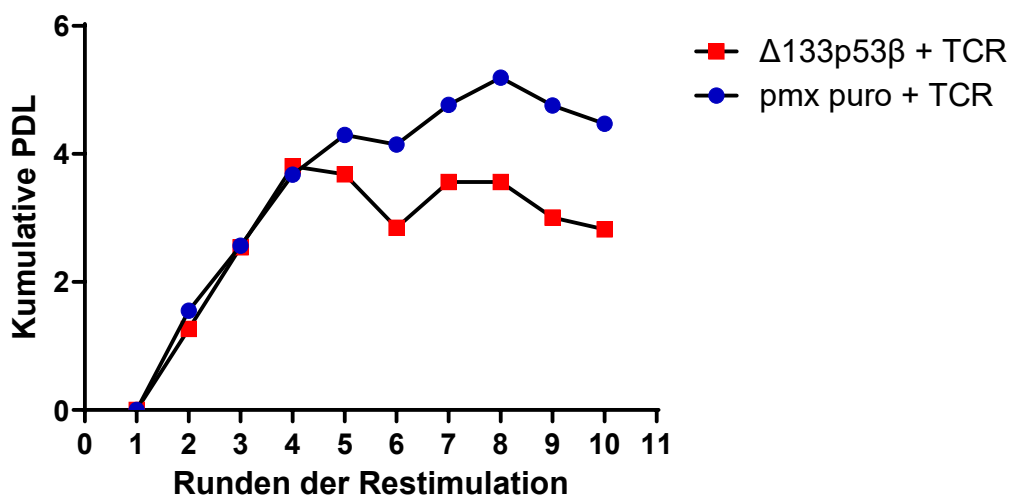


Abbildung 19: Durchflusszytometrisch ermittelte Freisetzung von Granzyme B und Expression von CD107a

(A) Durchflusszytometrische Untersuchung der Expression (% und MFI) von Granzyme B (n=4) und (B) von CD107a (n=3) nach Kokultur von Δ133p53β und pmx_IRES_puro transduzierten T-Zellen mit Saos2/143.

4.5 $\Delta 133p53\beta$ beeinflusst die Proliferationskapazität von T-Zellen negativ

Es ist bekannt, dass bei einer Zellseneszenz die Fähigkeit zur Proliferation vermindert ist und irgendwann zum Erliegen kommt (siehe Abschnitt 2.4). Um die Kapazität zur Proliferation zu bestimmen, wurden die T-Zellen vor jeder Restimulation gezählt und zur selben Anzahl ausgesät. Aus der eingesetzten Zellzahl zu Beginn und derjenigen nach einer Woche ließ sich der sogenannte „Population doubling level (PDL) bestimmen. Dieses Vorgehen wurde bei sechs unterschiedlichen biologischen Replikaten verwendet, um den Proliferationsindex zu ermitteln. Die Ergebnisse in Abbildung 20 zeigen, dass anfänglich in beiden Konditionen die Proliferation vergleichbar war. Nach einigen Restimulationen wurde erkennbar, dass sich die Kurven separieren und die $\Delta 133p53\beta$ Kondition deutlich hinter der Kontrollkondition blieb. Dies ließ sich in fünf der sechs Replikate beobachten. In drei der sechs Replikate ließ sich sogar in der $\Delta 133p53\beta$ Kondition beobachten, dass ein Plateau erreicht wird und die Proliferation fast zum Erliegen kommt. In den in Abbildung 20 exemplarisch dargestellten biologischen Replikaten wurde zum Ende der Messung ein PDL von 5,54 ($\Delta 133p53\beta$) und 9,7 (pMx_IRES_puro) bzw. 2,82 ($\Delta 133p53\beta$) und 4,47 (pMx_IRES_puro) errechnet, was einem Anstieg von 75% bzw. 58,5% zugunsten der Kontrollkondition entspricht.



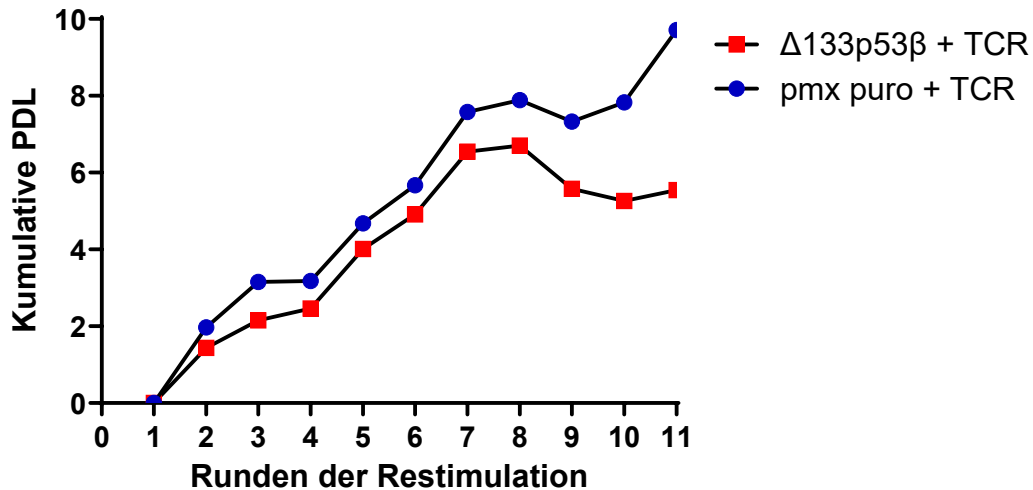


Abbildung 20: Darstellung des kumulativen „Population Doubling Level“ (PDL)

Die Y-Achse stellt die „Population Doubling Level“ (PDL-Werte) dar, während die X-Achse die Anzahl der Restimulationen (1 Runde entspricht einer Woche) abbildet. In dieser Abbildung werden die PDL-Kurven für n=2 unabhängige biologische Replikate exemplarisch dargestellt.

Als weitere Methode zur Erfassung der Proliferationskapazität wurde ein Thymidin-Assay durchgeführt, bei welchem das radioaktive Thymidin in die DNA der T-Zellen eingebaut wird. Anschließend werden die Szintillationen pro Minute erfasst, die umso höher ausfallen je stärker die Proliferation der Zellen ist. Abbildung 21 zeigt das Resultat dieses Versuchs. Man kann dem Diagramm entnehmen, dass die erfassten Szintillationen für die pmx_IRES_puro Kondition deutlich höher ausfallen als für die Δ133p53β Kondition. Der Unterschied ist mit einem p-Wert von $p=0,0203$ statistisch signifikant.

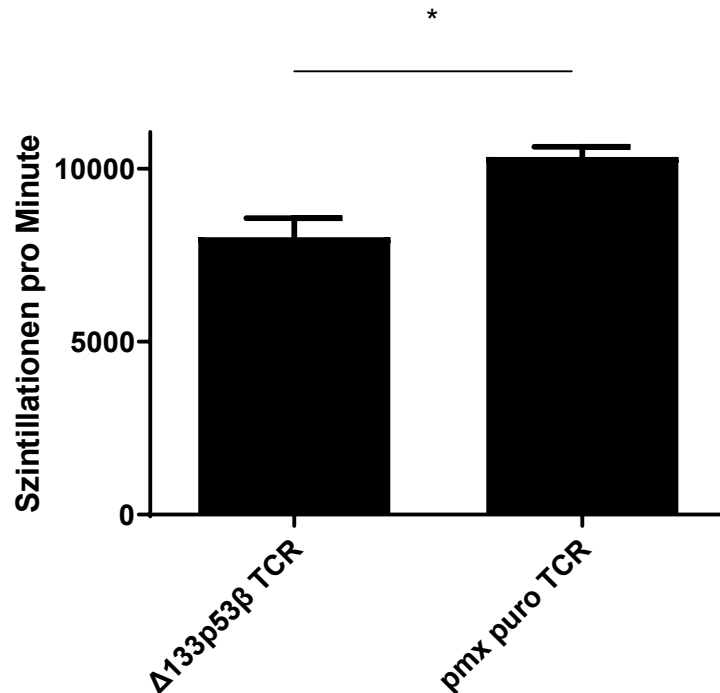


Abbildung 21: Thymidin Assay zur Erfassung der Proliferationskapazität

Die Y-Achse stellt für die beiden Versuchskonditionen die Anzahl der am Harvester ermittelten Zählungen der Szintillation als Ausdruck der proliferativen Kapazität. Diese fällt für die $\Delta 133p53\beta$ transduzierten T-Zellen signifikant geringer aus als für die Kontrollkondition.

4.6 $\Delta 133p53\beta$ beeinflusst nicht die metabolischen Eigenschaften von T-Zellen

Um das energetische und metabolische Profil der transduzierten T-Zellen näher zu erfassen, wurde mit einem biologischen Replikat exemplarisch ein sogenannter extrazellulärer Flux Versuch durchgeführt. Hierbei wurde die Veränderung des pH-Wertes als Maß der Glykolyse sowie der Sauerstoffverbrauch als Maß der Zellatmung gemessen. Abbildung 22 stellt das Resultat des Versuchs dar. In der Ausgangsbedingung lassen sich sowohl für die Glykolyse als auch die mitochondriale Energiegewinnung keinerlei Unterschiede nachweisen. Auch wenn die T-Zellen dem „Stresstest“ unterzogen werden, lässt sich allenfalls ein minimaler Unterschied beobachten. Hierbei beträgt die extrazelluläre Azidifikationsrate 1,97 mpH/min/Zelle für die $\Delta 133p53\beta$ Kondition und 2,25 mpH/min/Zelle für die pMx_IRES_puro Kondition, entsprechend einem Plus von etwa 14 % zugunsten der pMx_IRES_puro Kondition. Die Sauerstoffverbrauchsrate als Korrelat der mitochondrialen Respiration beträgt 7,53 pmol/min/Zelle für die $\Delta 133p53\beta$ Kondition und 8,73 pmol/min/Zelle für die pMx_IRES_puro Kondition, entsprechend einem Plus von etwa 15,9 % zugunsten der pMx_IRES_puro Kondition. Somit scheint die $\Delta 133p53\beta$ Isoform den Metabolismus

von T-Zellen nicht bzw. nur marginal zu beeinflussen, zumindest in diesem biologischen Replikat.

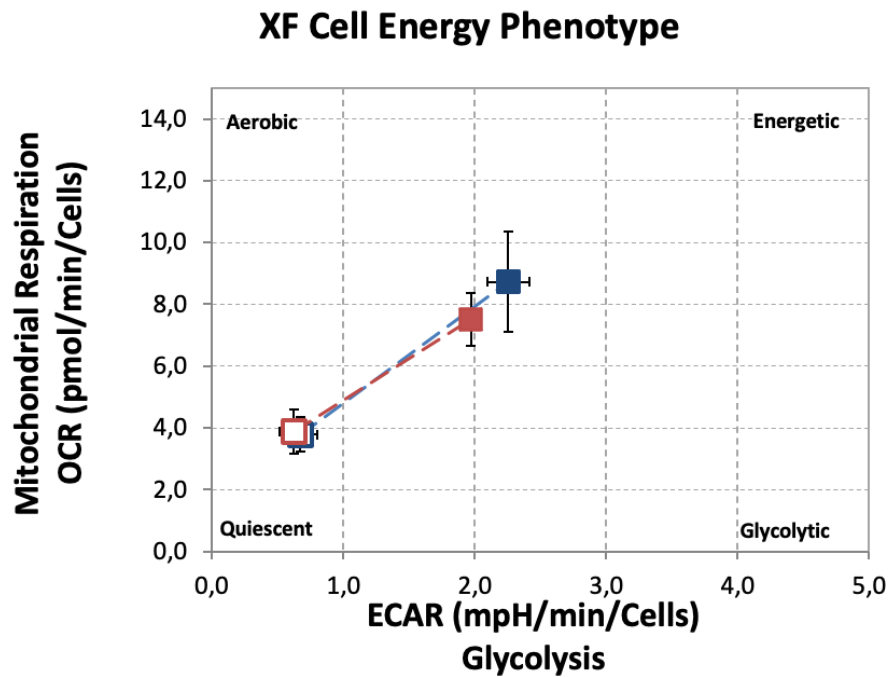


Abbildung 22: Extrazellulärer Flux Versuch

Die Y-Achse zeigt die mitochondriale Respiration veranschaulicht durch die Sauerstoffverbrauchsrate und die X-Achse zeigt die extrazelluläre Azidifikationsrate als Maß für die Glykolyse. In Rot ist die $\Delta 133p53\beta$ und in Blau die pMx_IRES_puro Kondition dargestellt. Der Versuch wurde mit n=1 biologischem Replikat durchgeführt.

5 Diskussion

In dieser Studie wurde die Rolle der $\Delta 133p53\beta$ Isoform auf verschiedene Funktionen und Charakteristika von humanen $CD8^+$ T-Zellen untersucht. Hierfür wurde aus peripheren mononukleären Blutzellen die Population der T-Zellen stimuliert, sodass schließlich diese mit einem Plasmid, welches das Gen für $\Delta 133p53\beta$ beinhaltet, retroviral transduziert werden konnten.

Durch die Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen mittels Durchflusszytometrie zeigte sich eine Assoziation, dass insbesondere die T-Zell-Differenzierungsmarker CD28 und CD57 oder inhibitorische Moleküle wie PD-1 und TIGIT in ihrer Oberflächenexpression durch $\Delta 133p53\beta$ beeinflusst wurden, während das Verhältnis von CD8 und CD4 sowie die Expression des TCR nicht verändert wurden. Gleichzeitig zeigten die $CD8^+$ T-Zellen, die $\Delta 133p53\beta$ überexprimierten, in den durchgeführten Kokultur Experimenten mit der Osteosarkom Zelllinie Saos2/143 eine verminderte Kapazität zur Lyse der Tumorzellen. Die zytotoxische Fähigkeit der $\Delta 133p53\beta$ Kondition war also kompromittiert. Um ein genaueres Bild davon zu haben, wie diese Reduktion der Zytotoxizität zu erklären ist, wurde die Kapazität der $CD8^+$ T-Zellen zur Sekretion der beiden relevanten Marker Granzyme B und CD107a analysiert. Hierbei zeigte sich jedoch kein relevanter Unterschied in den beiden Gruppen. Somit scheint die reduzierte Tumorlyse der $\Delta 133p53\beta$ transduzierten T-Zellen in keinem Zusammenhang mit diesen Faktoren zu stehen. Hingegen zeigte sich insbesondere nach Kontakt mit Tumorzellen in den $\Delta 133p53\beta$ transduzierten T-Zellen eine starke Tendenz zur verminderten Sekretion des Zytokins $IFN\gamma$, welches mitunter einen Einfluss auf die Zytotoxizität hat. Letztlich ließ sich über den zeitlichen Verlauf der Zellkultur hinweg beobachten, dass die proliferative Kapazität in der $\Delta 133p53\beta$ Kondition vermindert war. Metabolische Parameter für Glykolyse und mitochondriale Energiegewinnung wiesen in einem Experiment keine Unterschiede zwischen den Versuchsbedingungen auf.

Zusammenfassend ergibt sich das Bild, dass eine Überexpression der $\Delta 133p53\beta$ Isoform in $CD8^+$ T-Zellen einen Seneszenz-ähnlichen Phänotyp fördert, welcher mit einer Hochregulierung der Oberflächenmoleküle CD57, TIGIT sowie PD-1 insbesondere nach Kokultur mit Tumorzellen führt. Gleichzeitig kommt es zu einer verminderten Kapazität zur Tumorlyse, $IFN\gamma$ Sekretion (keine statistische Signifikanz) und Proliferation. Die Bedeutung dieser Eigenschaften soll im Folgenden genauer im Kontext der bekannten Literatur diskutiert werden.

5.1 $\Delta 133p53\beta$ und der Einfluss auf den Phänotyp von $CD8^+$ T-Zellen

Wie sich in der durchflusszytometrischen Analyse der Oberflächenmarker zeigte, war eine signifikante $CD57^+$ und $CD57^+/CD28^+$ doppelpositive Population in den $\Delta 133p53\beta$ exprimierenden $CD8^+$ T-Zellen vermehrt. Es ist bereits bekannt, dass die beiden Proteine CD57 und CD28 eine zentrale Rolle bei der weiteren Klassifizierung von $CD8^+$ T-Zellen spielen. CD57 ist allgemein bekannt als ein Protein, welches als ein Marker für replikative Seneszenz in T-Zellen angesehen wird und häufig genutzt wird, um funktionelle Immunschwäche beispielsweise in Patienten mit Autoimmunerkrankungen oder Krebs zu messen (155). Über die doppelpositive $CD57^+/CD28^+$ Population ist in der Literatur weniger bekannt als über die $CD57^+/CD28^-$ oder die $CD57^-/CD28^+$ Populationen. Die doppelpositive Population scheint jedoch sehr spezifische Merkmale aufzuweisen, die durch eine erhöhte Zytokinausschüttung und eine erhöhte Expression von koinhibitorischen Molekülen wie PD-1, TIGIT und CTLA-4 charakterisiert werden (156). Der zuletzt genannte Aspekt ist auch eine der Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit, worauf im Verlauf jedoch noch weiter eingegangen wird. Interessanterweise zeigte sich in den Vorarbeiten von Legscha et al. aus unserer Arbeitsgruppe, dass die $\Delta 133p53\alpha$ Isoform einen stammzellähnlichen Phänotyp fördert, der (neben weiteren Aspekten) durch eine erhöhte $CD28^+$ Population mit besseren funktionellen Eigenschaften gekennzeichnet ist (12). In der Arbeit von Mondal et al. hingegen konnte nachgewiesen werden, dass in der $CD28^-/CD57^+$ die Expression der $p53\beta$ Isoform überwiegt (11). Erstgenannte hat denselben N-Terminus wie die $\Delta 133p53\beta$ Isoform, während letztgenannte denselben C-Terminus hat. Die $\Delta 133p53\alpha$ und $\Delta 133p53\beta$ Isoform unterscheiden sich in ihrer Struktur lediglich an ihrem C-Terminus durch alternatives Splicing am Exon-9 β , wodurch das aus 10 Aminosäuren bestehende β -Carboxy-terminale Ende entsteht, welches einen Teil der Oligomerisierungsdomäne und die gesamte α -Domäne ersetzt (128). Obwohl der Strukturunterschied lediglich in dem kurzen C-terminalen Ende besteht, weisen diese beiden Isoformen dennoch wie oben beschrieben gegensätzliche Effekte auf.

5.2 Verminderte Zytotoxizität der $\Delta 133p53\beta$ überexprimierenden $CD8^+$ T-Zellen

Auf einer funktionellen Ebene zeigten unsere Daten, dass $\Delta 133p53\beta$ transduzierte $CD8^+$ T-Zellen in einem dreistufigen Kokultur Experiment mit Saos2/143 Tumorzellen deutlich weniger lysieren als die Kontrollzellen. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass im selben dreistufigen Kokultur Experiment die $\Delta 133p53\beta$ T-Zellen signifikant

mehr TIGIT und PD-1, beides relevante koinhibitorische Oberflächenmoleküle, exprimieren. Entnahm man aus diesem Experiment den Überstand der T-Zellen und untersuchte diesen im ELISA Assay hinsichtlich des Zytokins IFN γ , so fand sich hier wiederum eine verminderte Sekretion in der $\Delta 133p53\beta$ Kondition. Diese beiden Aspekte können mit den Resultaten des „Colony-forming assay“ in Einklang gebracht werden und diese erklären. Das Protein PD-1 ist in der Literatur sehr gut beschrieben und hat auch eine große klinische Relevanz. So ist bekannt, dass PD-1 durch die Bindung an seine Liganden PD-L1 und PD-L2, welche oft an der Oberfläche von Tumorzellen überexprimiert sind, inhibitorische Signale vermittelt und Exhaustion in T-Zellen fördert (157). Die Effekte dieser Interaktion sind u.a. Aufhebung des CD28 Signals, wodurch die Signalkette des TCR gestört wird. Weiterhin führt dies zu verminderter Ausschüttung von Zytokinen, dem Zellzyklusarrest in CD8⁺ T-Zellen sowie Veränderungen im Metabolismus der CD8⁺ T-Zellen (158). Auch TIGIT spielt mit seinen Liganden, darunter z.B. CD155 und CD112, eine wichtige Rolle in der Interaktion von CD8⁺ T-Zellen und Tumorzellen. So konnte beispielsweise in Versuchen mit Melanom Zellen nachgewiesen werden, dass u.a. die Zytokinausschüttung in Melanom-spezifischen zytotoxischen T-Zellen gehemmt und somit auch die Zytotoxizität der T-Zellen in der Effektorphase vermindert wird (159). Die klinische Relevanz von TIGIT ist durch zahlreiche Studien zur Blockade der TIGIT/CD155 Interaktion dokumentiert. So weisen CD8⁺ T-Zellen in Zervixkarzinomen eine hohe TIGIT Expression auf, welche die Exhaustion dieser verstärkt. Eine Blockade des TIGIT/CD155 Signals führt in diesem Fall zu einer Aufhebung der Exhaustion und einer verstärkten Anti-Tumor Antwort gegen das Zervixkarzinom (160). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass die duale Blockade von TIGIT und PD-1 in CD226 exprimierenden CD8⁺ T-Zellen aus nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) die Anti-Tumor Antwort noch weiter verstärken kann (161).

Weiterhin konnte bei Patienten mit MM beobachtet werden, dass der Progress der Erkrankung mit einer höheren Expression von TIGIT in den CD8⁺ T-Zellen dieser Patienten assoziiert war. Diese TIGIT⁺/CD8⁺ T-Zellen waren in ihrer Funktion kompromittiert, was u.a. mit einer verminderten Proliferation einherging. Durch die Blockade von TIGIT durch einen monoklonalen Antikörper wiederum konnte die Effektorfunktion der CD8⁺ T-Zellen der Patienten verbessert und der Progress des MM gebremst werden (162). Auch in anderen Tumorentitäten konnte die Relevanz von TIGIT und damit von einer TIGIT-Blockade dokumentiert werden. In einem transgenen

murinen Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom Modell konnte eine anti-TIGIT Behandlung das Tumorstadium verzögern und die Effektorfunktion der CD8⁺ T-Zellen aktivieren (163). Eine andere Studie wies nach, dass eine *ex vivo* Kombinationsbehandlung von mikrosatellitenstabilen kolorektalen Karzinomen mit Atezolizumab (anti-PD-L1) und Tiragolumab (anti-TIGIT) die Funktion von CD4⁺ und CD8⁺ TILs verbessert (164). Hier sei jedoch erwähnt, dass die mit dieser Kombination durchgeführte Phase III Studie SKYSCRAPER-01 bei PD-L1 exprimierendem metastasiertem NSCLC den primären Endpunkt der Studie nicht erreichte (165). Es wurden und werden aktuell noch weitere klinische Studien zu TIGIT-Blockade durchgeführt, z.B. mehrere Phase III Studien für das NSCLC oder eine Phase II Studie, die die Kombination von Etigilimab (anti-TIGIT) und Nivolumab (anti-PD-1) beim platinresistenten Ovarialkarzinom nach Rezidiv testet (165).

Interessanterweise wurde in Experimenten mit NKT-Zellen (Natürliche Killer-T-Zellen) festgestellt, dass die TIGIT/CD155 Interaktion in diesen Zellen über den NF- κ B Signalweg zu einer verminderten IFN γ Sekretion führt (166). Hier wäre ein möglicher Erklärungsansatz denkbar, weshalb in Δ 133p53 β transduzierten T-Zellen weniger IFN γ gebildet wird. Es wäre zu diskutieren, ob möglicherweise die mit Δ 133p53 β assoziierte Überexpression von TIGIT zu einer Aktivierung des NF- κ B Signalwegs und hierüber zu einer verminderten Sekretion von IFN γ führt.

Die gleichzeitige Observation der verminderten IFN γ Sekretion und reduzierten Kapazität zur Lyse von Tumorzellen in der Δ 133p53 β Kondition lässt sich im Kontext der in der Literatur beschriebenen Eigenschaften von IFN γ diskutieren. So ist bekannt, dass IFN γ von zytotoxischen T-Zellen sezerniert wird, um u.a. die MHC-I Expression zu fördern, was wiederum die TCR/MHC-vermittelte Tumorzell-Lyse erleichtert (167). Außerdem stellte sich heraus, dass die autokrine Sekretion von IFN γ naiven CD8⁺ T-Zellen bei der weiteren Differenzierung in Effektorzellen verhilft (168, 169). Diese Aspekte könnten neben der Überexpression der koinhibitorischen Moleküle TIGIT und PD-1 ein Erklärungsansatz sein, wieso Δ 133p53 β exprimierende CD8⁺ T-Zellen eine verminderte Kapazität zur Tumolyse aufweisen.

Weiterhin konnte in zwei von drei biologischen Replikaten eine Steigerung der IFN γ Sekretion in der Δ 133p53 β Kondition beobachtet werden verglichen mit Kontroll-T Zellen, nachdem die T-Zellen mit dem anti-PD-1 Antikörper Nivolumab behandelt wurden. In Experimenten mit murinen T-Zellen aus transgenen CD57BL/6 Mäusen und den Tumorzelllinien B16 (Melanom) und MC38 (Adenokarzinom des Kolons) konnte

gezeigt werden, dass eine Blockade von PD-1 zu einer vermehrten Sekretion von $\text{IFN}\gamma$ und durch $\text{IFN}\gamma$ induzierte Chemokine CXCL10 führt (170). Übertragen auf die Resultate der vorliegenden Arbeit kann diskutiert werden, ob möglicherweise auch hier die Blockade von PD-1 durch Nivolumab eine Steigerung von $\text{IFN}\gamma$ bewirkt, welche in der $\Delta 133\text{p}53\beta$ Kondition in zwei von drei Spendern vermehrt ausfällt, da bereits gezeigt wurde, dass $\Delta 133\text{p}53\beta$ in T-Zellen zu einer Hochregulierung von PD-1 führt. Es kann auch an dieser Stelle eine mögliche therapeutische Implikation zur Diskussion gestellt werden, auf welche im Verlauf noch eingegangen wird. An dieser Stelle sind weitere Versuche notwendig, um den möglichen Zusammenhang der $\Delta 133\text{p}53\beta$ und $\text{IFN}\gamma$ genauer zu beschreiben.

5.3 Einfluss der $\Delta 133\text{p}53\beta$ Isoform auf Seneszenz in T-Zellen

Eines der eindrucklichsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit war die verminderte Proliferationskapazität der $\Delta 133\text{p}53\beta$ transduzierten T-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-T-Zellen. Wie bereits in der Literatordiskussion beschrieben, ist das Sistieren der Proliferation, von Hayflick auch als replikative Seneszenz bezeichnet, eines der Kennzeichen der Seneszenz und damit des Alterungsprozesses (104, 105). Damit erfüllen die $\Delta 133\text{p}53\beta$ T-Zellen ein wichtiges Kriterium der Seneszenz. Doch es gibt weitere Merkmale, die den Phänotyp von seneszenten Zellen definieren. Vor dem Hintergrund des Zieles der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, ob die $\Delta 133\text{p}53\beta$ Isoform einen Einfluss auf die Seneszenz von T-Zellen hat, muss die Frage, ob die Kriterien der Seneszenz erfüllt sind, diskutiert werden.

Neben der reduzierten proliferativen Aktivität und Zytotoxizität, auf welche bereits eingegangen wurde, gibt es charakteristische Veränderungen des Phänotyps und des Zytokin Profils. Auf die beiden Proteine CD28 und CD57 wurde im Eingang der Diskussion verwiesen. Insbesondere CD57 gilt als eines der definierenden Oberflächenmarker für Seneszenz (171) aber auch TIGIT gehört zu diesen Markern, wie Chauvin et al. in Studien mit Melanom Patienten zeigten (172). Andere Marker wie z.B. TIM-3 oder LAG-3, in seneszenten Zellen erhöht, oder die verminderte Expression von CD28 konnten in den durchflusszytometrischen Analysen der $\Delta 133\text{p}53\beta$ T-Zellen nicht nachgewiesen werden. Auch das sog. SASP als charakteristisches Zytokin Profil seneszenten T-Zellen wurde bereits erwähnt. Interessanterweise gehört zu diesem Profil neben der vermehrten Sekretion von IL-6, IL-8 und $\text{TNF-}\alpha$ auch die Erhöhung von $\text{IFN}\gamma$ (173). Hier findet sich mit der Verminderung von $\text{IFN}\gamma$ in der $\Delta 133\text{p}53\beta$

Kondition eine Beobachtung, welche nicht dieses Kriterium erfüllt. Hingegen weisen T-Zellen, welche sich im Zustand der Exhaustion befinden, eine Reduktion der $\text{IFN}\gamma$ auf (174). Ein weiteres Charakteristikum, welches sich in seneszenten T-Zellen beschreiben lässt, ist die Veränderung des Metabolismus. Dieser weist einerseits die durch PD-1 hervorgerufene Drosselung der Glykolyse bei gleichzeitig vermehrter Fettsäureoxidation auf (175). Andererseits kommt es durch Aktivierung der MAP-Kinase p38 und der PI3K-Akt-mTOR Achse zur Inhibition der Autophagie und damit zur mitochondrialen Dysfunktion mit vermehrter Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (176). Derartige metabolische Veränderungen ließen sich in den entsprechenden Versuchen zur Beschreibung des energetischen Phänotyps der T-Zellen nicht nachweisen, zwischen den beiden Konditionen ergaben sich keine Unterschiede. Hier muss jedoch betont werden, dass diese Beobachtung einer Bestätigung durch eine größere Zahl biologischer Replikate bedarf, da das Experiment bisher mit einem Replikat erfolgte. Auch im Hinblick auf die Fettsäureoxidation ist zu beachten, dass entsprechende Versuche zur Beurteilung dieses Parameters noch ausstehend sind, sodass hierüber keine sichere Aussage getroffen werden kann.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die $\Delta 133\text{p}53\beta$ transduzierten T-Zellen gewisse Eigenschaften seneszenten T-Zellen besitzen, insbesondere im Hinblick auf Proliferation, Zytotoxizität und Expression gewisser Oberflächenmarker. Es sollte jedoch betont werden, dass keine eindeutige Einordnung vorgenommen werden kann. Während seneszente T-Zellen im klassischen Sinne $\text{CD}28\text{-CD}57^+$ sind (107), ist die CD57 Expression bei $\Delta 133\text{p}53\beta$ transduzierten T-Zellen mit der CD28 Expression vergesellschaftet im Sinne der doppelpositiven $\text{CD}28^+\text{CD}57^+$ Population. Auch bezogen auf die verminderte Zytotoxizität in den $\Delta 133\text{p}53\beta$ T-Zellen muss weiter differenziert werden, dass seneszente T-Zellen zwar eine reduzierte antigenspezifische Zytotoxizität bei jedoch erhaltener und potenter nichtspezifischer Zytotoxizität (107).

Auch andere Eigenschaften passen nicht in das Bild der T-Zell Seneszenz wie die Sekretion von $\text{IFN}\gamma$ und Granzyme B oder die Veränderungen des Metabolismus. Ganz andere Merkmale hingegen müssen im Rahmen weiterführender Experimente untersucht werden, um ein genaueres Bild zu erhalten. Hierzu gehören die weiterführende Analyse des „senescence-associated secretory phenotype“ (SASP) mit Messung anderer Zytokine wie beispielsweise $\text{TNF-}\alpha$, die Messung der Aktivität gewisser Transkriptionsfaktoren und Zellzyklusproteine wie p16 und p21 sowie die

Untersuchung der an der TCR Kaskade beteiligten Proteine wie z.B. ZAP70. Erst dann kann eine noch genauere und experimentell gesicherte Einordnung der $\Delta 133p53\beta$ transduzierten T-Zellen erfolgen.

5.4 Klinische Bedeutung und Implikationen

Im Rahmen einer solchen Arbeit stellt sich auch immer die Frage, ob sich aus den vorliegenden Ergebnissen Implikationen klinischer Relevanz, wie z.B. für Therapie und Diagnostik, ableiten lassen. In der Literatur finden sich mehrere Beispiele solcher Vorschläge für p53 Isoformen. Wie bereits in der Literaturdiskussion dargestellt, besteht in einigen Tumorentitäten ein Zusammenhang zwischen der $\Delta 133p53\beta$ Isoform und einer erhöhten Invasivität und Aggressivität mancher Tumorentitäten (150). Am Beispiel des Prostatakarzinoms konnte gezeigt werden, dass Tumore mit einer vermehrten Expression von $\Delta 133p53\beta$ ein kürzeres progressionsfreies Überleben, einen Gleason-Score von ≥ 7 und ein immunsuppressives Mikromilieu aufweisen (15). Somit ließe sich in diesem Fall $\Delta 133p53\beta$ beispielsweise als Marker für ein schlechteres Outcome in Patienten mit Prostatakarzinom nutzen. Auch im Glioblastom wurde eine erhöhte Expression von $\Delta 133p53\beta$ festgestellt, was den Tumorprogress fördert (153). Außerdem geht eine erhöhte Expression von $\Delta 133p53\beta$ mit einer aggressiveren und früheren cerebralen Metastasierung verschiedener Entitäten einher (16). In derselben Weise konnten auch andere p53 Isoformen als prognostische Biomarker für den Progress verschiedener maligner Erkrankungen identifiziert werden. So konnte neben den bereits in der Literaturdiskussion erwähnten Fällen beispielsweise nachgewiesen werden, dass die $\Delta 160p53$ Isoformen mit einer aggressiveren Form des malignen Melanoms (177) und die $p53\gamma$ Isoform mit einem verminderten progressionsfreien Überleben in Endometriumkarzinomen (178) assoziiert sind. Es muss jedoch auch erwähnt werden, dass die erhöhte Expression einiger p53 Isoformen mit einer guten Prognose einer Krebserkrankung assoziiert ist, was in einigen Studien dargelegt wurde. Beispielsweise ist im klarzelligen Nierenzellkarzinom eine erhöhte p53 β Expression mit einer besseren Prognose verbunden, hohe $\Delta 40p53\alpha$ Spiegel scheinen ein prognostischer Marker für das rezidivfreie Überleben im muzinösen Ovarialkarzinom zu sein und die vermehrte Expression von $\Delta 133p53\alpha$ ist ein Prädiktor für das verbesserte Gesamtüberleben beim hochgradigen serösen Ovarialkarzinom (141). Auch im HCC wird durch $\Delta 40p53\alpha$ die Proliferation der Tumorzellen gehemmt und die zelluläre Seneszenz induziert (147).

Die diversen Funktionen und Auswirkungen bzw. Effekte der p53 Isoformen lassen erkennen, dass es sich hier nicht lediglich um das unabhängige Agieren einer einzelnen Isoform handelt. Vielmehr ist das Zusammenspiel der verschiedenen p53 Isoformen noch nicht vollständig geklärt und Gegenstand gegenwärtiger Forschung, um den sog. „Code der p53 Isoformen“ zu entschlüsseln (128). Es wurden bereits die komplexen Interaktionen der p53 Isoformen untereinander und mit FLp53 exemplarisch dargestellt. Beispielhaft wurden die Bildung von Hetero-Oligomeren von $\Delta 40p53\alpha$ mit p53 α und deren Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität des IGF1-Rezeptor Promotors, die Indirekte Interaktion von p53 β mit p53 α am BAX-Promotor und deren Einfluss auf die Promotor-Aktivität von p53 α sowie die Initiierung der DNA-Reparatur durch von p53 α unabhängige Interaktion von $\Delta 133p53\alpha$ mit p73 genannt (130). Dieses komplexe Netzwerk wird noch umfangreicher, wenn man den Einfluss von p53 Mutationen auf die funktionellen Aktivitäten der Isoformen beleuchtet, was wiederum eine potenzielle klinische Relevanz hat. Trotz der zentralen Rolle von FLp53 liefert der alleinige Mutationsstatus von p53 nur begrenzte Aussagekraft hinsichtlich Therapieansprechen und Outcome. Betrachtet man hingegen die Expression von p53 Isoformen im Kontext von p53 Mutation und Dysregulation, so kann der Zusammenhang von p53 Mutationsstatus und Isoformen einen größeren Nutzen zur Beurteilung der o.g. Parameter bieten (179). In einer bereits zitierten Studie wurde z.B. publiziert, dass das krankheitsfreie Überleben beim Mammakarzinom mit hohen p53 β Spiegeln in Kombination mit dem Vorliegen einer p53 Mutation positiv korreliert ist (133). Auch Mutationen, die die Expression von p53 Isoformen selbst beeinflussen, spielen für das Verständnis von gewissen Krebserkrankungen eine wichtige Rolle. Keimbahnmutationen, die sich auf die p53 β Isoform auswirken, stellen beispielsweise eine Prädisposition für familiäre Krebs syndrome mit Häufung von Kolorektalem-, Brust-, und papillärem Schilddrüsenkrebs dar. In derselben Studie wird darauf verwiesen, dass in vielen Fällen bei Patienten mit Li-Fraumeni-Syndrom keine genetische Ursache gefunden werden kann, was die Einbeziehung jeglicher Varianten von p53, einschließlich Bereichen außerhalb der kanonischen Sequenz, umso wichtiger macht (180).

Aus diesem Grund sollte die Bedeutung der p53 Isoformen im Sinne eines Signalnetzwerkes diskutiert werden, in welchem die p53 Isoformen interagieren. Und genau in diesem Signalnetzwerk muss die Funktion der, in der vorliegenden Arbeit thematisierten, $\Delta 133p53\beta$ Isoform betrachtet und weiter erforscht werden.

Übertragen auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnte in Betracht gezogen werden, die Expression von $\Delta 133p53\beta$ in den zytotoxischen T-Zellen von Tumorpatienten zu bestimmen mit der Frage, ob beispielsweise Patienten mit der entsprechenden Isoform Expression besser oder schlechter auf Immuntherapien ansprechen. So ließen sich z.B. zwei Patientenkollektive differenzieren, $\Delta 133p53\beta^{hi}$ und $\Delta 133p53\beta^{low}$, welche dann für spezifischere Therapien in Frage kommen könnten. Dies müsste allerdings in weiteren Versuchen noch genauer untersucht werden. Dass p53 Isoformen ein therapeutisches Potenzial haben, lässt sich aus ebendieser Rolle in der Karzinogenese ableiten. Im Kontext von T-Zellen wurde dieses Potenzial erstmalig durch die bereits zitierte Publikation unserer Arbeitsgruppe in TCR-modifizierten T-Zellen demonstriert. Insbesondere konnten wir nachweisen, dass die Transduktion von seneszenten T-Zellen aus Patienten mit MM mit der $\Delta 133p53\alpha$ Isoform die Expression von CD45RA und CD62L sowie die zytolytische Kapazität im Vergleich zur Kontrolle erhöhen und damit die Seneszenz rückgängig gemacht werden konnte. Die Verbesserung der T-Zell-Funktion durch Modulation von $\Delta 133p53\alpha$ wurde kürzlich in CAR-modifizierten T-Zellen nachgewiesen (181), was unsere Arbeit bestätigt (12). Da jedoch die $\Delta 133p53\beta$ Isoform einen Phänotyp mit verminderter Proliferation, vermehrter Expression von inhibitorischen Oberflächenmarkern und reduzierter Lysekapazität aufweist, könnte möglicherweise eine Inhibition dieser Isoform in T-Zellen von Tumorpatienten einen therapeutischen Benefit erbringen, wenn tatsächlich eine hohe Expression nachgewiesen werden würde. Folglich könnte dem o.g. zunächst ein Screening von Tumorpatienten vorausgehen, um zu ermitteln, ob die T-Zellen jener eine Expression $\Delta 133p53\beta$ aufweisen. An einer Publikation, die jedoch erneut den Fokus auf die Tumorseite legt, soll exemplarisch das therapeutische Potenzial der $\Delta 133p53\beta$ Isoform diskutiert werden. Zunächst zeigt sich vereinfacht gesagt der bereits beschriebene Mechanismus, dass $\Delta 133p53\beta$ mit Wildtyp p53 um Bindungsstellen an der DNA konkurriert und damit eine Störung der p53 Funktion bedingt. Unter dem Einfluss des p53 Fragment-Peptids 107-129 zeigte sich eine Konformationsänderung von $\Delta 133p53\beta$ hin zur nativen Form und damit eine Wiederherstellung der normalen p53 Funktion (151). Wenn sich in Experimenten mit $\Delta 133p53\beta$ transduzierten T-Zellen unter dem Einfluss des p53 Fragment-Peptids 107-129 eine Wiederherstellung der Eigenschaften der Kontrollkondition nachweisen ließe, könnte dies als potenzielles therapeutisches Konzept in Frage kommen.

5.5 Offene Fragen und Ausblick

Um ein vollständiges Bild über die Funktion der $\Delta 133p53\beta$ in zytotoxischen T-Zellen zu erhalten, bedarf es der weiterführenden Analyse hinsichtlich des Phänotyps und der Funktion, insbesondere im Kontext der Seneszenz. Es muss eindeutig festgestellt werden, welche Seneszenz Kriterien erfüllt werden und welche als abweichend zu betrachten sind, um die $\Delta 133p53\beta$ Isoform im Spektrum der Seneszenz und Exhaustion korrekt einzuordnen. Konkret bedeutet dies, dass u.a. die Sekretion weiterer Zytokine wie IL-6, IL-8 und IL-10 getestet werden muss, da es sich hierbei um Zytokine des sog. SASP handelt. In diesem Kontext sind auch die Proteine des Zellzyklusarrests wie p16, p21 und FLp53 zu nennen. Hier wäre von Interesse, ob es zu einer veränderten Expression dieser Proteine in $\Delta 133p53\beta$ transduzierten T-Zellen kommt. Weiterhin bleibt die Frage offen, ob die Überexpression von $\Delta 133p53\beta$ die Komposition der Subpopulationen der CD8⁺ T-Zellen verändert. Zu diesen gehören die naiven T-Zellen (TN), die Stammzell-Gedächtnis-T-Zellen (T_{SCM}), die zentralen Gedächtnis-T-Zellen (T_{CM}), die Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T_{EM}) und die Effektor-T-Zellen (T_{EFF}), welche die durch die Oberflächenmarker CD62L, CCR7, CD45RA und CD45RO definiert werden (182). Einer weiterführenden Nachforschung bedarf die Frage, auf welchen Interaktionen und Grundlagen die Funktion der $\Delta 133p53\beta$ Isoform in T-Zellen beruht. An der Stelle kann exemplarisch die Analyse von Promotorregionen, welche mit der $\Delta 133p53\beta$ Isoform interagieren, genannt werden. Um zu bekräftigen, dass die reproduzierten Ergebnisse auf die $\Delta 133p53\beta$ Isoform zurückzuführen sind, muss in einem nächsten Schritt diese Isoform in *in vitro* Experimenten blockiert werden. Hierbei müssten dann die Effekte der Isoform wieder rückgängig gemacht werden können. Zur weiterführenden Testung eines klinischen Bezugs sollten schließlich T-Zellen von Tumorpatienten, z.B. aus MM, auf die Expression von $\Delta 133p53\beta$ untersucht werden, wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben. Wenn sich hierbei eine erhöhte Expression nachweisen lässt, kann die Isoform blockiert werden, um zu ermitteln, ob sich die Funktion der T-Zellen verbessern lässt.

6 Zusammenfassung

Mittels retroviraler Transduktion lassen sich CD8⁺ T-Zellen generieren, welche neben einem peptidspezifischen TCR die $\Delta 133p53\beta$ Isoform überexprimieren. Phänotypisch fallen diese T-Zellen im Vergleich zu Kontroll-T-Zellen insbesondere durch eine erhöhte Expression der inhibitorischen Oberflächenmoleküle CD57, TIGIT und PD-1 auf. In Langzeit-Kokultur Versuchen mit Zieltumorzellen weisen diese T-Zellen eine reduzierte zytotoxische Kapazität auf. Diese Beobachtung ist mit den anderen Ergebnissen dieser Arbeit in Einklang zu bringen. Einerseits können Tumorzellen insbesondere über die Hochregulierung von Immuncheckpoints, einschließlich TIGIT und PD-1, einen negativen Einfluss auf die Tumorlyse ausüben. Andererseits weisen $\Delta 133p53\beta$ transduzierte zytotoxische tumorantigenspezifische T-Zellen eine Tendenz zur verminderten IFN γ auf, einem Zytokin welches u.a. eine Hochregulierung von MHC-I in Tumorzellen und damit eine verstärkte Tumorlyse bewirkt. Die IFN γ Sekretion lässt sich durch Blockade von PD-1 mit dem Antikörper Nivolumab in der $\Delta 133p53\beta$ Kondition wieder steigern, was einen Zusammenhang zwischen Hochregulierung von PD-1 und verminderter IFN γ Sekretion andeutet, jedoch weiterer experimenteller Untersuchung bedarf. Diese müssten insbesondere die Kontrolle der Expression von MHC-I auf Tumorzellen während der Kokultur mit $\Delta 133p53\beta$ transduzierten T-Zellen (\pm Nivolumab) einschließen. Besonders bemerkenswert ist die Beobachtung, dass $\Delta 133p53\beta$ transduzierte T-Zellen eine stark reduzierte Proliferationskapazität aufweisen. Diese ist derart ausgeprägt, dass in der $\Delta 133p53\beta$ Kondition ein Proliferationsende erreicht wird, während in der Kontrollkondition noch eine Proliferation stattfindet.

Mit der festgestellten Hochregulierung inhibitorischer Oberflächenmarker, einer reduzierten Effektorfunktion der zytotoxischen T-Zellen und einer verminderten Proliferationskapazität weisen die $\Delta 133p53\beta$ transduzierten T-Zellen Charakteristika von seneszenten T-Zellen auf. Jedoch kann keine eindeutige Klassifizierung dieser als seneszent vorgenommen werden, da andere Faktoren nicht erfüllt werden. So ist die reduzierte IFN γ Sekretion eher als ein Merkmal terminaler Exhaustion zu betrachten. Der Metabolismus, welcher im Falle der Seneszenz kompromittiert ist, sowie die Bildung von Effektormolekülen wie Granzyme B werden durch die $\Delta 133p53\beta$ scheinbar überhaupt nicht beeinflusst. Letztlich müssen zur weiterführenden Charakterisierung Versuche mit Einbeziehung anderer Zytokine wie IL-6, IL-8 und IL-10 und der Zellzyklusproteine durchgeführt sowie die CD8⁺ Subpopulationen unter

dem Einfluss von $\Delta 133p53\beta$ genauer untersucht werden. Abschließend ergeben sich genügend Anhaltspunkte, eine Blockade der $\Delta 133p53\beta$ Isoform zur Optimierung der Fitness und Funktion von zytotoxischen T-Zellen in Betracht zu ziehen.

7 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt. Todesursachen nach Krankheitsarten 2023 [Internet]
URL: https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/_Grafik/_Interaktiv/todesursachen-krankheitsarten.html2025.
2. Depil S, Duchateau P, Grupp SA, Mufti G, Poirot L. 'Off-the-shelf' allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(3):185-99.
3. Zebley CC, Zehn D, Gottschalk S, Chi H. T cell dysfunction and therapeutic intervention in cancer. *Nat Immunol.* 2024;25(8):1344-54.
4. Xia A, Zhang Y, Xu J, Yin T, Lu XJ. T Cell Dysfunction in Cancer Immunity and Immunotherapy. *Front Immunol.* 2019;10:1719.
5. Chou JP, Effros RB. T cell replicative senescence in human aging. *Curr Pharm Des.* 2013;19(9):1680-98.
6. Callender LA, Carroll EC, Beal RWJ, Chambers ES, Nourshargh S, Akbar AN, et al. Human CD8(+) EMRA T cells display a senescence-associated secretory phenotype regulated by p38 MAPK. *Aging Cell.* 2018;17(1).
7. Zhao Y, Shao Q, Peng G. Exhaustion and senescence: two crucial dysfunctional states of T cells in the tumor microenvironment. *Cell Mol Immunol.* 2020;17(1):27-35.
8. Birch J, Gil J. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes Dev.* 2020;34(23-24):1565-76.
9. Huang Y, Che X, Wang PW, Qu X. p53/MDM2 signaling pathway in aging, senescence and tumorigenesis. *Semin Cancer Biol.* 2024;101:44-57.
10. Pawge G, Khatik GL. p53 regulated senescence mechanism and role of its modulators in age-related disorders. *Biochem Pharmacol.* 2021;190:114651.
11. Mondal AM, Horikawa I, Pine SR, Fujita K, Morgan KM, Vera E, et al. p53 isoforms regulate aging- and tumor-associated replicative senescence in T lymphocytes. *J Clin Invest.* 2013;123(12):5247-57.
12. Legscha KJ, Antunes Ferreira E, Chamoun A, Lang A, Awwad MHS, Ton G, et al. $\Delta 133p53\alpha$ enhances metabolic and cellular fitness of TCR-engineered T cells and promotes superior antitumor immunity. *J Immunother Cancer.* 2021;9(6).
13. Arsic N, Gadea G, Lagerqvist EL, Busson M, Cahuzac N, Brock C, et al. The p53 isoform $\Delta 133p53\beta$ promotes cancer stem cell potential. *Stem Cell Reports.* 2015;4(4):531-40.
14. Arsic N, Ho-Pun-Cheung A, Lopez-Crapez E, Assenat E, Jarlier M, Anguille C, et al. The p53 isoform $\Delta 133p53\beta$ regulates cancer cell apoptosis in a RhoB-dependent manner. *PLoS One.* 2017;12(2):e0172125.
15. Kazantseva M, Mehta S, Eiholzer RA, Gimenez G, Bowie S, Campbell H, et al. The $\Delta 133p53\beta$ isoform promotes an immunosuppressive environment leading to aggressive prostate cancer. *Cell Death Dis.* 2019;10(9):631.
16. Jesus ANB, Taha A, Wang D, Mehta PM, Mehta S, Reily-Bell A, et al. Increased Expression of the $\Delta 133p53\beta$ Isoform Enhances Brain Metastasis. *Int J Mol Sci.* 2023;24(2).
17. Brown JS, Amend SR, Austin RH, Gatenby RA, Hammarlund EU, Pienta KJ. Updating the Definition of Cancer. *Mol Cancer Res.* 2023;21(11):1142-7.
18. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med.* 2004;10(8):789-99.
19. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.
20. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.

21. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31-46.
22. Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med.* 2009;361(15):1475-85.
23. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature.* 1993;362(6422):709-15.
24. De Bont R, van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis.* 2004;19(3):169-85.
25. Muller HJ. ARTIFICIAL TRANSMUTATION OF THE GENE. *Science.* 1927;66(1699):84-7.
26. Doll R, Hill AB. Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. *Br Med J.* 1950;2(4682):739-48.
27. zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Science.* 1991;254(5035):1167-73.
28. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992;358(6381):15-6.
29. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, et al. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science.* 1991;253(5020):665-9.
30. Scully R, Livingston DM. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature.* 2000;408(6811):429-32.
31. Timar J, Kashofer K. Molecular epidemiology and diagnostics of KRAS mutations in human cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2020;39(4):1029-38.
32. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002;417(6892):949-54.
33. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(2):118-32.
34. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(4):265-73.
35. Amini A, Masoumi Moghaddam S, Morris DL, Pourgholami MH. The critical role of vascular endothelial growth factor in tumor angiogenesis. *Curr Cancer Drug Targets.* 2012;12(1):23-43.
36. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med.* 2013;19(11):1423-37.
37. Toledo B, Zhu Chen L, Paniagua-Sancho M, Marchal JA, Perán M, Giovannetti E. Deciphering the performance of macrophages in tumour microenvironment: a call for precision immunotherapy. *J Hematol Oncol.* 2024;17(1):44.
38. Caligiuri G, Tuveson DA. Activated fibroblasts in cancer: Perspectives and challenges. *Cancer Cell.* 2023;41(3):434-49.
39. Shan F, Somasundaram A, Bruno TC, Workman CJ, Vignali DAA. Therapeutic targeting of regulatory T cells in cancer. *Trends Cancer.* 2022;8(11):944-61.
40. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell.* 2007;128(4):669-81.
41. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007;128(4):693-705.
42. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis.* 2010;31(1):27-36.
43. Zeng Y, Chen T. DNA Methylation Reprogramming during Mammalian Development. *Genes (Basel).* 2019;10(4).
44. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature.* 2011;476(7360):298-303.
45. Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(21):9700-4.

46. Feinberg AP, Koldobskiy MA, Göndör A. Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression. *Nat Rev Genet.* 2016;17(5):284-99.
47. Esteller M, Dawson MA, Kadoch C, Rassool FV, Jones PA, Baylin SB. The Epigenetic Hallmarks of Cancer. *Cancer Discov.* 2024;14(10):1783-809.
48. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(7):564-9.
49. Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, et al. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med.* 1995;1(7):686-92.
50. Rusek AM, Abba M, Eljaszewicz A, Moniuszko M, Niklinski J, Allgayer H. MicroRNA modulators of epigenetic regulation, the tumor microenvironment and the immune system in lung cancer. *Mol Cancer.* 2015;14:34.
51. Audia JE, Campbell RM. Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016;8(4):a019521.
52. Garcia-Prieto CA, Villanueva L, Bueno-Costa A, Davalos V, González-Navarro EA, Juan M, et al. Epigenetic Profiling and Response to CD19 Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy in B-Cell Malignancies. *J Natl Cancer Inst.* 2022;114(3):436-45.
53. Prinzing B, Zebley CC, Petersen CT, Fan Y, Anido AA, Yi Z, et al. Deleting DNMT3A in CAR T cells prevents exhaustion and enhances antitumor activity. *Sci Transl Med.* 2021;13(620):eabh0272.
54. Miranda Furtado CL, Dos Santos Luciano MC, Silva Santos RD, Furtado GP, Moraes MO, Pessoa C. Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. *Epigenetics.* 2019;14(12):1164-76.
55. Hosseinahli N, Aghapour M, Duijf PHG, Baradaran B. Treating cancer with microRNA replacement therapy: A literature review. *J Cell Physiol.* 2018;233(8):5574-88.
56. Momparler RL, Idaghdour Y, Marquez VE, Momparler LF. Synergistic antileukemic action of a combination of inhibitors of DNA methylation and histone methylation. *Leuk Res.* 2012;36(8):1049-54.
57. Pili R, Liu G, Chintala S, Verheul H, Rehman S, Attwood K, et al. Combination of the histone deacetylase inhibitor vorinostat with bevacizumab in patients with clear-cell renal cell carcinoma: a multicentre, single-arm phase I/II clinical trial. *Br J Cancer.* 2017;116(7):874-83.
58. Zhang F, Zhou X, DiSpirito JR, Wang C, Wang Y, Shen H. Epigenetic manipulation restores functions of defective CD8⁺ T cells from chronic viral infection. *Mol Ther.* 2014;22(9):1698-706.
59. Woods DM, Sodr e AL, Villagra A, Sarnaik A, Sotomayor EM, Weber J. HDAC Inhibition Upregulates PD-1 Ligands in Melanoma and Augments Immunotherapy with PD-1 Blockade. *Cancer Immunol Res.* 2015;3(12):1375-85.
60. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004;21(2):137-48.
61. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.* 1970;13:1-27.
62. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002;3(11):991-8.
63. Abbott M, Ustoyev Y. Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. *Semin Oncol Nurs.* 2019;35(5):150923.

64. Zhang Y, Zhang Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cell Mol Immunol.* 2020;17(8):807-21.
65. McCarthy EF. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J.* 2006;26:154-8.
66. Farkona S, Diamandis EP, Blasutig IM. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Med.* 2016;14:73.
67. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature.* 2011;480(7378):480-9.
68. Esfahani K, Roudaia L, Buhlaiga N, Del Rincon SV, Papneja N, Miller WH, Jr. A review of cancer immunotherapy: from the past, to the present, to the future. *Curr Oncol.* 2020;27(Suppl 2):S87-s97.
69. Wang C, Yuan F. A comprehensive comparison of DNA and RNA vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* 2024;210:115340.
70. Buonaguro L, Tagliamonte M. Peptide-based vaccine for cancer therapies. *Front Immunol.* 2023;14:1210044.
71. Rosenberg SA, Dudley ME. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol.* 2009;21(2):233-40.
72. Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med.* 1988;319(25):1676-80.
73. Huang J, Khong HT, Dudley ME, El-Gamil M, Li YF, Rosenberg SA, et al. Survival, persistence, and progressive differentiation of adoptively transferred tumor-reactive T cells associated with tumor regression. *J Immunother.* 2005;28(3):258-67.
74. Lin B, Du L, Li H, Zhu X, Cui L, Li X. Tumor-infiltrating lymphocytes: Warriors fight against tumors powerfully. *Biomed Pharmacother.* 2020;132:110873.
75. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science.* 2006;314(5796):126-9.
76. Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, Dudley ME, et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol.* 2011;29(7):917-24.
77. Park TS, Rosenberg SA, Morgan RA. Treating cancer with genetically engineered T cells. *Trends Biotechnol.* 2011;29(11):550-7.
78. Wu R, Forget MA, Chacon J, Bernatchez C, Haymaker C, Chen JQ, et al. Adoptive T-cell therapy using autologous tumor-infiltrating lymphocytes for metastatic melanoma: current status and future outlook. *Cancer J.* 2012;18(2):160-75.
79. Bendle GM, Linnemann C, Hooijkaas AI, Bies L, de Witte MA, Jorritsma A, et al. Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy. *Nat Med.* 2010;16(5):565-70, 1p following 70.
80. Ellis GI, Sheppard NC, Riley JL. Genetic engineering of T cells for immunotherapy. *Nat Rev Genet.* 2021;22(7):427-47.
81. June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science.* 2018;359(6382):1361-5.
82. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med.* 2013;5(177):177ra38.

83. Zhang X, Zhu L, Zhang H, Chen S, Xiao Y. CAR-T Cell Therapy in Hematological Malignancies: Current Opportunities and Challenges. *Front Immunol.* 2022;13:927153.
84. Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J.* 2021;11(4):69.
85. Kouro T, Himuro H, Sasada T. Exhaustion of CAR T cells: potential causes and solutions. *J Transl Med.* 2022;20(1):239.
86. Fuchs F, Krackhardt AM. Paving the Way to Solid Tumors: Challenges and Strategies for Adoptively Transferred Transgenic T Cells in the Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel).* 2022;14(17).
87. Ma S, Li X, Wang X, Cheng L, Li Z, Zhang C, et al. Current Progress in CAR-T Cell Therapy for Solid Tumors. *Int J Biol Sci.* 2019;15(12):2548-60.
88. Marofi F, Motavalli R, Safonov VA, Thangavelu L, Yumashev AV, Alexander M, et al. CAR T cells in solid tumors: challenges and opportunities. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):81.
89. Mitra A, Barua A, Huang L, Ganguly S, Feng Q, He B. From bench to bedside: the history and progress of CAR T cell therapy. *Front Immunol.* 2023;14:1188049.
90. Schietinger A, Philip M, Krisnawan VE, Chiu EY, Delrow JJ, Basom RS, et al. Tumor-Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen-Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis. *Immunity.* 2016;45(2):389-401.
91. Crespo J, Sun H, Welling TH, Tian Z, Zou W. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol.* 2013;25(2):214-21.
92. Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:305-34.
93. Choi S, Schwartz RH. Molecular mechanisms for adaptive tolerance and other T cell anergy models. *Semin Immunol.* 2007;19(3):140-52.
94. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011;12(6):492-9.
95. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD, et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med.* 1998;188(12):2205-13.
96. Kim PS, Ahmed R. Features of responding T cells in cancer and chronic infection. *Curr Opin Immunol.* 2010;22(2):223-30.
97. Crawford A, Wherry EJ. The diversity of costimulatory and inhibitory receptor pathways and the regulation of antiviral T cell responses. *Curr Opin Immunol.* 2009;21(2):179-86.
98. Wang L, Liao F, Yang L, Jiang L, Duan L, Wang B, et al. KLRG1-expressing CD8+ T cells are exhausted and polyfunctional in patients with chronic hepatitis B. *PLoS One.* 2024;19(5):e0303945.
99. Wu K, Kryczek I, Chen L, Zou W, Welling TH. Kupffer cell suppression of CD8+ T cells in human hepatocellular carcinoma is mediated by B7-H1/programmed death-1 interactions. *Cancer Res.* 2009;69(20):8067-75.
100. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(26):2455-65.
101. Sheppard KA, Fitz LJ, Lee JM, Benander C, George JA, Wooters J, et al. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Lett.* 2004;574(1-3):37-41.
102. Ghosh C, Luong G, Sun Y. A snapshot of the PD-1/PD-L1 pathway. *J Cancer.* 2021;12(9):2735-46.
103. Liu R, Li HF, Li S. PD-1-mediated inhibition of T cell activation: Mechanisms and strategies for cancer combination immunotherapy. *Cell Insight.* 2024;3(2):100146.

104. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-217.
105. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961;25:585-621.
106. Liu X, Hoft DF, Peng G. Senescent T cells within suppressive tumor microenvironments: emerging target for tumor immunotherapy. *J Clin Invest*. 2020;130(3):1073-83.
107. Zhang J, He T, Xue L, Guo H. Senescent T cells: a potential biomarker and target for cancer therapy. *EBioMedicine*. 2021;68:103409.
108. Song Y, Wang B, Song R, Hao Y, Wang D, Li Y, et al. T-cell Immunoglobulin and ITIM Domain Contributes to CD8(+) T-cell Immunosenescence. *Aging Cell*. 2018;17(2).
109. Saul D, Kosinsky RL, Atkinson EJ, Doolittle ML, Zhang X, LeBrasseur NK, et al. A new gene set identifies senescent cells and predicts senescence-associated pathways across tissues. *Nat Commun*. 2022;13(1):4827.
110. Gurusamy D, Henning AN, Yamamoto TN, Yu Z, Zacharakis N, Krishna S, et al. Multi-phenotype CRISPR-Cas9 Screen Identifies p38 Kinase as a Target for Adoptive Immunotherapies. *Cancer Cell*. 2020;37(6):818-33.e9.
111. Ye J, Ma C, Hsueh EC, Dou J, Mo W, Liu S, et al. TLR8 signaling enhances tumor immunity by preventing tumor-induced T-cell senescence. *EMBO Mol Med*. 2014;6(10):1294-311.
112. Weng J, Moriarty KE, Baio FE, Chu F, Kim SD, He J, et al. IL-15 enhances the antitumor effect of human antigen-specific CD8(+) T cells by cellular senescence delay. *Oncoimmunology*. 2016;5(12):e1237327.
113. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000;408(6810):307-10.
114. Moll UM, Petrenko O. The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res*. 2003;1(14):1001-8.
115. Joerger AC, Fersht AR. The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. *Annu Rev Biochem*. 2016;85:375-404.
116. Dai C, Gu W. p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol Med*. 2010;16(11):528-36.
117. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(3):175-93.
118. Hao Q, Chen J, Lu H, Zhou X. The ARTS of p53-dependent mitochondrial apoptosis. *J Mol Cell Biol*. 2023;14(10).
119. Eischen CM. Genome Stability Requires p53. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(6).
120. Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*. 2009;137(3):413-31.
121. Hafner A, Bulyk ML, Jambhekar A, Lahav G. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(4):199-210.
122. Deng Y, Chan SS, Chang S. Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(6):450-8.
123. Childs BG, Baker DJ, Kirkland JL, Campisi J, van Deursen JM. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep*. 2014;15(11):1139-53.
124. Kortlever RM, Higgins PJ, Bernardis R. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol*. 2006;8(8):877-84.

125. Pearson M, Carbone R, Sebastiani C, Cioce M, Fagioli M, Saito S, et al. PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature*. 2000;406(6792):207-10.
126. Kuilman T, Peeper DS. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(2):81-94.
127. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:99-118.
128. Joruz SM, Bourdon JC. p53 Isoforms: Key Regulators of the Cell Fate Decision. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(8).
129. Khoury MP, Bourdon JC. The isoforms of the p53 protein. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(3):a000927.
130. Anbarasan T, Bourdon JC. The Emerging Landscape of p53 Isoforms in Physiology, Cancer and Degenerative Diseases. *Int J Mol Sci*. 2019;20(24).
131. Fujita K. p53 Isoforms in Cellular Senescence- and Ageing-Associated Biological and Physiological Functions. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23).
132. von Muhlinen N, Horikawa I, Alam F, Isogaya K, Lissa D, Vojtesek B, et al. p53 isoforms regulate premature aging in human cells. *Oncogene*. 2018;37(18):2379-93.
133. Avery-Kiejda KA, Morten B, Wong-Brown MW, Mathe A, Scott RJ. The relative mRNA expression of p53 isoforms in breast cancer is associated with clinical features and outcome. *Carcinogenesis*. 2014;35(3):586-96.
134. Hofstetter G, Berger A, Schuster E, Wolf A, Hager G, Vergote I, et al. $\Delta 133p53$ is an independent prognostic marker in p53 mutant advanced serous ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2011;105(10):1593-9.
135. Campbell H, Fleming N, Roth I, Mehta S, Wiles A, Williams G, et al. $\Delta 133p53$ isoform promotes tumour invasion and metastasis via interleukin-6 activation of JAK-STAT and RhoA-ROCK signalling. *Nat Commun*. 2018;9(1):254.
136. Takahashi R, Giannini C, Sarkaria JN, Schroeder M, Rogers J, Mastroeni D, et al. p53 isoform profiling in glioblastoma and injured brain. *Oncogene*. 2013;32(26):3165-74.
137. Boldrup L, Bourdon JC, Coates PJ, Sjöström B, Nylander K. Expression of p53 isoforms in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer*. 2007;43(3):617-23.
138. Bourdon JC. p53 and its isoforms in cancer. *Br J Cancer*. 2007;97(3):277-82.
139. Ånensen N, Hjelle SM, Van Belle W, Haaland I, Silden E, Bourdon JC, et al. Correlation analysis of p53 protein isoforms with NPM1/FLT3 mutations and therapy response in acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 2012;31(12):1533-45.
140. Anensen N, Oyan AM, Bourdon JC, Kalland KH, Bruserud O, Gjertsen BT. A distinct p53 protein isoform signature reflects the onset of induction chemotherapy for acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2006;12(13):3985-92.
141. Zhao L, Sanyal S. p53 Isoforms as Cancer Biomarkers and Therapeutic Targets. *Cancers (Basel)*. 2022;14(13).
142. Bourdon JC, Khoury MP, Diot A, Baker L, Fernandes K, Aoubala M, et al. p53 mutant breast cancer patients expressing p53 γ have as good a prognosis as wild-type p53 breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2011;13(1):R7.
143. Turnquist C, Beck JA, Horikawa I, Obiorah IE, Von Muhlinen N, Vojtesek B, et al. Radiation-induced astrocyte senescence is rescued by $\Delta 133p53$. *Neuro Oncol*. 2019;21(4):474-85.
144. Rojas EA, Corchete LA, De Ramón C, Krzeminski P, Quwaider D, García-Sanz R, et al. Expression of p53 protein isoforms predicts survival in patients with multiple myeloma. *Am J Hematol*. 2022;97(6):700-10.

145. Nutthasirikul N, Limpai boon T, Leelayuwat C, Patrakitkomjorn S, Jearanaikoon P. Ratio disruption of the $\Delta 133p53$ and TAp53 isoform equilibrium correlates with poor clinical outcome in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Int J Oncol.* 2013;42(4):1181-8.
146. Machado-Silva A, Perrier S, Bourdon JC. p53 family members in cancer diagnosis and treatment. *Semin Cancer Biol.* 2010;20(1):57-62.
147. Ota A, Nakao H, Sawada Y, Karnan S, Wahiduzzaman M, Inoue T, et al. $\Delta 40p53\alpha$ suppresses tumor cell proliferation and induces cellular senescence in hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Sci.* 2017;130(3):614-25.
148. Fujita K, Mondal AM, Horikawa I, Nguyen GH, Kumamoto K, Sohn JJ, et al. p53 isoforms $\Delta 133p53$ and p53beta are endogenous regulators of replicative cellular senescence. *Nat Cell Biol.* 2009;11(9):1135-42.
149. Joruz SM, Beck JA, Horikawa I, Harris CC. The $\Delta 133p53$ Isoforms, Tuners of the p53 Pathway. *Cancers (Basel).* 2020;12(11).
150. Arsic N, Slatter T, Gadea G, Villain E, Fournet A, Kazantseva M, et al. $\Delta 133p53\beta$ isoform pro-invasive activity is regulated through an aggregation-dependent mechanism in cancer cells. *Nat Commun.* 2021;12(1):5463.
151. Lei J, Qi R, Tang Y, Wang W, Wei G, Nussinov R, et al. Conformational stability and dynamics of the cancer-associated isoform $\Delta 133p53\beta$ are modulated by p53 peptides and p53-specific DNA. *Faseb j.* 2019;33(3):4225-35.
152. Gadea G, Arsic N, Fernandes K, Diot A, Joruz SM, Abdallah S, et al. TP53 drives invasion through expression of its $\Delta 133p53\beta$ variant. *Elife.* 2016;5.
153. Kazantseva M, Eiholzer RA, Mehta S, Taha A, Bowie S, Roth I, et al. Elevation of the TP53 isoform $\Delta 133p53\beta$ in glioblastomas: an alternative to mutant p53 in promoting tumor development. *J Pathol.* 2018;246(1):77-88.
154. Brahmer JR, Hammers H, Lipson EJ. Nivolumab: targeting PD-1 to bolster antitumor immunity. *Future Oncol.* 2015;11(9):1307-26.
155. Focosi D, Bestagno M, Burrone O, Petrini M. CD57+ T lymphocytes and functional immune deficiency. *J Leukoc Biol.* 2010;87(1):107-16.
156. Pangrazzi L, Reidla J, Carmona Arana JA, Naismith E, Miggitsch C, Meryk A, et al. CD28 and CD57 define four populations with distinct phenotypic properties within human CD8(+) T cells. *Eur J Immunol.* 2020;50(3):363-79.
157. Arasanz H, Gato-Cañas M, Zuazo M, Ibañez-Vea M, Breckpot K, Kochan G, et al. PD1 signal transduction pathways in T cells. *Oncotarget.* 2017;8(31):51936-45.
158. Raskov H, Orhan A, Christensen JP, Gögenur I. Cytotoxic CD8(+) T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br J Cancer.* 2021;124(2):359-67.
159. Inozume T, Yaguchi T, Furuta J, Harada K, Kawakami Y, Shimada S. Melanoma Cells Control Antimelanoma CTL Responses via Interaction between TIGIT and CD155 in the Effector Phase. *J Invest Dermatol.* 2016;136(1):255-63.
160. Liu L, Wang A, Liu X, Han S, Sun Y, Zhang J, et al. Blocking TIGIT/CD155 signalling reverses CD8(+) T cell exhaustion and enhances the antitumor activity in cervical cancer. *J Transl Med.* 2022;20(1):280.
161. Banta KL, Xu X, Chitre AS, Au-Yeung A, Takahashi C, O'Gorman WE, et al. Mechanistic convergence of the TIGIT and PD-1 inhibitory pathways necessitates co-blockade to optimize anti-tumor CD8(+) T cell responses. *Immunity.* 2022;55(3):512-26.e9.
162. Guillerey C, Harjunpää H, Carrié N, Kassem S, Teo T, Miles K, et al. TIGIT immune checkpoint blockade restores CD8(+) T-cell immunity against multiple myeloma. *Blood.* 2018;132(16):1689-94.

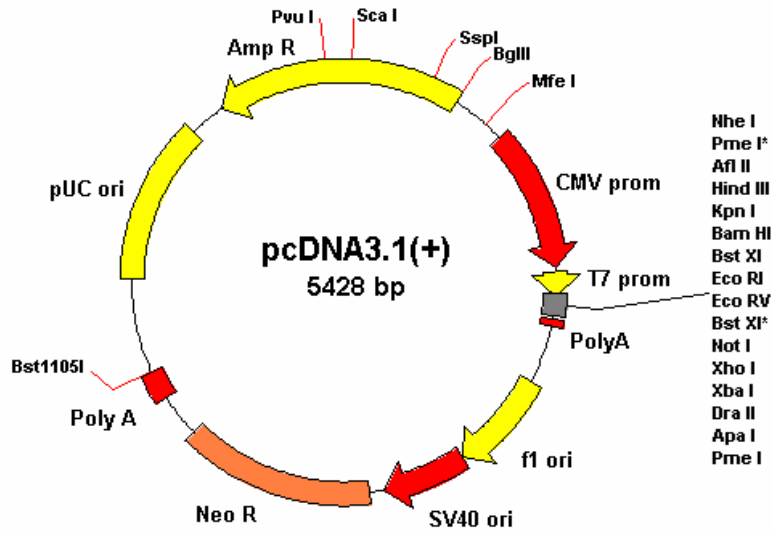
163. Wu L, Mao L, Liu JF, Chen L, Yu GT, Yang LL, et al. Blockade of TIGIT/CD155 Signaling Reverses T-cell Exhaustion and Enhances Antitumor Capability in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Immunol Res.* 2019;7(10):1700-13.
164. Thibaudin M, Limagne E, Hampe L, Ballot E, Truntzer C, Ghiringhelli F. Targeting PD-L1 and TIGIT could restore intratumoral CD8 T cell function in human colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2022;71(10):2549-63.
165. Dumbrava EE, Ben Haj Frej K, Sharon E, Tawbi H. Application and Expectations for Immune Checkpoint Blockade of LAG3 and TIGIT. *Annu Rev Med.* 2025;76(1):189-205.
166. Li M, Xia P, Du Y, Liu S, Huang G, Chen J, et al. T-cell immunoglobulin and ITIM domain (TIGIT) receptor/poliovirus receptor (PVR) ligand engagement suppresses interferon- γ production of natural killer cells via β -arrestin 2-mediated negative signaling. *J Biol Chem.* 2014;289(25):17647-57.
167. Huang Q, Xia J, Wang L, Wang X, Ma X, Deng Q, et al. miR-153 suppresses IDO1 expression and enhances CAR T cell immunotherapy. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):58.
168. Curtsinger JM, Agarwal P, Lins DC, Mescher MF. Autocrine IFN- γ promotes naive CD8 T cell differentiation and synergizes with IFN- α to stimulate strong function. *J Immunol.* 2012;189(2):659-68.
169. de Araújo-Souza PS, Hanschke SC, Viola JP. Epigenetic control of interferon-gamma expression in CD8 T cells. *J Immunol Res.* 2015;2015:849573.
170. Peng W, Liu C, Xu C, Lou Y, Chen J, Yang Y, et al. PD-1 blockade enhances T-cell migration to tumors by elevating IFN- γ inducible chemokines. *Cancer Res.* 2012;72(20):5209-18.
171. Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood.* 2003;101(7):2711-20.
172. Chauvin JM, Pagliano O, Fourcade J, Sun Z, Wang H, Sander C, et al. TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8⁺ T cells in melanoma patients. *J Clin Invest.* 2015;125(5):2046-58.
173. Ye J, Peng G. Controlling T cell senescence in the tumor microenvironment for tumor immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2015;4(3):e994398.
174. Jiang Y, Li Y, Zhu B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis.* 2015;6(6):e1792.
175. Patsoukis N, Bardhan K, Chatterjee P, Sari D, Liu B, Bell LN, et al. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat Commun.* 2015;6:6692.
176. Henson SM, Lanna A, Riddell NE, Franzese O, Macaulay R, Griffiths SJ, et al. p38 signaling inhibits mTORC1-independent autophagy in senescent human CD8⁺ T cells. *J Clin Invest.* 2014;124(9):4004-16.
177. Tadijan A, Precazzini F, Hanžić N, Radić M, Gavioli N, Vlašić I, et al. Altered Expression of Shorter p53 Family Isoforms Can Impact Melanoma Aggressiveness. *Cancers (Basel).* 2021;13(20).
178. Bischof K, Knappskog S, Stefansson I, McCormack EM, Trovik J, Werner HMJ, et al. High expression of the p53 isoform γ is associated with reduced progression-free survival in uterine serous carcinoma. *BMC Cancer.* 2018;18(1):684.
179. Ray Das S, Delahunt B, Lasham A, Li K, Wright D, Print C, et al. Combining TP53 mutation and isoform has the potential to improve clinical practice. *Pathology.* 2024;56(4):473-83.

180. Schubert SA, Ruano D, Joruz SM, Stroosma J, Glavak N, Montali A, et al. Germline variant affecting p53 β isoforms predisposes to familial cancer. *Nat Commun.* 2024;15(1):8208.
181. Roselle C, Horikawa I, Chen L, Kelly AR, Gonzales D, Da T, et al. Enhancing chimeric antigen receptor T cell therapy by modulating the p53 signaling network with $\Delta 133p53\alpha$. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2024;121(10):e2317735121.
182. Golubovskaya V, Wu L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel).* 2016;8(3).

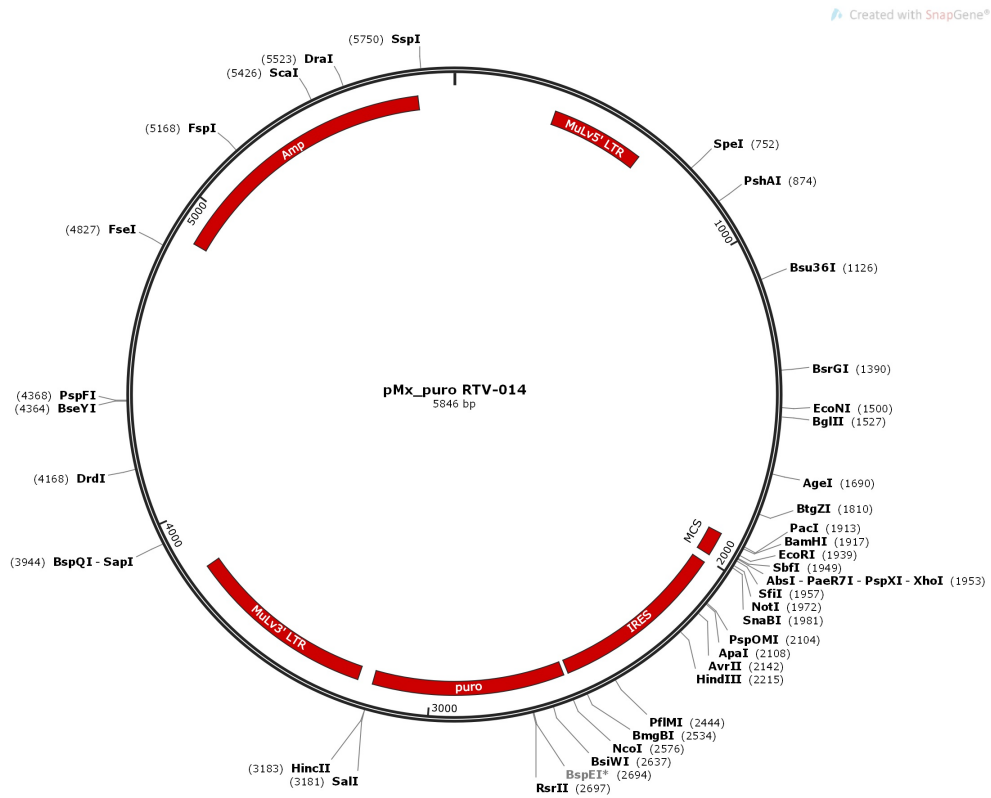
8 Anhang

Vektormappen

pcDNA 3.1:



pMx_IRES_puro (pMx_RTV-014):



9 Danksagung

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurde diese Seite aus der digitalen Version entfernt.

10 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurde diese Seite aus der digitalen Version entfernt.