

**Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Medizinische Klinik und Poliklinik- Innere Medizin A  
Zentrum für Knochenmarktransplantation  
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. E. Berdel -**

**Generierung und Charakterisierung von  
zytotoxischen Natürlichen Killer T-Lymphozyten mit  
tumorantigen-spezifischen chimären T-Zell-Rezeptoren**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

**zur**

**Erlangung des doctor rerum medicinalium**

**der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

**vorgelegt von  
Martina Pieper  
aus Bielefeld**

**2004**

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Heribert Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Joachim Kienast
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Eberhard Schlatter

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 2004



Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Medizinische Klinik und Poliklinik - Innere Medizin A

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. E. Berdel -

Referent: Univ.-Prof. Dr. J. Kienast

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Eberhard Schlatter

## **ZUSAMMENFASSUNG**

Generierung und Charakterisierung von zytotoxischen Natürlichen Killer T-Lymphozyten  
mit tumorantigen-spezifischen chimären T-Zell-Rezeptoren

Martina Pieper

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktionalität gentechnisch modifizierter Natürlicher Killer T-Lymphozyten (NKT-Zellen) im Hinblick auf eine innovative zelluläre Immuntherapie bei malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems untersucht.

Aus variablen leichten und variablen schweren Ketten eines Hybridom-Antikörpers wurde ein chimärer T-Zellrezeptor (cTCR) mit Spezifität für das CD33-Antigen auf blastären Zellen bei akuter myeloischer Leukämie konstruiert. Seine Funktionalität konnte jedoch nach retroviralem Gentransfer in humane mononukleäre Lymphozyten nicht nachgewiesen werden. Weiterhin wurden *in vitro* expandierte NKT-Zellen mit einem CD20 $\zeta$ -spezifischen cTCR (CD20 $\zeta$ -cTCR) mittels rekombinanter Retroviren modifiziert. CD20 ist ein ideales Targetantigen für zelluläre Immuntherapien, da es von den meisten Zellen bei B-Zell-Neoplasien exprimiert wird. Zur Generierung von CD20 $\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen wurde das Transduktionsprotokoll optimiert und anschließend die Funktionalität der genmodifizierten Effektorzellen nachgewiesen. CD20 $\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen lysieren spezifisch CD20<sup>+</sup>-Targetzellen und sekretieren antigenspezifisch das immunregulatorische Zytokin Interferon- $\gamma$ . Ebenso zeigen die modifizierten NKT-Zellen *in vitro* eine äußerst spezifische Zytolyse gegenüber leukämischen CD20<sup>+</sup>-Blasten erkrankter Patienten. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die durch den cTCR vermittelte Zytotoxizität modifizierter NKT-Zellen unabhängig von der Interaktion der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und LFA-1 ist. Außerdem wurde durch vergleichende Untersuchungen belegt, dass modifizierte NKT-Zellen bzgl. der zytotoxischen Kapazität modifizierten T-Zellen eindeutig überlegen sind. Die hier dargelegten Ergebnisse funktioneller CD20 $\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen sind die Basis für weitere Untersuchungen, die zu einer klinischen Applikation führen können.



1	Einleitung .....	1
<b>1.1</b>	<b>T-Zell-Rezeptorkomplex und chimäre T-Zell-Rezeptoren.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	T-Zell-Rezeptorkomplex .....	2
1.1.2	Chimäre T-Zell-Rezeptoren.....	5
<b>1.2</b>	<b>Immuntherapie .....</b>	<b>8</b>
1.2.1	Immuntherapie mit Antikörpern .....	8
1.2.2	Zelluläre Immuntherapie .....	9
<b>1.3</b>	<b>Therapeutische Bedeutung der Differenzierungsantigene CD33 und CD2012</b>	
1.3.1	Differenzierungsantigen CD33.....	12
1.3.2	Differenzierungsantigen CD20.....	14
<b>1.4</b>	<b>Ziele der vorliegenden Arbeit.....</b>	<b>16</b>
2	Material und Methoden .....	17
<b>2.1</b>	<b>Prokaryontische und eukaryontische Zellen.....</b>	<b>17</b>
2.1.1	Bakterienstämme .....	17
2.1.2	Säugetierzelllinien .....	17
<b>2.2</b>	<b>Vektoren .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3</b>	<b>Kulturmedien.....</b>	<b>20</b>
2.3.1	Kulturmedien für Bakterien.....	20
2.3.1.1	Antibiotika für bakterielle Kulturmedien .....	20
2.3.2	Kulturmedien für Säugetierzellen.....	21
2.3.2.1	Zusätze für Kulturmedien für Säugetierzellen.....	21
<b>2.4</b>	<b>Puffer und Lösungen.....</b>	<b>21</b>
<b>2.5</b>	<b>Enzyme und Chemikalien.....</b>	<b>22</b>
2.5.1	Enzyme .....	22
2.5.2	Restriktionsendonukleasen und Puffer .....	23
2.5.3	Chemikalien.....	23
2.5.4	Kommerzielle Kits.....	23
<b>2.6</b>	<b>Oligonukleotid-Primer .....</b>	<b>24</b>
<b>2.7</b>	<b>Antikörper und Zytokine.....</b>	<b>24</b>
2.7.1	Antikörper.....	24
2.7.2	Zytokine.....	25
<b>2.8</b>	<b>Kunststoffmaterialien.....</b>	<b>25</b>
<b>2.9</b>	<b>Kultivierung von Bakterienstämmen .....</b>	<b>25</b>
2.9.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	25
2.9.2	Kryokonservierung von Bakterienkulturen .....	25

2.9.3	Titerbestimmung von Bakterien in Flüssigkultur .....	26
<b>2.10</b>	<b>RNA-Isolierung</b> .....	<b>26</b>
2.10.1	Gesamt-RNA-Isolierung .....	26
2.10.2	Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA .....	27
<b>2.11</b>	<b>Reverse Transkription</b> .....	<b>27</b>
<b>2.12</b>	<b>DNA-Isolierung</b> .....	<b>27</b>
2.12.1	Isolierung von Plasmid-DNA mit dem QIAprep™ Spin Miniprep Kit.....	27
2.12.2	Isolierung von Plasmid-DNA mit dem QIAfilter™ Plasmid Midi Kit .....	28
2.12.3	Isolierung endotoxin-freier Plasmid-DNA mit dem EndoFree™ Plasmid Maxi Kit .....	28
<b>2.13</b>	<b>DNA-Reinigung und -Konzentrierung</b> .....	<b>28</b>
2.13.1	DNA-Reinigung mit dem QIAquick™ PCR Purification Kit .....	28
2.13.2	Alkoholfällung .....	28
2.13.2.1	Ethanol-Fällung .....	29
2.13.2.2	Isopropanol-Fällung .....	29
2.13.3	Isolierung von DNA aus Agarosegelen .....	29
2.13.3.1	DNA-Isolierung mit dem Jetquick Gel Extraction Kit.....	29
2.13.3.2	DNA-Isolierung mit dem QIAquick Gel Extraction Kit .....	30
2.13.3.3	DNA-Isolierung durch $\beta$ -Agarase-Behandlung.....	30
<b>2.14</b>	<b>Techniken zur Charakterisierung von DNA-Molekülen</b> .....	<b>30</b>
2.14.1	Hydrolyse von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	30
2.14.2	Agarose-Gelelektrophorese .....	31
2.14.3	Bestimmung des Molekulargewichts von DNA-Fragmenten .....	32
2.14.4	Photometrische Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren .....	32
2.14.5	DNA-Sequenzierung .....	33
<b>2.15</b>	<b>Klonierungen von DNA-Fragmenten</b> .....	<b>34</b>
2.15.1	Behandlung von Vektoren mit alkalischer Phosphatase.....	34
2.15.2	Auffüllung von 5'-Überhängen von DNA-Restriktionsfragmenten .....	35
2.15.3	Ligation von DNA-Restriktionsfragmenten .....	36
<b>2.16</b>	<b>Transformation von Bakterien</b> .....	<b>36</b>
2.16.1	Transformation durch Hitzeschock .....	36
2.16.1.1	Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	37
2.16.2	Transformation durch Z-Kompetenz .....	37
2.16.2.1	Präparation z-kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	37
2.16.2.2	Transformation z-kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	37
2.16.3	Ermittlung der Transformations-Effizienz .....	38
<b>2.17</b>	<b>Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)</b> .....	<b>38</b>
2.17.1	PCR mit AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase .....	38
2.17.2	PCR mit <i>Taq</i> DNA Polymerase .....	39
2.17.3	„splicing by overlap“-PCR .....	39



<b>2.18</b>	<b>ELISA für INF-<math>\gamma</math>-Bestimmungen</b> .....	<b>40</b>
2.18.1	Koinkubation der Effektor- und Targetzellen .....	40
2.18.2	Durchführung der INF- $\gamma$ -Bestimmung .....	40
<b>2.19</b>	<b>Kultivierung von Säugetierzellen</b> .....	<b>41</b>
2.19.1	Kultivierung von Suspensions- und adhärenen Zellen.....	41
2.19.2	Mediumwechsel von Zellen.....	41
2.19.2.1	Mediumwechsel von Suspensionszellen .....	41
2.19.2.2	Mediumwechsel adhärenter Zellen.....	41
2.19.3	Splitting von Zellen .....	42
2.19.3.1	Splitting von Suspensionszellen .....	42
2.19.3.2	Splitting adhärenter Zellen .....	42
2.19.4	Zellzahlbestimmung .....	42
2.19.5	Kryokonservierung eukaryontischer Zellen .....	43
2.19.6	Auftauen eukaryontischer Zellen.....	43
<b>2.20</b>	<b>Dichtegradienten-Zentrifugation</b> .....	<b>43</b>
2.20.1	Dichtegradienten-Zentrifugation von Zellkulturen .....	43
2.20.2	Dichtegradienten-Zentrifugation von NH <sub>4</sub> -Heparin-Vollblut .....	43
<b>2.21</b>	<b>Transfektion von Phoenix-Zellen</b> .....	<b>44</b>
<b>2.22</b>	<b>Generierung stabiler PG13- und Flyrd18-Produktionszelllinien</b> .....	<b>45</b>
<b>2.23</b>	<b>Retrovirale Transduktion humaner Zellen</b> .....	<b>47</b>
2.23.1	Beschichtung von Gewebekulturplatten mit $\alpha$ -CD3 und $\alpha$ -CD28.....	47
2.23.2	Beschichtung von Kunststoffplatten mit RetroNectin <sup>TM</sup> .....	47
2.23.3	Retrovirale Transduktion von PBMC.....	47
2.23.4	Modifizierte retrovirale Transduktion von PBMC .....	49
2.23.5	Retrovirale Transduktion von NKT-Zellen .....	49
<b>2.24</b>	<b>Kultivierung humaner NKT-Zellen</b> .....	<b>51</b>
2.24.1	Generierung humaner NKT-Zellen <i>in vitro</i> .....	51
2.24.2	Restimulierung humaner NKT-Zellen.....	52
<b>2.25</b>	<b>Durchflusszytometrische Analyse</b> .....	<b>52</b>
2.25.1	Ein-Schritt-Färbung .....	52
2.25.2	Zwei-Schritt-Färbung mit Phagen-Antikörper .....	52
<b>2.26</b>	<b>Magnetische Zellseparation</b> .....	<b>53</b>
<b>2.27</b>	<b>Radioaktiver Zytotoxizitäts-Assay</b> .....	<b>53</b>
2.27.1	„Cold Target Inhibition“-Assay.....	54
2.27.2	Zytotoxizitäts-Assay mit Antikörperblockierung.....	54
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>55</b>
<b>3.1</b>	<b>CD33<math>\zeta</math>-spezifische chimäre T-Zell-Rezeptoren</b> .....	<b>55</b>
3.1.1	Konstruktion CD33 $\zeta$ -spezifischer chimärer T-Zell-Rezeptoren .....	55
3.1.1.1	Klonierung des scFvCD33 und der CD33 $\zeta$ -Kette .....	55

3.1.1.2.	Konstruktion retroviraler Vektoren .....	57
3.1.1.3.	Konstruktion einer transienten Produktionszelllinie .....	59
3.1.1.4.	Konstruktion einer stabilen Produktionszelllinie .....	60
3.1.2	Transduktion und funktionelle Untersuchungen des CD33 $\zeta$ -cTCR.....	62
<b>3.2</b>	<b>CD20<math>\zeta</math>-spezifische chimäre T-Zell-Rezeptoren.....</b>	<b>66</b>
3.2.1	Expression CD20 $\zeta$ -spezifischer cTCR in NKT-Zellen .....	66
3.2.1.1	Konstruktion einer transienten Produktionszelllinie .....	66
3.2.1.2	Konstruktion einer stabilen Produktionszelllinie .....	67
3.2.1.3	Optimierung der Transduktionseffizienz humaner NKT-Zellen .....	68
3.2.1.4	Generierung CD20 $\zeta$ -cTCR-exprimierender NKT-Zellen <i>in vitro</i> .....	71
3.2.2	Funktionelle Untersuchungen CD20 $\zeta$ -cTCR-exprimierender NKT-Zellen	78
3.2.2.1	Zytotoxizität CD20 $\zeta$ -cTCR-exprimierender NKT-Zellen.....	78
3.2.2.2	„Cold Target Inhibition“-Assays .....	83
3.2.2.3	Zytokin-Sekretion CD20 $\zeta$ -cTCR- exprimierender NKT-Zellen .....	86
3.2.2.4	Einfluss von Adhäsionsmolekülen und Rituximab auf die Zytotoxizität CD20 $\zeta$ -cTCR-exprimierender NKT-Zellen.....	87
3.2.2.5	Zytotoxizität CD20 $\zeta$ -cTCR-exprimierender NKT-Zellen gegenüber Patientenzellen .....	88
3.2.3	Vergleichende Untersuchungen CD20 $\zeta$ -cTCR-exprimierender NKT-und CD20 $\zeta$ -cTCR-exprimierender T-Zellen.....	90
4	Diskussion .....	95
<b>4.1</b>	<b>CD33<math>\zeta</math>-spezifische chimäre T-Zell-Rezeptoren.....</b>	<b>96</b>
<b>4.2</b>	<b>CD20<math>\zeta</math>-spezifische chimäre T-Zell-Rezeptoren.....</b>	<b>98</b>
5	Literatur .....	110
<b>Danksagung.....</b>		<b>133</b>
<b>Lebenslauf .....</b>		<b>134</b>
<b>Anhang.....</b>		<b>I</b>
	Vektorkarten und –konstruktionen .....	I
	Nukleotid- und Aminosäuresequenzen.....	V
	Abkürzungen.....	VII





# 1 Einleitung

Trotz neuer therapeutischer Entwicklungen und Behandlungserfolgen sind die chronische lymphatische Leukämie (B-CLL) und die akute myeloische Leukämie (AML) des Erwachsenen bislang nahezu unheilbar. Die größten Probleme treten bei der Behandlung von Rezidiven auf. Herkömmliche zelluläre Immuntherapien werden mit unveränderten Zellen des Immunsystems durchgeführt (Kapitel 1.2.2). Innovative zelluläre Immuntherapien sehen jedoch den Einsatz von gentechnisch modifizierten Zellen, insbesondere T-Zellen vor (Kapitel 1.1), die unabhängig von ihrer natürlichen Spezifität gezielt mit der Spezifität für Tumorzellen ausgestattet werden, um diese zu lysieren (Kapitel 1.1.2).

## 1.1 T-Zell-Rezeptorkomplex und chimäre T-Zell-Rezeptoren

T-Zellen repräsentieren eine Subpopulation von Lymphozyten, die im Thymus ausreifen. Sie werden in verschiedene Klassen unterteilt: Zytotoxische T-Zellen (CTL),  $T_H1$ -Zellen,  $T_H2$ -Zellen und NKT-Zellen (Kapitel 1.2.2). Zytotoxische T-Zellen exprimieren den Korezeptor CD8 (CD=„cluster of differentiation“). Diese T-Zellen zerstören Zielzellen, die Antigenfragmente von zytosolischen Pathogenen, die an Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Klasse-I-Moleküle gebunden sind, auf der Zelloberfläche tragen. Sie sezernieren die Zytotoxine Perforin, um die Membran der Zielzelle zu perforieren, und Granzyme, die proteolytisch wirken. Außerdem werden Zytokine wie Interferon (INF)- $\gamma$  produziert, um weitere Zellen des Immunsystems zu aktivieren.  $T_H1$ -Zellen und  $T_H2$ -Zellen exprimieren den Korezeptor CD4 und erkennen Fragmente von Antigenen, die von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden.  $T_H1$ -Zellen sezernieren u. a. INF- $\gamma$ , das die Aktivierung von Makrophagen induziert. Sie exprimieren den Fas-Liganden (CD95L), der durch Interaktion mit Fas (CD95)-exprimierende Zellen die Apoptose der Zelle hervorruft. Die wichtigste Aufgabe der  $T_H2$ -Zellen ist die Aktivierung von B-Zellen durch die Sekretion der B-Zellen-Wachstumsfaktoren Interleukin (IL)-4 und IL-5.  $T_H2$ -Zellen exprimieren den

CD40-Liganden, der an CD40 auf den B-Zellen bindet und diese zur Proliferation anregt.

### 1.1.1 T-Zell-Rezeptorkomplex

Alle T-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche einen Antigenrezeptor (= T-Zell-Rezeptor, TCR), der zur Immunglobulin (Ig)-Superfamilie gehört. Der TCR bildet mit einem Komplex unveränderlicher Proteine (CD3-Komplex), die für die Signalübertragung innerhalb der Zelle erforderlich sind, den T-Zell-Rezeptorkomplex (T-Zell-Rezeptor:CD3-Komplex), der die hochspezifische Antigen-Erkennung von T-Zellen vermittelt. Jede T-Zelle trägt ungefähr 30 000 Antigenrezeptoren auf ihrer Oberfläche.

Der TCR besteht aus zwei unterschiedlichen Polypeptidmolekülen ( $\alpha$ -Kette und  $\beta$ -Kette), die über eine Disulfidbrücke zu einem Heterodimer verbunden sind. Der Cysteinrest der Disulfidbrücke ist in einer kurzen Gelenkregion („hinge“-Region, Peptid H) lokalisiert. Jede Kette verfügt über zwei Domänen, die durch eine aminoterminaler hypervariable Region, die die Bindungsstelle für das fremde Epitop bildet, und eine carboxyterminale konstante Region, die die Ketten in der Cytoplasmamembran verankert, festgelegt sind. Die aminoterminalen Regionen weisen Homologien zu den variablen (V)-Regionen der Immunglobuline und die carboxyterminalen Regionen eine Homologie zu den konstanten (C)-Regionen der Immunglobuline auf. Beide Ketten haben an jeder Domäne eine Kohlenhydratseitenkette. Jede Kette durchspannt die Cytoplasmamembran mit einer hydrophoben Transmembrandomäne, die ungewöhnlicherweise positiv geladene Seitenketten aufweist, die für die Stabilisierung mit den anderen Komponenten des T-Zell-Rezeptorkomplexes notwendig sind. Alle T-Zell-Rezeptoren sind monovalent und haben eine sehr kurze cytoplasmatische Domäne, die für die Signalweiterleitung innerhalb der Zelle ungeeignet ist. Die T-Zell-Rezeptoren erkennen Antigenepitope, die durch Moleküle des MHC von antigenpräsentierenden Zellen (APC) auf der Zelloberfläche präsentiert werden (Fremont *et al.*, 1996). Ein anderer nur gering vertretener Typ des T-Zell-Rezeptors (5-10% der CD3<sup>+</sup>-T-Zellen) besteht aus einer  $\gamma$ -Kette und einer  $\delta$ -Kette (Meuer *et al.*, 1983; Brenner *et al.*, 1988). Im Gegensatz zu T-Zellen mit  $\alpha\beta$ -TCR haben T-Zellen mit

$\gamma\delta$ -TCR das Potential zur klonalen Expansion ohne primäres Priming (Morita *et al.*, 1995).

Nachdem ein Peptid:MCH-Komplex an den T-Zell-Rezeptor gebunden hat, erfolgt die intrazelluläre Signalübertragung über den CD3-Komplex, der nicht-kovalent mit dem T-Zell-Rezeptor assoziiert ist (Malissen und Malissen, 1996). Dieser Komplex besteht aus den invarianten Transmembranproteinen CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  und CD3 $\zeta$ . Die  $\zeta$ -Ketten bilden über eine Disulfidbrücke ein Homodimer, dessen größter Anteil im Cytoplasma liegt. Die Transmembrandomänen des CD3-Komplexes weisen negativ geladene Seitenketten auf, die mit den positiv geladenen Transmembrandomänen des T-Zell-Rezeptors ionische Bindungen eingehen. Die cytoplasmatischen Domänen der CD3-Proteine enthalten Sequenzen, die als ITAMs („immunoreceptor tyrosine-based activation motifs“) bezeichnet werden. Diese Sequenzen assoziieren nach der Stimulierung des Rezeptors mit cytoplasmatischen Proteintyrosinkinasen, die über Phosphorylierungen das Signal in der Zelle weiterleiten (Cambier, 1995).

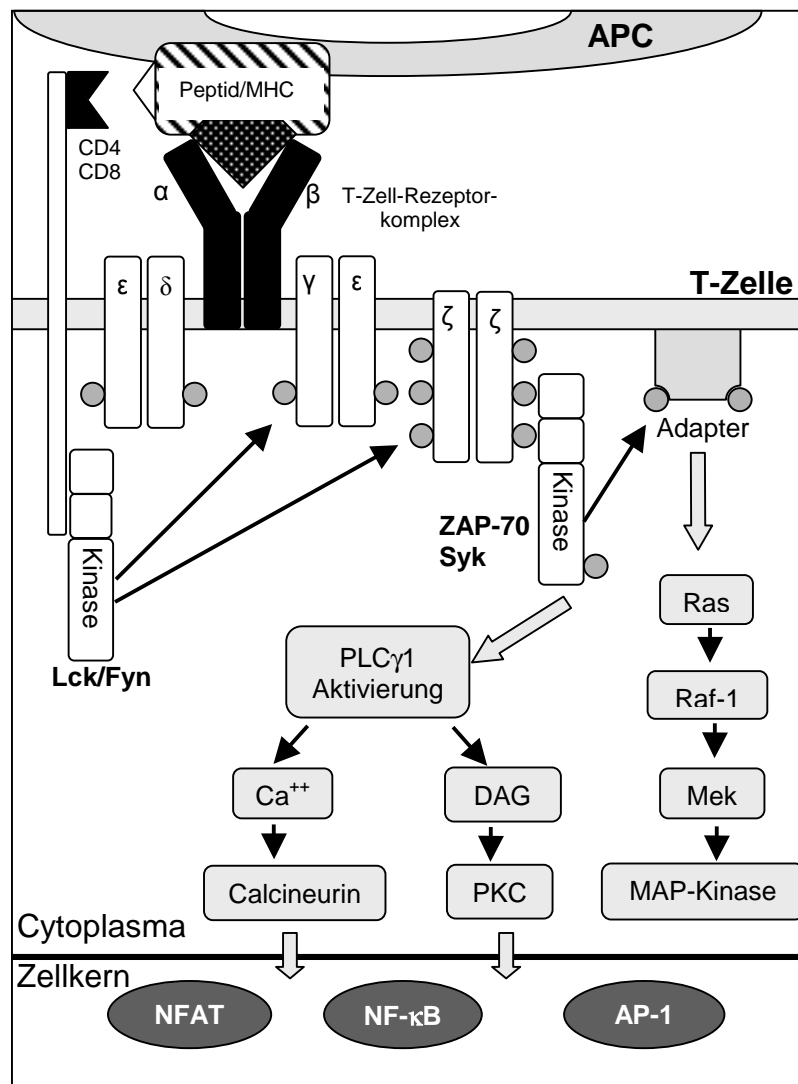
Die Signalübertragung durch antigenspezifische T-Zell-Rezeptoren erfordert ihre Aggregation durch viele Peptid:MHC-Komplexe. Für eine optimale Signalübertragung ist die Komplexbildung des Rezeptors mit den Korezeptoren CD4 und CD8 erforderlich, die eine 100-fache Verstärkung der Empfindlichkeit der T-Zellen für ein MHC-Molekül präsentiertes Antigen hervorruft. Die Aggregation induziert eine intrazelluläre Signalkaskade, die zur Aktivierung der T-Zellen führt. Die ersten Schritte der Signalübertragung werden vermutlich von zwei Tyrosinkinasen vermittelt: Lck, die konstitutiv mit den cytoplasmatischen Domänen von CD4 und CD8 verbunden ist (Janeway, 1992), und Fyn, die im Cytoplasma vorliegt und sich nach der Antigenerkennung an die cytoplasmatischen Domänen der CD3 $\zeta$ - und CD3 $\epsilon$ -Kette anlagert. Beide Tyrosinkinasen phosphorylieren die CD3 $\zeta$ - und CD3 $\epsilon$ -Kette, die daraufhin die cytosolischen Tyrosinkinasen ZAP-70 ( $\zeta$ -assoziiertes Protein 70) und Syk phosphorylieren und aktivieren. Durch die aktivierte Kinase ZAP-70 werden unterschiedliche Signalwege induziert. Zum einen aktiviert ZAP-70 das GTP-bindende Ras-Protein, das eine Kaskade von Kinasen aktiviert (Raf-1, Mek und MAP-Kinase). Diese Kaskade bewirkt schließlich die Transkription von Genen und die Aktivierung von genregulatorischen Proteinen, die zur Proteinfamilie Fos (eine Komponente des

Transkriptionsfaktors AP-1) gehören. Anschließend lagern sich die Fos-Proteine paarweise mit Molekülen der Familie Jun zusammen und bilden den kompletten Transkriptionsfaktor AP-1. Auf einem zweiten Weg aktiviert ZAP-70 die Phospholipase C- $\gamma$  (PLC $\gamma$ 1), die daraufhin Phosphatidylinositol in Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP $_3$ ) spaltet. IP $_3$  bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären Ca $^{2+}$ -Konzentration sowohl durch Ca $^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern als auch durch Öffnung spezifischer Ca $^{2+}$ -Kanäle in der Zellmembran. Daraufhin wird eine cytoplasmatische Proteinkinase, das Calcineurin, aktiviert. Calcineurin dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor NFAT ("nuclear factor of activated T cells"). Das dephosphorylierte NFAT kann in den Zellkern eindringen und einen Komplex mit AP-1 bilden. Das Diacylglycerin aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die anschließend eine Reihe von Enzymen aktiviert und den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B induziert. Zusammen mit den Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFAT aktiviert NF $\kappa$ B die Transkription spezifischer Gene, die zur Proliferation und Differenzierung und zur Effektorfunktion der T-Zelle führen (Cantrell, 1996). Abbildung 1.1 zeigt eine schematische Darstellung der intrazellulären Signalkaskade.

Für die Aktivierung von T-Zellen reicht das Signal, das durch die Bindung des Peptid:MCH-Komplexes ausgelöst wird, nicht aus. Zur vollständigen Stimulierung ist ein zweites kostimulatorisches Signal notwendig, das von den APC exprimiert wird und körpereigene Gewebezellen vor autoreaktiven Zellen schützt, die während ihrer Reifung nicht eliminiert wurden. Kostimulatorische Moleküle auf APC sind beispielsweise CD27, CD30, B7 (CD80), CD86, OX40 (CD134) und 4-1BB (CD137). Bleibt das zweite Signal aus, führt dies durch einen anergistischen Effekt zum Zelltod durch Apoptose (Rudd, 1996).

Die erstmalige Aktivierung (Priming) naiver T-Zellen ist ein äußerst komplexer Vorgang. Erst nach Weiterleitung eines kompletten Aktivierungreizes in Kombination adäquater Kostimulation über einen Zeitraum von 20 Stunden erfolgt die Differenzierung und klonale Expansion naiver T-Zellen (Iezzi *et al.*, 1998).





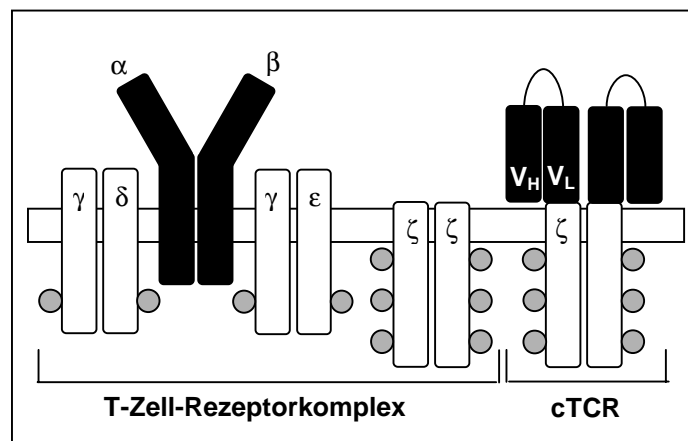
**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung der intrazellulären Signalkaskade der T-Zelle nach Epitop-Erkennung eines Peptid/MHC-Komplexes durch einen antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor. Abkürzungen und Erläuterungen: siehe Text.

### 1.1.2 Chimäre T-Zell-Rezeptoren

Die Behandlung von Tumoren umfasst neben Chemo- und Strahlentherapie auch immuntherapeutische Heilungsmethoden (Kapitel 1.2). Eine innovative Strategie zur immunologischen Behandlung von Tumoren ist die Rekrutierung von T-Zellen unabhängig von ihrer natürlichen Rezeptorspezifität durch gentechnische Modifikationen mit chimären T-Zell-Rezeptoren (cTCR).

In der ersten Entwicklungsphase von cTCR wurden T-Zellen mit zwei Genen transfiziert. Die konstante Region der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette der T-Zell-Rezeptoren wurde mit der leichten und schweren Kette der variablen Region des entsprechenden Antikörpers fusioniert. Dieses Fusionsprotein bildet mit dem nativen TCR einen heterodimeren Rezeptor. Diese Konstrukte sind funktionell (Gross *et al.*, 1989 a; Gross *et al.*, 1989 b; Gorochov *et al.*, 1992), aber ihre Herstellung durch den simultanen Transfer von zwei chimären Gene sehr schwierig.

Moderne cTCR bestehen aus einem signaltransduzierenden Molekül und einem Einzelkettenantikörper („single chain fragment variable“, scFv), der gegen ein Tumorassoziiertes Antigen (TAA) gerichtet ist. Dabei wird die spezifische Antigen-Erkennung durch Antikörper mit der Effektoreigenschaft zytotoxischer T-Zellen verbunden (Eshhar *et al.*, 1993). Die Grundlage dafür ist der ähnliche Aufbau des TCR und der Immunglobuline. Die variablen Domänen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors, die die antigene Determinante erkennen, und die variablen Domänen eines Antikörpers, die ebenfalls das antigene Epitop erkennen, zeigen einen ähnlichen molekularen Aufbau. Die variable leichte Kette ( $V_L$ ) und die variable schwere Kette ( $V_H$ ) von Antikörpern werden über einen Linker (Oligopeptid) miteinander verbunden und bilden das scFv, das in der Cytoplasmamembran verankert ist. Die Voraussetzung für die Herstellung dieser Ketten ist die Verfügbarkeit der entsprechenden tumorspezifischen monoklonalen Antikörper. Die zur Signaltransduktion benötigte Domäne wird in Form der CD3 $\zeta$ -Kette (Irving *et al.*, 1991; Letourneur und Klausner, 1991 und 1992) des TCR-Komplexes oder der  $\gamma$ -Kette des Fc $\epsilon$ RI- oder Fc $\gamma$ RIII-Rezeptors (Rezeptoren für die Fc-Region unterschiedlicher Immunglobulinisotypen) generiert (Wirthmüller *et al.*, 1992). Die CD3 $\zeta$ -Kette und  $\gamma$ -Kette sind Transmembranproteine. Zwischen der Transmembrandomäne des Signalmoleküls und dem extrazellulären Bereich des scFv wird eine humane Immunglobulin-„hinge“-Domäne (Moritz und Groner, 1995) eingefügt. Dadurch wird der Abstand des scFv zur Cytoplasmamembran und die Beweglichkeit des scFv vergrößert. Folglich wird die Antigenerkennung und -bindung verbessert. Zusätzlich wird eine humane Immunglobulin-„leader“-Sequenz als Signalpeptid eingefügt, das während des Transports zur Cytoplasmamembran abgespalten wird. Abbildung 1.2 zeigt den Vergleich zwischen nativem und chimärem T-Zellrezeptor-Komplex.



**Abb. 1.2:** Schematische Darstellung der Struktur des T-Zell-Rezeptorkomplexes und des chimären T-Zell-Rezeptors (cTCR);  $\alpha$ = CD3 $\alpha$ -Kette,  $\beta$ = CD3 $\beta$ -Kette,  $\gamma$ = CD3 $\gamma$ -Kette,  $\delta$ = CD3 $\delta$ -Kette,  $\epsilon$ = CD3 $\epsilon$ -Kette  $\zeta$ = CD3 $\zeta$ -Kette,  $V_H$ = variable schwere Kette,  $V_L$ = variable leichte Kette

Im cTCR wird eine Verbindung von Antigenerkennung und Signaltransduktion auf einer einzigen Polypeptidkette geschaffen, um schließlich die Differenzierung und Proliferation der T-Zelle hervorzurufen. Dies führt zur Aufnahme von Effektorfunktionen wie Lymphokinsekretion bzw. Zytolyse der Zielzellen. Die Antigen-Erkennung verläuft hierbei unabhängig von einer MHC-Molekül-Präsentation und vom nativen T-Zellrezeptor-Komplex. Außerdem können T-Zellen mit cTCR nicht nur Proteine bzw. Peptide, sondern auch Kohlehydrate und Lipide erkennen. Weiterhin sind „tumor-escape“-Mechanismen bei cTCR wirkungslos (Finney *et al.*, 2004). Folglich haben T-Zellen mit cTCR gegenüber T-Zellen mit nativem TCR entscheidende Vorteile.

Chimäre TCR werden stabil von Lymphozyten exprimiert. Die Spezifität zellulärer Immuntherapien kann durch Ausstattung von T-Lymphocyten mit cTCR verbessert werden (Abken *et al.*, 1997). Verschiedene cTCR mit unterschiedlichen Spezifitäten für TAA wurden entwickelt, z.B. Neu/HER2 (Stancovski *et al.*, 1993), „folate-binding protein“ (Hwu *et al.*, 1995), CEA (Darcy *et al.*, 1998), TAG-72 (McGuinness *et al.*, 1999), „renal tumor-associated antigen“ (Weijtens *et al.*, 1996), CD30 (Hombach *et al.*, 1998) und  $G_{D2}$  (Rossig *et al.*, 2001). Weiterhin wurden cTCR konstruiert gegen HIV (Roberts *et al.*, 1994 und 1998; Hege *et al.*, 1996; Bitton *et al.*, 1998) und gegen Antigene, die in Autoimmunerkrankungen involviert sind (Annenkov *et al.*, 1998 und 2000).

## 1.2 Immuntherapie

Die therapeutische Behandlung maligner Erkrankungen des hämatopoetischen Systems umfasst neben konventionellen Therapieansätzen wie Bestrahlung, Chemotherapie und Knochenmarktransplantation auch innovative Strategien wie die Immuntherapie. Die Immuntherapie hat das Ziel, die Spezifität und Sensitivität des körpereigenen Immunsystems für die Zerstörung der entarteten Tumorzellen zu mobilisieren. Die Behandlung mit monoklonalen Antikörpern und die Therapie mit Zellen des Immunsystems (zelluläre Immuntherapie) repräsentieren spezifische Formen der Immuntherapie.

### 1.2.1 Immuntherapie mit Antikörpern

Monoklonale Antikörper werden unverändert oder modifiziert verwendet. Der Einsatz monoklonaler Antikörper gegen TAA ist bei einigen Tumoren wirksam (Riethmüller *et al.*, 1993), hat jedoch aufgrund einer schwachen direkten Effektorfunktion eine begrenzte Fähigkeit, Tumorzellen zu zerstören. Die Spezifität eines Antikörpers kann mit der Aktivität von Zytostatika (Grossbard *et al.*, 1993) oder Radioisotopen gekoppelt werden (Witzig, 2003). Zusätzlich wurden bispezifische Antikörper konstruiert, die gleichzeitig gegen TAA und gegen CD3 des T-Zell-Rezeptors gerichtet sind (von Mehren und Weiner, 1996; Löffler *et al.*, 2000). Durch den Antikörper gegen CD3 wird die Verbindung von T-Zelle und Tumorzelle ermöglicht. Bispezifische Antikörper werden jedoch relativ schnell proteolytisch abgebaut (Lanzavecchia und Scheidegger, 1987) und verlieren dabei rasch ihre lytische Aktivität (Blank-Voorthuis *et al.*, 1993). Ein weiterer Nachteil von Antikörper-Therapien ist die Induktion von Resistenzmechanismen der Tumorzellen.

In klinischer Anwendung ist beispielsweise ein monoklonaler Antikörper, der sich gegen den B-Zell-Marker CD20 richtet (Rituximab/MabThera™) und zur Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen wie beispielsweise der chronischen lymphatischen Leukämie (B-CLL) eingesetzt wird (McLaughlin *et al.*, 1998 und Byrd *et al.*, 2001). Die Mechanismen der Zerstörung von Lymphozyten durch Rituximab beinhalten die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) und die

komplement-aktivierte Zytolyse. Da Rituximab nicht die Fähigkeit hat, Zielzellen in ausreichender Menge zu zerstören, müssen Resistenzmechanismen existieren, die bis jetzt jedoch nur zum Teil experimentell dokumentiert sind (Smith, 2003).

### 1.2.2 Zelluläre Immuntherapie

Bei der zellulären Immuntherapie werden speziell expandierte, stimulierte oder gentechnisch veränderte Zellen aus humanem Blut verwendet.

Eine Form der zellulären Immuntherapie ist die Gabe von tumorspezifischen CTL, die *in vitro* expandiert werden können (Mutis *et al.*, 1999; Maki, 2001). Die Aufgabe der CTL ist die Erkennung und Zerstörung fremder oder veränderter Zellen, und somit auch von Tumorzellen. Die Zielzellen müssen dafür jedoch die antigene Determinante in Verbindung mit den MHC-Molekülen der Klasse I auf der Oberfläche präsentieren. Voraussetzung für diese Strategie ist die Kenntnis immundominanter Tumorantigene. Eine Erklärung für die fehlende Proliferation von CTL *in vivo* ist, dass im Gegensatz zu viralen Antigenen viele TAA nicht nur exklusiv von Tumoren exprimiert werden, sondern auch von gesunden Zellen oder während spezieller Entwicklungsstadien der Zellen (Rössig und Brenner). Aufgrund der immunologischen Eigentoleranz können diese Antigene dann keine effektive Aktivierung der Immunantwort induzieren (Rössig und Brenner, 2003). Weiterhin wird eine effiziente anti-Tumor-CTL-Aktivierung durch die Prozessierung des zellulären Proteins kompliziert. Proteine müssen von APC in Peptidfragmente gespalten, mit MHC-Molekülen assoziiert und an die Zelloberfläche transportiert werden. Erst nach dieser Prozessierung ist die Erkennung des Peptids durch den TCR möglich. Viele Tumorzellen haben erworbene Defekte, die diesen Mechanismus der effektiven Antigen-Präsentierung betrifft, so dass keine Immunreaktion hervorgerufen wird und die Tumorzellen somit dem Immunsystem entkommen.

Ein anderer Ansatz der zellulären Immuntherapie ist die Gabe von dendritischen Zellen (DC). DC sind die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen. Sie haben die Fähigkeit, Tumorantigene zu präsentieren und dadurch eine tumorspezifische T-Zellimmunantwort zu induzieren (Banchereau und Steinman, 1998). DC können *in vitro* hergestellt und mit Tumorantigenen beladen (gepulst) werden. Bisher ist für eine effiziente

Vakzinierungstherapie mit CTL und DC die Herstellung ausreichender Zellmengen limitierend.

Weitere immuntherapeutische zelluläre Strategien sehen den Einsatz von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) oder Natürlichen Killer T-Lymphozyten (NKT-Zellen) vor. Beide Zelltypen können ohne vorherige Sensibilisierung Tumorzellen lysieren. NK-Zellen zeigen nicht die typischen T-Zell-Merkmale auf ihrer Oberfläche. Sie sind involviert in die angeborene Immunität gegenüber Viren und anderen intrazellulären Krankheitserregern sowie in die ADCC. Von den NK-Zellen leiten sich die durch IL-2 stimulierten Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK-Zellen) ab. LAK-Zellen haben die Fähigkeit, sowohl autologe als auch allogene Tumorzellen MHC-unabhängig zu erkennen und zu lysieren (Grimm *et al.*, 1982). Limitierend für ihre therapeutische Anwendung ist die hohe systemische Dosierung von IL-2, um optimale Effektorfähigkeiten dieser Zellen *in vivo* zu gewährleisten.

Der Anteil von NKT-Zellen im peripheren Blut ist gering (ca. 0,1-0,5%; Hammond und Godfrey, 2002). NKT-Zellen können jedoch *in vitro* durch Stimulierung mit IL-2, IL-15, INF- $\gamma$  und monoklonalen Antikörpern gegen CD3 expandiert werden (Schmid-Wolf *et al.*, 1993 und 1994; Verneris *et al.*, 2002; Guven *et al.*, 2003). Nach einer Kultivierungsdauer von 21 Tagen zeigt der Phänotyp folgende Oberflächenmoleküle: CD3, CD8, CD28, CD56 und TCR $\alpha/\beta$  (Lu und Negrin, 1994). Diese Zellen haben die Fähigkeit, Tumorzellen MHC-unrestringiert zu erkennen (Papamichail *et al.*, 2004) und besitzen verglichen mit LAK-Zellen *in vivo* eine höhere Zytotoxizität. Nach Kontakt mit T-Zellen können NKT-Zellen ein weites Spektrum von Zytokinen schnell produzieren: IL-4, IL-10, IL-13, INF- $\gamma$  und Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  (Godfrey *et al.*, 2000; Joyce, 2001). Außerdem haben sie eine hohe Proliferationsrate, die die Bereitstellung ausreichender Zellmengen für klinische Studien gewährleistet.

Das angeborene Immunsystem ist charakterisiert durch schnelle Reaktionen, die über Makrophagen, DC, Granulozyten und NK-Zellen vermittelt werden. Im Gegensatz dazu ist das erworbene Immunsystem, das hauptsächlich aus T- und B-Lymphozyten besteht, durch Gedächtnis- oder sekundäre Antworten charakterisiert. NKT-Zellen werden als mögliches Bindeglied zwischen der angeborenen und erworbenen Immunität angesehen (Taniguchi *et al.*, 2003; Brigl *et al.*, 2003). NKT-Zellen stammen von T-Zellen ab (Lu und Negrin, 1994) und können Tumorzellen durch einen perforin-abhängigen

Mechanismus zerstören (Brutkiewicz und Sriram, 2002). Besondere Kennzeichen der NKT-Zellen sind die Expression des T-Zell-Rezeptors (Merkmal der T-Lymphozyten) und des Oberflächenantigens CD56 (Merkmal der NK-Zellen; Bendelac *et al.*, 1995 und 1997; MacDonald, 1995). Außerdem ist die CD1d-Restriktion eine spezielle Eigenschaft der NKT-Zellen. CD1-Moleküle repräsentieren einen besonderen Typ von antigen-präsentierenden Molekülen, die evolutionsbiologisch mit den klassischen MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen verwandt sind. Gegensätzlich zu klassischen MHC-Molekülen, die ausschließlich Peptide binden, können CD1-Moleküle Lipide und Glykolipide binden (Hong *et al.*, 1999). Da die Entwicklung der NKT-Zellen nur in Anwesenheit von CD1d möglich ist, werden scheinbar nur die NKT-Zellen, die endogene Liganden assoziiert an CD1d erkennen, positiv selektioniert (Hong *et al.*, 1999).

Aufgrund ihrer Selbst-Aktivierung und ihrer Fähigkeit zur schnellen Freisetzung großer Mengen  $\text{INF-}\gamma$  wird angenommen, dass NKT-Zellen für die Initiierung und Regulierung verschiedener Immunantworten wichtig sind (Taniguchi *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2003). Bislang ist jedoch der funktionelle Mechanismus der Aktivierung nicht vollständig aufgeklärt. Wahrscheinlich sind endogene Liganden und IL-12 an diesem Prozeß beteiligt (Brigl *et al.*, 2003; Taniguchi *et al.*, 2003). Um die bisher unbekanntenen endogenen Liganden zu identifizieren, wurden Experimente mit dem synthetischen Glykopeptid  $\alpha$ -Galactosylceramid ( $\alpha$ -GalCer) durchgeführt, das von humanen Zellen nicht exprimiert wird, aber vom  $V_{\alpha}14$ -Rezeptor der NKT-Zellen spezifisch erkannt wird (Kawano *et al.* 1997). Da  $\alpha$ -GalCer als potenter Stimulator die Aktivierung der NKT-Zellen induziert (Kawano *et al.*, 1997; Couedel *et al.*, 1998), wird für die endogenen Liganden der NKT-Zellen eine dem  $\alpha$ -GalCer ähnliche Struktur postuliert (Hammond und Godfrey, 2002).

Die Aktivierung der NKT-Zellen ist abhängig von DC, die während einer Infektion zuerst aktiviert werden und neben proinflammatorischen Zytokinen (IL-1, IL-6 und  $\text{TNF-}\alpha$ ) auch IL-12 sezernieren. Das sezernierte IL-12 ist essentiell für die NKT-Zellen-Aktivierung und ihrer nachfolgenden  $\text{INF-}\gamma$ -Sekretion während einer Infektion (Brigl *et al.*, 2003; Schaible und Kaufmann, 2000). In Abwesenheit von DC ist jedoch die alleinige IL-12-Sekretion nicht ausreichend für eine NKT-Zellen-Aktivierung. Die Erkennung von endogenen Liganden assoziiert an CD1d

ist notwendig für die IL-12-vermittelte NKT-Zellen-Aktivierung. Das von NKT-Zellen sekretierte INF- $\gamma$  aktiviert andere Zelltypen; sowohl NK-Zellen und Makrophagen des angeborenen Immunsystems als auch CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (Schaible und Kaufmann, 2000). Die hauptsächliche Funktion von NKT-Zellen ist wahrscheinlich die schnelle Aktivierung anderer Effektorzelltypen, wie beispielsweise NK-Zellen (Carnaud *et al.*, 1999; Eberl und MacDonald, 2000; Taniguchi *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2003). Weiterhin sind NKT-Zellen primäre Ziele für die Induktion von Antitumor-Aktivität *in vivo* (Kitamura *et al.*, 1999; Cui *et al.*, 1997). Weiterhin sind NKT-Zellen resistent gegenüber der Fas-vermittelten Apoptose, deren Induktion in tumor-infiltrierenden Lymphozyten eine Form von „tumor-escape“-Mechanismen darstellt (O’Connell *et al.*, 1996 und 1997). Daher wird angenommen, dass NKT-Zellen wahrscheinlich FasL-exprimierende Tumorzellen effektiv lysieren können (Verneris *et al.*, 2000).

NKT-Zellen können den Prozess von Autoimmunerkrankheiten der Maus, wie Diabetes Typ 1 und Experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE), regulieren. Vermehrte Hinweise deuten darauf hin, dass NKT-Zellen auch bei humanen Autoimmunerkrankungen Funktionen übernehmen (Hammond und Godfrey, 2002). Die therapeutische Behandlung mit  $\alpha$ -GalCer bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen oder Tumoren wird evaluiert (Wilson und Delovitch, 2003). Zusätzlich können NKT-Zellen nach Knochenmarktransplantationen das Auftreten der „graft-versus-host“-Krankheit (graft-versus-host-disease, GVHD) in Abhängigkeit von IL-4 verhindern (Zeng *et al.*, 1999).

## **1.3 Therapeutische Bedeutung der Differenzierungsantigene CD33 und CD20**

### **1.3.1 Differenzierungsantigen CD33**

Das Differenzierungsantigen CD33 ist ein 67 kDa großes Oberflächenprotein, das von normal ausreifenden myeloischen Vorläuferzellen und von leukämischen Blasten während der akuten myeloischen Leukämie (AML) exprimiert wird (Griffin *et al.*, 1981; Dinndorf *et al.*, 1986; Peiper *et al.*, 1988). Normale hämatopoetische



Stammzellen und nicht-hämatologisches Gewebe exprimieren kein CD33. CD33 ist somit ein gewebsspezifisches, aber kein tumorspezifisches Antigen. Untersuchungen postulieren, dass die Ursache der AML in einer leukämischen Transformation auf der Ebene einer CD33-exprimierenden myeloischen Vorläuferzelle mit nachfolgender gestörter Ausreifung liegt (McCulloch, 1983; Fialkow *et al.*, 1987). Theoretisch kann durch ein spezifisches CD33-Targeting die Eradikation des malignen Stammzellklons unter Schonung der normalen Hämatopoese erreicht werden (Andrews *et al.*, 1986). CD33 ist somit ein ideales Zielantigen für immuntherapeutische Strategien bei der Behandlung von Patienten mit AML.

Die AML gehört zu den häufigsten Leukämie-Erkrankungen im Erwachsenenalter. Jährlich erkranken in Deutschland 2-4/100.000 Einwohner. Die Anzahl von Neuerkrankungen steigt mit zunehmendem Alter (Sandler, 1987). Trotz therapeutischer Erfolge ist die AML nicht in jedem Fall heilbar. Das Therapiekonzept mit kurativer Intention besteht in einer systemischen Kombinationschemotherapie, die auf durchflusszytometrischen Untersuchungen und einer individuellen Risikostratifizierung basiert (Hiddemann und Buchner, 2001). Die Behandlungserfolge hängen u. a. von zytogenetischen Aberrationen des Zellklons ab (Hiddemann und Buchner, 2001). Trotz optimierter Therapieprotokolle treten bei einer Vielzahl von Patienten behandlungsassoziierte Komplikationen (Stirewalt *et al.*, 2003) oder Rezidive auf (Hiddemann und Buchner, 2001). Eine kurative Behandlungsstrategie nach AML-Rezidiven besteht in der Transplantation allogener Knochenmark- oder Blutstammzellen im Anschluß an eine myeloablative Hochdosistherapie (Gratwohl *et al.*, 1999). Limitierend ist jedoch die Entstehung einer GVHD, die in Form einer unkontrollierten Immunreaktion des Transplantats gegenüber gesundem Gewebe vor allem der Haut, der Leber und des Darms abläuft (Goker *et al.*, 2001). Eine immuntherapeutische Behandlung der AML ist beispielsweise die Gabe von Gentuzumab Ozogamizin (GO; Mylotarg). GO besteht aus einem Konjugat eines monoklonalen Antikörpers, der sich gegen CD33 richtet, mit dem Zytostatikum Calicheamicin. Zur Zeit wird die Applikation von GO in Kombination mit Chemotherapeutika, in Verbindung mit Stammzell-Transplantation (Tomblyn und Tallman, 2003) und als hauptsächliche Therapieform untersucht (Giles *et al.*, 2003).

### 1.3.2 Differenzierungsantigen CD20

Das Differenzierungsantigen CD20 ist ein 33-37 kDa großes Oberflächenprotein, das von prä-B-Zellen, intermediären B-Zellen und reifen B-Zellen exprimiert wird. Ebenso weisen während der chronischen lymphatischen Leukämie (B-CLL) 95% aller malignen Blasten CD20 auf. Es ist somit ein geeignetes Zielantigen für Immuntherapieansätze. Da CD20 sowohl auf gesunden als auch auf leukämischen Zellen vorkommt, ist dieses Antigen gewebsspezifisch und nicht tumorspezifisch.

Die B-CLL ist mit einer Inzidenz von 3/100 000 die häufigste Leukämie-Erkrankung in der westlichen Welt (Brittinger *et al.*, 1997). Trotz therapeutischer Erfolge ist sie weiterhin eine unheilbare Erkrankung, deren Behandlungserfolg von innovativen therapeutischen Strategien, z. B. der zellulären Immuntherapie, abhängt. Die B-CLL ist charakterisiert durch die Akkumulierung von langlebigen klonalen B-Zellen im Knochenmark, Blut, in den Lymphknoten und der Milz (Jaffe *et al.*, 2001). Der klinische Verlauf dieser Erkrankung ist sehr heterogen. Durch die Klassifikationen nach Rai und Binet können unterschiedliche Prognosen aufgestellt werden. Bei einigen Patienten verläuft die Krankheit schnell und führt zum Tod, während bei anderen Patienten ein stabiler, nicht-progressiver Krankheitsverlauf zu erkennen ist (Rai *et al.*, 1975; Binet *et al.*, 1981). Konventionelle zytotoxische Behandlungen mit alkylierenden Agentien oder Purinanaloga resultieren in effektiven Remissionen (Wierda und O'Brien, 2001). Die Therapie mit dem Purinanalogon Fludarabin bei Erst- und Rezidivbehandlungen zeigt eine gute Wirkung, führt aber zu keiner signifikanten Lebensverlängerung der Patienten (Binet *et al.*, 1981; Montserrat *et al.*, 1997). Weitere für die palliative Therapie eingesetzte Zytostatika sind Chlorambucil und Fludarabinhaltige Kombinationen mit Mitoxantron und/oder Cyclophosphamid. Aufgrund der Entwicklung von Teil- oder Vollresistenzen der Tumore gegen Zytostatika bei Patienten nach Primärtherapie sind Rezidive das größte Problem. In klinischer Anwendung ist weiterhin ein monoklonaler Antikörper, der sich gegen das Differenzierungsantigen CD20 richtet (Rituximab/MabThera<sup>TM</sup>; McLaughlin *et al.*, 1998 und Byrd *et al.*, 2001). Rituximab hat jedoch nicht die Kompetenz, Zielzellen in ausreichender Menge zu lysieren (Smith, 2003). Die allogene Knochenmarktransplantation (KMT) ist ein neuer

Therapieansatz mit kurativem Ziel. Ihre Applikation ist jedoch durch die GVHD und die Spenderauswahl limitiert (Tefferi und Phyliky, 1992; Esteve und Montserrat, 2000). Autologe Knochenmarktransplantationen führen oft zu klinischer Remission, aber mit einer hohen Rezidivinzidenz (Khoury *et al.*, 1994).

Da maligne Blasten über MHC-II-Moleküle verfügen, aber eine minimale Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 haben, sind sie im Gegensatz zu gesunden B-Zellen schlechte APC. Sie haben nicht die Fähigkeit, antigenspezifische T-Zellen effektiv zu stimulieren (Eris, 1994). Zusätzlich weist der B-Zell-Rezeptor oftmals Defekte auf, so dass die T-Zell-Aktivierung ebenfalls verhindert wird (Caligaris-Cappio, 2000). Somit sind die malignen Blasten durch das Immunsystem nicht mehr eliminierbar.

Eine genetische Prädisposition gilt als sicher, da das Erkrankungsrisiko bei Verwandten ersten Grades zwei- bis siebenfach erhöht ist (Hamblin, 1998). 82% aller leukämischen Blasten weisen eine chromosomale Aberration auf (Dohner, 2000). Es existiert jedoch keine einzige karyotypische Abnormität, die konstant in allen B-CLL-Formen vorkommt und daher eine diagnostische Relevanz hätte. Die Ursache der B-CLL liegt in einem Defekt des Apoptose-Mechanismus (Caligaris-Cappio und Hamblin, 1999). Die B-CLL wird in Verbindung mit einer Überexpression des BCL2-Gens gebracht, die die Apoptose bei prä-B-Zellen blockiert (McDonnell *et al.*, 1990; Hockenberry *et al.*, 1991; Lazaridou *et al.*, 2000). Ein anderer prädisponierender genetischer Faktor ist das 1513A-C Allel des P2X7-Gens, das einen Rezeptor, der durch Mutation funktionsgestört ist, exprimiert. Dies resultiert in einer Reduzierung des anti-apoptotischen Effekts, der einen quantitativen Anstieg der B-Zellen zur Folge hat (Wiley *et al.*, 2002).

Studien der Mutationen in Immunglobulin-Genen in malignen Blasten weisen daraufhin, dass die B-CLL in zwei unterschiedliche Krankheiten abgegrenzt werden kann. Das Vorhandensein dieser Mutationen definiert eine Gruppe von Patienten mit einem stabilen oder langsamen Krankheitsverlauf. Die Abwesenheit dieser Mutationen führt zu einem progressiveren Krankheitsverlauf, der eine schnelle Behandlung erfordert (Staudt, 2003; Wiestner *et al.*, 2003).

## 1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit

Ziele der vorliegenden Arbeit sind die Generierung von NKT-Zellen *in vitro* und deren Modifikation mit CD20 $\zeta$ -spezifischen bzw. CD33 $\zeta$ -spezifischen cTCR durch retroviralen Gentransfer und die Untersuchung ihrer Funktionalität und Effektoreigenschaften.

Für eine mögliche zelluläre Immuntherapie der AML soll ein cTCR mit Spezifität für CD33 konstruiert werden. Ein variables Leichkettenfragment von CD33 (scFvCD33) soll aus einer CD33-Hybridomzelllinie kloniert werden und durch weitere Klonierungen mit der signaltransduzierenden CD3 $\zeta$ -Kette fusioniert werden. Dieses Fusionsprotein (CD33 $\zeta$ -cTCR) soll durch retroviralen Gentransfer in peripheren mononukleären Blutzellen und in NKT-Zellen zur Expression gebracht werden. Durch Zytotoxizitäts-Assays und Überprüfung der INF- $\gamma$ -Sekretion soll die Spezifität und Funktionalität CD33 $\zeta$ -cTCR-transduzierter Zellen nachgewiesen werden.

Für eine eventuelle zelluläre Immuntherapie der B-CLL soll ein cTCR, der spezifisch gegen CD20 gerichtet ist (CD20 $\zeta$ -cTCR), von *in vitro* expandierten NKT-Zellen exprimiert werden. Dafür soll der CD20 $\zeta$ -cTCR zunächst in die stabile Produktionszelllinie Flyrd18 durch retroviralen Gentransfer übertragen werden, um rekombinante Retroviren zu erzeugen, die für die Transduktion von *in vitro* generierten NKT-Zellen verwendet werden sollen. Die Spezifität und Funktionalität CD20 $\zeta$ -cTCR-transduzierter NKT-Zellen soll durch Zytotoxizitäts-Assays und Überprüfung der INF- $\gamma$ -Sekretion gezeigt werden. Weitere Analysen sollen Auskunft darüber geben, ob die Zytotoxizität transduzierter NKT-Zellen vom Vorhandensein der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und LFA-1 abhängig ist. Außerdem soll der Effekt von Rituximab auf die Zytotoxizität transduzierter NKT-Zellen überprüft werden. Ein weiteres Ziel ist der Funktionalitätsnachweis transduzierter NKT-Zellen gegenüber malignen Blasten von Patienten mit B-CLL *in vitro*. Aufgrund vergleichender Zytotoxizitäts-Assays soll die unterschiedliche zytolytische Kompetenz transduzierter NKT-Zellen und transduzierter T-Zellen belegt werden.

Zusammenfassend sollen die Untersuchung transduzierter NKT-Zellen Informationen im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung dieser Zellen geben. Daraus könnten innovative zelluläre Therapiestrategien zur Behandlung der B-CLL und AML resultieren, die besondere Bedeutung bei Rezidiven haben könnten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Prokaryontische und eukaryontische Zellen

#### 2.1.1 Bakterienstämme

**Tab 2.1:** In der vorliegenden Arbeit verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp / relevante Eigenschaften	Referenz
<b>Escherichia coli</b>		
DH5 $\alpha$ MCRr (Fa. Invitrogen)	F <sup>-</sup> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , $\Delta(\textit{argF lacZYA})U169$ , $\phi 80d$ , $\Delta(\textit{lacZ})M15$	Grant <i>et al.</i> (1990)
DH10B (Fa. Invitrogen)	F <sup>-</sup> , <i>araD139</i> , $\Delta(\textit{ara,leu})7697$ , $\Delta\textit{lacX74}$ , <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>deoR</i> , $\phi 80dlacZ\Delta M15$ , <i>endA1</i> , <i>nupG</i> , <i>recA1</i> , <i>mcrA</i> , $\Delta(\textit{mrr hsdRMS mrcBC})$	Grant <i>et al.</i> (1990)

#### 2.1.2 Säugetierzelllinien

##### A-204

human, Rhabdomyosarcom, adhärent (Monolayer), CD20<sup>-</sup> (Giard *et al.*, 1973)

##### Daudi

human, Burkitt's Lymphom, Suspensionszellen, CD20<sup>+</sup> (Klein *et al.*, 1968; Nadkarni *et al.*, 1969)

##### Flyrd18

stammt von humaner Fibrosarkomzelllinie HT1080 ab, Wirtsbereich vergleichbar mit amphotrop (Cosset *et al.*, 1995); Retroviren der stabilen Produktionzelllinie Flyrd18 (Cosset *et al.*, 1995) besitzen das Hüllprotein des feline endogenen Virus RD114 und nutzen als Rezeptor auf den Wirtszellen einen Transporter neutraler Aminosäuren (Rasko *et al.*, 1999). Da sie einen Tropismus für humane hämatopoetische Zellen zeigen (Kelly, 2000), können sie für die Infektion humaner T-Lymphozyten verwendet werden.

##### HL-60

human, akute myeloische Leukämie, Suspensionszellen, CD33<sup>+</sup> (Gallagher *et al.*, 1979)

**HSB-2**

human, T-Zell-Leukämie, Suspensionszellen, CD20<sup>+</sup> (Adams *et al.*, 1968 und 1970)

**Hybridomzelllinie 251**

produziert  $\alpha$ -CD33-Antikörper (Peiper *et al.*, 1989)

**OPM-2**

humanes multiples Myelom, Suspensionszellen, CD33<sup>-</sup> (Katagiri *et al.*, 1985)

**PG13**

murine Fibroblastenzelllinie, Wirtsbereich vergleichbar mit amphotrop (Miller *et al.*, 1991); PG13-Zellen (Miller *et al.*, 1991) produzieren retrovirale Vektoren mit Gibbonaffen Leukämievirus (GALV)-Hülle, die die Zellen über das Phosphat-Transportprotein Glvr-1 (Pit1) (Kavanaugh *et al.*, 1994) infizieren. Da Pit1 sehr stark auf Knochenmarkzellen exprimiert wird, ist die Transduktion myeloischer und lymphatischer Zellen mit Viren dieser Zelllinie effektiver als mit Viren mit amphotroper Hülle (Bauer *et al.*, 1995; Bunnell *et al.*, 1995).

**Phoenix-Ampho**

stammt von humaner embryonaler Nierenzelllinie 293 ab, Wirtsbereich amphotrop (Kinsella *et al.*, 1996); Retroviren, die eine amphotrope Hülle besitzen, infizieren ihre Wirtszellen über das Phosphat-Transportprotein Ram1 (Pit2) (Kavanaugh *et al.*, 1994). Da dieser Rezeptor auf eukaryontischen Zellen sehr weit verbreitet ist, ist das Wirtsspektrum dieser Retroviren sehr groß (Cone und Mulligan, 1984; Sorge *et al.*, 1984; Kurre *et al.*, 1999). Ihr Wirtsbereich umfasst sowohl murine als auch nicht-murine (auch humane) Zellen.

**Phoenix-Eco**

stammt von humaner embryonaler Nierenzelllinie 293 ab, Wirtsbereich ecotrop (Kinsella *et al.*, 1996)

**Raji**

human, Burkitt's Lymphom, Suspensionszellen, CD20<sup>+</sup> (Pulvertaft, 1964)

## 2.2 Vektoren

**Tab. 2.2:** In der vorliegenden Arbeit verwendete Vektoren

Vektor	relevante Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i> -Vektoren		
fUSE5	Tet <sup>R</sup> , Fusionsphage	Smith (1985)
pAB1::scFvCD33	Ap <sup>R</sup> , Ak-Expressions-Vektor	zur Verfügung gestellt von Müller, IMT Marburg
pRSV	Ap <sup>R</sup>	Eshhar <i>et al.</i> (1993)
pUC19	Ap <sup>R</sup> , Klonierungsvektor	Vieira und Messing (1982)
retrovirale Vektoren		
MSCV-I-GFP(M)	Ap <sup>R</sup> , retroviraler Vektor, Reporter gen GFP	Cherry <i>et al.</i> (2000)
SFG	Ap <sup>R</sup> , retroviraler Vektor	Riviere <i>et al.</i> (1995)
SFG::EGFP	Ap <sup>R</sup> , retroviraler Vektor, Reporter gen EGFP	zur Verfügung gestellt von Rössig, UK Münster
SFG::scFvCD20ζ	Ap <sup>R</sup> , retroviraler Vektor	zur Verfügung gestellt von Rössig, UK Münster; Ursprung scFvCD20: T. Tedder, Durham
in der vorliegenden Arbeit konstruierte Vektoren		
MSCV-I-GFP(M)::scFvCD33ζ	Ap <sup>R</sup> , retroviraler Vektor, Reporter gen GFP	diese Arbeit
pRSV::scFvCD33	Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
SFG::scFvCD33ζ	Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit

Rekombinante Retroviren sind effiziente Vektoren für die Übertragung von Genen in Säugetierzellen (Riviere *et al.*, 2000). Als Kontrollvektor für Transduktionen wurde der Vektor SFG::EGFP eingesetzt, der das Reporter gen für „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) trägt (Heim *et al.*, 1994, Zhang *et al.*, 1996). EGFP ist eine Variante des „Green Fluorescent Protein“ aus *Aequorea victoria* mit verschiedenen Punktmutationen gegenüber dem Wildtyp-Protein, das die Fluoreszenz in Säugetierzellen verstärkt. Der Vektor MSCV-I-GFP(M)::scFvCD33ζ trägt die Nukleotidsequenz für das Reporter gen „green fluorescent protein“ (GFP) aus *Aequorea victoria* (Prasher *et al.*, 1992), das ebenfalls wie EGFP im Durchflußzytometer ohne vorherige Färbung der Zellen detektiert werden kann. Da das stromabwärts gelegene Transgen (z. B. für cTCR) über eine IRES-Einheit mit GFP verbunden ist, kann davon ausgegangen werden, dass bei Expression des GFP auch das Transgen exprimiert wird.

## 2.3 Kulturmedien

### 2.3.1 Kulturmedien für Bakterien

Alle Mengen der einzuwiegenden Substanzen bezogen sich auf 1000 ml bidest. H<sub>2</sub>O.  
Für Festmedien wurden 15g Agar pro 1000 ml Flüssigmedium zugesetzt.

LB-Medium	10 g	Trypton	
	5 g	Yeast-Extract	
	10 g	NaCl	
SOB-Medium	20 g	Trypton	
	5 g	Yeast-Extract	
	0,58 g	NaCl	
	0,19 g	KCl	
	10 ml	1 M MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	
	10 ml	1 M MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	
			pH 6,0-7,0
S.O.C.-Medium	2 %	Trypton	
	0,5 %	Yeast-Extract	
	10 mM	NaCl	
	2,5 mM	KCl	
	10 mM	MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	Die Ansätze wurden getrennt autoklaviert und anschließend gemischt (pH 7,4)
	10 mM	MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	
	20 mM	Glucose	
2x TY-Medium	16 g	Trypton	
	10 g	Yeast-Extract	
	5 g	NaCl	
			pH 7,4

#### 2.3.1.1 Antibiotika für bakterielle Kulturmedien

**Tab. 2.3:** In der vorliegenden Arbeit verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Lösungsmittel	Stammlösung (mg/ml)	Selektion für <i>E.coli</i> (µg/ml)
Ampicillin (Ap)	H <sub>2</sub> O	100	100
Tetracyclin (Tet)	70% Ethanol	20	20



### 2.3.2 Kulturmedien für Säugetierzellen

Bezugsquelle	Kulturmedium
Biochrom	RPMI 1640
Invitrogen	AIM-V; DMEM; IMDM; RPMI 1640

#### 2.3.2.1 Zusätze für Kulturmedien für Säugetierzellen

Bezugsquelle	Substanz
Biochrom	L-Glutamin (20 mM)
Invitrogen	AB-Serum; FCS, hitzeinaktiviert

## 2.4 Puffer und Lösungen

Agarosegel-Ladepuffer	0,03 % (w/v) Bromphenolblau 40 % (v/v) Glycerin 117 mM EDTA
Agarose-Lösung, 0,8-1,5 % (w/v)	Agarose in TBE-Puffer aufkochen
Cell Dissociation Solution	0,04 M Tris-HCl 1 mM EDTA 0,15 M NaCl pH 7,4
Einfriermedium	10% (v/v) DMSO 50% (v/v) FCS 40% (v/v) Kulturmedium (z. B.: RPMI) bei -20°C lagern
ELISA-Biotinylated Antibody Buffer	PBS 1% (w/v) BSA
ELISA-Coating Buffer	PBS, pH 7,2-7,4
ELISA-HRP Streptavidin Buffer	PBS 0,1% (v/v) Tween20 1% (w/v) BSA
ELISA-Saturation Buffer	PBS 5% (w/v) BSA
ELISA-Standard Diluent Buffer	PBS 1% (w/v) BSA

ELISA-Waschpuffer	PBS 0,05% (v/v) Tween20
FACS-Puffer	Stammlösung: 4 g            NaN <sub>3</sub> 20 ml          PBS  Gebrauchslösung: 5 ml           Stammlösung 5 ml           HSA (20%) 1000 ml       PBS
MACS-Puffer	500 ml        PBS 0,5%          HSA 2 mM          EDTA
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	0,1% (v/v)   DEPC 500 ml        bidest. H <sub>2</sub> O ü/N bei RT oder 12 h bei 37°C, danach autoklavieren
Paraformaldehyd (1%, w/v)	1 g            Paraformaldehyd ad. 100 ml    PBS Die Lösung wurde auf 70°C im Wasserbad erwärmt und als Gebrauchslösung 1:10 mit PBS verdünnt.
TBE (10x)	108 g          Tris-Base 9,3 g          EDTA 55 g          Borsäure

## 2.5 Enzyme und Chemikalien

### 2.5.1 Enzyme

<b>Bezugsquelle</b>	<b>Enzym</b>
Applied Biosystems	AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase; DNA Sequencing Kit Big Dye 3.0
Invitrogen	M-MLV Reverse Transkriptase
MBI Fermentas	T4 DNA Ligase
New England Biolabs	Restriktionsendonuklease; T4 DNA Ligase; β-Agarase
Promega	CIAP; DNA Polymerase I großes (Klenow) Fragment
Qiagen	Taq DNA Polymerase

### 2.5.2 Restriktionsendonukleasen und Puffer

Enzym (Fa. NEB)	Reaktionspuffer	Erkennungssequenz
<i>Bam</i> HI	NEBuffer <i>Bam</i> HI +BSA	G/GATCC
<i>Eco</i> RI	NEBuffer <i>Eco</i> RI	G/AATTC
<i>Hpa</i> I	NEBuffer 4	GTT/AAG
<i>Nco</i> I	NEBuffer 4	C/CATGG
<i>Sfi</i> I	NEBuffer 2 +BSA	GGCCNNNN/NGGCC
<i>Sna</i> BI	NEBuffer 4 +BSA	TAC/GTA
<i>Xba</i> I	NEBuffer 2 +BSA	T/CTAGA

### 2.5.3 Chemikalien

Bezugsquelle	Substanz
Amersham Pharmacia	dNTP; RNAGuard™ (RNase Inhibitor)
AppliChem	Trypton; Yeast-Extract
Applied Biosystems	TSR
Behring	HSA, 20%
Biochrom	BIOCOLL Separation Solution (Dichte: 1,077 g/ml); Trypsin/EDTA-Lösung
Invitrogen	PBS (Dulbecco's, ohne Ca, Mg und Na-Bicarbonat); DTT; TRIZOL™-Reagenz; Trypanblau
Leo	Protaminsulfat (10 mg/ml)
Merck	Glyzerin (87%)
MBI Fermentas	DNA Marker
Novagen	GeneJuice™ Transfektionsreagenz; Pellet Paint™
Perkin Elmer	Na <sub>2</sub> <sup>51</sup> CrO <sub>4</sub>
Roche	Rituximab (MabThera™)
Roth	Ethidiumbromid (10 mg/ml); Ethanol, 70% und 98% (v/v)
Serva	Agarose; PFA; SDS
Sigma	Agarose (low melting); BSA; DEPC; EDTA; TritonX-100; Tween20
Takara	RetroNectin™
Wallac	Optiphase „Super Mix“

### 2.5.4 Kommerzielle Kits

Bezugsquelle	Kit
Diaclone	IFN-γ Eli-pair
Genomed	Jetquick Gel Extraction Kit
Qiagen	EndoFree™ Plasmid Maxi Kit Oligotex™ mRNA Mini Kit QIAfilter™ Plasmid Midi Kit QIAprep™ Spin Miniprep Kit QIAquick™ Gel Extraction Kit QIAquick™ PCR Purification Kit
Zymo Research	Z-Competent <i>E. coli</i> Transformation Kit

## 2.6 Oligonukleotid-Primer

<b>Primer</b>	<b>Nukleotidsequenz</b>
BI4A	AGT CTA ACG TTC GGC CCC AGC GGC CCC ATA GAC TGA TGG GGG TGT CGT TTT
BI3LINK	GGC TCG GGC GGT GGT GGG TCG GGT GGC SAG GTG AAG CTT CAG SAG TCW GGA CCT AGC CTG GTG
BI3LINK2	GGC TCG GGC GGT GGT GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCA SAG GTG AAG CTT CAG SAG TCW GGA CCT AGC CTG GTG
BI5LINK	GGC ACC CGA CCC ACC ACC GCC CGA GCC TGG GAA GAT GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC AGC
BI5LINK2	GCC ACC CGA CCC ACC ACC GCC CGA GCC ACC GCC ACC TGG GAA GAT GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC AGC
BI7SFI	ATG GCT CAG GGT TCG GCC GAC GTG GCC GAT RTT WTG MTG ACC CAA WCT CCA
BI8SFI	ATG GCT CAG GGT TCG GCC GAC GTG GCC GAT RTT GTK CTC ACY CAR TCT CCA GCA AT
3'CD33SnaBI	GAT CAC TAC GTA TGC GGC CGC CCG TTT
5'CD33XbaI	ACT GCT CTA GAG AGG TCA AGC TGC AGG AGT
3pRSV	CTT ATC ATG TCT GGA TCT AC
5pRSV3	TTG GGA TCG GGA CCT ACT
scFvCD33f	TGG CCC CGT GAA ACC TT
scFvCD33r	TGT TGC AGA TCC ACT GCC TG
3Zprox	TGC GCT CCT GCT GAA CTT
oligodT	Fa. Invitrogen
random hexamers	Fa. Invitrogen

## 2.7 Antikörper und Zytokine

### 2.7.1 Antikörper

<b>Bezugsquelle</b>	<b>Antikörper</b>
unmarkierte Antikörper:	
Amarsham Pharmacia	$\alpha$ -M13
BD Pharmingen	$\alpha$ -CD28; $\alpha$ -ICAM-1 (anti-CD54); $\alpha$ -LFA-1 (anti-CD11a)
Ortho Biotech	$\alpha$ -CD3 (OKT3)
markierte Antikörper für durchflusszytometrische Analysen:	
BD Pharmingen	$\alpha$ -CD3 PerCP; $\alpha$ -CD4 PE; $\alpha$ -CD4 PerCP; $\alpha$ -CD8 PE; $\alpha$ -CD8PerCP; $\alpha$ -CD20 PE; $\alpha$ -CD56 FITC; $\alpha$ -CD56 PE; GAM-FITC und entsprechende Isotyp-Kontrollen
Jackson	$\alpha$ -F(ab') <sub>2</sub> -Cy5
ImmunoResearch	$\alpha$ -F(ab') <sub>2</sub> -FITC
markierte Antikörper für magnetische Separationen:	
Miltenyi	CD56 „Micro Beads“

## 2.7.2 Zytokine

Bezugsquelle	Zytokin
Chiron	IL-2 (human, rekombinat)
Endogen	INF- $\gamma$ (human, rekombinat)
PeptoTec	IL-15 (human, rekombinat)

## 2.8 Kunststoffmaterialien

Bezugsquelle	Material
Amefa	Spritze, 20 ml
Becton & Dickinson	Kanülen; Messpipetten; 24-Multiwell-Platte, PS, nicht für Gewebekultur behandelt; Petrischalen; PS-Röhrchen, 5 ml
Biozym	Pipettenspitzen, steril, gestopft
Braun	Spritze, 50 ml
Eppendorf	Combitips; Pipettenspitzen
Greiner	Gewebekulturflaschen, und 75 cm <sup>2</sup> ; 96-Multiwell-Platten, Spitzboden und Rundboden; Petrischalen, Durchmesser 3,5 und 10 cm; PP-Röhrchen, 15 ml und 50 ml
Millipore	Filter Steritop <sup>TM</sup> , 150 ml, 0,22 $\mu$ m
Miltenyi	MidiMACS Trennsäule, Typ LS; Vorfilter
Nalge Company	Nalgene <sup>TM</sup> Filter, 0,45 $\mu$ m
Nunc	Einfrierröhrchen; 6-, 24- und 48-Multiwell-Platten, PS
Schleicher & Schüll	Filter, 0,2 $\mu$ m, steril
TSK Laboratory	Kanülen
Wallac	1450 Flexible 96 Plate; Sealing tape; 96-well Sample Plate;

## 2.9 Kultivierung von Bakterienstämmen

### 2.9.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

*E.coli*-Stämme wurden auf festem oder in flüssigem Medium unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika bei einer Temperatur von 37 °C im Brutschrank ü/N inkubiert, nachdem 1-3 ml Flüssigmedium oder Agarplatten mit Einzelkolonien beimpft worden waren. Flüssigkulturen wurden in einer Rollvorrichtung inkubiert.

### 2.9.2 Kryokonservierung von Bakterienkulturen

Bakterien einer ü/N-Kultur (Agar-Platte) wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und anschließend in 0,4 ml LB-Medium resuspendiert. Zu der Suspension wurde 0,6 ml Glycerin (87%, steril) gegeben. Die Lagerung erfolgte bei - 80°C. Die Bakterien dieser Kultur sind Monate bis Jahre lebensfähig.

### 2.9.3 Titerbestimmung von Bakterien in Flüssigkultur

Das Wachstum von Bakterien in Flüssigkultur wurde durch die Messung der optischen Dichte (o.D. = Extinktion) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 580$  nm mittels Photometer überprüft. Als Referenz diente das jeweilige sterile Nährmedium, in dem die Bakterien kultiviert wurden. Bei *Escherichia coli* entspricht eine o.D. von 0,1 einem Lebendtitert von ca.  $2 \times 10^7$  Zellen/ml.

## 2.10 RNA-Isolierung

### 2.10.1 Gesamt-RNA-Isolierung

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min bei 420g, RT) pelletiert. Zu dem Zellpellet wurde 1 ml TRIZOL<sup>™</sup>-Reagenz (Fa. Invitrogen) pro  $5-10 \times 10^6$  Zellen gegeben. Der Ansatz wurde 5 min bei RT inkubiert (oder bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren, um am nächsten Tag die Isolierung weiterzuführen). Pro 1 ml TRIZOL<sup>™</sup>-Reagenz wurden 0,2 ml Chloroform zugegeben. Der Ansatz wurde 2-3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 15 min bei 12000g ( $2-8^\circ\text{C}$ ) zentrifugiert und die wässrige Phase (oben, enthält RNA) abgenommen. Zu der wässrigen Phase wurde 1,5  $\mu\text{l}$  Pellet Paint<sup>™</sup> und 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 8,0) pipettiert. Pro 1 ml TRIZOL<sup>™</sup>-Reagenz wurde 0,5 ml Isopropanol zugegeben (RNA-Fällung). Der Ansatz wurde 10 min bei RT inkubiert und anschließend 10 min bei 12000g ( $2-8^\circ\text{C}$ ) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und pro 1 ml TRIZOL<sup>™</sup>-Reagenz 1 ml Ethanol (75%, v/v) zugegeben (Waschschritt). Der Ansatz wurde 5 min bei 7500g ( $2-8^\circ\text{C}$ ) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das RNA-Pellet wurde kurz bei RT getrocknet (nicht vollständig, da sonst die Löslichkeit der RNA abnimmt) und in nuklease-freiem  $\text{H}_2\text{O}$  oder SDS-Lösung (0,5%, w/v) resuspendiert. Die Qualität der RNA wurde photometrisch bestimmt. Reine RNA weist eine o.D.<sub>260</sub>/o.D.<sub>280</sub>-Ratio von 1,8-2,1 auf. Die RNA wurde bei  $-80^\circ$  gelagert.

### 2.10.2 Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA

Nachdem die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert worden war, wurde aus dieser Präparation die mRNA isoliert. Die mRNA-Isolierung wurde mit dem Oligotex™ mRNA Mini Kit (Fa. Qiagen) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

## 2.11 Reverse Transkription

Das Enzym Reverse Transkriptase nutzt eine einzelsträngige RNA-Probe als Matrize für die Synthese eines komplementären DNA-Stranges in Anwesenheit eines Primers. Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase (M-MLV RT) synthetisiert „first-strand“ cDNA bis zu 7 kb.

Reaktionsansatz:

	1x
first strand buffer (5 x)	4 µl
100 DTT (100 mM)	2 µl
dNTP Mix (80 mM)	1 µl
random hexamer oder oligo dT (100 pM)	1 µl
BSA-Lösung (1 mg/ml)	2 µl
RNAguard (10 U/µl)	1 µl
M-MLV RT (200 U/µl)	1 µl
	12 µl

Zu dem Reaktionsansatz wurde 1 µl RNA gegeben und das Volumen mit nuklease-freiem H<sub>2</sub>O auf 20 µl ergänzt. Der Reaktionsansatz wurde 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend 5 min bei 95°C erhitzt. Der Reaktionsansatz wurde auf Eis gekühlt, und die cDNA bei -20°C gelagert. Eine weitere Reinigung der cDNA war nicht erforderlich.

## 2.12 DNA-Isolierung

### 2.12.1 Isolierung von Plasmid-DNA mit dem QIAprep™ Spin Miniprep Kit

Diese Methode wurde zur Isolierung von kleinen Mengen hochreiner Plasmid-DNA angewendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben (Fa. Qiagen).

### **2.12.2 Isolierung von Plasmid-DNA mit dem QIAfilter™ Plasmid Midi Kit**

Diese Methode wurde zur Isolierung von großen Mengen (bis 100 µg) hochreiner Plasmid-DNA angewendet. Die Präparation wurde nach Herstellerangaben mit folgenden Modifikationen durchgeführt:

Nachdem die DNA-Eluierung durchgeführt worden war, wurde das DNA-Eluat à 833 µl in Eppendorfgefäßen aliquotiert. Pro Eppendorfgefäß wurde 583 µl Isopropanol (0,7 Vol.) zugegeben (DNA-Präzipitation). Nach der Zentrifugation (5 min bei 10000g, RT) wurde der Überstand verworfen. Pro Eppendorfgefäß wurde 300 µl Ethanol (70%, v/v) zugegeben (Waschschritt). Die Eppendorfgefäße wurden 5 min bei 10000g (RT) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde 10-15 min bei 60°C getrocknet und anschließend in 20 µl bidest. H<sub>2</sub>O oder EB-Puffer pro Eppendorfgefäß resuspendiert. Die DNA-Suspensionen wurden 5 min bei RT oder 37°C inkubiert und anschließend vereinigt. Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4°C oder -20°C.

### **2.12.3 Isolierung endotoxin-freier Plasmid-DNA mit dem EndoFree™ Plasmid Maxi Kit**

Diese Methode wurde zur Isolierung von großen Mengen (bis 500 µg) hochreiner endotoxin-freier Plasmid-DNA angewendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben (Fa. Qiagen) mit den in Kapitel 2.12.2 erläuterten Modifikationen.

## **2.13 DNA-Reinigung und -Konzentrierung**

### **2.13.1 DNA-Reinigung mit dem QIAquick™ PCR Purification Kit**

Die Reinigung der PCR- und Restriktions-Ansätze wurde nach den Herstellerangaben (Fa. Qiagen) durchgeführt.

### **2.13.2 Alkoholfällung**

Mit einer Alkoholfällung (Ethanol oder Isopropanol) kann DNA auf einfache Weise konzentriert oder gereinigt werden. In Anwesenheit von Alkohol und einwertigen Kationen (Na<sup>+</sup>) wird der DNA das Hydratwasser entzogen, und sie bildet ein Präzipitat, das sich durch Zentrifugation pelletieren läßt. Ethanol wird zur Konzentrierung kleiner Volumina und Isopropanol zur Konzentrierung großer Volumina eingesetzt.



### **2.13.2.1 Ethanol-Fällung**

Zu 1 Vol. DNA-Lösung wurden 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat, pH 8,0 und 2 Vol. Ethanol (96%, v/v), 4°C, gegeben und invertiert. Nach einer Inkubationsdauer von 30-45 min bei -80°C (oder ü/N bei -20°C) wurde die Lösung 15 min bei 10000g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das DNA-Pellet zweimal mit jeweils 500 µl Ethanol (70 %, v/v) gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte jeweils 5 min bei 10000g (4°C). Der Überstand wurde verworfen. Das DNA-Pellet wurde getrocknet (ca. 15 min bei RT) und in TE-Puffer (pH 8,0) oder bidest. H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **2.13.2.2 Isopropanol-Fällung**

Zu 1 Vol. DNA-Lösung wurden 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat, pH 8,0 und 2 Vol. Isopropanol (96%, v/v), 4°C, gegeben und invertiert. Die Lösung wurde 30 min bei 10000g (4°C) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde einmal mit 500 µl Ethanol (70 %, v/v) gewaschen und 15 min bei 10000g (4°C) zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurde das DNA-Pellet getrocknet (ca. 15 min bei RT) und in TE-Puffer (pH 8,0) oder bidest. H<sub>2</sub>O resuspendiert.

## **2.13.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

### **2.13.3.1 DNA-Isolierung mit dem Jetquick Gel Extraction Kit**

Das erforderliche DNA-Gelstück wurde mit einem Skalpell exakt ausgeschnitten, gewogen (maximales Gewicht pro Extraktion: 400 mg) und in ein Eppendorfgefäß überführt. Pro 100 mg Gel wurde 300µl Lösung L1 zugegeben. Während einer 15-minütigen Inkubation bei 50°C [bei größeren Gelstücken (>300 mg) Inkubationszeit auf 20-30 min verlängern] wurde das Eppendorfgefäß im Abstand von 3 min invertiert. Die Elutionssäule wurde in ein Eppendorfgefäß gegeben und die Säule beladen (maximale Kapazität: 700 µl). Die Säule wurde 2 min bei 10000g (RT) zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Bei Gelstücken >250 mg wurde 500 µl Lösung L1 zugeben (zusätzlicher Waschschrift). Die Säule wurde 1 min bei RT inkubiert und 2 min bei 10000g (RT) zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. 500 µl Lösung L2 wurde zugegeben (Waschschrift). Die Säule wurde 5 min bei RT inkubiert und 2 min bei 10000g (RT) zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule in ein neues

Eppendorfgefäß überführt. Danach wurde sie 2 min bei 10000g (RT) zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die Säule wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 1-2 min bei 60-65°C inkubiert. Auf ihre Mitte wurde 30-50 µl temperiertes (ca. 60°C) bidest. H<sub>2</sub>O oder temperierter Puffer (10 mM Tris-HCl; pH 8,0) pipettiert. Die Säule wurde 1 min bei RT inkubiert und 4 min bei 10000g (RT) zentrifugiert (DNA-Eluierung). Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4-8°C (für 5-7 Tage) bzw. bei -20°C.

### 2.13.3.2 DNA-Isolierung mit dem QIAquick Gel Extraction Kit

Die DNA-Präparation der ausgeschnittenen Agarosegel-Banden erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Fa. Qiagen).

### 2.13.3.3 DNA-Isolierung durch β-Agarase-Behandlung

Die DNA-Isolierung der ausgeschnittenen Agarosegel-Banden („low melting“-Agarose) wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt.

## 2.14 Techniken zur Charakterisierung von DNA-Molekülen

### 2.14.1 Hydrolyse von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsspaltungen wurden nach den für jedes Enzym spezifischen, vom Hersteller (Fa. New England Biolabs) empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Die für jedes Enzym optimale Ionenbedingung wurde durch Zugabe der entsprechenden Menge 10fach konzentrierten Reaktionspuffers eingestellt. Für die optimale Aktivität benötigten einige Enzyme BSA.

Reaktionsansatz:

	<b>1x</b>
Restriktionspuffer (10x)	4 µl
BSA (10x), ggfs.	4 µl
Restriktionsendonuklease	2 µl
bidest. H <sub>2</sub> O	ad 40 µl
	40 µl

Der Reaktionsansatz wurde 1-2 h oder ü/N bei dem Temperaturoptimum (37°C, 50°C) des jeweiligen Enzyms inkubiert. Bei Mehrfachrestriktionen wurde als Zwischenschritt

eine DNA-Reinigung durch Säulen-Eluierung (Kapitel 2.13.1) oder Agarosegel-Extraktion durchgeführt (Kapitel 2.13.3).

### 2.14.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung und Charakterisierung von DNA (nach Isolierung oder Restriktion). Aufgrund der Phosphatreste ist DNA negativ geladen und kann daher im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von Größe und Konformation der Moleküle [single strand (ss), double strand (ds), linear, open circle (oc), covalently closed circle (ccc)], der Konzentration des Agarosegels und der Stärke des elektrischen Feldes. Die verwendete Agarose-Konzentration von 0,5-1,5 % (w/v) richtet sich nach der erwarteten Größe der DNA bzw. der Restriktionsfragmente (siehe Tab. 2.4).

**Tab. 2.4** : Geeignete Agarose-Konzentrationen bzgl. aufzutrennender Fragmentgrößen

Agarose-Konzentration (%)	aufzutrennende Fragmentgrößen (kb)
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3

In dieser Arbeit wurden 0,8-1,5%ige Agarosegele verwendet. Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte in mit TBE-Puffer gefüllten Horizontalgelkammern (Sub-Cell™ GT Agarosegel-Elektrophoresesysteme, Fa. Biorad).

0,8-1,5% Agarose wurde in TBE-Puffer in der Mikrowelle bis zum Siedepunkt erhitzt. Nachdem die Lösung auf ca. 50°C abkühlt war, wurde 1 µl Ethidiumbromidlösung zugegeben. Die Lösung wurde in einen Gelträger gegossen und anschließend ein Kamm eingesetzt. Nach der Auspolymerisierung des Gels (ca. 20 min) wurde der Gelträger in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt und der Kamm entfernt. Die DNA-Proben wurden mit 5 µl Gel-Ladepuffer versetzt und die Geltaschen mit den Proben beladen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100 bis 130 Volt für 1,5 bis 2,5 h (analytische Gele) bzw. 4 bis 5 h (präparative Gele) bzw. 5-10 V/cm. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die DNA-Moleküle im UV-Licht ( $\lambda = 366$  nm für präparative und  $\lambda = 254$  nm für analytische Gele) durch den interkalierenden und

fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid als Banden sichtbar gemacht. Das Gel wurde mit einer CCD-Kamera (Gerät Gel Doc 2000, Fa. Biorad) fotografiert.

### 2.14.3 Bestimmung des Molekulargewichts von DNA-Fragmenten

Die Mobilität von linearen DNA-Fragmenten ist im elektrischen Feld umgekehrt proportional zum natürlichen Logarithmus ihrer Molekulargewichte. Durch Vergleiche mit Mobilitäten bekannter Größenstandards in Agarosegelen können die unbekanntes Größen der DNA-Fragmente ermittelt werden. Außerdem kann die Quantität einzelner DNA-Banden durch den Vergleich mit Massenstandards abgeschätzt werden. Als Größenstandards wurden DNA-Marker der Fa. MBI Fermentas eingesetzt: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fragmentgrößen: 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp) und GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fragmentgrößen: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp). Als Massen- und Größenstandard wurde der MassRuler™ DNA Ladder, High Range, (Fragmentgrößen/Quantitäten: 10000/200, 8000/160, 6000/120, 5000/100, 4000/80, 3000/60, 2500/50, 2000/40, 1500/32 bp bzw. ng/20 µl) der Fa. MBI Fermentas eingesetzt.

### 2.14.4 Photometrische Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei  $\lambda = 260$  nm gegen das Lösungsmittel bestimmt. Dabei gelten folgende Standardwerte für die Ermittlung der Konzentration (Sambrook *et al.*, 1989):

dsDNA: o.D.<sub>260</sub>=1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml

Oligonukleotide: o.D.<sub>260</sub>=1 entspricht einer Konzentration von 33 µg/ml

ssDNA oder RNA: o.D.<sub>260</sub>=1 entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml

Um die Reinheit der DNA zu beurteilen, wurde die Konzentration von Proteinen photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei  $\lambda = 280$  nm gegen das Lösungsmittel bestimmt. Der Quotient  $\text{o.D.}_{260}/\text{o.D.}_{280}$  ist ein Maß für die Verunreinigung der DNA mit Proteinen und sollte bei reiner DNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### 2.14.5 DNA-Sequenzierung

Für DNA-Sequenzierungen werden heute im Wesentlichen zwei unterschiedliche Verfahren angewendet: die Maxam-Gilbert-Technik (Maxam und Gilbert, 1980) oder die enzymatische Didesoxy-Sequenzierung (Sanger *et al.*, 1977).

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Nukleotidsequenzen wurden nach der Didesoxymethode mit dem Terminator Sequencing Kit Big Dye 3.0 (Fa. Applied Biosystems) am Gerät ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Fa. Applied Biosystems) durchgeführt. Diese Methode beruht auf der enzymatisch gesteuerten Replikation eines DNA-Stranges und einem Kettenabbruch. Ausgehend von einem Primer wird durch DNA-Polymerase der zum Matrizenstrang komplementäre Strang synthetisiert. Bausteine hierfür sind die vier Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs). Zusätzlich enthält jeder der vier Reaktionsansätze eine der vier basenanalogen 2',3'-Didesoxynukleotide (ddNTPs), deren Einbau das weitere Wachstum der Kette blockiert, da sich keine Phosphodiesterbindung ausbilden kann. Die Basenanaloga sind mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert. So entstehen Fragmente verschiedener Länge, die gelelektrophoretisch aufgetrennt werden können. Das Bandenmuster der vier Bahnen kann durch einen 4-Farben-Laser detektiert und somit die Sequenz der Nukleotide ermittelt werden.

Reaktionsansatz:

	1x
DTRM (dye terminator reaction mix)	1 µl
DTRM-Puffer (5x)	1 µl
bidest. H <sub>2</sub> O	ad 10 µl
DNA	60-360 ng
Primer (25 µM)	1 µl
	10 µl

Die Sequenzierungs-PCR erfolgte in Cyclern der Fa. MWG Biotech (MWG Biotech Primus) und Fa. Whatman (Biometra T Gradient) nach folgendem Protokoll:

96°C	7 min
96°C	20 s
45-60°C (T abhängig vom Primer)	60 s    35x wiederholen
60°C	4 min
4°C	∞

Anschließend wurde eine DNA-Präzipitation durchgeführt.

Reaktionsansatz:

	<b>1x</b>
PCR-Produkt	10 µl
bidest. H <sub>2</sub> O	80 µl
Na-Acetat (3 M, pH 4,6)	10 µl
Ethanol (98%, v/v)	250 µl
Dextran Blue	1 µl

Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 10000g (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 250 µl Ethanol (70%, v/v) gewaschen. Nach der Zentrifugation (15 min bei 10000g, RT) wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet getrocknet. Das trockene DNA-Pellet wurde in 20 µl TSR (Template Supression Reagent) resuspendiert und 2 min bei 95°C erhitzt. Die DNA wurde 2 min auf Eis gekühlt und entweder sofort in die Sequenzierungs-Analytik (ABIprism310) eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

## **2.15 Klonierungen von DNA-Fragmenten**

### **2.15.1 Behandlung von Vektoren mit alkalischer Phosphatase**

Durch die Behandlung mit alkalischer Phosphatase (CIAP = calf intestinal alkaline phosphatase) wird die Religation linearisierter Vektoren vermieden, die nur mit einem Restriktionsenzym hydrolysiert wurden. Die Kalkulierung der Endstückmenge [pmol] von linearer dsDNA erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Menge DNA } [\mu\text{g}]}{\text{Größe Vektor (kb)}} \times 3,04 = \text{Endstückmenge [pmol]}$$

CIAP (1 U/µl) wurde 1:100 in nuklease-freiem H<sub>2</sub>O verdünnt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte über Agarosegel-Extraktion oder Säulen-Eluierung (Kapitel 2.13.1 und 2.13.3) und wurde mit 35 µl bidest. H<sub>2</sub>O durchgeführt.

Reaktionsansatz:

	<b>1x</b>
CIAP Puffer (10x)	5 $\mu$ l
CIAP (0,01 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l pro Endstückmenge [pmol]
Plasmid-DNA	30 $\mu$ l
bidest H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ l
	50 $\mu$ l

Für Schnittstellen mit „sticky ends“ wurde der Reaktionsansatz 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung des Enzyms für 20 min bei 65°C. Für Schnittstellen mit „blunt ends“ oder „blunt/sticky ends“ wurde der Reaktionsansatz 15 min bei 37°C inkubiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 56°C wurde nochmals CIAP zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 15 min bei 37°C und anschließend 15 min bei 56°C inkubiert. Die DNA-Reinigung wurde durch Säulen-Eluierung (Kapitel 2.13.1) mit 35  $\mu$ l bidest. H<sub>2</sub>O ausgeführt.

### 2.15.2 Auffüllung von 5'-Überhängen von DNA-Restriktionsfragmenten

Enzym: Großes Fragment (Klenow) der DNA Polymerase I

Die Plasmid-DNA wurde gereinigt (Kapitel 2.13.1 und 2.13.3) und mit ca. 35  $\mu$ l bidest. H<sub>2</sub>O eluiert.

Reaktionsansatz:

	<b>1x</b>
DNA Polymerase Puffer (10x)	5 $\mu$ l
BSA (10x)	5 $\mu$ l
dNTP (1 mM)	2 $\mu$ l
Enzym (5U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
DNA (in bidest.H <sub>2</sub> O)	30 $\mu$ l
bidest. H <sub>2</sub> O	7 $\mu$ l
	50 $\mu$ l

Der Reaktionsansatz wurde 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Enzym 15 min bei 75°C inaktiviert. Die anschließende DNA-Aufreinigung erfolgte mit dem Qiagen PCR Purification Kit. Die Eluierung wurde mit 35  $\mu$ l bidest. H<sub>2</sub>O durchgeführt.

### 2.15.3 Ligation von DNA-Restriktionsfragmenten

Insert- und Vektor-Restriktionsfragmente, die durch die Ligasereaktion miteinander verknüpft werden sollten, wurden nach der Restriktion der DNA und Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen in unterschiedlichen Insert/Vektor-Ratios in die Ligation eingesetzt. Geeignete Insert/Vektor-Ratios waren 5:1, 10:1 und 20:1. Die erforderliche Insert/Vektor-Ratio wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Größe Insert (kb)} \times \text{Menge Vektor (ng)} \times \text{Ratio (Insert/Vektor)}}{\text{Größe Vektor (kb)}} = \text{Menge Insert (ng)}$$

Reaktionsansatz für T4 DNA Ligase (Fa. New England Biolabs), der ü/N bei 16°C inkubiert wurde:

	<b>1x</b>
Insert-DNA/Vektor-DNA mit bestimmter Ratio	x µl
Ligase-Puffer (10x)	1 µl
T4 DNA Ligase (400 U/µl)	1 µl
bidest. H <sub>2</sub> O	ad 10 µl
	10 µl

Reaktionsansatz für T4 DNA Ligase (Fa. MBI Fermentas):

	<b>1x</b>
Insert-DNA/Vektor-DNA mit bestimmter Ratio	x µl
Ligase-Puffer (10x)	2 µl
T4 DNA Ligase (1000 U/µl)	2 µl
bidest. H <sub>2</sub> O	ad 20 µl
	20 µl

Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 22°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend 10 min bei 65°C inaktiviert.

## 2.16 Transformation von Bakterien

### 2.16.1 Transformation durch Hitzeschock

In dieser Arbeit wurden für Transformationen durch Hitzeschock die kommerziell verfügbaren kompetenten *Escherichia coli*-Stämme DH5α und DH10B verwendet (Fa. Invitrogen), so dass eine Präparation kompetenter Zellen nicht erforderlich war.



### **2.16.1.1 Transformation kompetenter *Escherichia coli*-Zellen**

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, sorgfältig gemischt und à 20 µl aliquotiert. Nicht benötigte Aliquots wurden in ein Trockeneis/Ethanolbad gegeben (5 min) und bei -80°C kryokonserviert.

Pro Transformations-Ansatz wurde ein Aliquot kompetenter Zellen (20 µl) aufgetaut. Pro Aliquot wurde 1-10 ng DNA zugegeben. Der Transformations-Ansatz wurde gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock (45 s bei 42°C) wurde der Ansatz 2 min auf Eis inkubiert. Zu den Zellen wurde 1 ml S.O.C.- oder LB-Medium pipettiert. Die Zellsuspension wurde 1 h bei 37°C inkubiert (Rotations-Inkubator, 225 rpm). Die Zellsuspension wurde 1 min bei 10000g (RT) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet im Rücklauf resuspendiert. Die Zellen wurden auf entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert und ü/N bei 37°C inkubiert.

### **2.16.2 Transformation durch Z-Kompetenz**

In dieser Arbeit wurde das Z-Competent *E. coli* Transformation Kit der Fa. Zymo Research verwendet. Die *Escherichia coli*-Stämme DH5α und DH10B wurden transformiert.

#### **2.16.2.1 Präparation z-kompetenter *Escherichia coli*-Zellen**

In einem 500 ml-Erlenmeyerkolben wurde 50 ml SOB-Medium mit 500 µl einer frischen ü/N *Escherichia coli*-Kultur (LB-Medium) angeimpft. Die Kultur wurde 10-36 h bei RT inkubiert (Rotations-Inkubator, 225 rpm) bis eine o.D. von 0,4-0,6 erreicht worden war. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis ausgeführt. Sowohl die Puffer als auch die Zentrifuge wurden auf 4°C gekühlt. Die Bakterienkultur wurde 10 min auf Eis gekühlt und anschließend 6 min bei 3000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet sorgfältig in 5 ml Waschpuffer resuspendiert. Die Suspension wurde 6 min bei 3000g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde sorgfältig in 5 ml Kompetent-Puffer resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden à 20 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

#### **2.16.2.2 Transformation z-kompetenter *Escherichia coli*-Zellen**

Pro Transformations-Ansatz wurde ein Aliquot kompetenter Zellen (20 µl) aufgetaut. Pro Aliquot wurde 1-5 µl DNA zugegeben und der Ansatz sorgfältig gemischt. Die

Zellen wurden 15-60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf eine Platte mit vorgewärmten Selektionsmedium (37°C) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte ü/N bei 37°C.

### 2.16.3 Ermittlung der Transformations-Effizienz

100 µl kompetente Zellen wurden mit 50 pg pUC19-DNA transformiert wie in Kapitel 2.16.1.1 bzw 2.16.2.2 beschrieben. Der Transformations-Ansatz wurde 1:100 mit Kulturmedium verdünnt und 100 µl von dieser Verdünnung auf eine LB-Selektionsplatte (+Ampicillin, 100µg/ml) ausplattiert. Die Platte wurde ü/N bei 37°C inkubiert. Die Transformations-Effizienz (erwartet:  $>1,0 \times 10^7$  CFU/µg) wurde nach folgender Formel berechnet (CFU=colony forming unit):

$$\text{CFU}/\mu\text{g} = \frac{\text{CFU auf der Platte} \times 1 \times 10^6 \text{ pg} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{pUC19-DNA (pg)} \times \mu\text{g}}$$

## 2.17 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Amplifikation der DNA erfolgte in Cyclern der Fa. MWG Biotech (MWG Biotech Primus) und Fa. Whatman (Biometra T Gradient).

### 2.17.1 PCR mit AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase

Dieses Enzym ist eine „Hotstart-Taq“ (Fa. Applied Biosystems). Um unspezifische Reaktionen vor Beginn der PCR zu vermeiden, ist ihre enzymatische Aktivität durch ein Molekül blockiert, das erst nach Erhitzung auf 95°C (10 min) abgespalten wird.

Reaktionsansatz:

	1x
PCR-Puffer (10x)	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 µl
dNTP (10 mM)	1,25 µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
bidest. H <sub>2</sub> O	ad 47 µl
	47 µl
sense Primer (25 µM)	1 µl
antisense Primer (25 µM)	1 µl
cDNA	1 µl
	50 µl

**PCR-Protokoll:**

94°C Hotstart	10 min
94°C	45 s
55-60°C (T abhängig vom Primerpaar)	60 s      35x wiederholen
72°C	60 s
72°C	10 min
4°C	∞

**2.17.2 PCR mit *Taq* DNA Polymerase**

Dieses Enzym (Fa. Qiagen) hat keinen „Hotstart“ (Kapitel 2.17.1).

Reaktionsansatz:

	<b>1x</b>
PCR-Puffer (10x)	5 µl
dNTP (10 mM)	1,25 µl
<i>Taq</i> Polymerase (5 U/µl)	1 µl
bidest. H <sub>2</sub> O	ad 47 µl
	47 µl
sense Primer (25 µM)	1 µl
antisense Primer (25 µM)	1 µl
cDNA	1 µl
	50 µl

**PCR-Protokoll:**

94°C Denaturierung	4 min
94°C	45 s
55-60°C (T abhängig vom Primerpaar)	60 s      35x wiederholen
72°C	60 s
72°C	10 min
4°C	∞

**2.17.3 „splicing by overlap“-PCR**

Aus zwei verschiedenen PCR-Produkten, die mit Primern amplifiziert worden sind, die komplementäre Regionen haben, kann in einer anschließenden PCR („splicing by overlap“-PCR) ein Amplifikat synthetisiert werden, das die beiden ursprünglichen PCR-Produkte vereint.

Reaktionsansatz:

	<b>1x</b>
PCR-Puffer (10x)	5 µl
dNTP (10 mM)	1,25 µl
<i>Taq</i> Polymerase (5 U/µl)	1 µl
PCR-Produkt 1	100 ng
PCR-Produkt 2	100 ng
bidest. H <sub>2</sub> O	ad 48 µl
	48 µl

Die Amplifikation erfolgte zunächst für 7 Zyklen (Protokoll in Kapitel 2.17.2) ohne Primer. Zum Reaktionsansatz wurde jeweils 1 µl Primer 1 (25 µM) und 1 µl Primer 2 (25 µM) pipettiert. Die fortgesetzte Amplifikation erfolgte für weitere 28 Zyklen (Protokoll in Kapitel 2.17.2).

## 2.18 ELISA für INF- $\gamma$ -Bestimmungen

### 2.18.1 Koinkubation der Effektor- und Targetzellen

Effektor- und Targetzellen wurden 5 min bei 420g (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets anschließend in jeweils 5 ml Medium [AIM-V/ 2% AB-Serum/ 2 mM L-Gln] resuspendiert. Die Effektorzellen wurden auf eine Konzentration von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml und die Targetzellen auf eine Konzentration von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Die Targetzellen wurden mit 30 Gray bestrahlt. In eine 96-Multiwell-Platte (Rundboden) wurden pro well je 100 µl der beiden Zellsuspensionen pipettiert (Ratio Effektor- zu Targetzellen 1:3). Als negative Kontrollen wurden die Effektor- und Targetzellen jeweils separat mit 100 µl Medium pro well inkubiert. Die Koinkubation von Effektor- und Targetzellen erfolgte 72 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurde 140 µl Überstand pro well entnommen. Diese Überstände wurden direkt für die INF- $\gamma$ -Bestimmungen eingesetzt oder bei -80°C gelagert, um die INF- $\gamma$ -Bestimmung später durchzuführen.

### 2.18.2 Durchführung der INF- $\gamma$ -Bestimmung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Kit der Fa. Dianova (INF- $\gamma$  Eli-pair) verwendet. Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden nach Herstellerangaben angesetzt. Der ELISA wurde ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführt.

## **2.19 Kultivierung von Säugetierzellen**

### **2.19.1 Kultivierung von Suspensions- und adhärenenten Zellen**

Die Zellen wurden in geeigneten Kunststoffgefäßen (Gewebekulturflaschen oder Multiwell-Platten) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Feuchtbrutschrank (Fa. Heraeus) kultiviert. Wenn nicht anders angegeben, wurde das Kulturmedium RPMI 1640 (10% FCS/ 2 mM L-Gln) verwendet. Das Kulturvolumen richtete sich nach der Größe des Zellkulturgefäßes.

### **2.19.2 Mediumwechsel von Zellen**

#### **2.19.2.1 Mediumwechsel von Suspensionszellen**

Zellkulturen, deren Kulturmedium verbraucht war (pH-Indikator des Kulturmediums verfärbte sich von rot nach gelb-orange), wurden in ein Röhrchen überführt. Die Zellen wurden 5 min bei 420g (RT) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in entsprechendem Kulturmedium resuspendiert und in geeigneten Zellkulturgefäßen kultiviert.

#### **2.19.2.2 Mediumwechsel adhärenenter Zellen**

##### **Mediumwechsel adhärenenter Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung**

Das verbrauchte Kulturmedium (pH-Indikator des Kulturmediums verfärbte sich von rot nach gelb-orange) wurde aus der Gewebekulturflasche entnommen und verworfen. Zu den adhärenenten Zellen wurde 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung pipettiert. Die Zellen wurden 3-5 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert (abhängig vom Zelltyp eventuell länger) und die Ablösung der Zellen mikroskopisch kontrolliert. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 5-10 ml FCS-haltigem Kulturmedium inaktiviert und die Zellsuspension aus der Gewebekulturflasche in ein Röhrchen überführt. Die Zellen wurden 5 min bei 420g (RT) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in einem geeigneten Volumen Kulturmedium resuspendiert und in Zellkulturgefäßen kultiviert.

##### **Mediumwechsel adhärenenter Zellen mit „Cell Dissociation Solution“**

Für anschließende Oberflächenfärbungen von Zellen und empfindliche Zellen ist die Ablösung mit „Cell Dissociation Solution“ besser geeignet als die mit

Trypsin/EDTA-Lösung. Die Durchführung der Ablösung entsprach der mit Trypsin/EDTA-Lösung (siehe oben). Anstatt Trypsin/EDTA-Lösung wurde „Cell Dissociation Solution“ zu den Zellen gegeben.

### **2.19.3 Splitting von Zellen**

#### **2.19.3.1 Splitting von Suspensionszellen**

Zellkulturen, die eine zu hohe Zelldichte aufgewiesen haben, wurden in ein Röhrchen überführt. Die Zellen wurden 5 min bei 420g (RT) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 5-10 ml entsprechendem Kulturmedium resuspendiert. Abhängig vom Zelltyp wurde die Hälfte (Split 1:2) bis 9/10 (Split 1:10) dieser Suspension verworfen. Die restliche Suspension wurde in ein geeignetes Zellkulturgefäß überführt, mit dem entsprechenden Kulturmedium auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt und kultiviert.

#### **2.19.3.2 Splitting adhärenter Zellen**

Zellkulturen, die eine zu hohe Zelldichte aufgewiesen haben (z. B. konfluente Zellen), wurden in ein Röhrchen überführt. Die Ablösung der Zellen erfolgte wie in Kapitel 2.19.2.2 beschrieben mit Trypsin/EDTA-Lösung oder „Cell Dissociation Solution“. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in 5- 10 ml entsprechendem Kulturmedium resuspendiert und abhängig vom Zelltyp wurde die Hälfte (Split 1:2) bis 9/10 (Split 1:10) dieser Suspension verworfen. Die restliche Suspension wurde in ein geeignetes Zellkulturgefäß überführt, mit dem entsprechenden Kulturmedium auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt und kultiviert.

### **2.19.4 Zellzahlbestimmung**

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde 1:10 mit Trypanblau verdünnt. Ausschließlich toten Zellen wurden von diesem Farbstoff angefärbt. Eine Zählkammer (Neubauer) wurde mit 10 µl dieser Verdünnung befüllt. Die 4 großen Quadrate des Zählgitters wurden ausgezählt (nur vitale Zellen; ermittelte Zahl=x) und die Konzentration (Zellzahl/ml) nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{x}{4} \times 10 \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

### **2.19.5 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen**

Die Zellzahl der Zellkultur wurde ermittelt. Die Zellen wurden 5 min bei 420g (RT) zentrifugiert und der Überstand verworfen.  $5-10 \times 10^6$  Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in vorbereitete Einfrierröhrchen überführt. Die Einfrierröhrchen wurden rasch in eine Einfrierbox (mit Isopropanol) gestellt und bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Nach 2 Tagen wurden die Einfrierröhrchen in eine Tiefkühlung mit flüssigem  $\text{N}_2$  ( $-196^\circ\text{C}$ ) überführt. Die tiefgefrorenen Kulturen sind mehrere Jahre haltbar.

### **2.19.6 Auftauen eukaryontischer Zellen**

In einem 15 ml-Röhrchen wurde 10 ml Medium vorgelegt. Die kryokonservierten Zellen wurden rasch im Wasserbad ( $37^\circ\text{C}$ ) aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden in das vorbereitete Röhrchen überführt. Die Zellen wurden 5 min bei 420g (RT) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 10 ml Medium resuspendiert und in einem geeigneten Zellkulturgefäß kultiviert.

## **2.20 Dichtegradienten-Zentrifugation**

### **2.20.1 Dichtegradienten-Zentrifugation von Zellkulturen**

In ein 15ml-Röhrchen wurde 3 ml BIOCROLL Separation Solution vorgelegt. Die Zellen wurden 5 min bei 420g (RT) zentrifugiert und danach in 4 ml Medium resuspendiert. Die BIOCROLL Separation Solution wurde vorsichtig mit der Zellsuspension überschichtet. Das Röhrchen wurde 5 min bei 480g (mit Bremse, RT) zentrifugiert. Die Interphase, die die lebenden Zellen enthält, wurde mit einer Transferpipette abgenommen. Die lebenden Zellen wurden dreimal mit jeweils 10 ml Kulturmedium gewaschen. Die Zellkonzentration wurde bestimmt und die Zellen in geeigneter Konzentration in geeigneten Zellkulturgefäßen kultiviert.

### **2.20.2 Dichtegradienten-Zentrifugation von $\text{NH}_4$ -Heparin-Vollblut**

In ein 50 ml-Röhrchen wurde 15 ml BIOCROLL Separation Solution vorgelegt. Das periphere Blut ( $\text{NH}_4$ -Heparin-Vollblut) wurde 1:3,5 mit PBS verdünnt. Die BIOCROLL Separation Solution wurde vorsichtig mit dem verdünnten Vollblut überschichtet. Das

Röhrchen wurde 30 min bei 420g zentrifugiert (ohne Bremse, RT). Die Interphase, die die mononukleären peripheren Blutzellen (PBMC) enthält, wurde abgenommen. Die PBMC wurden mit 10 ml RPMI1640 (ohne Zusätze) gewaschen und 5 min bei 420g (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet anschließend mit RPMI (10% FCS/ 2 mM L-Gln) gewaschen (Zentrifugation 5 min bei 420g, RT). Das Zellpellet wurde in 5-10 ml AIM-V (2% AB-Serum/ 2 mM L-Gln) resuspendiert und eine Zellzahlbestimmung durchgeführt. Die erforderliche Zelldichte wurde mit AIM-V (2% AB-Serum/ 2 mM L-Gln) eingestellt und nach Depletion adhärenter Zellen durch Kunststoffadsorption wurden die Zellen in geeigneten Zellkulturgefäßen kultiviert.

## 2.21 Transfektion von Phoenix-Zellen

### Tag 0: Kultivierung von Phoenix-Eco- oder Phoenix-Ampho-Zellen

Eine 75 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflasche mit 80% konfluenten Phoenix-Zellen wurde auf zwei 6-Multiwell-Platten (=12 wells) verteilt [pro well 2 ml DMEM (10% FCS/ 2 mM L-Gln)]. Die Platten wurden vorsichtig geschwenkt und 18-24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert (eine Stunde später wurden die Platten nochmals geschwenkt), bis die Phoenix-Zellen eine Konfluenz von 60-80% erreicht hatten. Für die Generierung einer stabilen Produktions-Zelllinie wurden drei 6-Multiwell-Platten (= 18 wells) benötigt.

### Tag 1: Transfektion von Phoenix-Zellen

Reaktionsansatz:

	pro well (1x)	pro Platte (6,5x)
serumfreies DMEM	ad 100 µl	ad 650 µl
GeneJuice <sup>TM</sup>	3 µl	19,5 µl
Plasmid-DNA	1,5 µg	9,75 µg

Serumfreies DMEM wurde in ein Eppendorfgefäß vorgelegt. Das GeneJuice<sup>TM</sup>-Transfektionsreagenz wurde sorgfältig invertiert, zugegeben und mit dem Kulturmedium sorgfältig gemischt (pro 6-Multiwell-Platte wurde ein separater Reaktionsansatz hergestellt). Die Plasmid-DNA wurde zugegeben und sorgfältig mit den anderen Substanzen gemischt. Der Ansatz wurde 15-45 min bei RT inkubiert. Bei



den Phoenix-Zellen wurde ggfs. ein Mediumwechsel mit 2 ml DMEM (10% FCS/ 2 mM L-Gln) pro well durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde tropfenweise und gleichmäßig verteilt zu den Phoenix-Zellen gegeben (100 µl/well), und die Platte wurde vorsichtig geschwenkt. Die Platte wurde 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

**Tag 2:** Retrovirusproduktion transfizierter Phoenix-Zellen

Das Kulturmedium der Phoenix-Zellen wurde durch 1 ml IMDM (20% FCS/ 2 mM L-Gln) pro well ersetzt. Die Platten wurden 24 h bei 32°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

**Tag 3:** Abnahme retrovirushaltiger Überstände

Die Überstände transfizierter Phoenix-Zellen wurden abgenommen und durch einen 0,45 µm-Filter filtriert, um eventuell vorhandene Zellen zu entfernen. Die Überstände wurden à 1 ml aliquotiert und bei -80°C gelagert. Diese wurden für die anschließende Transduktion der Produktionszelllinien PG13 und Flyrd18 (Kapitel 2.22) verwendet.

## 2.22 Generierung stabiler PG13- und Flyrd18-Produktionszelllinien

Die gentechnischen Arbeiten (S2) sind nach dem Gentechnikgesetz genehmigt worden (Aktenzeichen: 64-M-1.1/01).

**Tag 0:**

Phoenix-Eco- oder Phoenix-Ampho-Zellen wurden in 6-Multiwell-Platten kultiviert (Kapitel 2.21).

**Tag 1:**

Die Phoenix-Zellen wurden mit rekombinanter DNA transfiziert (Kapitel 2.21). PG13- oder Flyrd18-Zellen wurden aufgetaut und kultiviert [Kulturmedium für PG13-Zellen: DMEM (10% FCS/ 2 mM L-Gln), Kulturmedium für Flyrd18-Zellen: IMDM (10% FCS/ 2 mM L-Gln)].

**Tag 2:** Retrovirusproduktion transfizierter Phoenix-Zellen

Das Kulturmedium transfizierter Phoenix-Zellen wurde gegen 1 ml IMDM (20% FCS/ 2 mM L-Gln) ausgetauscht (Kapitel 2.21) Die Zelldichte der PG13- oder Flyrd18-Zellen

wurde in einer 6-Multiwell-Platte so eingestellt, dass die Zellen am nächsten Tag eine Semikonfluenz (40-70%) zeigten. Die Zellen wurden 18-24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **Tag 3: Retrovirale Transduktion**

Die retrovirushaltigen Überstände wurden von den Phoenix-Zellen abgenommen, filtriert (Filter: 0,45 µl), aliquotiert und bis auf ein Aliquot eingefroren (Kapitel 2.21). Zum Aliquot wurde Protaminsulfat (finale Konzentration: 4 µg/ml) gegeben. Das Kulturmedium der PG13- oder Flyrd18-Zellen wurde abgenommen und verworfen. Zu den Zellen wurde der retrovirushaltige Überstand (+Protaminsulfat) gegeben. Die Inkubation erfolgte 12-24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

### **Folgende Tage:**

Nach der Inkubation wurde der retrovirushaltige Überstand abgenommen, verworfen und durch frisch aufgetauten retrovirushaltigen Überstand (+ Protaminsulfat) ersetzt. Die Zellen wurden 12-24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Im Abstand von 12-24 h wurde dies so oft wiederholt, bis die Aliquots aufgebraucht waren. Bei starker Zellproliferation wurden die Zellen in eine 6-Multiwell-Platte gesplittet. Bei schlechter Zellmorphologie wurde der retrovirushaltige Überstand durch das entsprechende Kulturmedium ersetzt, und dieses nach 12- bis 24-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> durch retrovirushaltigen Überstand ausgetauscht. Nach Abschluss der Transduktion wurden die transduzierten PG13- oder Flyrd18-Zellen (stabile Produktionszelllinien) in 75 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflaschen überführt und expandiert. Die Expression des Transgens des Retrovirus wurde durch durchflusszytometrische Analysen bestätigt. Bei Konfluenz der Zellen wurden 1:10-Splits durchgeführt und Aliquots der Produktionszelllinien bei -80°C bzw. -196°C eingefroren.

## 2.23 Retrovirale Transduktion humaner Zellen

### 2.23.1 Beschichtung von Gewebekulturplatten mit $\alpha$ -CD3 und $\alpha$ -CD28

Die Antikörper  $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28 wurden mit bidest. H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 1  $\mu$ g/ml verdünnt. Jedes well einer 24-Multiwell-Platte wurde mit 500  $\mu$ l (= 0,5  $\mu$ g) Antikörper-Verdünnung beschichtet. Die Platte wurde 2-4 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Antikörper-Verdünnung wurde abgenommen und verworfen. Jedes well wurde einmal mit 2 ml Medium [RPMI (10% FCS/2 mM L-Gln)] gewaschen. Falls die Platte nicht sofort benötigt wurde, wurde pro well 1 ml PBS zugegeben. Die Platte wurde mit Parafilm verschlossen und bei 4°C gelagert.

### 2.23.2 Beschichtung von Kunststoffplatten mit RetroNectin<sup>TM</sup>

RetroNectin<sup>TM</sup> ist ein rekombinantes Fibronektinfragment CH-296, das durch Kolo-kalisierung von Zellen und Viruspartikeln den Gentransfer verstärkt (Hanenberg *et al.*, 1996). Das lyophilisierte RetroNectin<sup>TM</sup> wurde mit 500  $\mu$ l bidest. H<sub>2</sub>O rekonstruiert, c= 1 mg/ml (RetroNectin<sup>TM</sup>-Stammlösung). Diese Stammlösung wurde à 70  $\mu$ l aliquotiert und bei -20°C gelagert. 7  $\mu$ l RetroNectin<sup>TM</sup>-Stammlösung wurden mit 1 ml PBS verdünnt (RetroNectin<sup>TM</sup>-Gebrauchslösung). Pro Transduktions-Ansatz wurde ein well einer nicht für Gewebekultur beschichteten 24-Multiwell-Platte (= RetroNectin<sup>TM</sup>-Platte) mit 1 ml RetroNectin<sup>TM</sup>-Gebrauchslösung beschichtet. Die Platte wurde ü/N bei 4°C inkubiert. Die RetroNectin<sup>TM</sup>-Gebrauchslösung wurde abgenommen und verworfen. Jedes well wurde einmal mit 2 ml Medium [RPMI (10% FCS/ 2 mM L-Gln) oder DMEM (10% FCS/ 2 mM L-Gln)] gewaschen. Falls die Platte nicht sofort benötigt wurde, wurde in jedes well 1 ml PBS gegeben. Die Platte wurde mit Parafilm verschlossen und bei 4°C gelagert.

### 2.23.3 Retrovirale Transduktion von PBMC

#### 48 h vor Transduktion:

Aus NH<sub>4</sub>-Heparin-Vollblut wurden die PBMC durch Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert (Kapitel 2.20.2). 2x10<sup>6</sup> der zu transduzierende Zellen wurden 48 h auf der mit  $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28 beschichteten Gewebekulturplatte (Kapitel 2.23.1) in 2 ml Kulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

**24 h vor Transduktion:**

Für die Transduktion von  $2 \times 10^6$  Zellen in einem well einer 24-Multiwell-Platte wurde eine 75 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflasche mit einer fast konfluenten Produktionszelllinie (PG13 oder Flyrd18) benötigt. Das Kulturmedium der Produktionszelllinie wurde abgenommen und verworfen. Zu den Zellen wurde 6 ml IMDM (20% FCS/ 2 mM L-Gln) gegeben. Die Zellen wurden 24 h bei 32°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. In diesem Zeitraum erfolgte die Produktion rekombinanter Retroviren.

**am Tag der Transduktion:**

Das Kulturmedium (= retrovirushaltiger Überstand) der Produktionszelllinien wurde quantitativ abgenommen und durch einen 0,45 µl Filter filtriert, um eventuell vorhandene Zellen zu entfernen. Das PBS wurde von der vorbereiteten RetroNectin<sup>™</sup>-Platte (Kapitel 2.23.2) abgenommen und verworfen. Jedes well der RetroNectin<sup>™</sup>-Platte wurde mit 2 ml DMEM (10% FCS/ 2 mM L-Gln) gewaschen. In jedes well wurde 0,5 ml retrovirushaltiger Überstand gegeben. Die Platte wurde 30-60 min bei 32°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Die vorherigen Schritte wurden so oft wiederholt, bis 1 ml Überstand verblieben war (9-10 mal). In jedes well wurde der verbliebene Überstand (1 ml) gegeben. Die zu transduzierenden Zellen wurden auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt [Kulturmedium: AIM-V (2% AB-Serum/ 2 mM L-Gln)]. In das well, in das der retrovirushaltige Überstand vorgelegt worden war, wurde 0,5 ml Zellsuspension (=  $1 \times 10^6$  Zellen) gegeben. Die Zellen wurden 48 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend von der RetroNectin<sup>™</sup>-Platte in ein Röhrchen überführt. Noch anhaftende Zellen auf der RetroNectin<sup>™</sup>-Platte wurden mit 3-5 Tropfen „Cell Dissociation Solution“ gelöst. Die Platte wurde 5 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, die Zellen mittels 2 ml Kulturmedium von der Platte abgenommen und in dasselbe Röhrchen wie oben überführt. Nach einer Zentrifugation (5 min bei 420g, RT) wurde das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und in 24-Multiwell-Platten (für Gewebekultur) kultiviert. Für die Expansion von NKT-Zellen wurde dem Kulturmedium IL-2 (finale Konzentration: 300 U/ml) und IL-15 (finale Konzentration: 50 ng/ml) zugegeben.

#### 2.23.4 Modifizierte retrovirale Transduktion von PBMC

**48 h bzw. 24 h vor Transduktion:** siehe Kapitel 2.23.3

##### **am Tag der Transduktion:**

Das Kulturmedium (= retrovirushaltiger Überstand) der Produktionszelllinien wurde quantitativ abgenommen und durch einen 0,45 µl Filter filtriert, um eventuell vorhandene Zellen zu entfernen. Die Überstände wurden à 1 ml in Eppendorfgefäßen aliquotiert und 60-90 min bei 14000g (4°C) zentrifugiert und anschließend 900 µl Überstand verworfen. Die Pellets wurden in dem restlichen Überstand (100 µl) resuspendiert und vereinigt (Gesamtvolumen: 600 µl). Von der vorbereiteten RetroNectin™-Platte (Kapitel 2.23.2) wurde das PBS abgenommen und verworfen. Jedes well der RetroNectin™-Platte wurde mit 2 ml DMEM (10% FCS/ 2 mM L-Gln) gewaschen. Die vereinigten retrovirushaltigen Überstände wurden in ein well gegeben. Die zu transduzierenden Zellen wurden auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt [Medium: AIM-V (2% AB-Serum/ 2 mM L-Gln)]. In das well, in das der retrovirushaltige Überstand vorgelegt worden war, wurde 1 ml Zellsuspension ( $=1 \times 10^6$  Zellen) gegeben. Die Zellen wurden 48 h oder 72 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und darauf von der RetroNectin™-Platte in ein Röhrchen überführt. Noch anhaftende Zellen auf der RetroNectin™-Platte wurden mit 3-5 Tropfen „Cell Dissociation Solution“ gelöst. Die Platte wurde 5 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, die Zellen mittels 2 ml Kulturmedium von der Platte abgenommen und in dasselbe Röhrchen wie oben überführt. Nach einer Zentrifugation (5 min bei 420g, RT) wurde das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und in 24-Multiwell-Platten (für Gewebekultur) kultiviert. Für die Expansion von NKT-Zellen wurde dem Kulturmedium IL-2 (finale Konzentration: 300 U/ml) und IL-15 (finale Konzentration: 50 ng/ml) zugegeben.

#### 2.23.5 Retrovirale Transduktion von NKT-Zellen

Kulturmedium: AIM-V (2% AB-Serum/ 2 mM L-Gln)

##### **Tag 0:** Isolierung mononukleärer Zellen

Aus NH<sub>4</sub>-Heparin-Vollblut wurden die PBMC durch Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert (Kapitel 2.20.2). Die mononukleären Zellen wurden nach den Waschschr

auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml mit Kulturmedium eingestellt und nach Zugabe von INF- $\gamma$  (finale Konzentration: 1000 U/ml) in 24-Multiwell-Platten kultiviert. Die Platten wurden 24h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

**Tag 1:** Unspezifische Stimulierung mit  $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28

24-Multiwell-Platten wurden mit  $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28 beschichtet (Kapitel 2.23.1). Pro well wurden  $2 \times 10^6$  mononukleäre Zellen in 2 ml Kulturmedium unter Zugabe von IL-2 (finale Konzentration: 300 U/ml) und IL-15 (finale Konzentration: 50 ng/ml) 48 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Produktionszelllinien wurden aufgetaut.

**Tag 2:**

Eine nicht für Zellkultur beschichtete 24-Multiwell-Platte wurde mit RetroNectin™ beschichtet (Kapitel 2.23.2). Das Kulturmedium der Produktionszelllinien wurde gewechselt (Kapitel 2.23.3).

**Tag 3:** Retrovirale Transduktion

Bei den PBMC wurde eine retrovirale Transduktion durchgeführt (Kapitel 2.23.3).

**Folgende Tage:** Expansion von NKT-Zellen

Im Abstand von zwei bis drei Tagen wurde die Interleukin-Zugabe (wie am Tag 1) zum Kulturmedium wiederholt. Die Zellen wurden abhängig von ihrer Dichte gesplittet und das Kulturmedium nach Verbrauch durch die Zellen gewechselt. An den Tagen 7, 14 und 21 wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt (Kapitel 2.25.1), um die NKT-Expansion aufzuzeichnen.

**Tag 21:** Magnetische Separation der NKT-Zellen

Am Tag 21 wurden die NKT-Zellen durch eine magnetische Separation mit CD56 „Micro Beads“ isoliert (Kapitel 2.26) und unter Interleukin-Zugabe (wie am Tag 1) weiterhin kultiviert.

Die Spender der peripheren Blutabnahmen sind über die Arbeiten mit der Blutspende aufgeklärt worden und haben ihre Einwilligung dafür gegeben.

## 2.24 Kultivierung humaner NKT-Zellen

### 2.24.1 Generierung humaner NKT-Zellen *in vitro*

Kulturmedium: AIM-V (2% AB-Serum/ 2 mM L-Gln)

#### **Tag 0:** Isolierung mononukleärer Zellen

Aus NH<sub>4</sub>-Heparin-Vollblut wurden die PBMC durch Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert (2.20.2). Die PBMC wurden nach den Waschschrinen auf eine Konzentration von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml mit Kulturmedium eingestellt und in 75cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflaschen unter Zugabe von INF- $\gamma$  (finale Konzentration: 1000 U/ml) kultiviert. Die Gewebekulturflaschen wurden ü/N bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### **Tag 1:** Unspezifische Stimulierung der Zellen mit $\alpha$ -CD3 und $\alpha$ -CD28

24-Multiwell-Platten wurden mit  $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28 beschichtet (Kapitel 2.23.1). Pro well wurden  $2 \times 10^6$  mononukleäre Zellen in 2 ml Kulturmedium unter Zugabe von IL-2 (finale Konzentration: 300 U/ml) und IL-15 (finale Konzentration: 50 ng/ml) kultiviert. Die Platten wurden 48 h bei 37°C inkubiert.

#### **Tag 3:**

Die Stimulierung wurde beendet, indem die Zellen von der beschichteten Platte abgenommen und in einer neuen unbeschichteten 24-Multiwell-Platte kultiviert wurden. Zu der Kultur wurde nochmals IL-2 (finale Konzentration: 300 U/ml) und IL-15 (finale Konzentration: 50ng/ml) gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

#### **folgenden Tage:** Expansion von NKT-Zellen

Im Abstand von zwei bis drei Tagen wurde die Interleukin-Zugabe (wie bei Tag 1) wiederholt. Die Zellen wurden abhängig von ihrer Dichte gesplittet und das Kulturmedium nach Verbrauch durch die Zellen gewechselt. An den Tagen 7, 14 und 21 wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt (Kapitel 2.25.1), um die NKT-Expansion zu dokumentieren.

### **2.24.2 Restimulierung humaner NKT-Zellen**

$1 \times 10^6$  frisch isolierte allogene PBMC und  $0,2 \times 10^6$  LCL (lymphoblastoide Zelllinie) wurden mit 30 Gray bestrahlt und in 1 ml Kulturmedium („Feeder-Mix“) vereinigt.  $1 \times 10^6$  NKT-Zellen wurden in 1ml Kulturmedium resuspendiert und zusammen mit dem „Feeder-Mix“ in einer 24-Multiwell-Platte kultiviert. Zu der Kultur wurden  $\alpha$ -CD3 (5 ng/ml), IL-2 (300 U/ml) und IL-15 (50 ng/ml) gegeben.

## **2.25 Durchflusszytometrische Analyse**

### **2.25.1 Ein-Schritt-Färbung**

Pro FACS („Fluorescence Activated Cell Sorting“-)Färbung wurden  $1-5 \times 10^5$  Zellen benötigt. Die erforderliche Zellzahl wurde 5 min bei 420g (RT) in 5 ml PS-Röhrchen (= FACS-Röhrchen) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden mit 500  $\mu$ l FACS-Puffer gewaschen und das Zellpellet im Rücklauf resuspendiert. Pro Ansatz wurden 3-5  $\mu$ l des/der entsprechenden FACS-Antikörper zugegeben. Die Zellen wurden 20 min im Dunkeln bei 4-8 °C inkubiert und anschließend zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in 200-500  $\mu$ l Paraformaldehyd (0,1%, w/v) resuspendiert (Fixierung) und bei 4-8 °C bis zur Analyse gelagert, die innerhalb der folgenden 5 Tage am Gerät FACS Calibur (Fa. B&D) durchgeführt wurde.

### **2.25.2 Zwei-Schritt-Färbung mit Phagen-Antikörper**

$0,5-1 \times 10^6$  Zellen wurden 5 min bei 420g (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet einmal mit 500  $\mu$ l FACS-Waschpuffer in 5 ml PS-Röhrchen gewaschen. Zu den Zellen wurde 750  $\mu$ l Phagen-Antikörper (= Überstand einer Bakterienkultur, die mit Phagen transformiert wurde) und 100  $\mu$ l FACS-Puffer gegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei RT inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit jeweils 500  $\mu$ l FACS-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in 100  $\mu$ l unmarkiertem Maus-anti-M13 Antikörper (1 mg/ml, verdünnt 1:100 mit FACS-Puffer) resuspendiert. Die Zellen wurden 30 min bei RT inkubiert und anschließend zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde im Rücklauf resuspendiert und 5  $\mu$ l GAM-FITC-Antikörper zugegeben. Die Zellen wurden im Dunkeln 15 min bei 4-8°C inkubiert und anschließend zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde



in 400-500  $\mu$ l PFA (0,1%, w/v) resuspendiert (Fixierung) und bei 4-8 °C bis zur Analyse gelagert, die innerhalb der folgenden 5 Tage am Gerät FACS Calibur (Fa. B&D) durchgeführt wurde.

## 2.26 Magnetische Zellseparation

Für die magnetische Zellseparation (MACS) der NKT-Zellen wurden  $1 \times 10^8$  Zellen in 800  $\mu$ l MACS-Puffer resuspendiert. Zu den Zellen wurden 180  $\mu$ l CD56-„Micro Beads“ (Fa. Miltenyi) gegeben. Die Zellen wurden 15 min bei 4-8°C inkubiert und anschließend mit 10-20 Vol. MACS-Puffer gewaschen. Dazu wurden sie 10 min bei 300g (RT) zentrifugiert, der Überstand quantitativ abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert. Eine LS-Säule wurde in einem Magnetblock (MidiMACS Separator, Fa. Miltenyi) befestigt, der an einer Metallplatte (MACS MultiStand, Fa. Miltenyi) angebracht worden ist. Ein Vorfilter wurde auf die LS-Säule gesetzt. Die Säule wurde mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert und die Zellsuspension auf den Vorfilter gegeben. Der Durchlauf wurde aufgefangen (CD56-negative Fraktion); die CD56-positive Fraktion verblieb aufgrund des Magnetfeldes in der Säule. Die Säule wurde dreimal mit jeweils 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Der Durchlauf wurde ebenfalls als CD56-negative Fraktion aufgefangen. Die Säule wurde aus dem magnetischen Feld entfernt. Mit 3 ml MACS-Puffer wurde die CD56-positive Fraktion mit Hilfe des Stempels eluiert. Das Eluat wurde aufgefangen. Die Zellfraktionen wurden in geeignetem Kulturmedium kultiviert.

## 2.27 Radioaktiver Zytotoxizitäts-Assay

Alle Versuche wurden in Dreifachbestimmung und in einem Reaktionsvolumen von 200  $\mu$ l durchgeführt; Kulturmedium: RPMI 1640 (10% FCS/ 2 mM L-Gln).

$1-2 \times 10^6$  Targetzellen wurden mit 50-100  $\mu$ l  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  (entspricht 100  $\mu\text{Ci} = 3,7 \text{ MBq}$ ) inkubiert (60-90 min bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$ ). Anschließend wurden die Zellen 5x mit Kulturmedium gewaschen (Zentrifugation 4 min bei 480g, RT) und auf eine Konzentration von  $2,5 \times 10^4$  Zellen/ml eingestellt. Die Effektorzellen wurden auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. In eine 96-Multiwell-Platte (Spitzboden) wurden die Effektorzellen und die  $^{51}\text{Cr}$ -markierten Targetzellen in folgenden

Effektor- zu Targetzellen-Ratios (E:T-Ratios) pipettiert: 40:1, 20:1, 10:1 und 5:1 . Um eine komplette Zytolyse der Targetzellen und damit eine maximale Freisetzung des  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  zu erreichen, wurde in einem separaten Ansatz 100  $\mu\text{l}$  Triton-X zu den Targetzellen gegeben. Durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Kulturmedium wurde die spontane Zytolyse der Targetzellen in einem separaten Ansatz und damit die minimale Freisetzung des  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  überprüft. Die Koinkubation von Effektor- und Targetzellen erfolgte 4 h bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$ . Nach der Inkubation wurde pro well 50  $\mu\text{l}$  Überstand in eine 96-well-Sample Plate (Fa. Wallac) pipettiert. Zu diesem Überstand wurde pro well 150  $\mu\text{l}$  „Opti Phase Super Mix“ (Szintillationsflüssigkeit, Fa. Wallac) gegeben. Die Platte wurde mit einer Abklebefolie („Sealing Tape“, Fa. Wallac) verschlossen, auf eine „1450 Flexible 96 Plate“ (Platte für das Gerät) überführt und 2 min geschüttelt. Die erfolgte  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung wurde im Gerät 1450 Microbeta Trilux (Fa. Wallac) ermittelt.

Bei erfolgreicher Zytolyse der Targetzellen wurde das  $^{51}\text{Cr}$  freigesetzt. Dabei ist die Menge des freigesetzten Chroms proportional zur Zytolyseeffizienz. Die spezifische Zytotoxizität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Spezifische Zytolyse} = \frac{\text{Freisetzung der Probe} - \text{Spontanfreisetzung}}{\text{Maximalfreisetzung} - \text{Spontanfreisetzung}} \times 100$$

### **2.27.1 „Cold Target Inhibition“-Assay**

Effektorzellen (siehe oben) wurden mit unmarkierten Targetzellen („cold target“) in einer 96-Multiwell-Platte (Spitzboden) 30 min bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert.  $^{51}\text{Cr}$ -markierte Targetzellen („hot targets“, siehe oben) wurden in den „cold target“ : „hot target“-Ratios 0, 20:1, 40:1 und 80:1 dazugegeben. Die Koinkubation erfolgte bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$ . Die Messung der  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung erfolgte wie oben beschrieben.

### **2.27.2 Zytotoxizitäts-Assay mit Antikörperblockierung**

Der Versuch wurde wie unter 2.27 durchgeführt mit folgenden Ausnahmen: Vor der Zugabe der Targetzellen wurden die Effektorzellen mit  $\alpha$ -LFA-1 30 min bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  vorinkubiert. Vor Zugabe der Effektorzellen wurden die Targetzellen mit  $\alpha$ -ICAM-1 und Rituximab 30 min bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  vorinkubiert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 CD33 $\zeta$ -spezifische chimäre T-Zell-Rezeptoren

In der vorliegenden Arbeit wurde ein CD33 $\zeta$ -spezifischer cTCR (CD33 $\zeta$ -cTCR) konstruiert, der durch retroviralen Gentransfer in PBMC bzw. NKT-Zellen exprimiert werden sollte. Die Karten aller dazu benötigten und generierten Vektoren sind im Anhang dargestellt.

#### 3.1.1 Konstruktion CD33 $\zeta$ -spezifischer chimärer T-Zell-Rezeptoren

##### 3.1.1.1 Klonierung des scFvCD33 und der CD3 $\zeta$ -Kette

Aus der Hybridomzelllinie 251, die Antikörper gegen CD33 produziert, wurde die Gesamt-RNA isoliert, aus der anschließend die mRNA präpariert wurde. Diese wurde für die Synthese der cDNA mit oligodT und random Primern als Matrize verwendet. Aus der cDNA wurden die kodierenden DNA-Sequenzen der variablen leichten Kette ( $V_L$ ) und der variablen schweren Kette ( $V_H$ ) des CD33-Antikörpers mittels spezieller Primerpaare (Dubel *et al.*, 1994) amplifiziert (RT-PCR). Die Primerpaare wurden so konstruiert, dass *Sfi*I-Erkennungssequenzen bzw. komplementäre Linkerfragmente an die Enden der Amplifikationsprodukte angefügt worden sind (Tabelle 3.1), um die anschließende Klonierung in den Fusionsphagen fUSE5 zu ermöglichen (Smith, 1985; Little *et al.*, 1994). Die Primerpaare 1-3 verfügten über eine Nukleotidsequenz für einen 15 aa-Linker und die Primerpaare 4-6 über eine Nukleotidsequenz, aus der ein 9 aa-Linker hervorgegangen ist. Alle Primerpaare lieferten Amplifikate einer Größe von ca. 400 bp. Die Linkersequenzen hatten in der nachfolgenden „splicing by overlap“-PCR die beiden Amplifikate der  $V_H$ - und der  $V_L$ -Nukleotidsequenz (Primer BI7SFI und BI4A oder Primer BI8SFI und BI4A) verbunden und amplifiziert, so dass die komplette Nukleotidsequenz für das scFvCD33 entstanden war.

**Tab. 3.1:** Verwendete Primer für die Amplifikation und Verbindung der CD33-V<sub>H</sub>- und CD33-V<sub>L</sub>-Nukleotidsequenz

Primerpaar	Länge der Linkersequenz	variable Kette
BI7SFI + BI5LINK2 (1)	15 aa	V <sub>L</sub>
BI8SFI + BI5LINK2 (2)	15 aa	V <sub>L</sub>
BI3LINK2 + BI4A (3)	15 aa	V <sub>H</sub>
BI7SFI + BI5LINK (4)	9 aa	V <sub>L</sub>
BI8SFI + BI5LINK (5)	9 aa	V <sub>L</sub>
BI3LINK + BI4A (6)	9 aa	V <sub>H</sub>

Alle scFv-Nukleotidsequenzen, die durch unterschiedliche Primer-Kombinationen entstanden waren, wurden nach Hydrolyse mit *Sfi*I in die *Sfi*I-Erkennungssequenz der replikativen Form des Fusionsphagen fUSE5 ligiert. Dieser Vektor ist ein Bacteriophage, der seine Wirtszellen (z. B. *E. coli*) nicht lysiert (temperenter Phage). Er verbindet die Eigenschaften der Integration in das Genom der Wirtszelle mit der Präsentation der scFv-Aminosäuren in einer immunologisch akzeptablen Form auf seinem Hüllprotein („Phage-Display“).

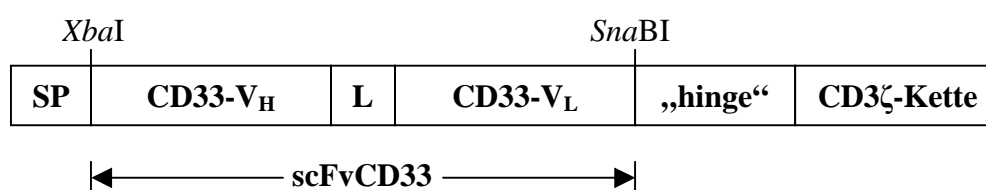
Nach der Ligation und Transformation in *E. coli* wurden Klone in Flüssigmedium kultiviert. Die Überstände der Kulturen, die fUSE5::scFvCD33 enthalten, wurden auf die Bindungseigenschaften mit CD33 getestet, um den Klon mit der besten Affinität für CD33 zu ermitteln. Dafür wurden die Überstände mit der Zelllinie HL-60 (CD33<sup>+</sup>) inkubiert. Die CD33-Expression der Zellen wurde durch durchflusszytometrische Analysen gezeigt. Anschließend wurden die Zellen mit murinem  $\alpha$ -M13-Antikörper, der sich gegen das Hüllprotein M13 des Phagen richtet, inkubiert und anschließend mit fluoreszenzfarbstoffmarkiertem Ziege- $\alpha$ -Maus (goat- $\alpha$ -mouse, GAM)-Antikörper gefärbt. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte jedoch, dass keiner der Klone die gewünschte Bindung an CD33-exprimierende Zellen (HL-60) eingehen konnte. Somit war keines der potentiellen scFvCD33 funktionell.

Eine kooperierende Arbeitsgruppe (Universität Marburg, Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Prof. Müller) stellte daraufhin die Nukleotidsequenz eines potentiell funktionellen scFvCD33 zur Verfügung. An die scFvCD33-Sequenz, die inseriert in das Plasmid pAB1 (pAB1::scFvCD33) vorlag, wurden durch eine PCR die

Erkennungssequenzen *Xba*I und *Sna*BI (Primer 3'CD33*Sna*BI und 5'CD33*Xba*I) angefügt, um eine anschließende Klonierung in den Vektor pRSV::SP.14G2a-Ig- $\zeta$  (6994 bp) zu ermöglichen. Dieser Vektor trägt neben einem Insert, das in der folgenden Klonierung entfernt worden ist, die Nukleotidsequenzen für ein humanes Signalpeptid (SP), eine humane „hinge“-Domäne und die signaltransduzierende Domäne der CD3 $\zeta$ -Kette. Der Vektor wurde mit *Bst*EII hydrolysiert und das entstandene „sticky end“ durch das Klenow-Fragment der DNA Polymerase I zu einer glatten Schnittstelle polymerisiert. Anschließend wurde der Vektor mit *Xba*I hydrolysiert, um das Insert zu entfernen.

Das modifizierte PCR-Produkt der scFvCD33-Sequenz wurde mit *Xba*I und *Sna*BI hydrolysiert und in den restringierten Vektor stromaufwärts der CD3 $\zeta$ -Kette im Leseraster kloniert. Das Konstrukt pRSV::scFvCD33 $\zeta$  (6943 bp) trägt alle DNA-Sequenzen (Signalpeptid, scFv, „hinge“-Domäne, CD3 $\zeta$ -Kette), die für einen kompletten cTCR notwendig sind, so daß eine Fusion des Einzelkettenfragments scFvCD33 mit der Transmembran- und cytoplasmatischen Domäne der CD3 $\zeta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors im Leseraster der Expressionkassette entstand (Abb. 3.1).

Die Nukleotidsequenz des scFvCD33 $\zeta$  im Vektor pRSV::scFvCD33 $\zeta$  wurde mit den Primern 5pRSV3, 3pRSV und 3Zprox, die die  $\zeta$ -Kette flankieren, bestätigt. Damit wurde sichergestellt, dass in dem Vektor das erwartete Fusionsgen in der richtigen Anordnung, ohne Verschiebung des Leserasters enthalten war.

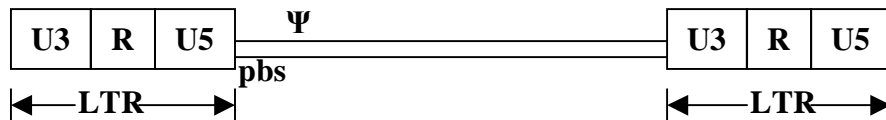


**Abb. 3.1:** Schematische Darstellung der Expressionskassette für CD33 $\zeta$ -spezifische cTCR; *l*=linker, *scFv*= variables Leichtkettenfragment, *sp*= Signalpeptid, *V<sub>H</sub>*=variable schwere Kette, *V<sub>L</sub>*=variable leichte Kette,

### 3.1.1.2. Konstruktion retroviraler Vektoren

Für retrovirale Transduktionen humaner Zellen wurden die beiden replikationsdefekten retroviralen Vektoren SFG und MSCV-I-GFP(M) verwendet. Durch die in den

Vektoren enthaltenen Long Terminal Repeats (LTR), in denen Promotor- und Enhancer-Sequenzen codiert sind, und das Verpackungssignal  $\Psi$  (Abb 3.2) kann das transkribierte virale Genom in das zelluläre Genom integrieren und sich die virale RNA an Nukleokapsidmoleküle sich bildender Viruspartikel anlagern (Mann *et al.*, 1983). Die Gene für viruseigene Proteine wurden durch die zu transduzierenden Gene ersetzt. Als Kontrollvektor wurde SFG::EGFP eingesetzt.



**Abb 3.2:** Schematische Darstellung des retroviralen Genoms;  $\Psi$ =Verpackungssignal, *ltr*= long terminal repeat; *pbs*= primer binding site, Bindungsstelle für tRNA-Primer, *U3*= unique sequence, Nukleotidsequenz, die nur am 3'-Ende des RNA-Genoms auftritt, *U5*= unique sequence, Nukleotidsequenz, die nur am 5'-Ende des RNA-Genoms auftritt

### Retroviraler Vektor SFG

Der retrovirale Vektor SFG (6371 bp), dessen Struktur sich für Expressionen von Transgenen in T-Zellen als vorteilhaft erwiesen hat (Riviere *et al.*, 1996), wurde mit *Bam*HI hydrolysiert und das entstandene „sticky end“ mit dem Klenow-Fragment der DNA Polymerase I zu einer glatten Schnittstelle polymerisiert. Der linearisierte Vektor wurde anschließend mit *Nco*I restringiert. Da dieser Vektor auch ohne kompatible Schnittstellen zur Religation neigt, wurde eine CIAP-Behandlung durchgeführt. Das erhaltene definierte Vektorfragment hat eine Größe von 6341 bp. Das Konstrukt pRSV::scFvCD33 $\zeta$  wurde mit *Nco*I und *Hpa*I hydrolysiert, um die komplette Nukleotidsequenz des chimären TCR als definiertes Restriktionsfragment zu erhalten (1444 bp). Dieses DNA-Fragment wurde in den restringierten Vektor SFG inseriert. Der konstruierte Vektor SFG::scFvCD33 $\zeta$  hat eine Größe von 7785 bp und enthält die komplette Nukleotidsequenz für den CD33 $\zeta$ -spezifischen cTCR.

### Retroviraler Vektor MSCV-I-GFP(M)

Der retrovirale Vektor MSCV-I-GFP(M) (6825 bp) enthält ein internes Ribosomen-eintrittssignal (IRES), das die Expression eines weiteren Gens unter Kontrolle eines

einzelnen Promoters ermöglicht (Pelletier *et al.*, 1988). Transgene werden stromabwärts des IRES inseriert.

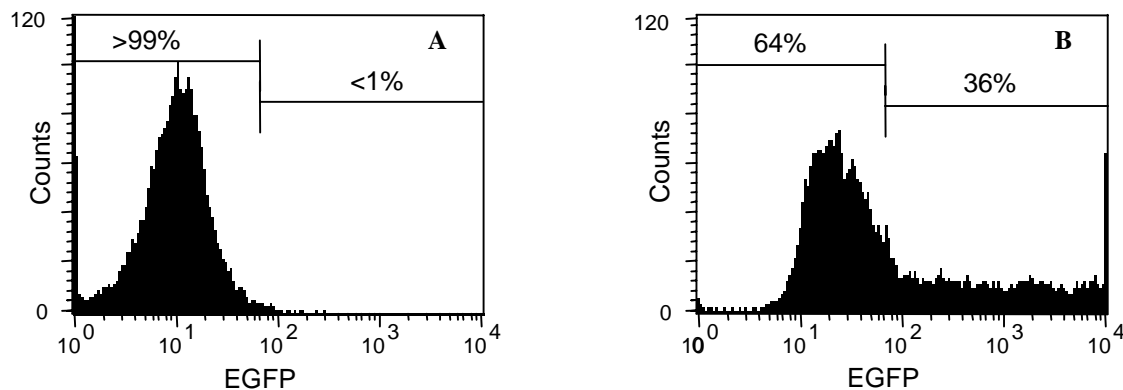
Dieser Vektor wurde mit *EcoRI* linearisiert und das entstandene „sticky end“ mit dem Klenow-Fragment der DNA Polymerase I zu einer glatten Schnittstelle polymerisiert. Anschließend wurde der Vektor mit *SnaBI* hydrolysiert. Das erhaltene definierte Vektorfragment hatte eine Größe von 6656 bp. Das Konstrukt pRSV::scFvCD33 $\zeta$  wurde mit *NcoI* und *HpaI* hydrolysiert, um die komplette Nukleotidsequenz für den chimären TCR als Restriktionsfragment zu erhalten (1444 bp). Als Zwischenschritt wurde das „sticky end“, das durch die *NcoI*-Hydrolyse entstanden war, mit dem Klenow-Fragment der DNA Polymerase I zu einer glatten Schnittstelle polymerisiert. Das Insert wurde in den vorbereiteten Vektor MSCV-I-GFP(M) kloniert. Der konstruierte Vektor MSCV-I-GFP(M)::scFvCD33 $\zeta$  hat eine Größe von 8100 bp und enthält die komplette Nukleotidsequenz für den CD33 $\zeta$ -spezifischen cTCR.

### 3.1.1.3. Konstruktion einer transienten Produktionszelllinie

Die retrovirale transiente Produktionszelllinie Phoenix-Eco (Pear *et al.*, 1993; Kinsella *et al.*, 1996) enthält die retroviralen Gene *gag*, *pol* und *env* und kodiert damit alle für die Replikation, Verpackung und Infektion notwendigen viralen Proteine. Da diese Zelllinie jedoch kein Verpackungssignal  $\Psi$  besitzt, können keine infektiösen Partikel gebildet werden. Der Zusammenbau infektiöser Viruspartikel wird erst durch die Transfektion der Zellen mit retroviralen Vektoren, die u. a. über das Verpackungssignal  $\Psi$  verfügen, möglich. Der Wirtsbereich muriner Retroviren, die eine ecotrope Hülle besitzen, beschränkt sich auf Zellen von Mäusen und Ratten.

Für die Produktion rekombinanter Retroviren wurde zunächst die Produktionszelllinie Phoenix-Eco mit den Vektoren SFG::scFvCD33 $\zeta$  und MSCV-I-GFP(M)::scFvCD33 $\zeta$  transient transfiziert. Als Kontrollvektor wurde SFG::EGFP verwendet. Nach 24-stündiger Inkubation der Phoenix-Eco-Zellen bei 37°C (in Medium mit 10% FCS) und einer nachfolgenden 24-stündigen Inkubation bei 32°C (in Medium mit 20% FCS, Retrovirus-Produktion) wurden die retrovirushaltigen Überstände abgenommen. Transfizierte Zellen, die EGFP (Vektor SFG::EGFP) bzw. GFP [Vektor MSCV-I-GFP(M)] exprimieren, können ohne vorherige Färbung im

Durchflusszytometer detektiert werden. Die Überprüfung der Transfektionseffizienz der Phoenix-Eco-Zellen wurde anhand des Kontrollvektors SFG::EGFP durchgeführt, indem die EGFP-Expression durchflusszytometrisch quantifiziert wurde. Da die maximale Transfektionseffizienz der Phoenix-Eco-Zellen SFG::EGFP bei 36% (Abb. 3.3) lag, wurde angenommen, dass auch der cTCR von ca. 40% der Zellen exprimiert wurde.



**Abb. 3.3:** EGFP-Expression transfizierter Phoenix-Eco-Zellen mit SFG::EGFP (Durchflusszytometrie); **A:** native Phoenix-Eco-Zellen (negative Kontrolle); **B:** transfizierte Phoenix-Eco-Zellen

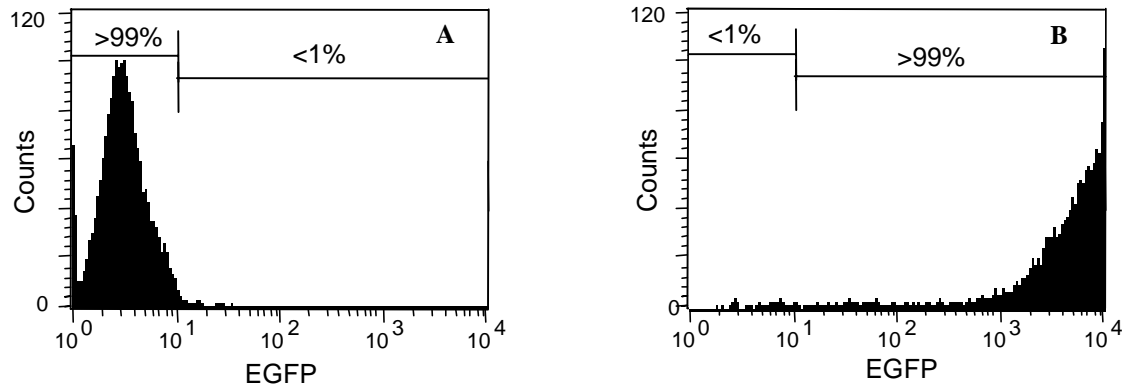
#### 3.1.1.4. Konstruktion einer stabilen Produktionszelllinie

Der Vorteil der stabilen Produktionszelllinie PG13 gegenüber einer transienten Verpackungszelllinie (z. B. Phoenix-Eco) liegt in der stabilen Integration des Virions in das Genom der Wirtszelle und der damit verbundenen konstitutiven Expression des Transgens.

Der retrovirushaltige Überstand der transfizierten Phoenix-Eco-Zellen (SFG::scFvCD33 $\zeta$ , MSCV-I-GFP(M)::scFvCD33 $\zeta$  und SFG::EGFP) wurde für die Transduktion der stabilen Produktionszelllinie PG13 verwendet. Dieser Vorgang wurde unter Zugabe von Protaminsulfat mehrfach wiederholt, um eine optimale Transduktion und somit eine hochtitrige Virusproduktion zu gewährleisten. Die Transduktionseffizienz wurde im Abstand von 2-3 Tagen mit Hilfe der EGFP-Expression durchflußzytometrisch kontrolliert. Die Transduktion der PG13-Zellen wurde so oft wiederholt, bis eine Transduktionsrate der Produktionszelllinien von >95% erreicht worden war. Durchflusszytometrische

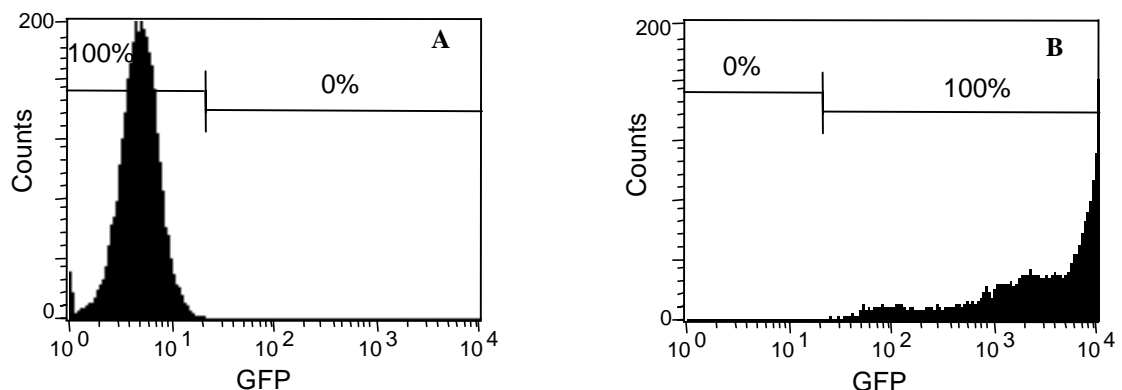


Analysen zeigten, dass über 99% der PG13-Zellen EGFP exprimieren (Abb. 3.4). Daher wurde davon ausgegangen, dass auch der cTCR von über 99% der PG13-Zellen exprimiert wurde. Die hier konstruierte stabile Produktionszelllinie PG13/SFG::EGFP konnte für alle folgenden Transduktionen als positive Kontrolle verwendet werden.



**Abb. 3.4:** EGFP-Expression transduzierter PG13-Zellen mit Retroviren der Zelllinie Phoenix-Eco/SFG::EGFP (Durchflusszytometrie); **A:** native PG13-Zellen (negative Kontrolle); **B:** transduzierte PG13-Zellen

Ebenso erfolgreich war die Transduktion mit MSCV-I-GFP(M)::scFvCD33 $\zeta$  verlaufen. Die Transduktionseffizienz der PG13-Zellen, die anhand der GFP-Expression durchflusszytometrisch quantifiziert wurde, hatte einen Wert von 100% (Abb. 3.5). Da in diesem Vektor das stromabwärts gelegene Transgen (z. B. Gen für cTCR) über eine IRES-Einheit mit GFP verbunden ist, konnte angenommen werden, dass auch das chimäre Gen exprimiert wurde.

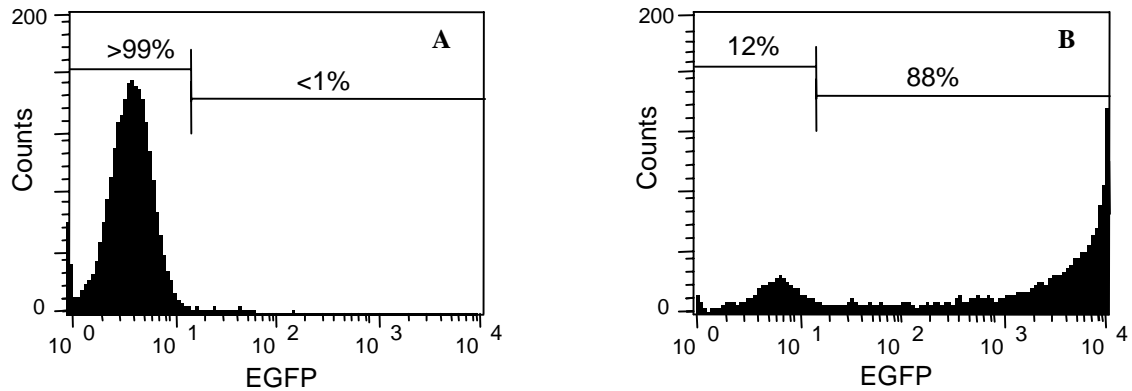


**Abb. 3.5:** GFP-Expression transduzierter PG13-Zellen mit Retroviren der Zelllinie Phoenix-Eco/MSCV-I-GFP(M)::scFvCD33 $\zeta$  (Durchflusszytometrie); **A:** native PG13-Zellen (negative Kontrolle); **B:** transduzierte PG13-Zellen

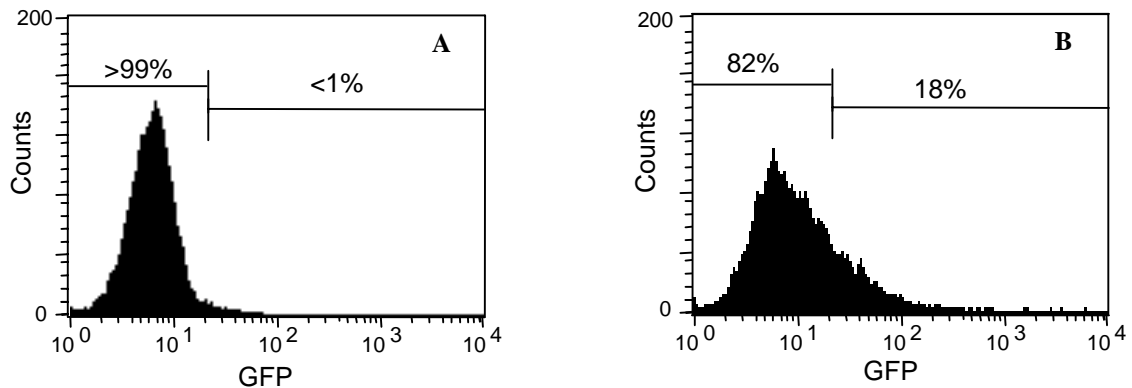
Um die Transkription des scFvCD33 $\zeta$  in den transduzierten PG13-Zellen zu bestätigen, wurden die Gesamt-RNA der Produktionszelllinien PG13/SFG::scFvCD33 $\zeta$  und PG13/MSCV-I-GFP(M)::scFvCD33 $\zeta$  isoliert und anschließend als Matrize für die cDNA-Synthese verwendet. Die cDNAs wurden in einer RT-PCR mit den Primern scFvCD33r und scFvCD33f, die am 5'- und am 3'-Ende der scFv-Nukleotidsequenz binden, amplifiziert. Durch die anschließende Sequenzierung des Amplifikationsproduktes (ca. 600 bp) wurde die Nukleotidsequenz des scFvCD33 bestätigt. Dadurch wurde gezeigt, dass das Gen für scFvCD33 durch retroviralen Gentransfer erfolgreich in die stabile Produktionszelllinie PG13 übertragen worden ist. Die Transkription des Gens wurde korrekt von der Wirtszelle durchgeführt.

### **3.1.2 Transduktion und funktionelle Untersuchungen des CD33 $\zeta$ -cTCR**

PBMC wurden aus dem peripheren Blut gesunder Spender isoliert und 48 h mit koimmobilisierten  $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28 prästimuliert, da Retroviren nur aktivierte Zellen transduzieren können. Die retrovirushaltigen Überstände der stabilen Verpackungszelllinien PG13/SFG::scFvCD33 $\zeta$ , PG13/MSCV-I-GFP(M)::scFvCD33 $\zeta$  und PG13/SFG::EGFP wurden für die Transduktion der PBMC eingesetzt. Nach einer 48-stündigen Inkubation auf Retronectin<sup>™</sup>-beschichteten Kulturplatten wurden die Überstände verworfen und die transduzierten PBMC unter Zugabe von IL-2 expandiert. Die Transduktionseffizienzen der PBMC wurden nach weiteren 3-5 Kultivierungstagen mit Hilfe der EGFP- bzw. GFP-Expression ermittelt. Alle Transduktionen wurden erfolgreich durchgeführt. Die Transduktionseffizienz der PBMC mit Retroviren der Zelllinie PG13/SFG::EGFP ergab einen maximalen Wert von 88% (Abb. 3.6) und mit Retroviren der Zelllinie PG13/MSCV-I-GFP(M)::scFvCD33 $\zeta$  einen maximalen Wert von 18% (Abb. 3.7). Aufgrund der GFP- bzw. EGFP-Expression wurde davon ausgegangen, dass auch der cTCR exprimiert wurde.



**Abb. 3.6:** EGFP-Expression transduzierter PBMC mit Retroviren der Zelllinie PG13/SFG::EGFP (Durchflusszytometrie); **A:** native PBMC (negative Kontrolle); **B:** transduzierte PBMC

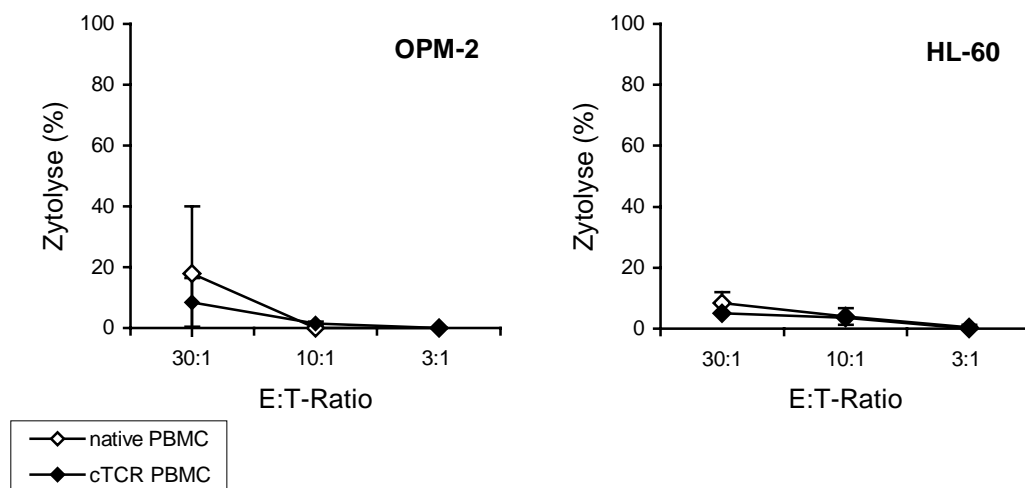


**Abb. 3.7:** GFP-Expression transduzierter PBMC mit Retroviren der Zelllinie PG13/MSCV-I-GFP(M)::scFvCD33 $\zeta$  (Durchflusszytometrie); **A:** native PBMC (negative Kontrolle); **B:** transduzierte PBMC

Um die Expression des cTCR zu verifizieren, wurde die Gesamt-RNA aus den transduzierten PBMC isoliert. Diese diente als Matrize für die Synthese der cDNA, die mit den Primern CD33f und CD33r in einer RT-PCR amplifiziert worden war. Das Amplifikationsprodukt (ca. 600 bp) wurde sequenziert und die Nukleotidsequenz des scFvCD33 bestätigt. Dadurch wurde bewiesen, dass das Gen für das scFvCD33 in PBMC korrekt transkribiert wurde.

Die transduzierten PBMC (Effektorzellen), die nachweislich das Gen für den cTCR enthalten, wurden auf ihre Effektoreigenschaften wie targetspezifische Zytokinproduktion und Zytolyse von Targetzellen untersucht. Dazu wurden native

(negative Kontrolle) und transduzierte PBMC in einem Zytotoxizitäts-Assay in verschiedenen Effektorzellen:Targetzellen (E:T)-Ratios auf ihre spezifischen Effektormechanismen wie Antigenerkennung (CD33) und Zytolyse gegenüber radioaktiv-markierten Targetzellen überprüft. Als CD33-exprimierende Targetzellen wurde die Zelllinie HL-60 und als CD33<sup>-</sup>-Targetzellen wurde die Zelllinie OPM-2 verwendet. Wie erwartet hatten die nativen PBMC keinen Effekt auf die Targetzellen (HL-60 und OPM-2). Ebenso wurden die CD33<sup>-</sup>-Targetzellen OPM-2 nicht von transduzierten PBMC lysiert. Jedoch wurden auch die CD33<sup>+</sup>-Targetzellen HL-60 von transduzierten PBMC nicht erkannt und effektiv lysiert (Abb. 3.8). Die Zytolyse der CD33<sup>-</sup>-Targetzellen und CD33<sup>+</sup>-Targetzellen durch transduzierte PBMC zeigte keinen Unterschied.

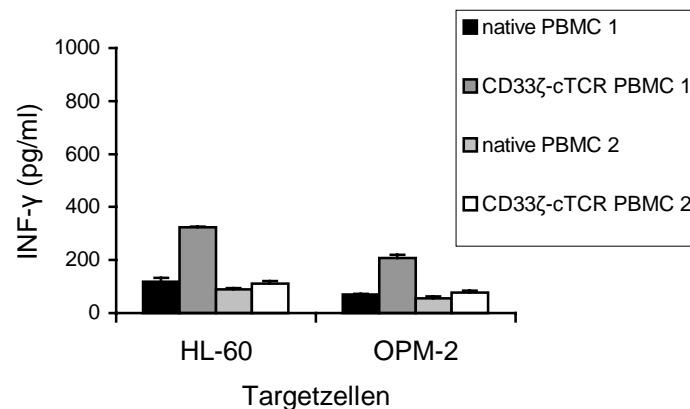


**Abb. 3.8:** Zytolyse <sup>51</sup>Cr-markierter Targetzellen der Zelllinien HL-60 (CD33<sup>+</sup>) und OPM-2 (CD33<sup>-</sup>) durch native und CD33 $\zeta$ -cTCR-transduzierte PBMC (Retroviren der Zelllinie PG13/SFG::scFvCD33); n=2

Die transduzierten PBMC weisen keine zytolytische Aktivität auf. Das Zielantigen CD33 konnte nicht vom CD33 $\zeta$ -spezifischen chimären Rezeptor erkannt werden, so dass Reaktionen der transduzierten Zelle nicht induziert werden konnten.

Weiterhin wurde die targetspezifische INF- $\gamma$ -Produktion transduzierter PBMC überprüft. Native (negative Kontrolle) und transduzierte PBMC von zwei Spendern wurden jeweils mit bestrahlten Targetzellen HL-60 und OPM-2 (Effektorzellen/Targetzellen-Ratio 1:3) koinkubiert. Nach einer 72-stündigen

Koinkubation wurden die Überstände in einem ELISA auf die INF- $\gamma$ -Produktion untersucht (Abb 3.9).



**Abb. 3.9:** INF- $\gamma$ -Produktion nativer und CD33 $\zeta$ -cTCR-transduzierter PBMC (Retroviren der Zelllinie PG13/SFG::*scFvCD33*) nach Koinkubation mit CD33<sup>+</sup>-Targetzellen (HL-60) und CD33<sup>-</sup>-Targetzellen (OPM-2); *pbmc 1*=PBMC von Spender 1, *pbmc 2*=PBMC von Spender 2

Erwartungsgemäß sekretierten sowohl die nativen PBMCs als auch die transduzierten Zellen bei Koinkubation mit CD33<sup>-</sup>-Targetzellen (OPM-2) kaum INF- $\gamma$  (100-150 pg/ml). Transduzierte Zellen produzierten jedoch nicht mehr als 300 pg/ml INF- $\gamma$  bei Koinkubation mit CD33<sup>+</sup>-Targetzellen (HL-60). Erwartungsgemäß sollte die targetspezifische INF- $\gamma$ -Produktion transduzierter Zellen verglichen mit nativen Zellen 10-100fach höher sein. Das Ergebnis der Unfunktionalität des CD33 $\zeta$ -spezifischen cTCR wurde mit der kaum vorhandenen INF- $\gamma$ -Produktion bestätigt.

Da die transduzierten PBMC keine Effektorfunktionen (Zytokinsekretion oder Zytolyse der Targetzellen) zeigten, ist dieser potentielle CD33 $\zeta$ -spezifische cTCR nach Transduktion in PBMC unfunktionell. Daher wurde die geplante Expression des cTCR in NKT-Zellen nicht durchgeführt.

## **3.2 CD20 $\zeta$ -spezifische chimäre T-Zell-Rezeptoren**

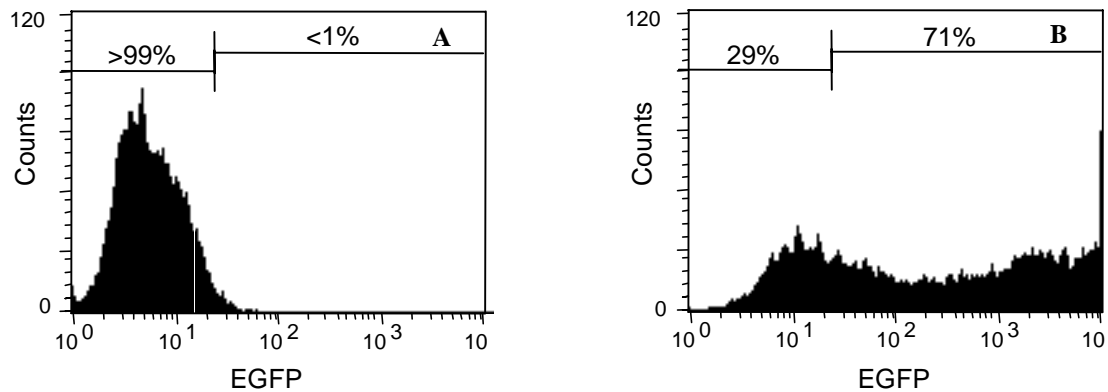
Die Nukleotidsequenz für den vollständigen CD20 $\zeta$ -spezifischen chimären T-Zell-Rezeptor hat als Insert im retroviralen Vektor SFG (SFG::scFvCD20 $\zeta$ ) vorgelegen.

### **3.2.1 Expression CD20 $\zeta$ -spezifischer cTCR in NKT-Zellen**

Für die Produktion rekombinanter Retroviren wurden zunächst Zellen der transienten Produktionszelllinie Phoenix-Ampho mit SFG::scFvCD20 $\zeta$  transfiziert. Die von Phoenix-Ampho-Zellen produzierten rekombinanten Retroviren wurden anschließend für die Transduktion der Produktionszelllinie PG13 verwendet. Die produzierten Retroviren dieser Zellen wurden schließlich für die Transduktion humaner PBMC verwendet, die durch IL-Gabe zu NKT-Zellen differenzierten.

#### **3.2.1.1 Konstruktion einer transienten Produktionszelllinie**

Zellen der humanen Zelllinie Phoenix-Ampho wurden mit dem Vektor SFG::scFvCD20 $\zeta$  durch eine Lipofektion transient transfiziert. Nach 24-stündiger Inkubation der Phoenix-Ampho-Zellen bei 37°C (in Kulturmedium mit 10% FCS) und nachfolgender 24-stündiger Inkubation bei 32°C (in Kulturmedium mit 20% FCS, Retrovirus-Produktion) wurde der retrovirushaltige Überstand abgenommen. Gleichzeitig wurden andere Phoenix-Ampho-Zellen mit dem Kontrollvektor SFG::EGFP transfiziert, um die Transfektionseffizienz über die Expression des EGFP durchflusszytometrisch quantifizieren zu können. Die Transfektion der Phoenix-Ampho-Zellen wurde erfolgreich durchgeführt. Da maximal 71% der Zellen mit dem Kontrollvektor transfiziert wurden (Abb 3.10), konnte davon ausgegangen werden, dass auch die Transfektion mit dem cTCR erfolgreich verlaufen ist.



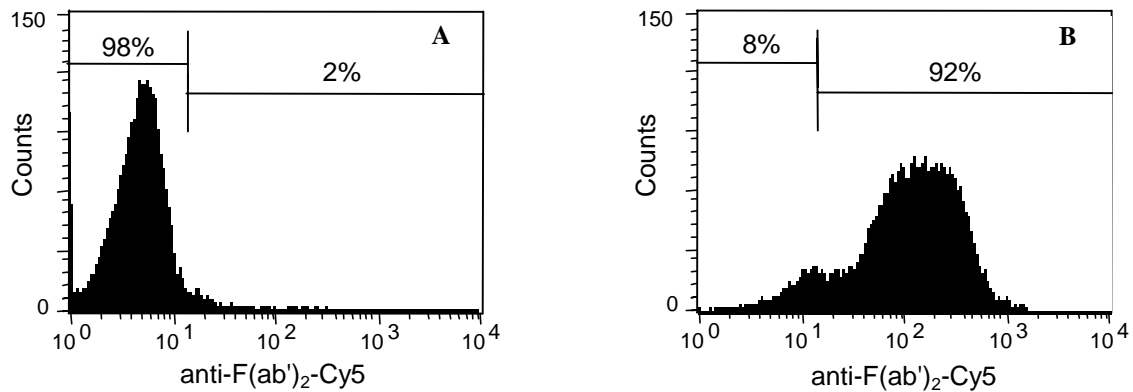
**Abb. 3.10:** EGFP-Expression von Phoenix-Ampho-Zellen nach Transfektion mit SFG::EGFP (Durchflusszytometrie); **A:** native Phoenix-Ampho-Zellen (negative Kontrolle), **B:** transfizierte Phoenix-Ampho-Zellen

### 3.2.1.2 Konstruktion einer stabilen Produktionszelllinie

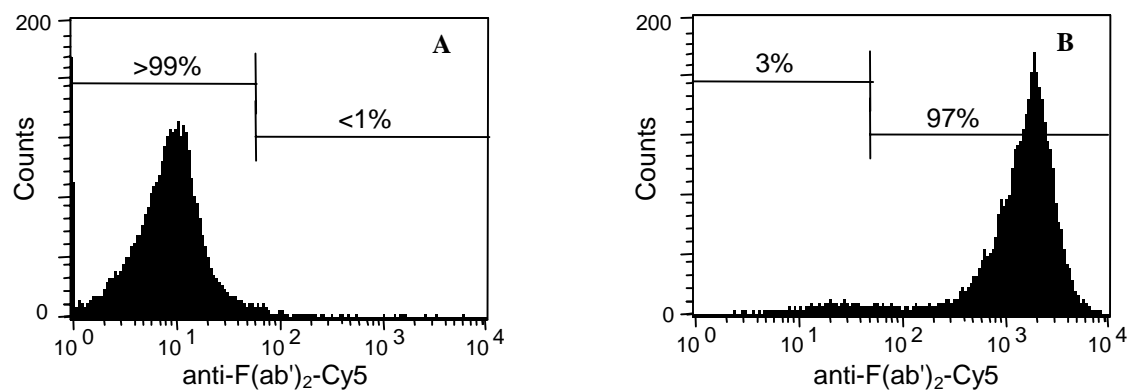
Der retrovirushaltige Überstand der transfizierten Phoenix-Ampho-Zellen (SFG::scFvCD20 $\zeta$ ) wurde für die Transduktion der stabilen Produktionszelllinie Flyrd18 verwendet. Dieser Vorgang wurde unter Zugabe von Protaminsulfat mehrfach wiederholt, um eine optimale Transduktion und somit eine hochtitrige Virusproduktion zu gewährleisten.

Nach der Transduktion der Flyrd18-Zellen wurde die Expression des CD20 $\zeta$ -spezifischen cTCR auf der Zelloberfläche durch Färbung mit einem Cy5- bzw. FITC-gekoppelten Ziege-anti-Maus-IgG-F(ab')<sub>2</sub>-Antikörper durchflusszytometrisch detektiert. Da keine Isotyp-Kontrolle dieses Antikörpers kommerziell erhältlich ist, wurden die jeweiligen nativen Zellen als negative Kontrolle verwendet. Die Flyrd18-Zellen konnten erfolgreich mit dem CD20 $\zeta$ -spezifischem cTCR transduziert werden. 92% der Zellen haben den cTCR exprimiert (Abb. 3.11).

Zusätzlich war eine alternative stabile Produktionszelllinie vorhanden: PG13/SFG::scFvCD20 $\zeta$ . Die Transduktionsrate dieser Zelllinie wurde mit 97% ermittelt (siehe Abb. 3.12).



**Abb. 3.11:** cTCR-Expression von Flyrd18-Zellen nach Transduktion mit Retroviren der Zelllinie Phoenix-Ampho/SFG::scFvCD20 $\zeta$  [Durchflusszytometrie nach Färbung mit Cy5-Ziege-anti-Maus-F(ab')<sub>2</sub>-Antikörper]; **A:** native Flyrd18-Zellen (negative Kontrolle), **B:** transduzierte Flyrd18-Zellen



**Abb. 3.12:** cTCR-Expression von PG13-Zellen nach Transduktion mit Retroviren der Zelllinie Phoenix-Ampho-Zellen/SFG::scFvCD20 $\zeta$  [Durchflusszytometrie nach Färbung mit Cy5-Ziege-anti-Maus-F(ab')<sub>2</sub>-Antikörper]; **A:** native PG13-Zellen (negative Kontrolle), **B:** transduzierte PG13-Zellen

### 3.2.1.3 Optimierung der Transduktionseffizienz humaner NKT-Zellen

Um die geplanten Transduktionen humaner NKT-Zellen unter besten Bedingungen durchführen zu können, wurden einzelne Parameter der Transduktions-Durchführung optimiert.

Da nicht bekannt war, ob die Transduktion frisch isolierter PBMC, die nach der Transduktion zu NKT-Zellen differenzieren, oder bereits differenzierter NKT-Zellen zu besseren Transduktionseffizienzen führte, wurden sowohl frisch isolierte PBMC als auch differenzierte NKT-Zellen transduziert.



### Optimierung der unspezifischen Prestimulation von PBMC

Um die optimale Prestimulierungszeit der Zellen fur eine effiziente Transduktion zu ermitteln, wurden PBMC aus dem peripheren Blut des selben gesunden Spenders an drei aufeinanderfolgenden Tagen isoliert und nach Depletion adherenter Zellen durch Kunststoffadsorption unter Zugabe von  $\text{INF-}\gamma$  (1000 U/ml) kultiviert. Die Zellen wurden nach 24-stundiger Kultivierung mit koimmobilisierten  $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28 weitere 24 h, 48 h und 72 h kultiviert (unspezifische Prestimulation). Nach der Prestimulation wurden die Zellen mit Retroviren der Zelllinie PG13/SFG::scFvCD20 $\zeta$  und der Kontroll-Zelllinie PG13/SFG::EGFP transduziert. Die Transduktionseffizienz aller Ansatze wurde anhand der Expression des EGFP oder des scFvCD20 $\zeta$  durchflusszytometrisch ermittelt. (Tab. 3.2).

**Tab. 3.2:** Transduktionseffizienzen von PBMC nach unterschiedlichen Prestimulierungszeiten mit  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28-Antikorpfern und Transduktion mit Retroviren der Zelllinien PG13/SFG::scFvCD20 $\zeta$  bzw. PG13/SFG::EGFP (cTCR- bzw. EGFP-Expression; Durchflusszytometrie)

Prestimulierungsdauer	Transduktionseffizienz (%)	
	PG13/SFG::scFvCD20 $\zeta$	PG13/SFG::EGFP
$\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28		
24 h	23	37
48 h	31	41
72 h	19	23

Dabei stellte sich heraus, dass die hochsten Transduktionseffizienzen nach einer 48-stundigen Prestimulierungsdauer erzielt worden war. Die effizienteste Transduktion mit dem cTCR wurde nach 48-stundiger Prestimulierungsdauer erzielt (31%). Ein entsprechendes Ergebnis wurde bei der Transduktion mit EGFP nach 48-stundiger Prestimulation ermittelt (41%). Basierend auf dieser Feststellung wurden alle weiteren Transduktionen humaner PBMC nach einer Prestimulierungsdauer von 48 h durchgefuhrt. Erst danach wurde die Differenzierung transduzierter Zellen zu NKT-Zellen durch Zytokin-Gabe stimuliert.

### Abhängigkeit von Restimulierung und Kultivierungsdauer der NKT-Zellen

Durch Zytokin-Gabe (IL-2 und IL-15) zum Kulturmedium können PBMC *in vitro* zu NKT-Zellen differenzieren. Da der Anteil der NKT-Zellen 14-21 Tagen nach Beginn der wiederholten Interleukin-Gabe auf ca. 30- 50% zugenommen hatte, wurde die Transduktion differenzierter Zellen in diesem Zeitraum durchgeführt.

Aus peripherem Blut gesunder Spender wurden PBMC isoliert und kultiviert. Durch Zugabe von INF- $\gamma$  (1000 U/ml), IL-2 (300 U/ml) und IL-15 (50 ng/ml) wurde die Expansion von NKT-Zellen stimuliert. Nach einer Kultivierungsdauer von 17 Tagen wurden  $1 \times 10^6$  Zellen mit einem „Feeder-Mix“ aus inaktivierten allogenen LCL und PBMC restimuliert und 24 h inkubiert, um zu untersuchen, ob die Transduktionseffizienz der Zellpopulation, die anteilig zu NKT-Zellen differenziert war, durch diese Restimulierung gesteigert werden konnte. Die restimulierten und nicht-restimulierten Zellen wurden nach einer Kultivierungsdauer von insgesamt 18 Tagen mit Retroviren der Zelllinie PG13/SFG::*scFvCD20 $\zeta$*  transduziert. Die Transduktionseffizienz aller Ansätze wurde durch Quantifizierung der Oberflächenexpression des cTCR durchflusszytometrisch bestimmt (Tab 3.3).

**Tab. 3.3 :** Transduktionseffizienzen anteilig differenzierter NKT-Zellen, die ohne oder mit Restimulierung transduziert wurden [cTCR- Expression; Durchflusszytometrie nach Färbung mit Ziege-anti-Maus-IgG-F(ab')<sub>2</sub>-Antikörper]

PBMC	Transduktionseffizienz (%)	
	ohne Restimulierung	mit Restimulierung
1	1	10
2	<1	13

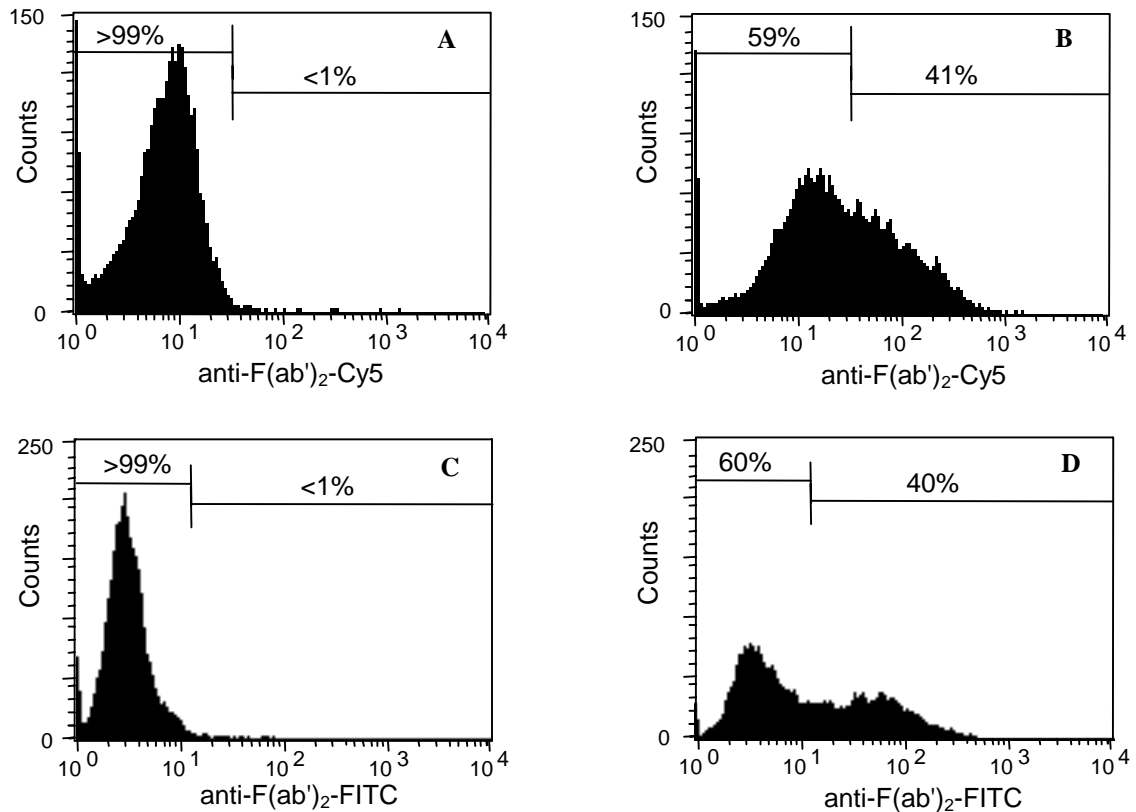
Die Zellen beider Spender konnten ohne vorherige Restimulierung mit Retroviren der Zelllinie PG13/SFG::*scFvCD20 $\zeta$*  nicht transduziert werden. Jedoch ist die Transduktion der gleichen Zellen nach einer Restimulierung mit dem „Feeder-Mix“ erfolgreich verlaufen. Vergleiche mit Transduktionseffizienzen frisch isolierter Zellen mit kurzer Kultivierungsdauer (2, 3 oder 4 Tage; Tab. 3.2) zeigten, dass diese Zellen effizienter als differenzierte Zellen mit langer Kultivierungsdauer (18 Tage; Tab. 3.3) transduziert werden konnten. Sogar die geringste Transduktionsrate frisch isolierter Zellen nach

72-stündiger Prästimulierungszeit (19%; Tab. 3.2) war höher als die anteilig differenzierter NKT- Zellen (13%; Tab. 3.3). Um eine erfolgreiche Transduktion differenzierter NKT-Zellen durchzuführen, war eine vorherige Restimulierung der Zellen mit „Feeder-Mix“ unbedingt erforderlich.

Alle weiteren Transduktionen humaner NKT-Zellen wurden nach diesen Optimierungskriterien durchgeführt: Die Zellen wurden nach 48-stündiger unspezifischer Prästimulierung ( $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28) und einer kurzen Kultivierungsdauer von drei Tagen transduziert; bei längerer Kultivierungsdauer (> 4 Tage) wurden die Zellen 24 h vor der Transduktion durch Koinkubation mit einem „Feeder-Mix“ aus inaktivierten allogenen LCL und PBMC in AIM-V (2% AB-Serum/ 2 mM L-Gln) restimuliert.

#### **3.2.1.4 Generierung CD20 $\zeta$ -cTCR-exprimierender NKT-Zellen *in vitro***

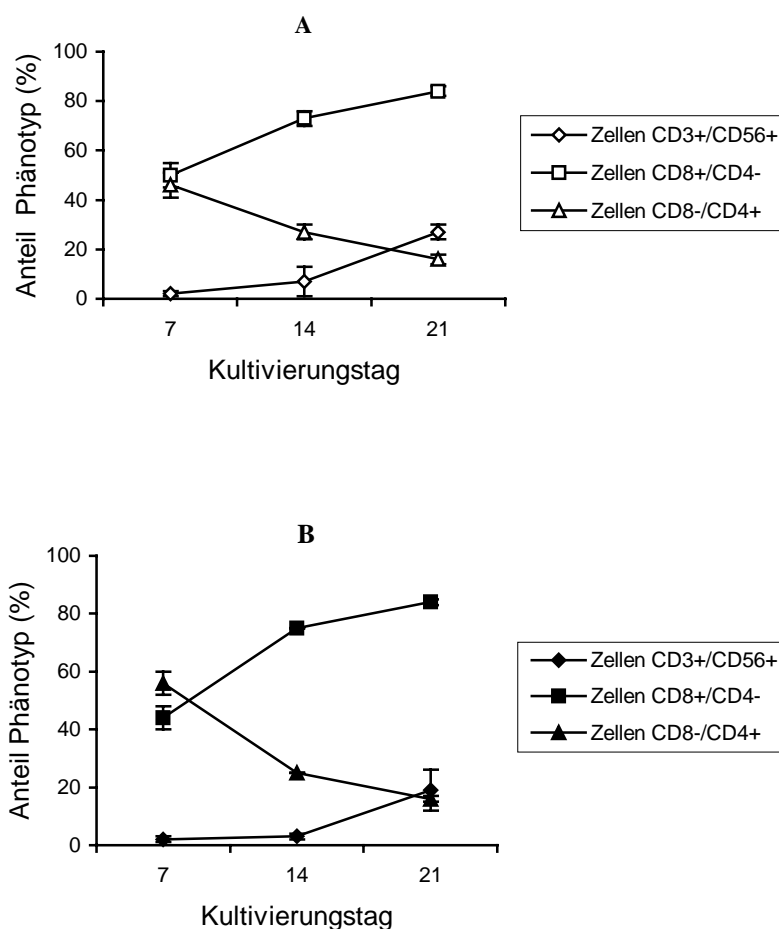
Aus peripherem Blut gesunder Spender wurden PBMC isoliert und nach Depletion der adhärennten Zellen durch Kunststoffadsorption unter Zugabe von INF- $\gamma$  (1000 u/ml) kultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen mit koimmobilisierten  $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28 unspezifisch prästimuliert. Durch Zugabe von IL-2 (300 U/ml) und IL-15 (50 ng/ml) wurde die Expansion der NKT-Zellen stimuliert. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen mit Retroviren der Zelllinien PG13/SFG::*scFv*CD20 $\zeta$  und Flyrd18/SFG::*scFv*CD20 $\zeta$  erfolgreich mit dem cTCR transduziert. Um Transduktionseffizienzen zu vergleichen, wurden sowohl Retroviren der murinen Zelllinie PG13/SFG::*scFv*CD20 $\zeta$  als auch der humanen Zelllinie Flyrd18/SFG::*scFv*CD20 $\zeta$  für den Gentransfer eingesetzt. Die bei separaten Ansätzen ermittelten Transduktionseffizienzen (Tag 3-5 nach Transduktion) variierten zwischen 21% und 44% (PG13/SFG::*scFv*CD20 $\zeta$ ) und zwischen 6% und 40% (Flyrd18/SFG::*scFv*CD20 $\zeta$ ). Exemplarisch sind Zellen mit sehr guter Transduktionseffizienz in Abb. 3.13 dargestellt.



**Abb. 3 13:** Vergleich der cTCR-Expression von PBMC nach Transduktion mit Retroviren der Zelllinien PG13/SFG::scFvCD20 $\zeta$  (**B**) und Flyrd18/SFG::scFvCD20 $\zeta$  (**D**); **A**, **C**: native PBMC (negative Kontrolle), [Durchflusszytometrie nach Färbung mit Cy5- bzw. FITC-Ziege-anti-Maus-IgG-F(ab')<sub>2</sub>-Antikörper]

Unabhängig davon, ob die Transduktionen mit Retroviren der Zelllinie PG13 oder Flyrd18 durchgeführt worden waren, hatten ca. 40% der Zellen das Transgen auf der Zelloberfläche exprimiert. Das Ergebnis zeigte, dass die Zelllinien PG13 und Flyrd18 gleichermaßen geeignet sind für die Produktion von Retroviren für den retroviralen Gentransfer in PBMC.

Um nach der Transduktion der PBMC eine kontinuierliche Expansion der NKT-Zellen zu erreichen, wurden sowohl transduzierte als auch native Zellen mit IL-2 (300 U/ml) und IL-15 (50 ng/ml) drei Wochen kultiviert. Da NKT-Zellen (CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>) und T-Zellen (CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>-</sup>) einen unterschiedlichen Phänotyp haben, konnten die phänotypischen Veränderungen der transduzierten und nativen Zellpopulationen durch durchflusszytometrische Analysen aufgezeichnet werden. Dafür wurden die Zellen an den Kultivierungstagen 7, 14 und 21 mit  $\alpha$ -CD3-PerCP,  $\alpha$ -CD56-FITC und zusätzlich mit  $\alpha$ -CD4-PE (Identifizierung von T<sub>H</sub>1-Zellen und T<sub>H</sub>2-Zellen) bzw.  $\alpha$ -CD8-PE (Identifizierung von zytotoxischen T-Zellen) gefärbt (Abb. 3.14).

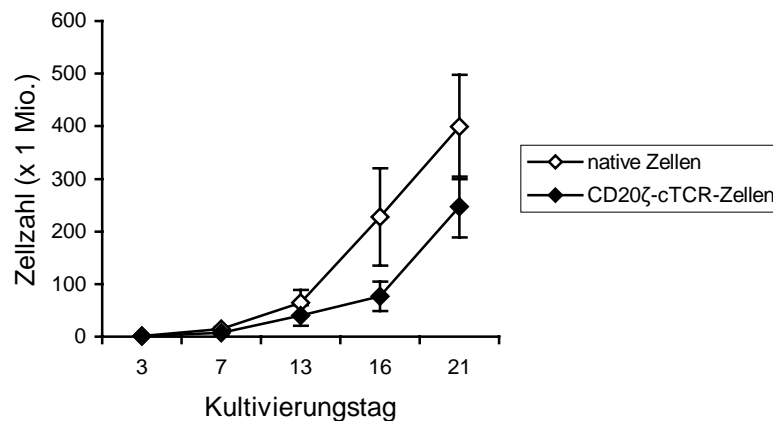


**Abb. 3.14:** Phänotypische Analyse nativer (A) und CD20 $\zeta$ -cTCR-transduzierter PBMC-Zellpopulationen (B) nach Gabe von IL-2 (300 U/ml) und IL-15 (50 ng/ml) (CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>: NKT-Zellen, CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>: zytotoxische T-Zellen, CD8<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup>: T<sub>H</sub>1-Zellen und T<sub>H</sub>2-Zellen); Transduktionseffizienz: 21-27%; n=3 (Durchflusszytometrie nach Färbung mit  $\alpha$ -CD3-PerCP,  $\alpha$ -CD56-FITC,  $\alpha$ -CD4-PE bzw.  $\alpha$ -CD8-PE)

Der Anteil der NKT-Zellen ist sowohl in der transduzierten als auch in der nativen Zellpopulation kontinuierlich von unter 5% am Tag 7 auf 20%-30% am Tag 21 gestiegen. Auch der Anteil CD8<sup>+</sup>-Zellen hat in beiden Zellpopulationen von Tag 7 kontinuierlich bis zum Tag 21 auf ca. 85% zugenommen. Hingegen hat der Anteil der CD4<sup>-</sup>-Zellen in beiden Zellpopulationen stetig von Tag 7 bis Tag 21 bis ca. 15% abgenommen. Je länger die Kultivierung der Zellen mit IL-2 (300 U/ml) und IL-15 (50 ng/ml) durchgeführt worden war, desto größer wurde der NKT-Anteil in der Population. Ebenso wurde unter diesen Bedingungen der Anteil der zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) größer und der Anteil der T<sub>H</sub>1-Zellen und T<sub>H</sub>2-Zellen (beide CD4<sup>+</sup>)

kleiner. Die Differenzierung von nativen und transduzierten Zellen zu NKT-Zellen zeigte keinen Unterschied.

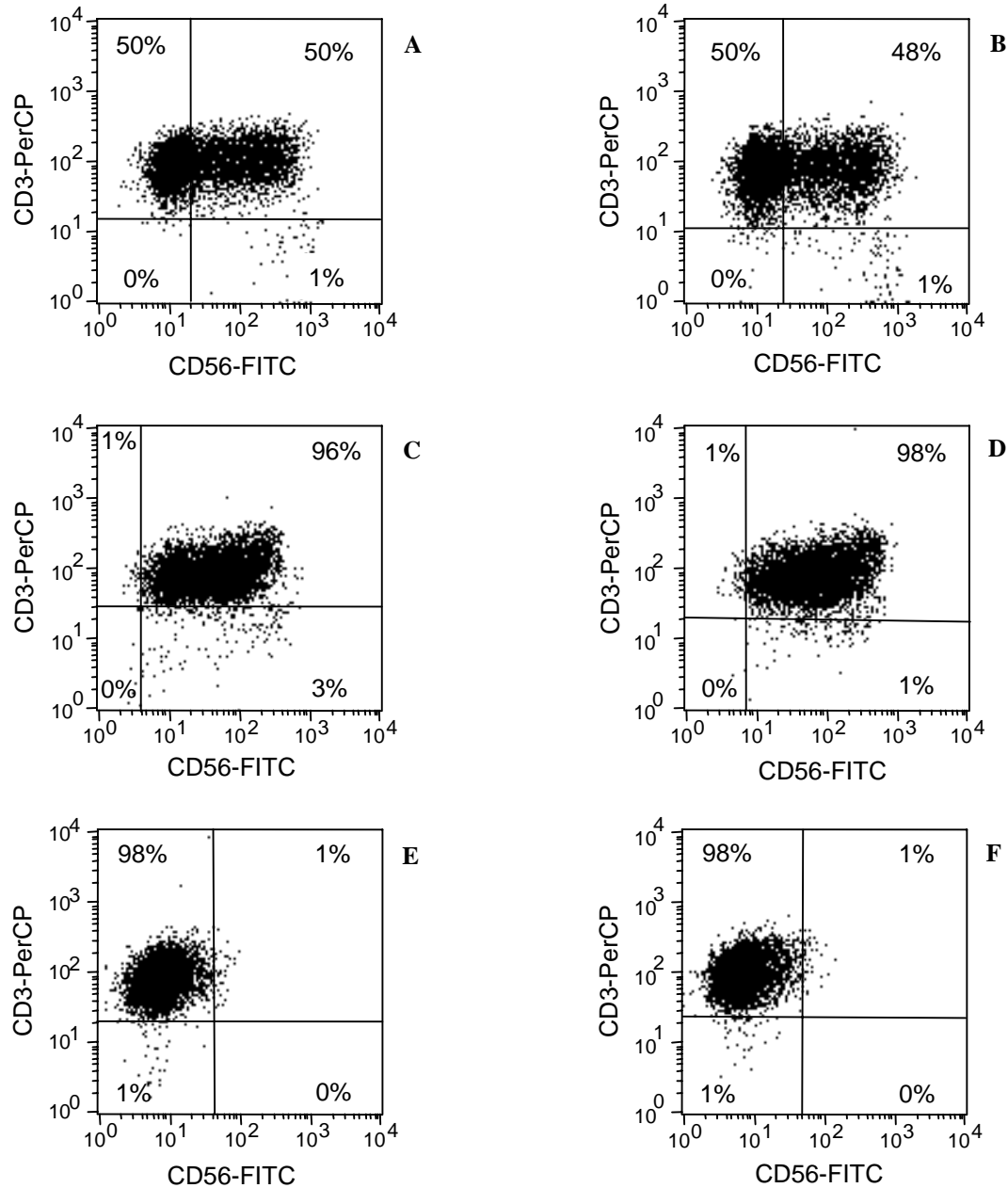
Weiterhin wurde die Proliferation der transduzierten und nativen Zellen an den Kultivierungstagen 3, 7, 13, 16 und 21 durch Zellzahlbestimmungen in der Zählkammer ermittelt (Abb. 3.15). Ausgehend von  $1 \times 10^6$  Zellen (am Tag der Transduktion, Kultivierungstag 3) stieg die Zellzahl der transduzierten Zellen auf ca.  $250 \times 10^6$  und die der nativen Zellen auf ca.  $400 \times 10^6$  am Tag 21. Beide Zelltypen zeigten eine sehr gute Proliferation, wobei in dieser Stichprobe (n=3) die Proliferationsrate der nativen größer als die der transduzierten Zellen war.



**Abb 3.15:** Zellzahl-Expansion nativer und CD20 $\zeta$ -cTCR-transduzierter PBMC in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer (Transduktionsrate 7-14%; n= 3)

Zur Untersuchung der Effektoreigenschaften von CD20 $\zeta$ -cTCR-exprimierenden NKT-Zellen waren native und transduzierte NKT-Zellen mit sehr hoher Reinheit (> 95%) erforderlich. Da reine NKT-Zellpopulationen durch wiederholte Gabe von IL-2 (300 U/ml) und IL-15 (50 ng/ml) nicht erzeugt werden konnten, wurde am Kultivierungstag 21 (Tag 18 nach Transduktion) eine magnetische Zellseparation (MACS) mit CD56 „Micro Beads“ durchgeführt. Da am Tag 21 kaum CD3<sup>-</sup>-Zellen in den Zellpopulationen vorhanden waren (durchflusszytometrische Untersuchungen), wurden durch die Separation mit CD56 „Micro Beads“ die CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> NKT-Zellen isoliert. Die Reinheit der NKT-Zellen konnte durch die magnetische Separation auf 85% bis 98% gesteigert werden. Für alle weiteren funktionellen Untersuchungen der CD20 $\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen wurden ausschließlich Populationen mit Reinheiten zwischen

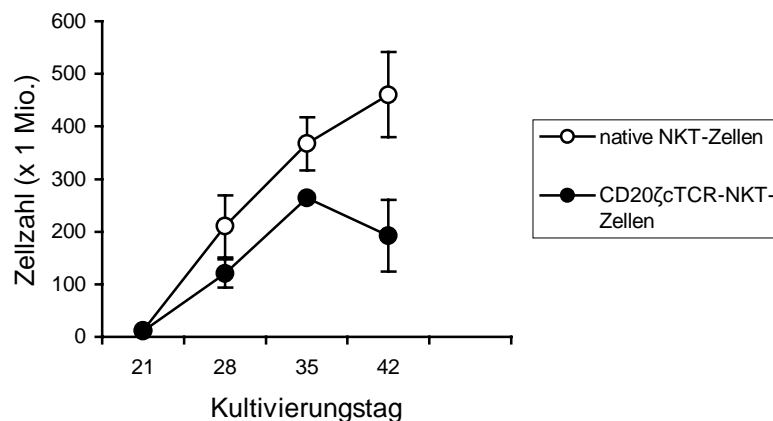
95% und 98% verwendet. Exemplarisch ist die phänotypische Analyse transduzierter und nativer Zellpopulationen vor und nach der Separation in Abb. 3.16 dargestellt.



**Abb. 3.16:** Phänotyp nativer und cTCR-CD20 $\zeta$ -transduzierter PBMC vor und nach magnetischer Separation (Durchflusszytometrie nach Färbung mit  $\alpha$ -CD3-PerCP und  $\alpha$ -CD56-FITC); **A:** native Zellpopulation vor Separation, **B:** transduzierte Zellpopulation vor Separation, **C:** native CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>-Fraktion (NKT-Zellen) nach Separation, **D:** transduzierte CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>-Fraktion (NKT-Zellen) nach Separation, **E:** native CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>-</sup>-Fraktion (T-Zellen) nach Separation, **F:** transduzierte CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>-</sup>-Fraktion (T-Zellen) nach Separation

In diesem Beispiel war der NKT-Anteil der nativen und der transduzierten Population vor der magnetischen Separation (Tag 21) jeweils ca. 50%. Der Anteil CD3<sup>-</sup>-negativer Zellen war geringer als 2%. Nach der magnetischen Separation lagen fast reine NKT-Zellpopulationen vor (97% NKT-Zellen bei transduzierten Zellen, 95% NKT-Zellen bei nativen Zellen). Die Zellen, die während der magnetischen Separation depletiert worden sind, zeigten den Phänotyp der T-Zellen CD56<sup>-</sup>/CD3<sup>+</sup> (ca. 99% bei transduzierten und nativen Zellen). Diese T-Zellpopulationen wurden für vergleichende Untersuchungen verwendet (Kapitel 3.2.3).

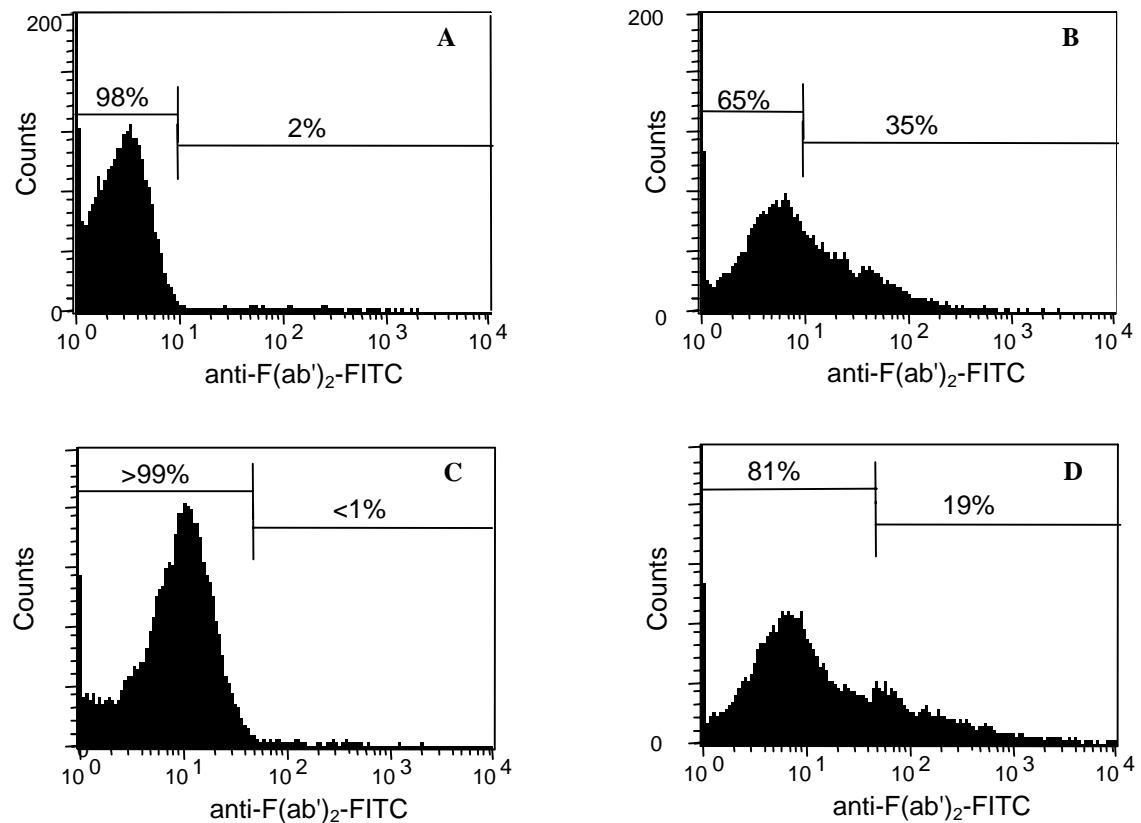
Um die Expansion der reinen NKT-Populationen (nativ und transduziert) nach der Separation zu verfolgen, wurden an den Kultivierungstagen 28, 35 und 42 Zellzahlbestimmungen in der Zählkammer durchgeführt (Abb. 3.17). Ausgehend von  $1 \times 10^6$  Zellen am Tag 21 wurde die sehr gute Proliferation nativer und transduzierter NKT-Zellen bis zum Kultivierungstag 35 gezeigt, wobei in dieser Stichprobe (n=2) die Proliferation der nativen größer als die der transduzierten Zellen war. In der Zeitspanne zwischen dem 36. und dem 42. Kultivierungstag hatte in dieser Stichprobe die Anzahl der transduzierten Zellen abgenommen, während die nativen Zellen weiterhin proliferierten.



**Abb. 3.17:** Zellzahl-Expansion nativer und cTCR-CD20ζ-transduzierter NKT-Zellpopulationen (n= 2; Transduktions-Effizienz: 15-23%)



Da die ursprüngliche Zellpopulation in der magnetischen Separation aufgetrennt worden war, wurden die Transduktionsraten erneut durchflusszytometrisch quantifiziert. Die Werte für separat durchgeführte Aufreinigungen lagen zwischen 14% und 35% (PG13/SFG::scFvCD20 $\zeta$ ) und zwischen 9% und 19% (Flyrd18/SFG::scFvCD20 $\zeta$ ). Die maximalen Transduktionsraten für NKT-Zellen, die mit Retroviren der Zelllinien PG13/SFG::scFvCD20 $\zeta$  und Flyrd18/SFG::scFvCD20 $\zeta$  erzielt wurden, sind in Abb. 3.18 gezeigt. Auch nach der magnetischen Separation zeigte sich kein Unterschied darin, ob Retroviren der Zelllinien PG13 oder Flyrd18 für die Transduktion verwendet wurden (vgl. Abb. 3.13).



**Abb. 3.18:** cTCR-Expression reiner NKT-Zellpopulationen nach magnetischer Separation; **A**, **C**: native NKT-Zellen (negative Kontrolle); **B**: Transduktion mit Retroviren der Zelllinie PG13/SFG::scFvCD20 $\zeta$ ; **D**: Transduktion mit Retroviren der Zelllinie Flyrd18/SFG::scFvCD20 $\zeta$ ; [Durchflusszytometrie nach Färbung mit FITC-Ziege-anti-Maus-IgG-F(ab')<sub>2</sub>-Antikörper]

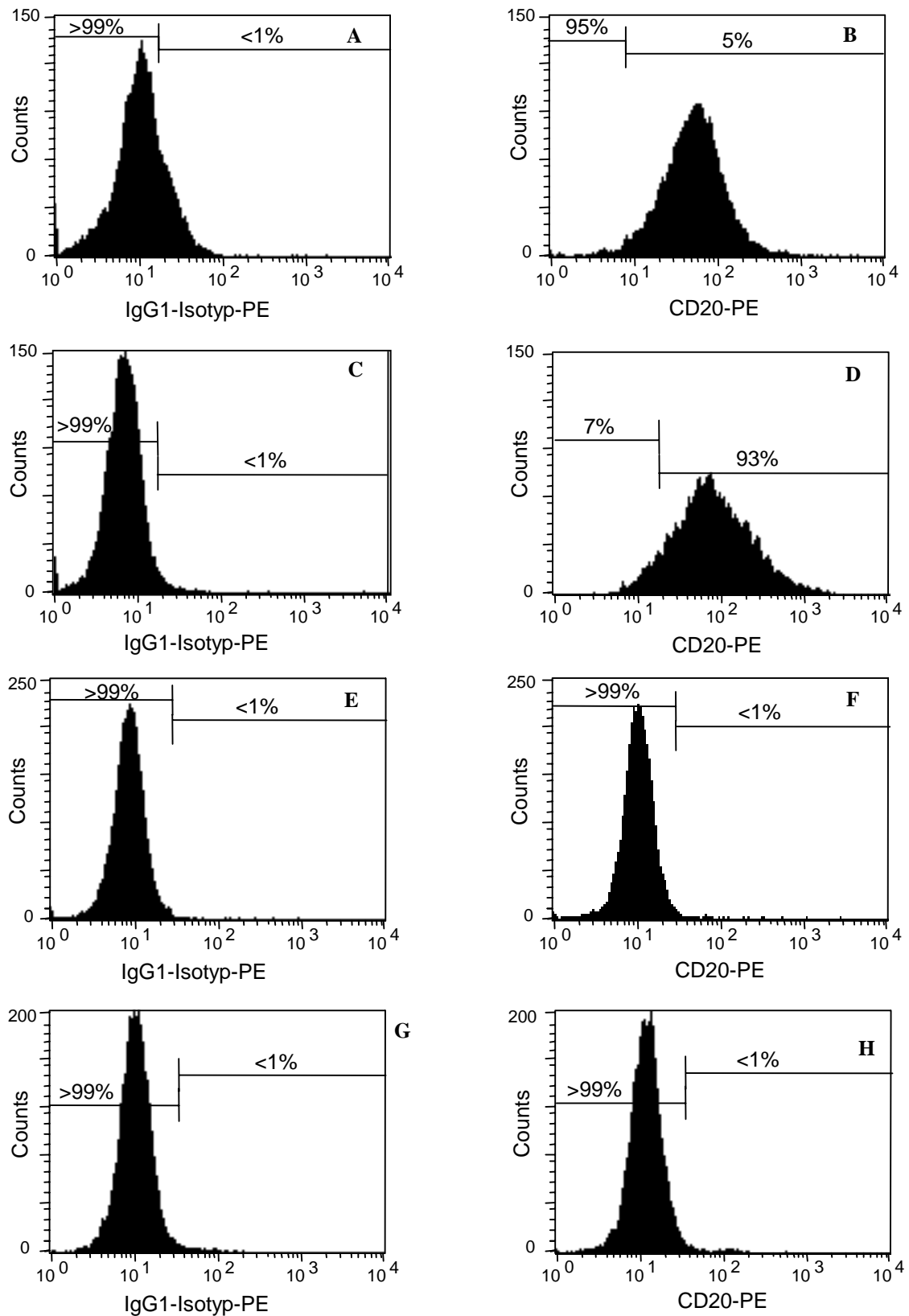
Die Expansion reiner NKT-Zellpopulationen (NKT-Zellen >95%) konnte *in vitro* erfolgreich durchgeführt werden. Weiterhin konnten transduzierte NKT-Zellen generiert werden, die den CD20 $\zeta$ -cTCR exprimieren (Transduktionsraten 9-37%).

### **3.2.2 Funktionelle Untersuchungen CD20 $\zeta$ -cTCR-exprimierender NKT-Zellen**

Nachdem die Expression der CD20 $\zeta$ -spezifischen cTCR auf der Oberfläche von NKT-Zellen nachgewiesen wurde, sind funktionelle Untersuchungen bezüglich der Zytotoxizität, Zytokin-Sekretion (INF $\gamma$ ) und Effektoreigenschaften durchgeführt worden.

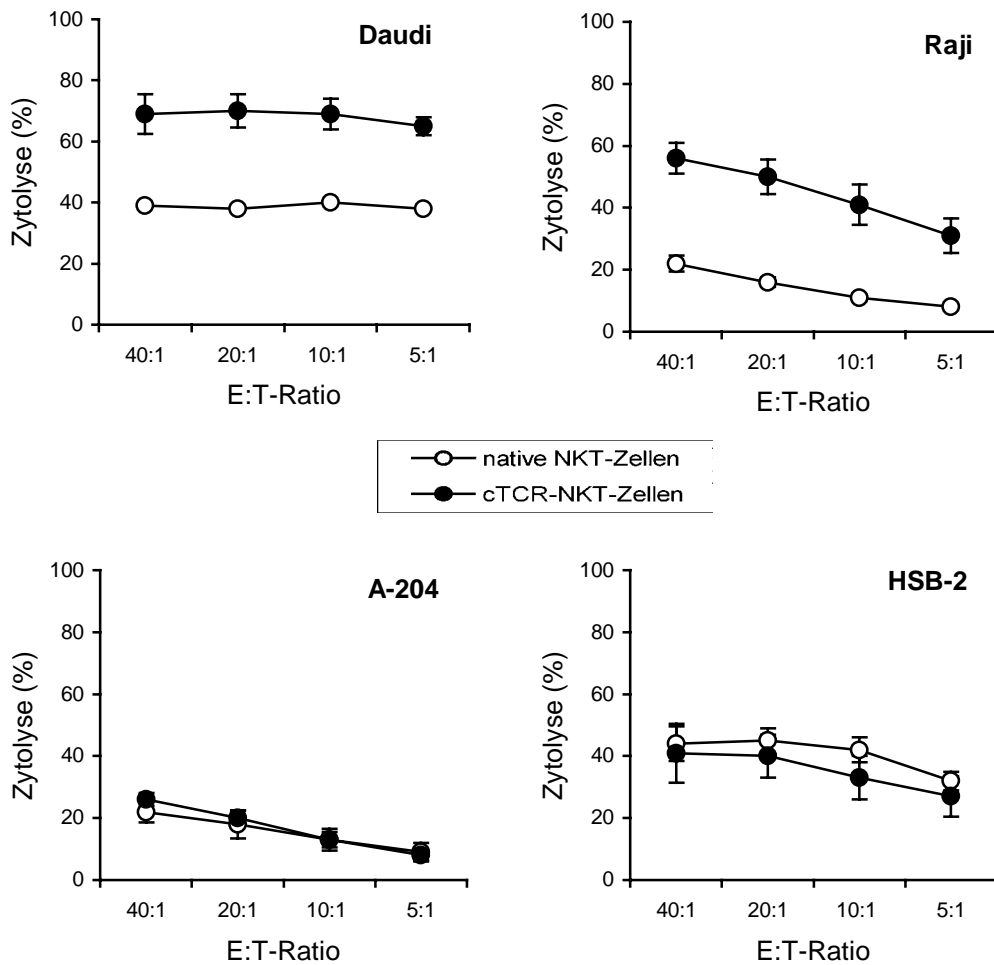
#### **3.2.2.1 Zytotoxizität CD20 $\zeta$ -cTCR-exprimierender NKT-Zellen**

Um die zytotoxische Spezifität CD20 $\zeta$ -cTCR-exprimierender NKT-Zellen nachzuweisen, wurden native und transduzierte NKT-Zellen in Zytotoxizitäts-Assays als Effektorzellen eingesetzt und in verschiedenen Effektorzellen/Targetzellen (E:T)-Ratios (5:1, 10:1, 20:1 und 40:1) mit unterschiedlichen Targetzelllinien (Daudi, Raji, A-204 und HSB-2) koinkubiert. Die transduzierten NKT-Zellen wurden mit Retroviren unterschiedlicher Produktionszelllinien (PG13/SFG::scFvCD20 $\zeta$  und Flyrd18/SFG::scFvCD20 $\zeta$ ) hergestellt, um zu untersuchen, ob die Zytotoxizität der CD20 $\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen unabhängig von der Retroviren produzierenden Zelllinie ist. Die Targetzelllinien Daudi und Raji, die auf ihrer Oberfläche CD20 exprimieren (Abb. 3.19), müssen von einem funktionellen cTCR der transduzierten Effektorzellen erkannt und lysiert werden. Die Targetzellen A-204 und HSB-2, die kein CD20 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Abb. 3.19) müssen von der Zytolysefähigkeit der transduzierten Effektorzellen über den cTCR unbeeinflusst bleiben. Da HSB-2 jedoch sensitiv gegenüber der NKT-Aktivität ist, können diese Zellen über die NKT-Aktivität unabhängig vom cTCR der transduzierten Effektorzellen lysiert werden.



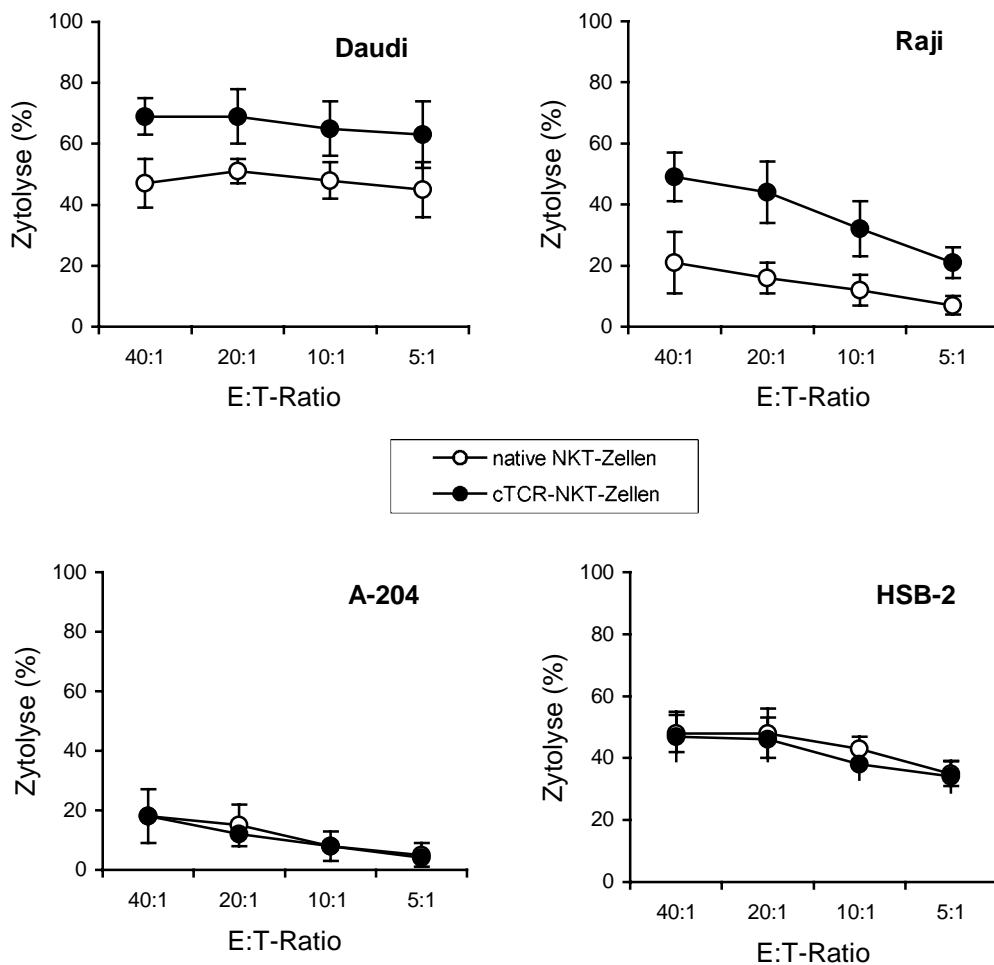
**Abb. 3.19:** CD20-Expression der  $^{51}\text{Cr}$ -markierten Targetzelllinien Daudi (A, B), Raji (C, D), A-204 (E, F) und HSB-2 (G, H); (Durchflusszytometrie nach Färbung mit IgG1-Isotyp-PE bzw.  $\alpha$ -CD20PE)

Die mit Retroviren der Produktionszelllinien PG13/SFG::scFvCD20 $\zeta$  transduzierten NKT-Zellen (Abb. 3.20) hatten wie erwartet Zellen der Targetzelllinie Daudi (CD20<sup>+</sup>) erkannt und lysiert. (65% bei E:T-Ratio 5:1; 69% bei E:T-Ratio 40:1). Die nativen NKT-Zellen zeigten auch eine unspezifische Zytolysekapazität gegenüber den Daudi-Zellen, die jedoch geringer als die der transduzierten NKT-Zellen war (38% bei E:T-Ratio 5:1; 39% bei E:T-Ratio 40:1). Auch die Zellen der Targetzelllinie Raji (CD20<sup>+</sup>) wurden erwartungsgemäß von den CD20 $\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen lysiert (31% bei E:T-Ratio 5:1; 56% bei E:T-Ratio 40:1). Die nativen NKT-Zellen lysierten wie erwartet nur 8% (E:T-Ratio 5:1) bis 22% (E:T-Ratio 40:1) der Raji-Zellen. Auch hier lag die Zytolysekapazität transduzierter Zellen deutlich über der nativer Zellen. Die Zellen der Targetzelllinie A-204 (CD20<sup>-</sup>) wurden in vergleichsweise geringem Maße von transduzierten (8% bei E:T-Ratio 5:1; 26% bei E:T-Ratio 40:1) und nativen NKT-Zellen lysiert (9% bei E:T-Ratio 5:1; 22% bei E:T-Ratio 40:1). Die Zellen der Targetzelllinie HSB-2 (CD20<sup>-</sup>) wurden unabhängig vom cTCR über die NKT-Aktivität der NKT-Zellen lysiert. Native NKT-Zellen lysierten 32% (E:T-Ratio 5:1) bis 44% (E:T-Ratio 40:1) der Targetzellen. Die transduzierten NKT-Zellen zeigten ähnliche Effektoreigenschaften gegenüber HSB-2-Zellen (27% bei E:T-Ratio 5:1; 41% bei E:T-Ratio 40:1). Damit wurde gezeigt, dass die transduzierten NKT-Zellen ihre Eigenschaften behalten und weiterhin über ihre NKT-Aktivität spezielle Targetzellen (HSB-2) lysieren können.



**Abb. 3.20:** Zytolyse  $^{51}\text{Cr}$ -markierter Targetzellen der Zelllinien Daudi ( $\text{CD}20^+$ ), Raji ( $\text{CD}20^+$ ), A-204 ( $\text{CD}20^-$ ) und HSB-2 ( $\text{CD}20^-$ , sensitiv gegenüber NKT-Aktivität) durch native und  $\text{CD}20\zeta$ -cTCR-transduzierte NKT-Zellen (Retroviren der Zelllinie PG13/SFG:: $\text{scFvCD}20\zeta$ );  $n=4$ ; Transduktionsrate: 7-21%

Die Zytotoxizitäts-Assays der mit Retroviren der Produktionszelllinie Flyrd18/SFG:: $\text{scFVCD}20\zeta$  transduzierten NKT-Zellen (Abb. 3.21) zeigten sehr ähnliche Ergebnisse wie die mit Retroviren der Produktionszelllinie PG13/SFG:: $\text{scFVCD}20\zeta$  transduzierten NKT-Zellen.



**Abb. 3.21:** Zytolyse  $^{51}\text{Cr}$ -markierter Targetzellen der Zelllinien Daudi ( $\text{CD}20^+$ ), Raji ( $\text{CD}20^+$ ), A-204 ( $\text{CD}20^-$ ) und HSB-2 ( $\text{CD}20^-$ , sensitiv gegenüber NKT-Aktivität) durch native und  $\text{CD}20\zeta$ -cTCR-transduzierte NKT-Zellen (Retroviren der Zelllinie Flyrd18/SFG:: $\text{scFvCD}20\zeta$ );  $n=4$ ; Transduktionsrate: 7-21%

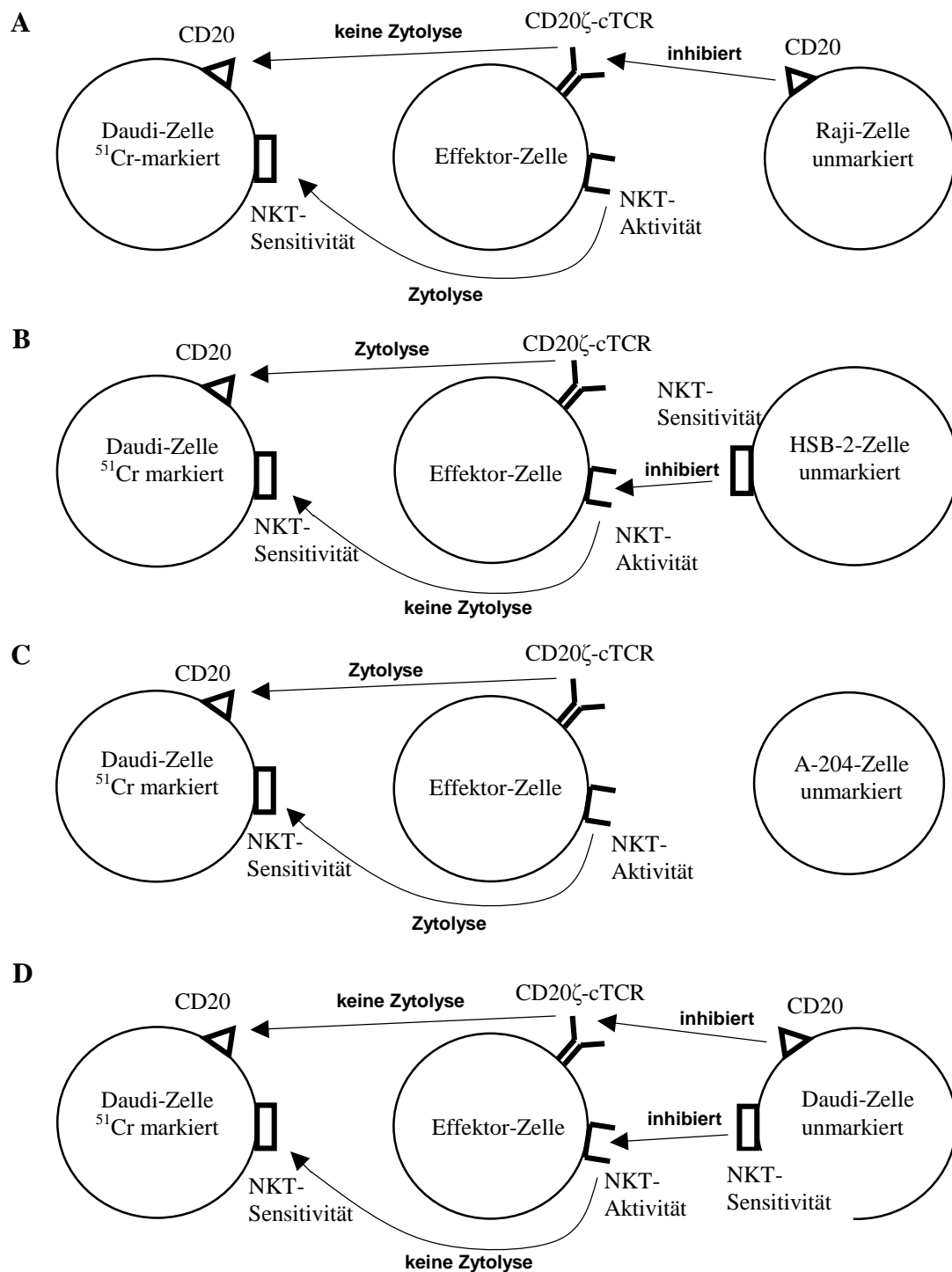
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass  $\text{CD}20\zeta$ -cTCR-transduzierte NKT-Zellen  $\text{CD}20^+$ -Targetzellen erkennen und lysieren, während sie auf  $\text{CD}20^-$ -Targetzellen einen geringen oder keinen Effekt haben. Aufgrund der antigenspezifischen Zytotoxizität der transduzierten NKT-Zellen, wurde die Funktionalität des  $\text{CD}20\zeta$ -spezifischen chimären T-Zell-Rezeptors nachgewiesen. Die nativen NKT-Zellen zeigten gegenüber allen Targetzellen eine unspezifische zytolytische Aktivität, die jedoch immer deutlich geringer als die der  $\text{CD}20\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen war. Die vergleichenden Zytotoxizitäts-Assays haben gezeigt, dass die spezifische Zytotoxizität der

CD20 $\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen unabhängig davon ist, welche Zelllinie für die Produktion der zur Transduktion eingesetzten rekombinanten Retroviren verwendet wurde.

### 3.2.2.2 „Cold Target Inhibition“-Assays

Um die Beteiligung des cTCR und der NKT-Aktivität CD20 $\zeta$ -cTCR-exprimierender NKT-Zellen (Effektorzellen) an der Zytolyse von Targetzellen zu unterscheiden, wurden sogenannte „Cold Target Inhibition“-Assays durchgeführt. Da Daudi-Zellen scheinbar über die NKT-Aktivität (unspezifische Zytolyse) und über den cTCR (spezifische Zytolyse) der Effektorzellen lysiert werden können, wurden diese Zellen als Targetzellen eingesetzt (Abb.3.20 und 3.21).

Durch Koinkubation <sup>51</sup>Cr-markierter Daudi-Zellen mit verschiedenen unmarkierten Zellen (Daudi, Raji, A-204 und HSB-2) in unterschiedlichen Ratios („cold target“ : „hot target“ - Ratio = c:h-Ratio) wurde spezifisch die Zytolyse über den cTCR oder die Zytolyse über die NKT-Aktivität der Effektorzellen inhibiert (Abb. 3. 22). Raji-Zellen sollten durch ihr CD20-Oberflächenmolekül den CD20 $\zeta$ -spezifischen cTCR der transduzierten NKT-Zellen inhibieren. Folglich sollte dann die Zytolyse der Daudi-Zellen nur noch über die NKT-Aktivität der transduzierten NKT-Zellen möglich sein (Abb. 3.22, A). HSB-2-Zellen (CD20<sup>-</sup>) sollten durch ihre NKT-Sensitivität die NKT-Aktivität der transduzierten NKT-Zellen inhibieren. Folglich sollten dann die Daudi-Zellen nur noch über den cTCR transduzierter NKT-Zellen lysiert werden (Abb. 3.22, B). A-204-Zellen wurden als Kontrolle eingesetzt, die keine Reduzierung der Zytolyse der Daudi-Zellen hervorrufen sollten, da sie weder über CD20-Oberflächenmoleküle noch über eine NKT-Sensitivität verfügen (Abb. 3.22, C). Als weitere Kontrolle wurden unmarkierte Daudi-Zellen mitgeführt, die sowohl die NKT-Aktivität als auch die cTCR transduzierter NKT-Zellen inhibieren sollten (Abb. 3.22, D).



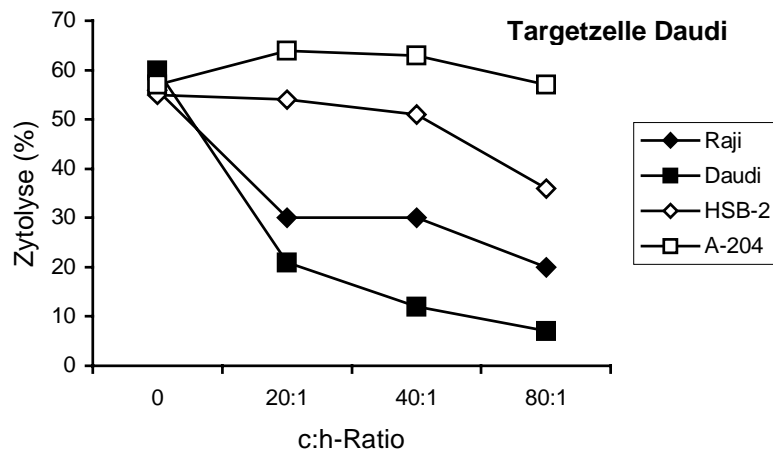
**Abb.3.22:** Schematische Darstellung der Koinkubations-Ansätze des „Cold Target Inhibition“-Assays; die Zytolyse <sup>51</sup>Cr-markierter Daudi-Zellen soll inhibiert werden; **A:** Inhibierung des cTCR transduzierter NKT-Zellen durch CD20 der Raji-Zellen; **B:** Inhibierung der NKT-Aktivität transduzierter NKT-Zellen durch NKT-sensitive HSB-2-Zellen; **C:** Kontrolle, keine Inhibierung durch A-204-Zellen; **D:** Kontrolle, Inhibierung des cTCR und der NKT-Aktivität transduzierter NKT-Zellen durch Daudi-Zellen



Die Zytolyse der Zellen der Targetzelllinie Daudi durch transduzierte NKT-Zellen wurde erwartungsgemäß nicht von A-204-Zellen beeinflusst (Abb. 3.23). Die Zytolyse der Daudi-Zellen hatte wie erwartet durch Koinkubation mit allen anderen Zellen abgenommen. Am stärksten wurde die Zytolyse der Daudi-Zellen durch Koinkubation mit Daudi-Zellen verringert (60% bei c:h-Ratio 0; 7% bei c:h-Ratio 80:1). Daudi-Zellen inhibierten sowohl den cTCR als auch die NKT-Aktivität der transduzierten NKT-Zellen. Die Zytolyse der Daudi-Zellen wurde durch Koinkubation mit Raji-Zellen von 56% (c:h-Ratio 0) auf 20% (c:h-Ratio 80:1) verringert. Die zytolytische Aktivität transduzierter NKT-Zellen wurde hauptsächlich über die NKT-Sensitivität vermittelt, da Raji-Zellen die cTCR der Effektorzellen inhibierten. Die Differenz zwischen der Zytolyse bei Koinkubation mit Raji-Zellen und bei Koinkubation mit A-204-Zellen gibt die Zytolyse der Daudi-Zellen über die NKT-Sensitivität an. 37% (c:h-Ratio 80:1) der Targetzellen wurden demnach über die NKT-Aktivität der NKT-Zellen lysiert.

Die Zytolyse der Daudi-Zellen hatte durch Koinkubation mit HSB-2-Zellen von 55% (c:h-Ratio 0) auf 36% (c:h-Ratio 80:1) abgenommen. Diese Zytolyse ist im Wesentlichen auf den cTCR zurückzuführen, da durch die HSB-2-Zellen die NKT-Aktivität transduzierter NKT-Zellen inhibiert worden ist. Die Differenz zwischen der Zytolyse bei Koinkubation mit HSB-2-Zellen und bei Koinkubation mit A-204-Zellen gibt die Zytolyse der Targetzellen Daudi über den cTCR an. 21% (c:h-Ratio 80:1) der Targetzellen wurden demnach über den cTCR transduzierter NKT-Zellen erkannt und lysiert.

Die zytolytische Kapazität der Effektorzellen konnte spezifisch durch kompetitive Inhibierung der cTCR bzw. der NKT-Aktivität reduziert werden. Die Zytotoxizität der CD20 $\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen konnte in zwei Komponenten aufgeteilt werden: eine cTCR-vermittelte und eine über die NKT-Aktivität vermittelte Zytolyse. Die effektive Zytolyse der CD20 $\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen wird sowohl über den cTCR als auch über die NKT-Aktivität vermittelt.



**Abb. 3.23:** „Cold Target Inhibition“-Assay: Zytolyse  $^{51}\text{Cr}$ -markierter Daudi-Zellen durch transduzierte NKT-Zellen nach Koinkubation mit unmarkierten Targetzellen der Zelllinien Daudi, Raji, A-204 und HSB-2; E:T-Ratio 20:1; 21% Transduktionsrate (Retroviren der Zelllinie PG13/SFG::scFvCD20 $\zeta$ )

### 3.2.2.3 Zytokin-Sekretion CD20 $\zeta$ -cTCR- exprimierender NKT-Zellen

Eine weitere wichtige Effektoreigenschaft funktioneller transduzierter Zellen ist die Produktion von Zytokinen bei Präsentation des entsprechenden Antigens. Daher wurde die INF $\gamma$ -Sekretion transduzierter NKT-Zellen nach spezifischer Stimulation des CD20 $\zeta$ -cTCR mit CD20 $^{+}$ -Targetzellen (Daudi und Raji) untersucht. Als Vergleich wurden Stimulierungen mit CD20 $^{-}$ -Targetzellen (A-204 und HSB-2) durchgeführt. Native NKT-Zellen wurden als negative Kontrollen analysiert. Die Überstände der Koinkubationen von Effektorzellen und Targetzellen wurden in einem ELISA auf die INF- $\gamma$  Produktion untersucht (Tab. 3.4).

Die CD20 $\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen sezernierten bei Präsentation von CD20-exprimierenden Targetzellen deutlich mehr INF- $\gamma$  (Koinkubation mit Daudi: 27870 pg/ml; Koinkubation mit Raji: 13281 pg/ml) als bei Präsentation von CD20 $^{-}$ -Targetzellen (Koinkubation mit A-204: 25 pg/ml; Koinkubation mit HSB-2: 91 pg/ml). Native NKT-Zellen produzierten immer deutlich weniger INF- $\gamma$  als transduzierte NKT-Zellen (Koinkubation mit Daudi: 786 pg/ml; Koinkubation mit Raji: 1104 pg/ml; Koinkubation mit A-204: 14 pg/ml; Koinkubation mit HSB-2: 112 pg/ml).

**Tab. 3.4:** IFN- $\gamma$ -Sekretion (pg/ml) von Effektorzellen nach Stimulation durch Targetzellen; n=3; Transduktionsrate: 14-23% (Retroviren der Zelllinie PG13/SFG::scFvCD20 $\zeta$ )

Targetzellen	INF- $\gamma$ (pg/ml)	
	native NKT-Zellen	CD20 $\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen
Daudi (CD20 <sup>+</sup> )	786 ( $\pm$ 429)	27870 ( $\pm$ 14103)
Raji (CD20 <sup>+</sup> )	1104 ( $\pm$ 900)	13281 ( $\pm$ 5851)
A-204 (CD20 <sup>-</sup> )	14 ( $\pm$ 10)	25 ( $\pm$ 13)
HSB-2 (CD20 <sup>-</sup> )	112 ( $\pm$ 26)	91 ( $\pm$ 25)

Die INF- $\gamma$ -Produktion der CD20 $\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen ist abhängig von der Präsentation von CD20<sup>+</sup>-Targetzellen. Nur bei Koinkubation mit CD20-exprimierenden Zellen wurde INF- $\gamma$  von CD20 $\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen spezifisch sezerniert. Die unspezifische INF- $\gamma$ -Produktion nativer NKT-Zellen war bei allen Koinkubationen sehr gering.

### 3.2.2.4 Einfluss von Adhäsionsmolekülen und Rituximab auf die Zytotoxizität CD20 $\zeta$ -cTCR-exprimierender NKT-Zellen

In Blockierungsstudien wurde der Einfluss der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (CD54) und LFA-1 (CD11a) auf die zytolytische Aktivität CD20 $\zeta$ -cTCR-transduzierter NKT-Zellen (Effektorzellen) untersucht. Dafür wurden die Targetzellen Raji in Zytotoxizitäts-Assays verwendet (E:T-Ratio 20:1). Durch Zugabe des jeweiligen Antikörpers gegen ICAM-1 und LFA-1 konnten diese Adhäsionsmoleküle blockiert werden.

Rituximab ist ein monoklonaler Antikörper gegen CD20, der für die Therapie der B-CLL eingesetzt wird. Die Auswirkung der Zugabe dieses Antikörpers auf die Zytotoxizität transduzierter NKT-Zellen sollte untersucht werden.

Als Referenzwert (=100%) wurde die Zytolyse der Targetzellen durch die Effektorzellen ohne Zugabe eines blockierenden Antikörpers oder Rituximab verwendet. Die Zytolyse bei Vorhandensein des Antikörpers oder Rituximab wurde in Beziehung zu diesem Referenzwert gesetzt ( Tab. 3.5).

**Tab. 3.5:** Modulierung der Zytotoxizität CD20 $\zeta$ -cTCR-exprimierender NKT-Zellen gegenüber Raji-Zellen bei Blockierung von Adhäsionsmolekülen (Antikörper, c= 1  $\mu$ g/ml) bzw. Gabe von Rituximab (c= 5  $\mu$ g/ml); E:T-Ratio 20:1; n= 4; Transduktionsrate: 7-16% (Retroviren der Zelllinie PG13/SFG::scFvCD20 $\zeta$ )

	Zytolyse Targetzellen Raji (%)
<b>ohne Ak/Rituximab</b>	100
<b><math>\alpha</math>-LFA-1</b>	89 (82-97)
<b><math>\alpha</math>-ICAM-1</b>	74 (56-98)
<b>Rituximab</b>	104 (80-149)

Durch die Inhibierung der Adhäsionsmoleküle LFA-1 und ICAM-1 wurde die Zytotoxizität der Effektorzellen gegenüber Rajizellen nicht signifikant reduziert. Diese Adhäsionsmoleküle haben einen sehr geringen Einfluss auf die zytolytische Aktivität gezeigt.

Auch bei Vorhandensein von Rituximab wurde die Zytotoxizität der Effektozellen nicht verringert. Rituximab hatte keine Auswirkungen auf die zytolytische Fähigkeit der transduzierten Effektorzellen.

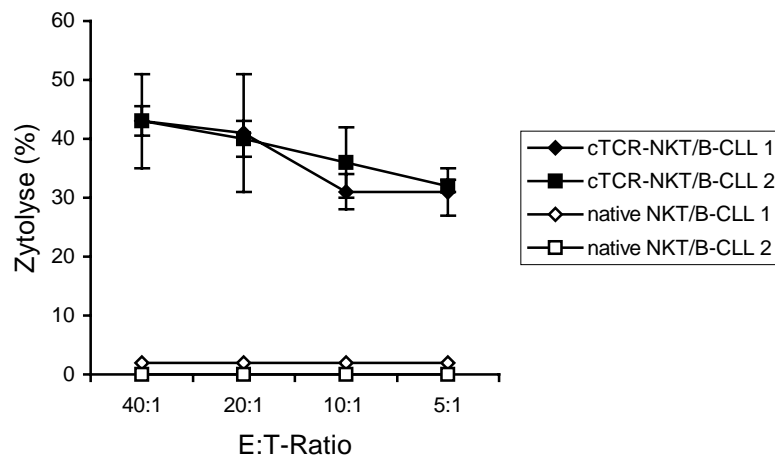
### 3.2.2.5 Zytotoxizität CD20 $\zeta$ -cTCR-exprimierender NKT-Zellen gegenüber Patientenzellen

Um die Effektoreigenschaften CD20 $\zeta$ -cTCR-transduzierter und nativer NKT-Zellen gegenüber primären Lymphomzellen zu untersuchen, wurden PBMC aus dem peripheren Blut von Patienten, die an einer B-CLL erkrankt waren, isoliert. Durchflusszytometrische Analysen bestätigten die CD20-Expression der Lymphozyten von Patient 1 (B-CLL 1, 91% CD20<sup>+</sup>-Zellen) und Patient 2 (B-CLL 2, 80% CD20<sup>+</sup>-Zellen). Die Patientenzellen wurden als Targetzellen in Zytotoxizitäts-Assays verwendet.

Die malignen Zellen beider Patienten wurden von CD20 $\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen spezifisch erkannt und erfolgreich lysiert (ca. 30% bei E:T-Ratio 5:1; ca. 40% bei E:T-Ratio 40:1). Erwartungsgemäß zeigten die nativen NKT-Zellen gegenüber den malignen Zellen

keinen Effekt. Eine unspezifische Zytolyse der Targetzellen war ausgeblieben (Abb. 3.24).

Die Funktionalität des CD20 $\zeta$ -cTCR wurde anhand der Zytolyse der malignen Zellen, die CD20 exprimieren, bestätigt. Die spezifische Zytolyse leukämischer CD20-exprimierender Zellen durch CD20 $\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen konnte *in vitro* erfolgreich nachgewiesen werden. Native NKT-Zellen, die nicht den cTCR exprimieren, hatten keinen Einfluss auf die malignen Zellen. Eine unspezifische Zytolyse der B-CLL-Zellen durch native NKT-Zellen ist nicht aufgetreten. Erst durch die Ausstattung mit einem cTCR gegen CD20 konnten die NKT-Zellen die leukämischen Zellen äußerst spezifisch lysieren.



**Abb. 3.24:** Zytolyse  $^{51}\text{Cr}$ -markierter Patientenzellen durch native und CD20 $\zeta$ -cTCR-transduzierte NKT-Zellen; Transduktionsrate: 14-15% (Retroviren der Zelllinie PG13/SFG::scFvCD20 $\zeta$ ); *b-cll 1*: Zellen von Patient 1 mit B-CLL, *b-cll 2*: Zellen von Patient 2 mit B-CLL

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen, dass der CD20 $\zeta$ -cTCR funktionell ist. Die Expression des CD20 $\zeta$ -cTCR von NKT-Zellen konnte durch retroviralen Gentransfer realisiert werden. Die spezifische Zytotoxizität der CD20 $\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen wurden im Vergleich mit nativen NKT-Zellen nachgewiesen. Die Zytotoxizität der CD20 $\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen richtet sich spezifisch gegen Zellen, die das Oberflächenmolekül CD20 tragen. Die INF- $\gamma$ -Sekretion transduzierter Zellen ist in spezifischer Weise von der CD20-Präsentation auf Zellen abhängig. Scheinbar ist die Zytotoxizität transduzierter NKT-Zellen nicht abhängig von

den Adhäsionsmolekülen ICAM-1 und LFA-1. Ebenso werden maligne Zellen (CD20<sup>+</sup>), die von Patienten mit B-CLL stammen, *in vitro* äußerst spezifisch von transduzierten NKT-Zellen erkannt und lysiert. Maligne Zellen bleiben von nativen NKT-Zellen völlig unbeeinflusst.

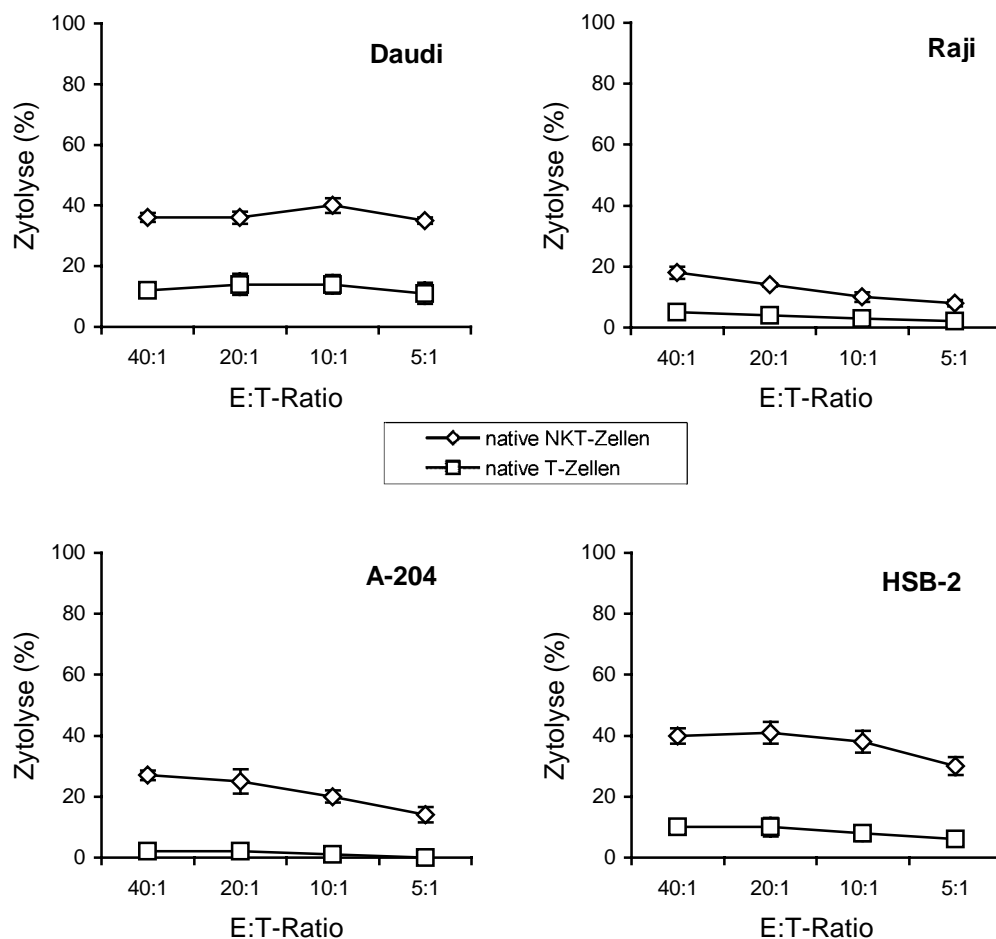
### **3.2.3 Vergleichende Untersuchungen CD20 $\zeta$ -cTCR-exprimierender NKT- und CD20 $\zeta$ -cTCR-exprimierender T-Zellen**

Da die zytolytische Kompetenz nativer NKT-Zellen größer ist als die nativer T-Zellen, sollte untersucht werden, ob dieser Aspekt auch bei vergleichenden Analysen transduzierter NKT-Zellen und transduzierter T-Zellen zutrifft. Dafür sollte die Funktionalität des CD20 $\zeta$ -cTCR in beiden Zellpopulationen (NKT-Zellen und T-Zellen) gezeigt und verglichen werden.

Durch die magnetische Separation der Lymphozyten mit CD56 MicroBeads wurden die CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>-Zellen (NKT-Zellen) und die CD56<sup>-</sup>/CD3<sup>+</sup>-Zellen (T-Zellen) separiert. Somit wurden sowohl die nativen als auch die transduzierten Zellpopulationen in reine NKT-Zellpopulationen und reine T-Zellpopulationen getrennt. Die cTCR-vermittelte Zytotoxizität transduzierter NKT- und T-Zellen als Effektorzellen gegenüber Targetzellen (Daudi, Raji, A-204 und HSB-2) wurde in Zytotoxizitäts-Assays verglichen. Als negative Kontrolle wurden die jeweiligen nativen Zellen eingesetzt. Als Grundvoraussetzung waren die Transduktionseffizienzen der verglichenen transduzierten NKT- und T-Zellen mit geringer Abweichung (ca. 3%) übereinstimmend.

Die nativen NKT-Zellen zeigten gegenüber allen Targetzelllinien eine höhere unspezifische Zytotoxizität als die nativen T-Zellen (Abb. 3.25). Die nativen T-Zellen führten bei allen Targetzelllinien zu einer Zytolyse von unter 10%. Native NKT-Zellen lysierten mehr Zellen der Targetzelllinie Daudi (36% bei E:T-Ratio 40:1) als native T-Zellen (12% bei E:T-Ratio 40:1). Durch native NKT-Zellen wurden mehr Zellen der Targetzelllinie Raji (18% bei E:T-Ratio 40:1) lysiert als durch native T-Zellen (5% bei E:T-Ratio 40:1). Native NKT-Zellen führten bei 27% (E:T-Ratio 40:1) der Zellen der Targetzelllinie A-204 zur Zytolyse. Hingegen wurden nur 2% (E:T-Ratio 40:1) der A-204-Zellen von nativen T-Zellen lysiert. 40% (E:T-Ratio 40:1) der Zellen der

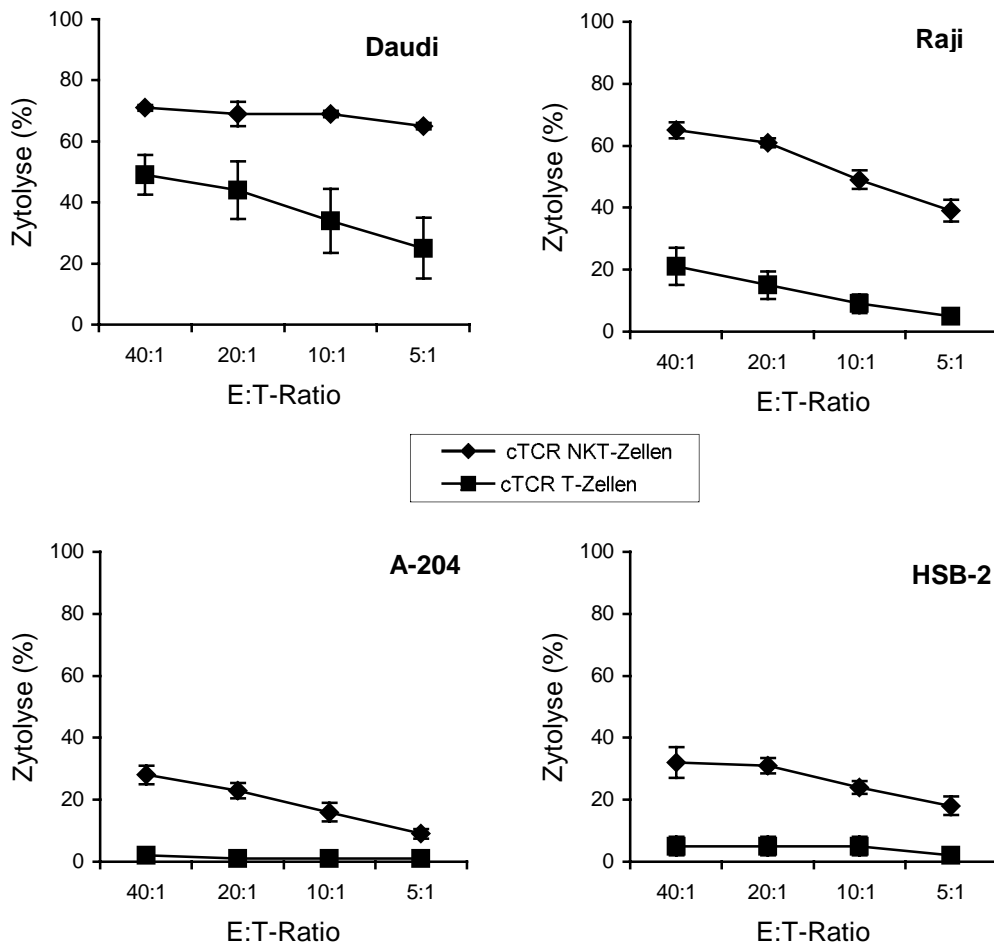
Targetzelllinie HSB-2 wurden von nativen NKT-Zellen lysiert, während nur 10% (E:T-Ratio 40:1) der HSB-2-Zellen durch native T-Zellen lysiert wurden.



**Abb. 3.25:** Zytolyse  $^{51}\text{Cr}$ -markierter Targetzellen der Zelllinien Daudi, Raji, A-204 und HSB-2 durch native NKT- und T-Zellen; n=3

Auch der Vergleich der transduzierten Zellpopulationen zeigte, dass die Zytolysewerte aller Targetzellen durch transduzierte T-Zellen von transduzierten NKT-Zellen übertroffen wurden (Abb. 3.26). Transduzierte NKT-Zellen lysierten erwartungsgemäß 71% (E:T-Ratio 40:1) der Zellen der Targetzelllinie Daudi. Transduzierte T-Zellen lysierten hingegen nur 49% (E:T-Ratio 40:1) der Daudi-Zellen. Transduzierte NKT-Zellen führten bei 71% (E:T-Ratio 40:1) der Zellen der Targetzelllinie Raji zur Zytolyse. Nur 21% (E:T-Ratio 40:1) der Raji-Zellen wurden von transduzierten T-Zellen lysiert. 28% (E:T-Ratio 40:1) der Zellen der Targetzelllinie A-204 wurden von

transduzierten NKT-Zellen lysiert, während transduzierte T-Zellen kaum zu einer Zytolyse führten (2% bei E:T-Ratio 40:1). Transduzierte NKT-Zellen lysierten 32% (E:T-Ratio 40:1) der Zellen der Targetzelllinie HSB-2. Die HSB-2-Zellen wurden wie die A-204-Zellen kaum von transduzierten T-Zellen lysiert (5% bei E:T-Ratio 40:1).



**Abb. 3.26:** Zytolyse  $^{51}\text{Cr}$ -markierter Targetzellen der Zelllinien Daudi, Raji, A-204 und HSB-2 durch CD20 $\zeta$ -cTCR-transduzierte NKT- und T-Zellen (Retroviren von Zelllinie PG13/SFG::scFvCD20 $\zeta$ ); n=3; Transduktionsrate: 14-22%

Um zu überprüfen, ob transduzierte NKT-Zellen eine höhere spezifische Zytotoxizität als transduzierte T-Zellen zeigen, wurde die Differenz zwischen der Gesamtlysefähigkeit (repräsentiert durch die Zytolyse transduzierter Zellen, die aus der Zytolyse über den cTCR und aus der unspezifischen Zytolyse besteht) und der unspezifischen Zytolyse der Targetzellen gebildet (Tab. 3.6). Die unspezifische nicht



über den cTCR-vermittelte Zytolyse der Targetzellen wurde durch native Effektorzellen ermittelt.

**Tab. 3.6:** Spezifische Zytolyse  $^{51}\text{Cr}$ -markierter Targetzellen durch CD20 $\zeta$ -cTCR-transduzierte Effektorzellen (Retroviren der Zelllinie PG13/SFG::scFvCD20 $\zeta$ ). Angegeben ist die Differenz zwischen der Gesamtlysefähigkeit und der unspezifischen Zytolysefähigkeit der Effektorzellen

Targetzelle	E:T-Ratio	spezifische Zytolyse	
		NKT-Zellen	T-Zellen
Daudi	40:1	35	37
	20:1	33	30
	10:1	29	20
	5:1	30	14
Raji	40:1	47	16
	20:1	47	11
	10:1	39	6
	5:1	31	3
A-204	40:1	1	0
	20:1	0	0
	10:1	0	0
	5:1	0	0
HSB-2	40:1	0	0
	20:1	0	0
	10:1	0	0
	5:1	0	0

Die CD20 $^{+}$ -Targetzellen Daudi wurden durch transduzierte NKT-Zellen auch nach Subtraktion der unspezifischen Zytolyse nativer NKT-Zellen gleichermaßen oder sogar besser lysiert als durch transduzierte T-Zellen. Ebenso wurden die CD20 $^{+}$ -Targetzellen Raji durch transduzierte NKT-Zellen auch nach Subtraktion der unspezifischen Zytolyse nativer NKT-Zellen effizienter lysiert als durch transduzierte T-Zellen. Damit wurde gezeigt, dass die spezifische Zytotoxizität transduzierter NKT-Zellen gegenüber CD20 $^{+}$ -Targetzellen quantitativ deutlich größer ist als die transduzierter T-Zellen.

Transduzierte NKT-Zellen sind in Bezug auf die zytolytische Kompetenz transduzierten T-Zellen eindeutig überlegen. Die Untersuchungen zeigten, dass die zytotoxische Aktivität der transduzierten NKT-Zellen und T-Zellen spezifisch und über den cTCR vermittelt ist.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein CD33 $\zeta$ -spezifischer cTCR konstruiert und in PBMC durch retroviralen Gentransfer übertragen. Weiterhin wurden NKT-Zellen (CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>) *in vitro* generiert und durch rekombinante Retroviren mit CD20 $\zeta$ -spezifischen cTCR ausgestattet. Durch die Untersuchungen ihrer Funktionalität und Effektoreigenschaften wurden Erkenntnisse für eine mögliche therapeutische Verwendung gentechnisch veränderter NKT-Zellen gewonnen.

Die Transduktion von T-Zellen mit funktionellen cTCR wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt (Rössig und Brenner, 2003; Willemsen *et al.*, 2003). Eine innovative viel versprechende Strategie ist die Kombination der potenten Effektorfunktionen humaner NKT-Zellen mit der spezifischen Antigenerkennung über chimäre T-Zell-Rezeptoren. Die Antigen-Erkennung verläuft dabei MHC-unrestringiert und unabhängig von der nativen Spezifität der NKT-Zellen (Baume *et al.*, 1990; Lowdell *et al.*, 2001). *In vitro* expandierte native NKT-Zellen wurden bereits für die Behandlung von Hodgkin- und Non-Hodgkin-Erkrankungen eingesetzt (Leemhuis *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit fanden zwei Formen chimärer T-Zell-Rezeptoren mit unterschiedlicher Spezifität Anwendung. Die cTCR, die für eine zelluläre Immuntherapie der AML eingesetzt werden sollen, richten sich gegen das Differenzierungsantigen CD33. Das Oberflächenprotein CD33 wird von normal ausreifenden myeloischen Vorläuferzellen und bei über 90% der Patienten mit AML von den leukämischen Blasten exprimiert (Griffin *et al.*, 1981; Dinndorf *et al.*, 1986). Da normale hämatopoetische Stammzellen und nicht-hämatologisches Gewebe kein CD33 exprimieren, ist es ein geeignetes Targetantigen für die Eradikation des leukämischen Vorläuferzell-Klons, auf dessen Ebene die leukämische Transformation bei der AML stattfindet. Die cTCR, die für eine zelluläre Immuntherapie der B-CLL Verwendung finden sollen, richten sich gegen das Differenzierungsantigen CD20. Dieses Antigen wird von Prä-B-Zellen, intermediären B-Zellen und reifen B-Zellen, aber nicht von Stammzellen, Pro-B-Zellen und Plasmazellen exprimiert. Da CD20 auch

von den meisten malignen B-Zellen exprimiert wird, ist es ein ideales Targetantigen für Immuntherapien mit chimären T-Zellrezeptoren.

Ein effektiver Gentransfer in T-Zellen ist entscheidend für die erfolgreiche Expression chimärer T-Zell-Rezeptoren. Für die gentechnische Modifizierung humaner T-Zellen wurde ein retrovirales Gentransfersystem verwendet, das die Transduktion eines hohen Anteils aktivierter T-Zellen ermöglicht (Rössig *et al.*, 2001). Mit dieser Methode wurden Transduktionsraten von 27-44% erreicht. Eine Positivselektion transduzierter Zellen ist bei diesen hohen Transduktionseffizienzen nicht erforderlich. Dies ist für eine mögliche klinische Anwendung vorteilhaft, da für Positivselektionen die Koexpression selektierbarer Markergene notwendig sind, die hochimmunogen und wahrscheinlich zu einer immunvermittelten Beseitigung modifizierter T-Zellen *in vivo* führen.

#### **4.1 CD33 $\zeta$ -spezifische chimäre T-Zell-Rezeptoren**

Die DNA-Sequenzen für die V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Kette eines anti-CD33-Antikörpers wurden aus der cDNA der Hybridomzelllinie 251 durch eine RT-PCR amplifiziert und in einer „splicing by overlap“-PCR zu einer Nukleotidsequenz für das scFvCD33 verbunden. Dieses Molekül zeigte nach der Klonierung in den Fusionsphagen fUSE5 keine Affinität zu CD33. Eine Antigen-Antikörper-Bindung zwischen CD33 und scFvCD33 konnte nicht nachgewiesen werden. Mögliche Ursachen der Unfunktionalität des cTCR könnten eine fehlerhafte Transkription oder Translation des codierenden Gens sein. Außerdem könnte eine inkorrekte Prozessierung, Faltung oder fehlende Dimerisierung des Proteins zur Unfunktionalität geführt haben.

Mit der gleichen Zielsetzung wurde eine alternative Nukleotidsequenz eines potentiell funktionellen scFvCD33, die von einer kooperierenden Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurde, erfolgreich in den Vektor pRSV inseriert. Da dieser Vektor über die Nukleotidsequenzen für die CD3 $\zeta$ -Kette, ein humanes Signalpeptid und die humane „hinge“-Domäne verfügt, wurde die vollständige Nukleotidsequenz für einen CD33 $\zeta$ -spezifischen chimären T-Zell-Rezeptor kloniert. Diese Nukleotidsequenz wurde erfolgreich in verschiedene retrovirale Vektoren [MSCV-I-GFP(M) und SFG] kloniert

und im Anschluss daran eine Transfektion der transienten Produktionszelllinie Phoenix-Eco durchgeführt. Anschließend wurde mit von Phoenix-Eco produzierten Retroviren eine stabile Produktionszelllinie PG13 hergestellt, um durch retroviralen Gentransfer humane PBMC mit dem Transgen zu modifizieren.

Die gentechnisch veränderten PBMC wurden auf ihre funktionellen Eigenschaften wie Zytolysefähigkeit und Zytokin-Sekretion (INF- $\gamma$ ) untersucht. In Zytotoxizitäts-Assays wurde die zytotoxische Spezifität transduzierter PBMC gegenüber CD33<sup>-</sup> (OPM-2) und CD33<sup>+</sup>- Targetzellen (HL-60) analysiert. Jedoch zeigten die modifizierten PBMC gegenüber CD33-positiven Targetzellen keine Zytolysefähigkeit. Die nicht vorhandene Zytotoxizität modifizierter PBMC ist auf die Unfunktionalität des scFvCD33 zurückzuführen. Ebenso wurde die targetspezifische Zytokinsekretion (INF- $\gamma$ ) transduzierter PBMC nach Koinkubation mit CD33<sup>-</sup> und CD33<sup>+</sup>- Targetzellen untersucht. Die INF- $\gamma$ -Produktion transduzierter und nativer Zellen zeigte keinen Unterschied. CD33 $\zeta$ -cTCR-transduzierte PBMC sezernierten sehr geringe Mengen INF- $\gamma$  trotz CD33<sup>+</sup>-Antigenstimulation. Diese Untersuchungen bestätigten die Unfunktionalität des CD33 $\zeta$ -cTCR.

Um die Transkription des cTCR in den PBMC zu zeigen, wurde eine RT-PCR durchgeführt und die Nukleotidsequenz des scFvCD33 durch Sequenzierung bestätigt. Durch diese Methodik konnte eine fehlerfreie Transkription des Gens nachgewiesen werden. Daher ist die Unfunktionalität des scFvCD33 $\zeta$  nicht auf eine fehlerhafte oder nicht vorhandene Übertragung des Transgens in die humane Zelle zurückzuführen. Die Nukleotidsequenz des scFvCD33 wurde korrekt ohne Splicing und Inversionen transkribiert. Die Unfunktionalität des cTCR könnte auf einer inkorrekten Translation des Gens beruhen. Weitere Ursachen könnten mangelhafte Proteinprozessierung, Proteinfaltung oder Dimerisierung bzw. ein inkorrekt Proteineinbau in die Cytoplasmamembran sein. Auch bei richtiger Aminosäuresequenz kann die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins fehlerhaft sein. Die Domänen des scFvCD33 $\zeta$  hätten dann nicht die Konformation, um das Antigen (CD33) zu binden und damit die Aktivierung der T-Zellen über die signaltransduzierende Domäne der CD33 $\zeta$ -Kette zu induzieren. Außerdem könnte die Expressionsdichte der cTCR so gering sein, dass nur wenige CD33-Moleküle gebunden werden, und diese Erkennung für eine Aktivierung der Zytotoxizität bzw. INF- $\gamma$ -Sekretion quantitativ nicht ausreichend ist. Grösseren

Aufschluss über das Vorhandensein des CD33 $\zeta$ -cTCR in der Cytoplasmamembran könnten proteinchemische Untersuchungen geben. Dennoch würde dieser Nachweis zu keinen neuen Erkenntnissen hinsichtlich einer fehlende Funktionalität des cTCR führen, da die Oberflächenexpression des Proteins, aber nicht seine Funktionalität bzw. deren Ursache gezeigt würde. Wenn tatsächlich der cTCR in der Cytoplasmamembran nachgewiesen würde, könnten weitere Untersuchungen wie Affinitäts- und Bindungsstudien durchgeführt werden, die Erklärungen für die Unfunktionalität geben könnten.

## **4.2 CD20 $\zeta$ -spezifische chimäre T-Zell-Rezeptoren**

Für die Produktion rekombinanter Retroviren wurden zunächst der retrovirale Vektor SFG::scFvCD20 $\zeta$  und der Kontroll-Vektor SFG::EGFP für Transfektion der transienten Produktionszelllinie Phoenix-Ampho verwendet. Nach der Transfektion exprimierten bis zu 70% der Phoenix-Ampho-Zellen das Reportergen EGFP. Anschließend wurde die stabile Produktionszelllinie Flyrd18 mit von Phoenix-Ampho produzierten Retroviren transduziert. Durch Färbung mit einem Cy5- bzw. FITC-gekoppelten Ziege-anti-Maus-IgG-F(ab')<sub>2</sub>-Antikörper, der an alle murinen variablen Domänen bindet, konnte die Expression des CD20 $\zeta$ -cTCR von Flyrd18/SFG::CD20 $\zeta$ -cTCR-Zellen durchflußzytometrisch quantifiziert werden (Transduktionsrate 92%). Somit wurde gezeigt, daß die Oberflächenexpression des CD20 $\zeta$ -cTCR mit der EGFP-Expression korreliert.

Weiterhin wurden Retroviren der stabile Produktionszelllinie PG13/SFG::scFvCD20 $\zeta$  (Transduktionsrate: 97%) für den Gentransfer verwendet. Mit den beiden unterschiedlichen Produktionszelllinien standen Zelllinien zur Verfügung, die eine hochtitrige Retrovirusproduktion und damit eine effiziente Transduktion humaner T-Zellen ermöglichten. Dabei stellte sich heraus, dass die erfolgreiche Transduktion humaner T-Zellen unabhängig davon war, ob die rekombinanten Retroviren von murinen (PG13-Zellen) oder humanen Zellen (Flyrd18-Zellen) produziert wurden.

Um die Transduktion humaner NKT-Zellen, die bislang nicht beschrieben war, unter besten Bedingungen ausführen zu können, wurden Optimierungsversuche durchgeführt. Da ausschließlich sich teilende Zellen durch Retroviren transduziert werden können,

müssen sich die Zellen in einer Proliferationsphase befinden. Um frisch isolierte PBMC aus peripherem Blut gesunder Spender zur Zellteilung anzuregen, wurden diese mit koimmobilisierten  $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28 unspezifisch prästimuliert. Die Untersuchungen zeigten, dass eine 48-stündige Prästimulierungsdauer zur effektivsten Transduktion dieser Zellen geführt hat. Weiterhin stellte sich heraus, dass die Transduktion frisch isolierter humaner T-Zellen (Kultivierungsdauer 3 Tage), die erst nach der Transduktion durch Zytokin-Gabe (IL-2 und IL-15) zu NKT-Zellen differenzierten, effizienter war als die Transduktion bereits entdifferenzierter NKT-Zellen (Kultivierungsdauer > 20 Tage). Für die Transduktion entdifferenzierter NKT-Zellen erwies sich eine 24-stündige Restimulierung mit einem „Feeder-Mix“ (inaktivierte allogene PBMC und LCL) als essentiell, da diese Zellen andernfalls nicht transduziert werden konnten. Nach diesen Optimierungskriterien wurden alle Transduktionen frisch isolierter T-Zellen und NKT-Zellen erfolgreich durchgeführt. Erst im Anschluss an die Transduktion erfolgte die zytokinabhängige Expansion humaner NKT-Zellen *in vitro* (Schmidt-Wolf *et al.*, 1993; Lu und Negrin, 1994). Da nicht alle Zellen zu NKT-Zellen differenzierten, wurden am Kultivierungstag 21 reine NKT-Zellpopulationen durch magnetische Separation isoliert. Die Generierung und Expansion reiner nativer und transduzierter NKT-Zellpopulationen konnte *in vitro* erfolgreich durchgeführt werden. In der ausgezählten Stichprobe (n=2) hatten die nativen Zellen eine größere Expansionsrate als die transduzierten Zellen. Die hier beobachtete unterschiedliche Proliferation nativer und transduzierter NKT-Zellen durch Zählkammerzählung ist statistisch nicht signifikant. Für eine gesicherte Aussage bezüglich der Proliferationsfähigkeit transduzierter Lymphozyten müssten weitere Proliferations-Assays durchgeführt werden. Vorausgegangene Studien konnten jedoch bereits zeigen, dass die Proliferationsraten nativer und transduzierter Zellen ähnlich sind (Rössig *et al.*, 2002).

Um die Funktionalität der CD20 $\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen nachzuweisen, wurden ihre Effektoreigenschaften wie Zytotoxizität und Zytokin-Produktion (INF- $\gamma$ ) untersucht. Zur Differenzierung zwischen unspezifischer und CD20 $\zeta$ -cTCR-vermittelter Zytotoxizität der transduzierten NKT-Zellen erfolgten vergleichende Untersuchungen gegenüber CD20<sup>+</sup>-Targetzellen mit hoher (Zelllinie Daudi) und geringer NKT-Sensitivität (Zelllinie Raji) sowie gegenüber CD20<sup>-</sup>-Targetzellen mit hoher

(Zelllinie A-204) und geringer NKT-Sensitivität (Zelllinie HSB-2). Die spezifische Zytotoxizität der CD20 $\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen gegenüber CD20<sup>+</sup>-Targetzellen wurde eindeutig nachgewiesen. Erwartungsgemäß sollte die unspezifische Zytolyse von Targetzellen durch native Zellen, und von CD20<sup>-</sup>-Targetzellen unter 10% liegen. Die unspezifische Zytolyse war jedoch größer als erwartet und ist auf eine NKT-Sensitivität der Targetzellen zurückzuführen, wobei die NKT-Sensitivität der Daudi-Zellen besonders hoch war. Weiterhin zeigte sich, dass transduzierte und native NKT-Zellen die Targetzelllinie HSB-2 lysieren (reien NKT-Aktivität). Da die Zytolyse der CD20<sup>+</sup>-Targetzellen quantitativ immer größer war als die der CD20<sup>-</sup>-Targetzellen, ist die spezifische und effektive Zytotoxizität der CD20 $\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen eindeutig gezeigt worden.

Nach dem Nachweis der spezifischen Zytotoxizität transduzierter NKT-Zellen wurde die antigenspezifische Zytokinsekretion (INF- $\gamma$ ) transduzierter und nativer NKT-Zellen verglichen. Die INF- $\gamma$ -Sekretion transduzierter NKT-Zellen bei Präsentation von CD20<sup>+</sup>-Targetzellen (Daudi und Raji) war vergleichsweise sehr viel höher als die der nativen NKT-Zellen. Transduzierte und native NKT-Zellen produzierten ohne CD20-Antigenpräsentation nur sehr geringe Mengen INF- $\gamma$ . Die INF- $\gamma$ -Sekretion transduzierter NKT-Zellen hängt spezifisch von der Präsentation von CD20<sup>+</sup>-Targetzellen ab. Native NKT-Zellen haben fast keine unspezifische INF- $\gamma$ -Produktion. Die Produktion von INF- $\gamma$  wird als Schlüsselreaktion für die Aktivierung anderer Zelltypen *in vivo* während einer Infektion angesehen (Birgl *et al.*, 2003; Schaible und Kaufmann, 2000). NKT-Zellen können nach Aktivierung durch IL-12, das von aktivierten DC synthetisiert worden ist, sehr viel INF- $\gamma$  in kurzer Zeit sekretieren (Taniguchi *et al.*, 2003; Brigl *et al.*, 2003). Diese Beobachtungen konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Dabei ist aber die Aktivierung der NKT-Zellen *in vitro* wahrscheinlich nicht abhängig von IL-12 und dem nativen TCR, sondern über die Erkennung des CD20-Antigens der Targetzellen über den cTCR. genmodifizierter NKT-Zellen. Übereinstimmend mit den hier erzielten Ergebnissen wurde in präklinischen Studien eine signifikante *in vivo* Antitumor-Aktivität gentechnisch modifizierter T-Zellen nachgewiesen (Hwu *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1998; McGuinness *et al.*, 1999).



Für eine Überprüfung der Zytotoxizität der Effektorzellen (CD20 $\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen), die ausschließlich über den cTCR vermittelt wird, stand keine geeignete Targetzelllinie zur Verfügung. Ebenso war eine spezifische Inhibierung des CD20 $\zeta$ -cTCR durch ein geeignetes Antigen oder einen Anti-Antikörper aufgrund der Nicht-Verfügbarkeit derselben nicht möglich. Um dennoch die Zytolysemechanismen (über die NKT-Aktivität oder den cTCR) der Effektorzellen zu unterscheiden, wurden Zytotoxizitäts-Assays nach dem Prinzip „Cold Target Inhibition“ durchgeführt. Als „hot target“ ( $^{51}\text{Cr}$ -markiert) wurde hierbei die NKT-sensitive und CD20 $^+$ -Targetzelllinie Daudi eingesetzt und in verschiedenen Ratios unmarkierte „cold targets“ (Zelllinien Raji, HSB-2, A-204 und Daudi) hinzugegeben. Die Untersuchungen zeigten, dass die Zytolyse der Daudi-Zellen durch Konkurrenz um die cTCR der Effektorzellen durch Zugabe von Raji-Zellen (CD20 $^+$ ) reduziert wird, d. h. die zytolytische Aktivität wurde hauptsächlich über die NKT-Aktivität der Effektorzellen vermittelt. Rechnerisch ergibt die Subtraktion des Zytolysewerts der Daudi-Zellen bei Inhibierung mit Raji-Zellen vom Zytolysewert bei Inhibierung mit A-204-Zellen (CD20 $^-$ , keine NKT-Sensitivität) einen theoretischen Wert für die Zytotoxizität über die reine NKT-Aktivität von 37%. Weiterin wurde gezeigt, dass die Zytolyse der Daudi-Zellen durch Inhibierung der NKT-Aktivität der Effektorzellen durch Zusatz von HSB-2-Zellen (CD20 $^-$ , NKT-Sensitivität) verringert wurde, d. h. die Zytolyse ist im Wesentlichen auf den cTCR zurückzuführen. Die Subtraktion des Zytolysewerts der Daudi-Zellen bei Inhibierung mit HSB-2-Zellen vom Zytolysewert bei Inhibierung mit A-204-Zellen gibt einen theoretischen Wert von 21% für die reine cTCR-vermittelte Zytotoxizität an. Die zytolytische Kapazität der Effektorzellen konnte durch die spezifische Inhibierung des cTCR bzw. der NKT-Aktivität der Effektorzellen reduziert werden. Die Zytolysemechanismen transduzierter NKT-Zellen konnten in eine NKT-Aktivität (unspezifische Zytolyse) und eine Erkennung über den CD20 $\zeta$ -spezifischen cTCR (spezifische Zytolyse) unterschieden werden. Folglich beruht die effektive Zytotoxizität transduzierter NKT-Zellen auf einer unspezifischen und einer spezifischen Zytolyse. Um dieses Ergebnis zu unterstützen, wären für weitere Untersuchungen Targetzelllinien (CD20 $^+$ ) erforderlich, die keine Sensitivität gegenüber der NKT-Aktivität zeigen, oder ein CD20-Antigen/Peptid, das spezifisch den cTCR inhibiert. Da diese bislang nicht verfügbar sind, können diese Nachweise nicht durchgeführt werden.

Um die spezifische Zytotoxizität transduzierter NKT-Zellen im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung zu untersuchen, wurden leukämische Lymphozyten ( $CD20^+$ ) von zwei Patienten, die an B-CLL erkrankt sind, als Targetzellen in Zytotoxizitäts-Assays eingesetzt. Während native NKT-Zellen gegenüber den malignen Zellen keine zytotoxische Aktivität zeigten (0% Zytolyse), erkannten und lysierten die transduzierte NKT-Zellen die Patienten-Zellen. Da die NKT-Aktivität keinen Einfluß auf die Zytolyse der malignen Blasten hatte, kann eine unspezifische Wirkung durch die NKT-Aktivität ausgeschlossen werden. Die  $CD20\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen sind folglich nicht nur gegenüber Zelllinien zytotoxisch, sondern auch gegenüber malignen  $CD20^+$ -Blasten erkrankter Erwachsener. Da native NKT-Zellen keine unspezifische Zytolyse hervorgerufen haben, ist die Spezifität transduzierten NKT-Zellen gegenüber malignen  $CD20^+$ -Blasten sehr viel höher als gegenüber  $CD20^+$ -Zelllinien. Da  $CD20$  außerdem ausschließlich von bestimmten Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert wird und nicht auf anderen Geweben vorkommt, ist die zytolytische Spezifität der  $CD20\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen gegenüber den malignen Blasten gewährleistet. Diese Erkenntnis ist besonders wichtig, damit während einer möglichen klinischen Applikation nur  $CD20^+$ -Zellen von genmodifizierten NKT-Zellen erkannt und lysiert werden. Um eine mögliche immunologische Reaktion des Patienten auf allogene Zellen auszuschließen, könnten autologen NKT-Zellen aus peripherem Blut von Patienten mit B-CLL expandiert, gentechnisch mit  $CD20\zeta$ -cTCR modifiziert und retransfundiert werden (Guven *et al.*, 2003).

*In vitro* expandierte humane NKT-Zellen verfügen über eine hohe zytotoxische Aktivität. Das zytotoxische Potential genmodifizierter NKT-Zellen ( $CD3^+/CD56^-$ ) und genmodifizierter T-Zellen ( $CD3^+/CD56^-$ ) wurde verglichen. In Zytotoxizitäts-Assays gegenüber den Targetzelllinien Daudi, Raji, A-204 und HSB-2 zeigten bereits native NKT-Zellen eine höhere unspezifische Zytolyse gegenüber den Targetzellen als die nativen T-Zellen. Die hohe unspezifische Zytolyse der NKT-Zellen ist wahrscheinlich auf die NKT-Aktivität zurückzuführen. Da T-Zellen keine NKT-Aktivität besitzen, war ihre unpezifische Zytotoxizität sehr gering.  $CD20^+$ -Targetzellen wurden durch transduzierte NKT-Zellen und T-Zellen lysiert. Dabei wurden deutlich mehr Targetzellen durch transduzierte NKT-Zellen als durch transduzierte T-Zellen lysiert.

Diese ist jedoch nicht nur über den cTCR vermittelt, sondern wahrscheinlich auch von der NKT-Aktivität beeinflusst. Um die über die NKT-Aktivität vermittelte Zytotoxizität unberücksichtigt zu lassen, wurden die Zytolysewerte durch native NKT-Zellen von den Zytolysewerten durch transduzierte NKT-Zellen subtrahiert. Für einen Vergleich wurden ebenso die Zytolysewerte durch native T-Zellen von den Zytolysewerten durch transduzierte T-Zellen subtrahiert. Auch nach Subtraktion ist die Zytotoxizität der NKT-Zellen weiterhin quantitativ größer als die der T-Zellen. Der Vergleich der spezifischen zytolytischen Aktivität transduzierter NKT- und T-Zellen in Zytotoxizitäts-Assays zeigte eindeutig, dass NKT-Zellen den T-Zellen bezüglich ihrer Zytotoxizität deutlich überlegen sind. Die Funktionalität des CD20 $\zeta$ -cTCR wurde sowohl in NKT- als auch in T-Zellen erfolgreich nachgewiesen.

Die unterschiedlichen Zytolysefähigkeiten könnten von der Expressionsdichte des cTCR abhängen. Obwohl die Transduktionsraten der verglichenen NKT- und T-Zellpopulationen sehr ähnlich waren, können diese Werte dennoch keine Auskunft über die tatsächliche Expressionsdichte der cTCR geben. Die Zytotoxizität transduzierter Zellen könnte von der Expressionsdichte der cTCR auf jeder einzelnen Zelle abhängen. Für einen exakten Vergleich der Zytolysefähigkeit transduzierter NKT- und T-Zellen würde wahrscheinlich eine Bestimmung der Expressionsdichte erforderlich sein. Dennoch wurde gezeigt, dass die zytolytische Kompetenz CD20 $\zeta$ -transduzierter NKT-Zellen höher als die CD20 $\zeta$ -transduzierter T-Zellen ist.

Zur weiteren Charakterisierung der Effektorfunktionen transduzierter NKT-Zellen wurden die Adhäsionsmoleküle LFA-1 und ICAM-1 der Effektorzellen mit Antikörpern inhibiert. In diesen Blockierungsstudien konnte gezeigt werden, dass die Zytotoxizität der CD20 $\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen unabhängig von den Adhäsionsmolekülen LFA-1 und ICAM-1 ist. Im Gegensatz zu nativen NKT-Zellen, deren zytotoxische Kompetenz auf diesen Adhäsionsmolekülen basiert (Schmidt-Wolf *et al.*, 1993 und 1996), sind diese Moleküle nicht essentiell für die Zytotoxizität transduzierter NKT-Zellen. Die zytolytische Fähigkeit der Effektorzellen wird dann vermutlich über den cTCR vermittelt.

Bereits in klinischer Anwendung ist ein monoklonaler Antikörper gegen CD20 (Rituximab/MabThera<sup>TM</sup>), der u. a. für die Behandlung von B-CLL verwendet wird (McLaughlin *et al.*, 1998; Byrd *et al.*, 2001). Die Auswirkung von Rituximab auf die Zytotoxizität transduzierter NKT-Zellen wurde untersucht. Die durchgeführten Experimente zeigten, dass Rituximab *in vitro* weder einen anergistischen noch synergistischen Effekt auf die Zytotoxizität der CD20 $\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen ausübt. Die zytolytische Fähigkeit der Effektorzellen wird bei Vorhandensein von Rituximab weder vergrößert noch verringert. Wahrscheinlich sind die Epitope, die von Rituximab bzw. vom CD20 $\zeta$ -cTCR erkannt werden, unterschiedlich, so dass keine kompetitive Hemmung des selben Epitops vorliegt. Eine andere Erklärung könnte eine gegenseitige sterische Behinderung sein, die dazu führt, dass nur Rituximab oder der cTCR an das CD20-Antigen binden kann.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen können nicht das hochkomplexe immunologische System im menschlichen Körper widerspiegeln, aber sind dennoch erste positive Hinweise für eine prinzipiell erfolgreiche zelluläre Immuntherapie bei Patienten mit B-Zellneoplasien. Auch über eventuelle Nebenwirkungen im menschlichen Körper können aufgrund dieser Untersuchungen keine Angaben gemacht werden, da *in vitro* ausschließlich PBMC von Patienten separat untersucht worden sind. Klinischen Anwendungen müssen selbstverständlich weitere Untersuchungen vorangehen. Diese Ergebnisse sind als sehr positiv und vielversprechend bezüglich einer zellulären Immuntherapie bei der B-CLL zu werten, obwohl jedoch erste klinische Studien mit rekombinanten T-Lymphozyten eine enttäuschende Diskrepanz zwischen der *in vitro*-Zytotoxizität und der therapeutischen Effektivität zeigten (Mitsuyasu *et al.*, 2000; Deeks *et al.*, 2002). Selbst bei optimaler Persistenz der Zellen im peripheren Blut und unverminderter Oberflächenexpression des cTCR über viele Wochen war die Zytotoxizität und Zytokinsekretion der Zellen nach adoptivem Transfer nicht mehr vorhanden (Walker *et al.*, 2000). Die transgenen Zellen zeigen nach dem Transfer eine mangelhafte oder fehlende Expansion und einen rapiden Funktionsverlust der transgenen T-Zellen (Rössig und Brenner, 2003). Offenbar ist die Funktionalität der mit cTCR ausgestatteten T-Zellen abhängig von ihrem Aktivierungszustand (Brockner und Karjalainen, 1995; Brockner, 2000). Dabei wird eine

suffiziente T-Zellproliferation über den Weg des cTCR genmodifizierter T-Zellen angezweifelt (Brocker *et al.*, 2000; Rössig *et al.* 2000 und 2001; Eshhar *et al.*, 2001; Hombach *et al.*, 2001; Maher *et al.*, 2002). Über den cTCR ist eine antigen-abhängige, spezifische Zytolyse der Targetzellen möglich, jedoch keine vollständige Aktivierung der T-Zelle mit nachfolgender Proliferation und Expansion. Eine der ersten cTCR-Zelltherapien, die klinisch angewendet worden ist, ist ein adoptives Immuntherapie-Protokoll gegen HIV (Mitsuyasu *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 2000). Leider zeigte der *in vitro* funktionelle rekombinante cTCR (*ex vivo* expandierte CD4 $\zeta$ -modifizierte CD8<sup>+</sup>-T-Zellen) keinen Effekt. Potente Strategien zur Verbesserung des therapeutischen Potentials cTCR-modifizierter Zellen, um präventiv ihrer funktionellen Inaktivierung *in vivo* zu begegnen, werden aktuell entwickelt (Rössig und Brenner, 2003). Die Ursachen, die die *in vivo*-Überlebensrate und persistierende Anti-Tumor-Funktionalität der genmodifizierten CTL limitieren, sind ihre Immunogenität, ihre Rekrutierung spezifischer Hilfe durch T-Zellen und die Qualität des chimären Rezeptorsignals (Rössig und Brenner, 2003). Durch eine Reduzierung der Immunogenität könnte das Verschwinden der rekombinanten T-Zellen *in vivo* aufgehalten werden. Dafür könnten aktuell verfügbare Hybridom-Antikörper humanisiert werden durch den Ersatz der murinen durch humane Domänen (Hombach *et al.*, 2000). Außerdem wäre die Konstruktion komplett humaner rekombinanter scFv durch Phagen Display Technologie möglich (Cai und Garen, 1995). Weiterhin könnte die Koexpression von zwei potentiell immunogenen Markergenen durch eine Optimierung des retroviralen Gentransfers vermieden werden (Pollok *et al.*, 1998); in der vorliegenden Arbeit wurde der Gentransfer unter optimierten Bedingungen durchgeführt.

Der wichtigste funktionelle Aspekt effektiver cTCR *in vivo* für eine erfolgreiche Immuntherapie ist die Stärke und Qualität des Aktivierungssignals, das von der Signalinduktion über den chimären T-Zell-Rezeptor hervorgerufen wurde. Das Aktivierungssignal muss ausreichend stark und hochwertig sein, um eine adaptive Immunantwort auslösen zu können. Idealerweise würden, analog zu der T-Zell-Stimulierung über Peptid/MHC, cTCR-modifizierte T-Zellen eine komplette Effektorantwort und ein spezifisches T-Zellen-Gedächtnis hervorrufen, die eine effiziente und lebenslange anti-Tumor-Immunität etablieren. Der über cTCR vermittelte Signalweg war jedoch (in transgenen Mäusen) nicht ausreichend, um die Aktivierung

primärer T-Zellen auszulösen, solange sie nicht über ihren nativen Rezeptor prästimuliert worden sind (Brocker und Karjalainen, 1995; Brocker, 2000). Damit übereinstimmend induziert die Stimulierung der T-Zellen über den chimären Rezeptor *in vitro* keine proliferative Antwort (Beecham *et al.*, 2000; Rössig *et al.*, 2001 und 2002). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, daß die cTCR-vermittelte Signalübertragung limitiert ist und Defekte aufweist. Signale, die für die Induktion klonaler Proliferation benötigt werden, sind inkomplett (Rössig und Brenner, 2003). Detaillierte Kenntnisse über die molekularen Mechanismen und Defekte der cTCR-vermittelten Signaltransduktion sind bislang im Gegensatz zur T-Zell-Aktivierung über den nativen TCR nicht verfügbar. Eine Vermutung war, daß die begrenzte Anzahl der T-Zell-Rezeptor-Signaldomänen, die in chimären Rezeptoren präsentiert werden, möglicherweise verantwortlich für die beobachteten funktionellen Defizite sind. Dennoch scheint die Anzahl der ITAM, die in der intrazellulären Region des Rezeptors vorliegen, nicht mit der Rezeptorfunktion zu korrelieren. Die CD3 $\zeta$ -Kette des TCR (drei ITAM) und die  $\gamma$ -Kette des Fc Rezeptors (ein ITAM) wurden in chimären Rezeptoren verwendet und zeigten ähnliche Effektivität (Romeo und Seed, 1991; Eshhar *et al.*, 1993; Stancovski *et al.*, 1993; Roberts *et al.*, 1998). Modifizierte Rezeptoren wurden konstruiert, in denen die src-Kinase Lck direkt mit der CD3 $\zeta$ -Kette in einem kombinierten Rezeptor verbunden ist (Geiger *et al.*, 2001). Diese kombinierten Rezeptoren formieren einen qualitativ superioren signaltransduzierenden Komplex, was reflektiert wird in der Zunahme der frühen Ereignisse in der TCR-Signal-Transduktion und in einer größeren Quantität der IL-2-Sekretion. Diese innovativen Rezeptoren sind bislang noch nicht klinisch validiert worden.

Jedoch führt die Signaltransduktion über die CD3 $\zeta$ -Kette, die für die wichtigen Effektormechanismen der T-Zelle wie Interferon- $\gamma$ -Freisetzung und Zerstörung der Zielzelle obligat ist, nicht zu einem vollständigen Aktivierungssignal innerhalb der Zelle (Pule *et al.*, 2003). Übereinstimmend mit dem dualen Signal-Modell der T-Zell-Aktivierung, ist wahrscheinlich ein zusätzliches kostimulatorisches Signal zum TCR-vermittelten Signal für ein effizientes Priming naiver T-Zellen erforderlich (Finney *et al.*, 2004). Dies resultiert in zellulärer Proliferation, Zytokin-Sekretion und Vermeidung von aktivierungs-induzierter Anergie (Greenfield *et al.*, 1998). Zusätzliche kostimulatorische Signalmoleküle, wie beispielsweise CD28, CD134 und CD137 sind

scheinbar für eine komplette Signaltransduktion essentiell (Maher *et al.*, 2002; Finney *et al.*, 2004). Der bislang am Besten verstandene kostimulatorische Reaktionsweg ist die Interaktion zwischen B7 und CD28. Physiologischerweise werden kostimulatorische Signale von APC angeboten. Da jedoch die meisten Tumorzellen keine bzw. wenige kostimulatorische Moleküle exprimieren, erhalten cTCR-modifizierte T-Lymphozyten bei Bindung an das Targetantigen keine kostimulatorischen Signale, so dass die Aktivierung der T-Zellen inkomplett ist. Dieser Mangel an kostimulatorischen Signalen könnte entscheidend an der funktionellen und permanenten Inaktivierung der Zellen nach adoptivem Transfer *in vivo* beteiligt sein.

Unterschiedliche Untersuchungen *in vitro* belegen, dass durch eine Kostimulierung die cTCR-abhängige Induktion von Zytokin-Sekretion und T-Zell-Proliferation deutlich gesteigert wurde (Beecham *et al.*, 2000; Hombach *et al.*, 2001). Modifizierte cTCR wurden mit kostimulatorischen Signalen ausgestattet. Eine effektive CD28-Signalinduktion kann in primären T-Zellen über den cTCR vermittelt werden, indem ein extrazelluläres anti-Tumor-Antikörper-Fragment mit der signaltransduzierenden Domäne des CD28 fusioniert wird (Krause *et al.*, 1998). Doppelt transfizierte Zellen exprimieren simultan scFvCD28- und scFvCD3 $\zeta$ -cTCR, die zu einer effektiven Kostimulierung führen, wenn das Antigen von beiden scFv erkannt wird (Alvarez-Vallina und Hawkins, 1996). Weiterhin wurden Rezeptoren konstruiert, die die Signal-Domänen der CD3 $\zeta$ -Kette des TCR und des CD28-Rezeptors kombinieren und mit einer extrazellulären anti-Tumor-Antikörper-Domäne verbunden sind (Finney *et al.*, 1998; Beecham *et al.*, 2000; Geiger *et al.*, 2001; Hombach *et al.*, 2001). In transduzierten T-Zellen wurden tatsächlich beide Signale über denselben Rezeptor induziert, resultierend in effektiver Kostimulierung. Diese Zellen proliferieren im Gegensatz zu rekombinanten Zellen ohne weitere kostimulatorische Moleküle (Finney *et al.*, 2004). Der hier konstruierte CD28-spezifische cTCR könnte durch Modifikation mit kostimulatorischen Molekülen verbessert werden, um eine suffiziente NKT-Zell-Aktivierung nach Erkennung des Antigens über den cTCR zu indizieren. Eine andere Alternative, um die Limitierungen aktueller Immuntherapien mit chimären T-Zell-Rezeptoren zu umgehen, ist die genetische Modifizierung von Effektor-T-Zellen mit nativer Spezifität für ein starkes virales Antigen. Klinische Studien zeigten, dass *in vitro* hergestellte Epstein-Barr-Virus (EBV)-spezifische T-Zellen *in vivo* expandieren,

persistieren und länger als 6 Jahre funktionstüchtig bleiben. EBV-spezifische Zellen können lange in der Präsenz von EBV-infizierten B-Zellen *in vivo* überleben. Transduzierte EBV-spezifische T-Zellen werden *in vivo* im Rahmen einer Reaktivierung des EBV in infizierten antigenpräsentierenden B-Zellen wiederholt über den nativen TCR aktiviert. Die EBV-spezifischen T-Zellen erkennen EBV-infizierte Targets über ihren konventionellen TCR und Tumor-Targets über den cTCR und können beide Targets effizient lysieren (Rössig *et al.*, 2002). Die klinische Überprüfung ihres therapeutischen Potentials ist bislang nicht erfolgt, aber in Vorbereitung.

### **Zusammenfassende Beurteilung**

In der vorliegenden Arbeit wurde ein CD33 $\zeta$ -spezifischer cTCR konstruiert, der sich jedoch nach Transfer in PBMC als unfunktionell erwiesen hat. Weiterhin wurden NKT-Zellen *in vitro* generiert, die mit CD20 $\zeta$ -spezifischen cTCR gentechnisch modifiziert wurden. Der cTCR, der sich gegen das Oberflächenmolekül CD20 richtet, wird in einer funktionellen Weise auf der Oberfläche von NKT-Zellen exprimiert. Die Erkennung des CD20-Moleküls verläuft spezifisch. Die Zytolyse durch CD20 $\zeta$ -cTCR-NKT-Zellen richtet sich spezifisch sowohl gegen CD20<sup>+</sup>-Zelllinien als auch gegen leukämische CD20<sup>+</sup>-Lymphozyten erkrankter Erwachsener (Patienten mit B-CLL). Diese genmodifizierten Zellen produzieren targetspezifisch INF- $\gamma$ , um andere Zellen zu rekrutieren, und können *in vitro* bis zu 5 Wochen proliferieren. Eine wichtige zukünftige Modifikation des cTCR ist die Ausstattung mit kostimulatorischen Molekülen, beispielsweise mit CD28 oder OX40 (Finney *et al.*, 2004), um eine komplette Signalinduktion der Zelle durch die Stimulierung des cTCR zu erhalten. Die gentechnische Modifikation von T-Lymphozyten für die Erkennung antigener Strukturen auf Tumorzellen über cTCR hat ein großes Potential für die zelluläre Immuntherapie von Krebserkrankungen. Neben genmodifizierten NKT-Zellen sind CTL, EBV-spezifische T-Zellen (Rössig *et al.*, 2000) und  $\gamma\delta$ -T-Zellen (Rischer *et al.*, 2004, in Vorbereitung) mit cTCR ausgestattet worden. Genmodifizierte NKT-Zellen könnten Grundlage für eine neue Strategie der zellulären Immuntherapie sein. Sie könnten eingesetzt werden als integraler Bestandteil einer multimodalen Behandlungsstrategie für Krebserkrankungen, insbesondere für die Lysierung großer



---

Mengen maligner Zellen („tumor-debulking“) vor Einleitung einer Chemo- oder Strahlentherapie oder zur Behandlung minimaler Resterkrankungen nach autologer oder allogener Knochenmarktransplantation. Ein großer Vorteil der NKT-Zellen ist ihre Fähigkeit, schnell große Mengen inflammatorischer Zytokine zu produzieren, um andere Zellen des Immunsystems zu aktivieren, die ebenfalls an der Tumorabwehr beteiligt sind (Taniguchi *et al.*, 2003). Die direkte klinische Applikation dieser Zellen verlangt jedoch Optimierungen individueller Komponenten, da zwischen ihrer Effektivität *in vitro* und *in vivo* weiterhin große Unterschiede bestehen könnten. Unter Berücksichtigung der klinischen Applikation ist der Aspekt der Sicherheit von besonderer Bedeutung. Schwere unerwünschte Nebenwirkungen retroviralen Gentransfers wurden kürzlich in einer klinischen Gentherapie-Studie der X-chromosomalen Form der schweren kombinierten Immundefizienz (X-SCID) beobachtet (Baum *et al.*, 2003). Ein oder mehrere Ereignisse insertieller Mutagenese in transduzierten hämatopoetischen Stammzellen führten zur malignen Entartung lymphatischer Zellen mit Entwicklung einer Leukämie. Die gentechnische Modifizierung reifer T-Zellen (und damit auch NKT-Zellen) mit cTCR birgt theoretisch ein deutlich geringeres Risiko, da die Zellen im Vergleich zu hämatopoetischen Stammzellen bereits terminal ausdifferenziert sind. Sie erhalten ihren Proliferationsreiz nicht über den chimären, sondern über den nativen TCR, und haben somit keinen Selektionsvorteil gegenüber den nicht-modifizierten Zellen. In bisherigen klinischen Studien mit retroviral transduzierten reifen T-Zellen sind keine Fälle sekundärer Leukämie aufgetreten.

## 5 Literatur

- 1) Abken, H., Hombach, A., Heuser, C., Sircar, R., Pohl, C., and Reinhold, U. (1997): Chimeric T-cell receptors: highly specific tools to target cytotoxic T lymphocytes to tumor cells. *Cancer Treat. Rev.* 23: 97-112
- 2) Adams, R. A., Flowers, A., and Davis, B. J. (1968): Direct implantation and serial transplantation of human acute lymphoblastic leukemia in hamsters. *Cancer Res.* 28: 1121-1125
- 3) Alvarez-Vallina, L. and Hawkins, R. E. (1996): Antigen-specific targeting of CD28-mediated T-cell costimulation using chimeric single-chain antibody variable fragment-CD28 receptors. *Eur. J. Immunol.* 26: 2304-2309
- 4) Andrews, R. G., Takahashi, M., Segal, M. G., Powell, J. S., Berstein I. D., and Singer, J. W. (1986): The L4F3 antigen is expressed by unipotent and multipotent colony-forming cells but not by their precursors. *Blood* 68: 1030-1035
- 5) Annenkov, A. E. and Chernajovsky, Y. (2000): Engineering mouse T lymphocytes specific to type II collagen by transduction with a chimeric receptor consisting of a single-chain Fv and TCR  $\zeta$ . *Gene Ther.* 7: 714-722
- 6) Annenkov, A. E., Moyes, S. P., Eshhar, Z., Mageed, R. A., and Chernajovsky, Y. (1998): Loss of original antigenic specificity in T cell hybridomas transduced with a chimeric receptor containing single-chain Fv of an anti-collagen antibody and Fc $\epsilon$ RI-signaling  $\gamma$  subunit. *J. Immunol.* 161: 6604-6613
- 7) Appelbaum, F. R., Matthews, D. C., Eary, J. F., Badger, C. C., Kellogg, M., Press, O. W., Martin, P. J., Fisher, D. R., Nelp, W. B., Thomas, E. D., *et al.* (1992): The use of

---

radiolabeled anti-CD33 antibody to augment marrow irradiation prior to marrow transplantation for acute myelogenous leukaemia. *Transplantation* 54: 829-833

8) Banchereau, J. and Steinman, R. M. (1998): Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252

9) Bauer, T. R. Jr., Miller, A. D., and Hickstein, D. D. (1995): Improved transfer of the leukocyte integrin CD18 subunit into hematopoietic cell lines by using retroviral vectors having a gibbon ape leukemia virus envelope. *Blood* 86: 2379-2387

10) Baum, C., Dullmann, J., Li, Z., Fehse, B., Meyer, J., Williams, D. A., and von Kalle, C. (2003): Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood* 101: 2099-2114

11) Baume, D. M., Caliguri, M. A., Manley, T. J., Daley, J. F., and Ritz, J. (1990): Differential expression of CD8- $\alpha$  and CD8- $\beta$  associated with MHC-restricted and non-MHC-restricted cytolytic effector cells. *Cell. Immunol.* 131: 352- 365

12) Beecham, E. J., Ma, Q., Ripley, R., and Junghans, R. P. (2000): Coupling CD28 co-stimulation to immunoglobulin T-cell receptor molecules: The dynamics of T-cell proliferation and death. *J. Immunother.* 23: 631-642

13) Bendelac, A. (1995): Mouse NK1<sup>+</sup> T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 7: 367

14) Bendelac, A., Rivera, M. N., Park, S. H., and Roark, J. H. (1997): Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 535-562

15) Binet, J. L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguët, H., Goasguen, J. *et al.* (1981): A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48: 198-206

- 16) Bitton, N., Verrier, F., Debre, P., and Gorochov, G: Characterization of T cell-expressed chimeric receptors with antibody-type specificity for the CD4 binding site of HIV-1 gp120. *Eur. Immunol.* 28: 4177-4187
- 17) Blank-Voorthuis, C. J., Braakman, E., Ronteltap, C. P., Tilly, B. C., Sturm, E., Warnaar, S. O., and Bolhuis, R. L. (1993): Clustered CD3/TCR complexes do not transduce activation signals after bispecific monoclonal antibody-triggered lysis by cytotoxic T lymphocytes via CD3. *J. Immunol.* 71: 6641-6649
- 18) Brenner, M. B., Strominger, J. L., and Krangel, M. S. (1988): The  $\gamma\delta$  T cell receptor. *Adv. Immunol.* 43: 133-192
- 19) Brigl, M., Bry, L., Kent, S. C., Gumperz, J. E., and Brenner, M. B. (2003): Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat. Immunol.* 4: 1230-1237
- 20) Brittinger, G., Hellriegel, K.-P. und Hiddemann, W. (1997): Chronische und lymphatische Leukämie und Haarzellenleukämie. Diagnostik und Therapie. Empfehlungen einer Konsensustagung. *Med. Klin.* 92: 309-312
- 21) Brocker, T (2000): Chimeric Fv- $\zeta$  or Fv- $\epsilon$  receptors are not sufficient to induce activation or cytokine production in peripheral T cells. *Blood* 96: 1999-2001
- 22) Brocker, T. and Karjalainen, K. (1995): Signals through T cell receptor- $\zeta$  chain alone are insufficient to prime resting T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 181: 1653-1659
- 23) Brutkiewicz, R. R. and Sriram, V. (2002): Natural killer T (NKT) cells and their role in antitumor immunity. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 41: 287-298
- 24) Bunnell, B. A., Muul, L. M., Donahue, R. E., Blaese, R. M., and Morgan, R. A. (1995): high-efficiency retroviral-mediated gene transfer into human and nonhuman primate peripheral blood lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 7739-7743

- 
- 25) Byrd, J. C., Myrphy, T., Howard, R. S., Lucas, M. S., Goodrich, A., Park, K. *et al.* (2001): Rituximab using a thrice weekly dosing schedule in B-cell chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma demonstrates clinical activity and acceptable toxicity. *J. Clin. Oncol.* 19: 2153-2164
- 26) Cai, X. and Garen, A. (1995): Anti-melanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cells: Selection of specific antibodies from single-chain Fv fusion phage libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 6537-6541
- 27) Caligaris-Cappio, F. and Hamblin, T. J. (1999): B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J. Clin. Oncol.* 17: 399-408
- 28) Caligaris-Cappio, F. (2000): Biology of chronic lymphocytic leukemia. *Rev. Clin. Exp. Hematol.* 4: 5-21
- 29) Cambier, J. C. (1995): Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAM). *J. Immunol.* 155: 3281-3285
- 30) Cantrell, D. (1996): T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 259-274
- 31) Carnaud, C., Lee, D., Donnars, O., Park, S. H., Beavis, A., Koezuka, Y., and Bendelac, A. (1999): Cutting edge: cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J. Immunol.* 163: 4647-4650
- 32) Cherry, S. R., Binischkiewicz, D., van Parijs, L., Baltimore, D., and Jaenisch, R. (2000): Retroviral expression in embryonic stem cells and hematopoietic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 20: 7419-7426

- 33) Cone, R. D. and Mulligan, R. C. (1984): High-efficiency gene transfer into mammalian cells: generation of helper-free recombinant retrovirus with broad mammalian host range. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81: 6349-6353
- 34) Cosset, F. L., Takeuchi, Y., Battini, J. L., Weiss, R. A., and Collins, M. K. (1995): High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J. Virol.* 69: 7430-7436
- 35) Couedel, C., Peyrat, M. A., Brossay, L., Koezuka, Y., Porcelli, S. A., Davodeau, F., and Bonneville, M. (1998): Diverse CD1d-restricted reactivity patterns of human T cells bearing "invariant" AV24BV11 TCR. *Eur. J. Immunol.* 28: 4391-4397
- 36) Cui, J., Shin, T., Kawano, T., Sato, H., Kondo, E., Toura, I., Kaneko, Y., Koseki, H., Kanno, M., and Taguchi, M. (1997): Requirement for V $\alpha$ 14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 278: 1623-1626
- 37) Darcy, P. K., Kershaw, M. H., Trapani, J. A., and Smyth, M. J. (1998): Expression in cytotoxic T Lymphocytes of a single-chain anti-carcinoembryonic antigen antibody. redirected Fas ligand-mediated lysis of colon carcinoma. *Eur. J. Immunol.* 28: 1663-1672
- 38) Deeks, S. G., Wagner, B., Anton, P. A., Mitsuyasu, R. T., Scadden, D. T., Huang, C., Macken, C., Richman, D. D., Christopherson, C., June, C. H., Lazar, R., Broad, D. F., Jalali, S., and Hege, K. M. (2002): A phase II randomized study of HIV-specific T-cell gene therapy in subjects with undetectable plasma viremia on combination antiretroviral therapy. *Mol. Ther.* 5: 788-797
- 39) Dinndorf, P. A., Andrews, R. G., Benjamin, D., Ridgway, D., Wolff, L., and Berstein, I. D. (1986): Expression of normal myeloid-associated antigens by acute leukemia cells. *Leukemia* 3: 440-445

- 
- 40) Dohner, H., Stilgenbauer, S., Brenner, A., Leupolt, E., Krober, A., Bullinger, L., Doherty, K., Bentz, M., and Lichter, P. (2000): Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 343 (26): 1910-1916
- 41) Dubel, S., Breitling, F., Fuchs, P., Zewe, M., Gotter, S., Welschof, M., Moldenhauer, G., and Little, M. (1994): Isolation of IgG antibody Fv-DNA from various mouse and rat hybridoma cell lines using the polymerase chain reaction with a simple set of primers. *J. Immunol. Methods* 175: 89-95
- 42) Eberl, G. and MacDonald, H. R. (2000): Selective induction of NK cell proliferation and cytotoxicity by activated NKT cells. *Eur. J. Immunol.* 30: 985-992
- 43) Eris, J. M., Basten, A., Brink, R., Doherty, K., Kehry, M. R., and Hodgkin, P. D. (1994): Anergic self-reactive B cells present self antigen and respond normally to CD40-dependent T-cell signals but are defective in antigen-receptor-mediated functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 4392-4396
- 44) Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G., and Schindler, D. G. (1993): Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the  $\gamma$  or  $\zeta$  subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 720-724
- 45) Eshhar, Z., Waks, T., Bendavid, A., and Schindler, D. G. (1993): Functional expression of chimeric receptor genes in human T cells. *J. Immunol. Methods* 248: 67-76
- 46) Esteve, J. and Montserrat, E. (2000): Hematopoietic stem cell transplantation for B-cell chronic lymphocytic leukemia: current status. *Rev. Clin. Exp. Hematol.* 42: 167-178
- 47) Fialkow, P. J., Singer, J. W., Raskind, W. H., Adamson, J. W., Jacobson, R. J., Bernstein, I. D., Dow, L. W., Najfeld, V., and Veith, R. (1987): Clonal development,

stem-cell differentiation, and clinical remissions in acute nonlymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 317: 468-473

48) Finney, H. M., Akbar, A. N., and Lawson, A. D. (2004): Activation of resting human primary cells with chimeric receptors: Costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR chain. *J. Immunol.* 172: 104-113

49) Fremont, D. H., Rees, W. A., and Kozono, H. (1996): Biophysical studies of T-cell receptors and their ligands. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 93-100

50) Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F., and Gallo, R. (1979): Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 54: 713-733

51) Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., and Parks, W. P. (1973): *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 51: 1417-1423

52) Giles, F., Estey, E., and O'Brian, S. (2003): Gemtuzumab ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer* 98: 2095-2104

53) Geiger, T. L., Nguyen, P., Leitenberg, D., and Flavell R. A. (2001): Integrated src kinase and costimulatory activity enhances signal transduction through single-chain chimeric receptors in T lymphocytes. *Blood* 98: 2364-2371

54) Godfrey, D. I., Hammond, K. J., Poulton, L. D., Smyth, K. J., and Baxter, A. G. (2000): NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol. Today* 21: 573-583

55) Goker, H., Haznedaroglu, I. C., and Chao, N. J. (2001): Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Exp. Hematol.* 29: 259-277



- 
- 56) Gorochov, G., Lustgarten J., Waks, T., Gross, G., and Eshhar, Z. (1992): Functional assembly of chimeric T-cell receptor chains. *Int. J. Cancer Suppl.* 7: 53-57
- 57) Grant, S. G. N., Jessee, J., Bloom, F. R., and Hanahan, D. (1990): Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4645-4649
- 58) Gratwohl, A., Passweg, J., Baldomero, H., and Hermans, J. (1999): Blood and marrow transplantation activity in Europe 1997. European group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant.* 24: 231-245
- 59) Greenfield, E. A., Nguyen, K. A., and Kuchroo, V. K. (1998): CD28/B7 costimulation: A review. *Crit. Rev. immunol.* 18: 389-418
- 60) Griffin, J. D., Ritz, J., Nadler, L. M., and Schlossman S. F. (1981): Expression of myeloid differentiation antigens on normal and malignant myeloid cells. *J. Clin. Invest.* 68: 932-941
- 61) Grimm, E. A., Mazumder, A., Zhang, H. Z., and Rosenberg S. A. (1982): Lymphokine-activated killer cell phenomenon. lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* 155: 1823-1841
- 62) Gross, G., Waks, T., and Eshhar, Z. (1989): Expression of immunoglobulin-T-cell receptor as functional receptors with antibody type-specificity . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 10024-10028
- 63) Gross. G., Gorochov, G., Waks, T., and Eshhar, Z (1989): Generation of effector T cells expressing chimeric T-cell receptor with antibody type-specificity. *Transplant. Proc.* 21: 127-130

- 64) Grossbard, M. L., Gribben, J. G., Freedman, A. S., Lambert, J. M., Kinsella, J., Rabinowe, S. N., Eliseo L., Taylor, J. A., Blattler, W. A., and Epstein, C. L. (1993): Adjuvant immunotoxin therapy with anti-B4-blocked ricin after autologous bone marrow transplantation for patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 81: 2263-2271
- 65) Guven, H., Gilljam, M., Chambers, B. J., Ljunggren, H. G., Christensson, B., Kimby, E., and Dilber, M. S. (2003): Expansion of natural killer (NK) and natural killer-like T (NKT)-cell populations derived from patients with B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): a potential source for cellular immunotherapy. *Leukemia* 17: 1973-1980
- 66) Hamblin, T. and Oscier, D. (1998): Chronic lymphocytic leukemia. In Whittacker, J. and Holmes, J. (eds), *Leukemia and Associated Diseases*. Blackwell Science, Oxford, pp. 105-135
- 67) Hammond K. J. L. und Godfrey, D. I. (2003): NKT cells: Potential targets for autoimmune disease therapy? *Tissue Antigens* 59: 353-363
- 68) Hanenberg, H., Xiao, X. L., Dilloo, D., Hashino, K., Kato, I., and Williams, D. A. (1996): Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat. Med.* 2: 876-882
- 69) Hege, K. M., Cooke, K. S., Finer, M. H., Zsebo, K. M., and Roberts, M. R. (1996): Systemic T-cell-independent tumor immunity after transplantation of universal receptor-modified bone marrow into SCID mice. *J. Exp. Med.* 184: 2261-2269
- 70) Heim, R., Prasher, D. C., and Tsien, R. Y. (1994): Wavelength and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 1250-1254
- 71) Hiddemann, W. and Buchner, T (2001): Current status and perspectives of therapy for acute myeloid leukemia. *Semin. Hematol.* 38: 3-9

- 
- 72) Hockenberry, D. M., Zutter, M., Hickey, W., Nahm, M. and Korsmeyer, S. J. (1991): BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88: 6961-6965
- 73) Hombach, A., Heuser, C., Sircar, R., Tillmann, T., Diehl, V., Pohl, C., and Abken, H. (1998): An anti-CD30 chimeric receptor that mediates CD3- $\zeta$ -independent T-cell activation against Hodgkin's lymphoma cells in the presence of soluble CD30. Cancer Res. 58: 1116-1119
- 74) Hombach, A., Schneider, C., Sent, D., Koch, D., Willemsen, R. A., Diehl, V., Kruis, W., Bolhuis, R. L., Pohl, C., and Abken, H. (2000): An entirely humanized CD3 $\zeta$ -chain signaling receptor that directs peripheral blood T cells to specific lysis of carcinoembryonic antigen-positive tumor cells. Int. J. Cancer 88: 115-120
- 75) Hombach, A., Sent, D., Schneider, C., Heuser, C., Koch, D., Pohl, C., Seliger, B., and Abken, H. (2001): T-cell activation by recombinant receptors: CD28 costimulation is required for interleukin-2 secretion and receptor-mediated T-cell proliferation but does not affect receptor-mediated target cell lysis. Cancer Res. 61: 1976-1982
- 76) Hombach, A., Wiczarkowicz, A., Marquardt, T., Heuser, C., Usai, L., Pohl, C., Seliger, B., and Abken, H. (1998): Tumor-specific T-cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 $\zeta$  signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/ CD3 $\zeta$  signaling receptor molecule. J. Immunol. 167: 6123-6131
- 77) Hong, S., Scherer, D. C., Singh, N., Mendiratta, S. K., Serizawa, I., Koezuka, Y., and Van Kaer, L. (1999): Lipid antigen presentation in the immuno system: lesson learned from CD1d knockout mice. Immunol. Rev. 169: 31-44
- 78) Hwu, P., Yang, J. C., Cowherd, R., Treisman, J., Shafer G. E., Eshhar, Z., and Rosenberg, S.A. (1995): *In vivo* antitumor activity of T cells redirected with chimeric antibody/T-cell receptor genes. Cancer Res. 55: 3369-3373

- 79) Iezzi, G., Karjalainen, K., and Lanzavecchia, A.: The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity*. 8: 89-95
- 80) Irving, B. A. and Weiss, A. (1991): The cytoplasmatic domain of the T-cell receptor  $\zeta$  chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* 64: 891-901
- 81) Jaffe, E. S., Harris, N. L., Stein, H., and Vardiman, J. W. (2001) Pathology and Genetics eds. World Health Organization classification of tumors: Tumors of hematopoietic and lymphoid tissue. Lyon, France: IARC Press, 84-86
- 82) Janeway, C. A. jr. (1992): The T-cell receptor is a multicomponent signaling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 645-674
- 83) Joyce, S. (2001): CD1d and natural T cells: how their properties jump-start the immune system. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 442-469
- 84) Katagiri, S., Yonezawa, T., Kuyama, J., Kanayama, Y., Nishida, K., Abe, T., Tamaki, T., Ohnishi, M., and Tarui, S. (1984): Two distinct human myeloma cell lines originating from one patient with myeloma. *Int. J. Cancer* 36: 241-246
- 85) Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Taura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakawaga, R., Sato, H., Kondo, E., Koseki, H., and Taniguchi, M. (1997): CD1d-restricted and TCR-mediated activation of  $V\alpha 14$  NKT cells by glycosylceramides. *Science*: 278: 1626-1629
- 86) Kavanaugh, M. P., Miller, D. G., Zhang, W., Law, W., Kozak, S. L., Kabat, D., and Miller, A. D. (1994): Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 7071-7075

- 
- 87) Kelly, P. F., Vandergriff, J., Nathwani, A., Nienhuis, A. W., and Vanin, E. F. (2000): Highly efficient gene transfer into cord blood nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency repopulating cells by oncoretroviral vector particles pseudotyped with the feline endogenous retrovirus (RD114) envelope protein. *Blood* 96: 1206-1214
- 88) Khouri, I. F., Keating, M. J., Vriesendorp, H. M., Reading, C. L., Przepiorka, D., Huh Y. O. *et al.* (1994): Autologous and allogeneic bone marrow transplantation for chronic lymphocytic leukemia: preliminary results. *J. Clin. Oncol.* 12: 748-758
- 89) Kinsella, T. M. and Nolan, G. P. (1996): Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Hum. Gene Ther.* 7: 1405-1413
- 90) Kitamura, H., Iwakabe, K., Yahata, T., Nishimura, S., Ohta, A., Ohmi, Y., Sato, M., Takeda, K., Okumura, K., Van Kaer, L., Kawano, T., Taniguchi, M., and Nishimura, T. (1999): The natural killer T (NKT) cell ligand  $\alpha$ -galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin(IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *J. Exp. Med.* 189: 1121-1127
- 91) Klein, E., Klein, G., Nadkarni, J. S., Nadkarni, J. J., Wigzell, H., and Clifford, P. (1968): Surface IgM- $\kappa$  specificity on a Burkitt's lymphoma cell *in vivo* and in derived culture lines. *Cancer Res.* 28: 1300-1310
- 92) Krause, A., Guo, H. F., Latouche, J. B., Tan, C., Cheung, N. K., and Sadelain, M. (1998): Antigen-dependent CD28 signaling selectively enhances survival and proliferation in genetically modified activated human primary T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 188: 619-626
- 93) Kurre, P., Kiem, H. P., Morris, J., Heyward, S., Battini, J. L., and Miller, A. D. (1999): Efficient transduction by an amphotropic retrovirus vector is dependent on high-level expression of the cell surface virus receptor. *J. Virol.* 73: 495-500

- 94) Lanzavecchia, A. und Scheidegger, D. (1987): The use of hybrid hybridomas to target human cytotoxic lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 17: 105-111
- 95) Lazaridou, A., Miraxtsi, C., Korantzis, J., Eleftheriadis, N., and Christakis, J. I. (2000): Simultaneous detection of BCL-2 protein, trisomy 12, retinoblastoma and P53 monoallelic gene deletion in B-cell chronic lymphocytic leukemia by fluorescence *in situ* hybridization (FISH): relation to disease status. *Leuk. Lymphoma* 36 (5-6): 503-512
- 96) Leemhuis, T., Wells, S., Horn, P., Scheffold, C., Edinger, M., and Negrin, R. S. (2000): Autologous cytokine-induced killer cells for the treatment of relapsed Hodgkin's disease and Non- Hodgkin's lymphoma. *Blood* 96: 839a
- 97) Letourneur, F. and Klausner, R. D. (1991): T-cell and basophil activation through the cytoplasmatic tail of T-cell-receptor  $\zeta$  family proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 8905-8909
- 98) Letourneur, F. and Klausner, R. D. (1992): Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmatic tail of CD3  $\epsilon$ . *Science* 255: 79-82
- 99) Little, M., Breitling, F., Micheel, B., and Dubel, S. (1994): Surface display of antibodies. *Biotechnol. Adv.* 12: 539-555
- 100) Loffler, A., Kufer, P., Lutterbuse, R., Zettl, F., Daniel, P. T., Schwenkenbecher, J. M., Riethmuller, G., Dorken, B., and Bargou, R. C. (2000): A recombinant bispecific single chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood* 95: 2098-2103
- 101) Lowdell, M. W., Lamb, L., Hoyle, C., Velardi, A., Prentice, H. G. (2001): Non-MHC-restricted cytotoxic cells: their roles in the control and treatment of leukaemias. *Br. J. Haematol.* 114: 11-24

- 
- 102) Lu, P. H. and Negrin, R. S. (1994) : A novel population of expanded human CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells derived from T cells with potent *in vivo* antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency. *J. Immunol.* 153: 1687-1696
- 103) MacDonald, H. R. (1995): NK1.1<sup>+</sup> T cell receptor- $\alpha/\beta$ <sup>+</sup> cells: new clues to their origin, specificity, and function. *J. Exp. Med.* 182: 633-638
- 104) Malissen, B. and Malissen, M. (1996): Functions of TCR and pre-TCR subunits: lessons from gene ablation. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 383-393
- 105) Maki, G. (2001): *Ex vivo* purging of stem cell autografts using cytotoxic cells. *J. Hematother. Stem. Cell Res.* 10: 545-551
- 106) Maher, J., Brentjens, R. J., Gunset, G., Riviere, I., and Sadelain, M. (2002): Human T-lymphocytes cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCR $\zeta$ /CD28 receptor. *Nat. Biotechnol.* 20: 70-75
- 107) Mann, R., Mulligan, R. C., and Baltimore, D. (1983): Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* 33: 153-159
- 108) Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1980): Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* 65: 499-560
- 109) McCulloch, E. A. (1983): Stem cells in normal and leukemic hemopoiesis (Henry Stratton Lecture, 1982). *Blood* 62: 1-13
- 110) McDonnell, T. J., Nunez, G., Platt F. M., Hockenberry, D., London L., McKearn, J. P., and Korsmeyer, S. J. (1990): Deregulated Bcl-2-immunoglobulin transgene expands a resting but responsive immunoglobulin M- and D-expressing B-cell population. *Mol. Cell Biol.* 10 (5): 1901-1907

111) McGuinness, R. P., Ge, Y., Patel, S. D., Kashmiri, S. V., Lee, H. S., Hand, P. H., Schlom, J., and Finer, M. H. (1999): Anti-tumor activity of human T cells expressing the CC49- $\zeta$  chimeric immune receptor. *Hum. Gene Ther.* 10: 165-73

112) McLaughlin, P., Grillo-Lopez, A. J., Link, B. K., *et al.* (1998): Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J. Clin. Oncol.* 16: 2825-2833

113) von Mehren, M. und Weiner, L. M. (1996): Monoclonal antibody-based therapy. *Curr. Opin. Oncol.* 8: 493-498

114) Meuer, S. C., Fitzgerald, K. A., Hussey, R. E., Hodgdon, J. C., Schlossman, S. F., and Reinherz, E. L. (1983): Clonotypic structures involved in antigen-specific human T cell function. Relationship to the T3 molecular complex. *J. Exp. Med.* 157: 705-719

115) Miller, A. D., Garcia, J. V., von Suhr, N., Lynch, C. M., Wilson, C., and Eiden, M. V. (1991): Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia. *J. Virol.* 65: 2220-2224

116) Mitsuyasu, R. T., Anton, P. A., Deeks, S. G., Scadden, D. T., Connick, E., Downs, M. T., Bakker, A., Roberts, M. R., June, C. H., Jalali, S., Lin, A. A., Pennathur-Das, R., and Hege, K. M. (2000): Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4 $\zeta$  gene-modified autologous CD4(+) and CD8(+) T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Blood* 96: 785-793

117) Montserrat, E., Bosch F., and Rozman, C. (1997): Treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia: current status and future perspectives. *J. Intern. Med. Suppl.* 740: 63-67

118) Morita, C. T., Beckman, E. M., Bukowski, J. F. *et al.* (1995): Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human  $\gamma\delta$  T cells. *Immunity.* 3: 495-507



- 
- 119) Moritz, D. und Groner, B. (1995): A spacer region between the single chain antibody- and the Cd3  $\zeta$ -chain domain of chimeric T cell receptor components is required for efficient ligand binding and signaling activity. *Gene Ther.* 2: 539-546
- 120) Mutis, T., Verdijk, R., Schrama, E., Esendam, B., Brand, A., and Goulmy, E. (1999): Feasibility of immunotherapy of relapsed leukemia with *ex vivo* generated cytotoxic T lymphocytes specific for hematopoietic system-restricted minor histocompatibility antigens. *Blood* 93: 2336-2341
- 121) McGuinness, R. P., Ge, Y., Patel, S. D., Kashmiri, S. V., Lee, H. S., Hand, P. H., Schlom, J., Finer, M. H., and McArthur, J. G. (1999): Anti-tumor activity of human T cells expressing the CC49- $\zeta$  chimeric immune receptor. *Hum. Gene. Ther.* 10: 165-173
- 122) Nadkarni, J. S., Nadkarni, J. J., Clifford, P., Manolov, G., Fenyó, E. M., and Klein, E. (1969): Characteristics of new cell lines derived from Burkitt's lymphomas. *Cancer* 23: 64-79
- 123) O'Connell, J., Bennett, M. W., O'Sullivan, G. C., Collins, J. K., and Shanahan, F. (1997): The Fas counterattack: a molecular mechanism of tumor immune privilege. *Mol. Med.* 3: 294-300
- 124) O'Connell, J., O'Sullivan, G. C., Collins, J. K., and Shanahan, F. (1997): The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J. Exp. Med.* 184: 1075-1082
- 125) Papamichail, M., Perez, S. A., Gritzapis, A. D., and Baxevanis, C. N. (2004): Natural killer lymphocytes: biology, development, and function. *Cancer Immunol. Immunother.* 53: 176-186
- 126) Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., and Baltimore, D. (1993): Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90: 8392-8396

127) Peiper, S. C., Ashmun, R. A., and Look, A. T. (1988): Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of a human gene encoding the CD33 myeloid differentiation antigen. *Blood* 72: 314-321

128) Peiper, S. C., Leboeuf, R. D., Hughes, C. B., Prasthofer, E. F., Borowitz, M. J., Dewutter-Dambuyant, C., Katz, D. R., Walker, W., Ashmun, R. A., and Look, A. T. : Report on the CD33 cluster workshop: biochemical and genetic characterization of gp67. In: Knapp, W., Dorken, B., Gilks, W. R., Rieber, E. P., Schmidt, R. E., Stein, H., and von dem Borne, A. E. G. (eds.), *Leucocyte Typing IV*, p. 814. New York: Oxford University Press, 1989

129) Pelletier, J. and Sonenberg, N. (1988): Internal initiation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334: 320-325

130) Pollok, K. E., Hanenberg, H., Noblitt, T. W., Schroeder, W. L., Kato, I., Emanuel, D., and Williams, D. A. (1998): High-efficiency gene transfer into normal and adenosine deaminase-deficient T lymphocytes is mediated by transduction on recombinant fibronectin fragments. *J. Virol.* 72: 4882-4892

131) Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. and Cormier, M. J. (1992): Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111: 229-233

132) Pule, M., Finney, H., and Lawson, A. (2003): Artificial T-cell receptors. *Cytherapy* 5(3): 211-226

133) Pulvertaft, J. V. (1964): Cytology of Burkitt's tumour (african lymphoma). *Lancet* 39: 238-240

134) Rai, K. R., Sawitzky, A., Cronkite, E. P., Chanana, A. D., Levy R. N., and Pasternak, B. S. (1975): Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46: 219-234

- 
- 135) Rasko, J. E., Battini, J. L., Gottschalk, R. J., Mazo, I., and Miller, A. D. (1999): The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 2129-2134
- 136) Rischer, M., Pscherer, S., Duwe, S., Vormoor, J., Jürgens, H., and Rossig, C. (2004): Human  $\gamma\delta$  T cells as mediators of chimeric-receptor redirected antitumor immunity (in Vorbereitung)
- 137) Rithmuller, G., Schneider-Gadicke, E., and Johnson, J. P. (1993): Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 732-739
- 138) Riviere, I., Brose, K., and Mulligan, R. C. (1995): Effects of retroviral vector design on expression of human adenosine deaminase in murine bone marrow transplant recipients engrafted with genetically modified cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 6733-6737
- 139) Riviere, I., Gallardo, H. F., Hagani, A. B., and Sadelain, M. (2000): Retroviral-mediated gene transfer in primary murine and human T-lymphocytes. *Mol. Biotechnol.* 15: 133-142
- 140) Roberts, M. R., Cooke, K. S., Tran, A. C., Smith, K. A., Lin W. Y., and Finer, M. H. (1998): Antigen-specific cytotoxicity by neutrophils and NK cells expressing chimeric immune receptors bearing  $\zeta$  or  $\gamma$  signaling domains. *J. Immunol.* 161: 375-384
- 141) Roberts, M. R., Qin, L., Zhang, D., Smith, D. H., Tran A. C., Dull, T. J., Groopman, J. E., Capon, D. J., Byrn, R. A., and Finer, M. H. (1994): Targeting of human immunodeficiency virus-infected cells by CD8<sup>+</sup> T lymphocytes armed with universal T-cell receptors. *Blood* 84: 2878-2889
- 142) Romeo, C. and Seed, B. (1991): Cellular immunity to HIV activated by CD4 fused to T cell receptor or Fc receptor polypeptides. *Cell* 64: 1037-1046

- 143) Rossig, C., Bollard, C. M., Nuchtern, J., Merchant, D. A., and Brenner, M. K. (2001): Targeting of G(D)2-positive tumor cells by human T lymphocytes engineered to express chimeric T-cell receptor genes. *Int. J. Cancer* 94: 228-236
- 144) Rossig, C., Bollard, C. M., Nuchtern, J., Ronney, C. M., and Brenner, M. K. (2002): Epstein-Barr virus-specific human T lymphocytes expressing anti-tumor chimeric T cell receptors: Potential for improved immunotherapy. *Blood* 99: 2009-2016
- 145) Rossig, C. and Brenner M. K. (2003): Chimeric T-cell receptors for the targeting of cancer cells. *Acta Haematol.* 110: 154-159
- 146) Rossig, C., Nuchtern, J., and Brenner, M. K. (2000): Selection of human anti-tumor single-chain Fv antibodies from the B-cell repertoire of patients immunized against autologous neuroblastoma. *Med. Pediatr. Oncol.* 35: 692-695
- 147) Rudd, C. E. (1996): Upstream-downstream: CD28 cosignaling pathways and T cell function. *Immunity.* 4: 527-534
- 148) Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- 149) Sandler, D. P. (1987): Epidemiology of acute myelogenous leukemia. *Semin. Oncol.* 14: 359-364
- 150) Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74: 5463-5467
- 151) Schaible, U. E. and Kaufmann, S. H. (2000): CD1 molecules and CD1-dependent T cells in bacterial infections: a link from innate to acquired immunity? *Semin. Immunol.* 12: 527-535

---

152) Schmidt-Wolf, I. G., Lefterova, P., Johnston, V., Scheffold, C., Csipai, M., Mehta, B. A., Tsuruo, T., Huhn D., and Negrin, R. S. (1996): Sensitivity of multidrug-resistant tumor cell lines to immunologic effector cells. *Cell. Immunol.* 169: 85-90

153) Schmidt-Wolf, I. G., Lefterova, P., Mehta, B. A., Fernandez, L. P., Huhn D., Blume, K. G., Weissman, I. L., and Negrin, R. S. (1993): Phenotypic characterization and identification of effector cells involved in tumor cell recognition of cytokine-induced killer cells. *Exp. Hematol.* 21: 1673-1679

154) Schmidt-Wolf, I. G., Lefterova, P., Johnston, V., Huhn D., Blume, K. G., and Negrin, R. S. (1994): Propagation of large numbers of T cells with natural killer cell markers. *Br. J. Haematol.* 87: 453-458

155) Smith, M. R. (2003): Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* 22 (47): 7359-7368

156) Smith, G. P. (1985): Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228: 1315-1317

157) Sorge, J., Wright, D., Erdman, V. D., and Cutting, A. E. (1984): Amphotropic retrovirus vector system for human cell gene transfer. *Cell. Biol.* 4: 1730-1737

158) Stancovski, I., Schindler, D. G., Waks, T., Yarden, Y., Sela, M., and Eshhar, Z. (1993): Targeting of T lymphocytes to Neu/HER2-expressing cells using chimeric single chain Fv receptors. *J. Immunol.* 151: 6577-6582

159) Staudt, L. M. (2003): Molecular diagnosis of the hematologic cancers. *New Eng. J. Med.* 348: 1777-1785

160) Stirewalt, D. L., Meshinchi, S., and Radich, J. P. (2003): Molecular targets in acute myelogenous leukemia. *Blood Rev.* 17: 15-23

- 161) Taniguchi, M., Harada, M., Kojo, S., Nakayama, T., and Wakao, H. (2002): The regulatory role of V $\alpha$ 14 NKT cells in innate and acquired immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 483-513
- 162) Taniguchi, M., Seino, K, and Nakayama, T. (2003): The NKT cell system: bridging innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 4 (12): 1164-1165
- 163) Tefferi, A. and Phyliky, R. L. (1992): A clinical update on chronic lymphocytic leukemia. II. Critical analysis of current chemotherapeutic modalities. *Mayo. Clin. Proc.* 67: 457-461
- 164) Tomblyn, M. R. and Tallman, M. S. (2003): New developments in antibody therapy for acute myeloid leukemia. *Semin. Oncol.* 30: 502-508
- 165) Verneris, M. R., Baker, J., Edinger, M., and Negrin, R. S. (2002): Studies of *ex vivo* activated and expanded CD8<sup>+</sup> NK-T cells in humans and mice. *J. Clin. Immunol.* 22: 131-136
- 166) Verneris, M. R., Kornacker, M., Mailander, V., and Negrin, R. S. (2000): Resistance of *ex vivo* expanded CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> T cells to Fas-mediated apoptosis. *Cancer Immunol. Immunother.* 49: 335-345
- 167) Verhoeven, M., Milstein, C., and Winter, G. (1988): Reshaping human antibodies: Grafting an anti-lysozyme activity (1988): *Science* 239: 1534-1536
- 168) Vieira, J. and Messing, J. (1982): The pUC plasmids, an M13mp7 derived system for insertions mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19: 259-268
- 169) Walker, R. E., Bechtel, C. M., Natarajan, V., Baseler, M., Hege, K. M., Metcalf, J. A., Stevens, R., Hazen, A., Blaese, R. M., Chen, C. C., Leitman, S. F., Palensky, J., Wittes, J., Davey, R. T., Falloon, J., Polis, M. A., Kovacs, J. A., Broad, D. F., Levine,

---

B. L., Roberts, M. R., Masur, H., and Lane, H. C. (2000): Long-term *in vivo* survival of receptor-modified syngeneic T cells in patients with human immunodeficiency virus infection. *Blood* 96: 467-474

170) Wang, G., Chopra, R. K., Royal, R. E., Yang, J. C., Rosenberg, S. A., and Hwu, P. (1998): A T cell-independent antitumor response in mice with bone marrow cells retrovirally transduced with an antibody/Fc- $\gamma$  chain chimeric receptor gene recognizing a human ovarian cancer antigen. *Nat. Med.* 4: 168-172

171) Weijtens, M. E., Willemsen, R. A., Valerio, D., Stam, K., and Bolhuis, R. L. (1996): Single chain Ig/ $\gamma$  gene-redirceted human T lymphocytes produce cytokines, specifically lyse tumor cells, and rycycle lytic capacity. *J. Immunol.* 175: 836-843

172) Wiley, J. S., Dao-Ung, L. P., Gu, B. J., Slyter, R., Shemon, A. N., Taper, J., Gallo, J., and Manoharan, A. (2002): A loss-of-function polymorphic mutation in the cytolytic P2X7 receptor gene and chronic lymphocytic leukaemia: a molecular study. *Lancet* 360 (9349): 1898-1899

173) Wiestner, A., Rosenwald, A., Barry, T. S., Wright, G., Davis, R. E., Henrickson, S. E., Zhao, H., Ibbotson, R. E., Orchard, J. A., Davis, Z., Stetler-Stevenson, M., Raffeld, M., Aethur, D. C., Marti, G. E., Wilson, W. H., Hamblin, T. J., Oscier, D. G., and Staudt, L. M. (2003): ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 101: 4944-4951

174) Willemsen, R. A., Debets, R., Chames, P., and Bolhuis, R. L. H. (2003): Genetic engineering of T cell specificity for immunotherapy of cancer. *Hum. Immunol.* 64: 56-68

175) Wilson, S. B. and Delovitch, T. L. (2003): Janus-like role of regulatory iNKT cells in autoimmune disease and tumour immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 211-222

176) Wirthmueller, U., Kurosaki, T., Murakami, M. S., and Ravetch, J. V. (1992): Signal transduction by Fc  $\gamma$  RIII (CD16) is mediated through the  $\gamma$  chain. *J. Exp. Med.* 175: 1381-1390

177) Witzig, T. E. (2003): Efficacy and safety of 90Y ibritumomab tiuxetan (Zevalin) radioimmunotherapy for non-Hodgkin's lymphoma. *Semin. Oncol.* 30: 11-16

178) Zeng, D., Lewis, D. Dejbakhsh-Jones, S., Lan, F., Garcia-Ojeda, M., Sibley, R. *et al.* (1999): Bone marrow NK1.1(-) and NK1.1(+) T cells reciprocally regulate acute graft versus host disease. *J. Exp. Med.* 189: 1073-1081

179) Zhang, G., Gurtu, V., and Kain, S. R. (1996): An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227: 707-711



## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. Kienast für die interessante und vielfältige Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit sowie die wissenschaftliche Betreuung.

Ich möchte mich bei Dr. Christian Scheffold bedanken für die Betreuung meiner Arbeit und die sehr guten Hilfestellungen durch stetige Anregungen und Verbesserungsvorschläge.

Für die großzügige Bereitstellung von Zelllinien und die engagierte Unterstützung bei Problemlösungen möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Claudia Rössig bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Dr. Susanne Duwe bedanken für die motivierenden Diskussionen, unzähligen Tips zur erfolgreichen Laborarbeit und das konstruktive Korrekturlesen meiner Arbeit.

Für die hervorragende Einarbeitung in die Zellkulturtechniken möchte ich mich bei Sybille Pscherer bedanken.

Für die freundliche Überlassung der scFvCD33-Nukleotidsequenz danke ich dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Prof. Müller, an der Universität Marburg.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des KMT-Zentrums, die sowohl durch ihre Hilfsbereitschaft und Verlässlichkeit als auch mit aufbauenden Ratschlägen und tatkräftiger Unterstützung zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Mann Martin bedanken für das detaillierte Korrekturlesen meiner Arbeit, die zeitraubende Hilfe am PC und das immer offene Ohr für kleine und große Probleme, die während meiner Promotion nicht abreißen wollten.

## Lebenslauf

Martina Pieper

geboren am 10. August 1972 in Bielefeld

deutsche Staatsangehörigkeit

verheiratet

### Schulbildung

1979 - 1983 Besuch der Grundschule in Schloß Holte-Stukenbrock

1983 - 1992 Besuch des Gymnasiums in Verl

06/1992 Allgemeine Hochschulreife am Gymnasium in Verl

### Ausbildung/Berufstätigkeit

1992 – 1994 Ausbildung zur medizinisch-technischen Laboratoriumsassistentin an den Friedrich-von-Bodelschwingh-Schulen Bethel in Bielefeld

06/1994 Abschlussprüfung zur medizinisch-technischen Laboratoriumsassistentin

1994 – 1996 Berufstätigkeit als medizinisch-technische Laboratoriumsassistentin im Franziskus-Hospital in Bielefeld

### Studium/Berufstätigkeit

1996 – 2001 Studium der Diplom-Biologie an der Universität Bielefeld

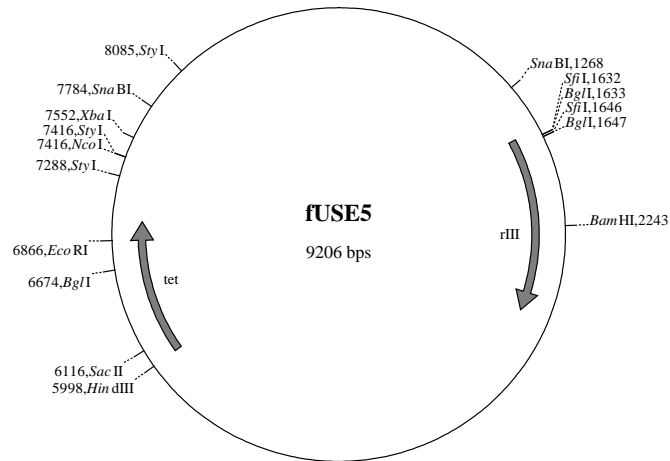
09/2001 Abschluss des Studiums der Diplom-Biologie mit der Diplomarbeit zum Thema „Untersuchungen am Plasmid pCM2 von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: Identifizierung der *pat-1*-homologen Gene *phpA* und *phpB* und Nachweis der Konjugation“ am Lehrstuhl für Mikrobiologie und Gentechnologie der Universität Bielefeld

seit 11/2001 Wissenschaftliche Angestellte in der Arbeitsgruppe „Zelluläre Immuntherapie“ am Knochenmarktransplantations-Zentrum des Universitätsklinikums in Münster mit dem Ziel der Promotion

## Anhang

### Vektorkarten und -konstruktionen

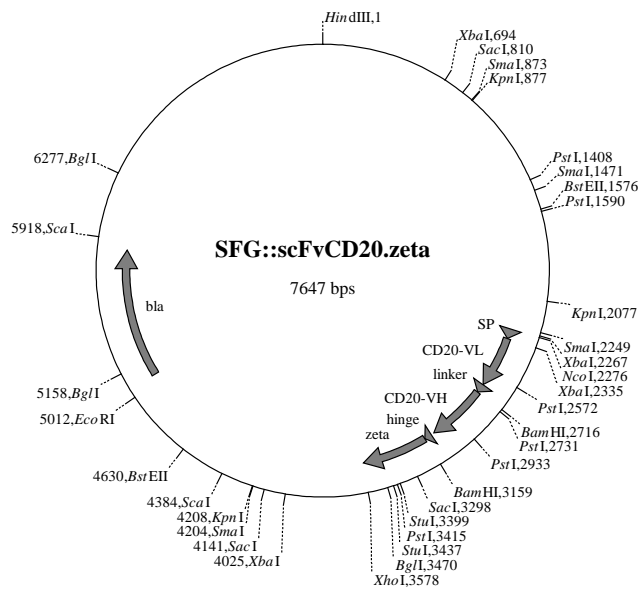
#### Fusionsphage fUSE5



*rIII*: Protein III

*tet*: Tetracyclin-Resistenz (schematisch)

#### Retroviraler Vektor SFG::scFvCD20 $\zeta$

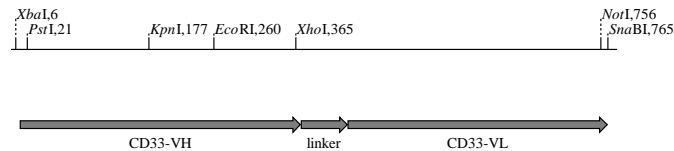


*bla*: Ampicillin-Resistenz (schematisch)

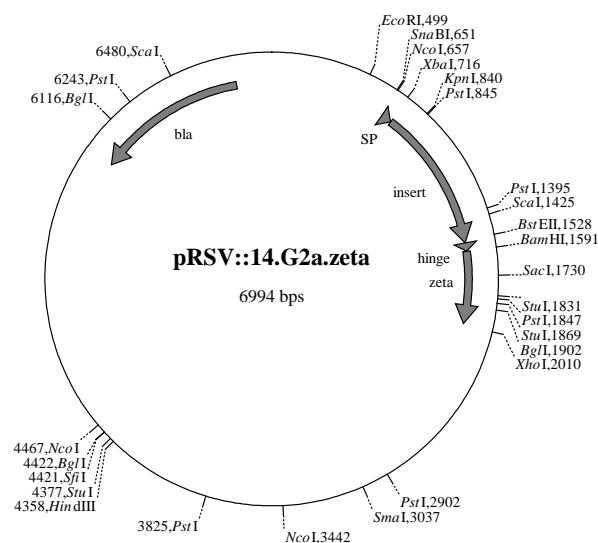
## Vektor pRSV::scFvCD33 $\zeta$

An die scFvCD33-Nukleotidsequenz, die inseriert in den Vektor pAB1 vorlag, wurden die Erkennungssequenzen *Sna*BI und *Xba*I angefügt.

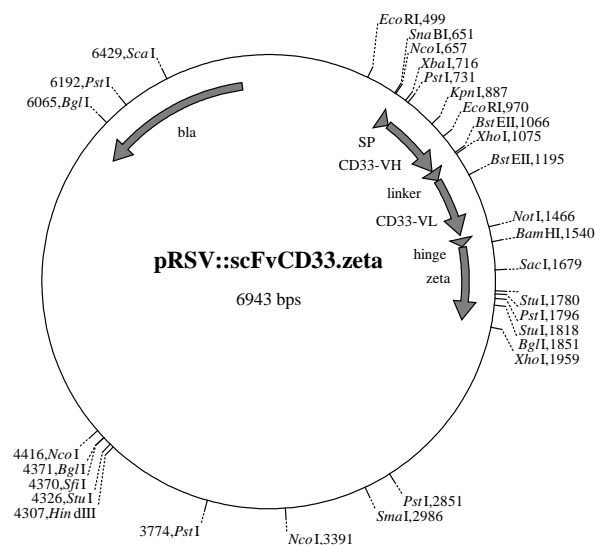
PCR-Produkt scFvCD33 mit Erkennungssequenzen *Sna*BI und *Xba*I (776 bp):



Das Insert 14.G2a wurde aus dem Vektor pRSV::14.G2a $\zeta$  über die Erkennungssequenzen *Bst*II (anschließende Klenow-Behandlung) und *Xba*I entfernt.



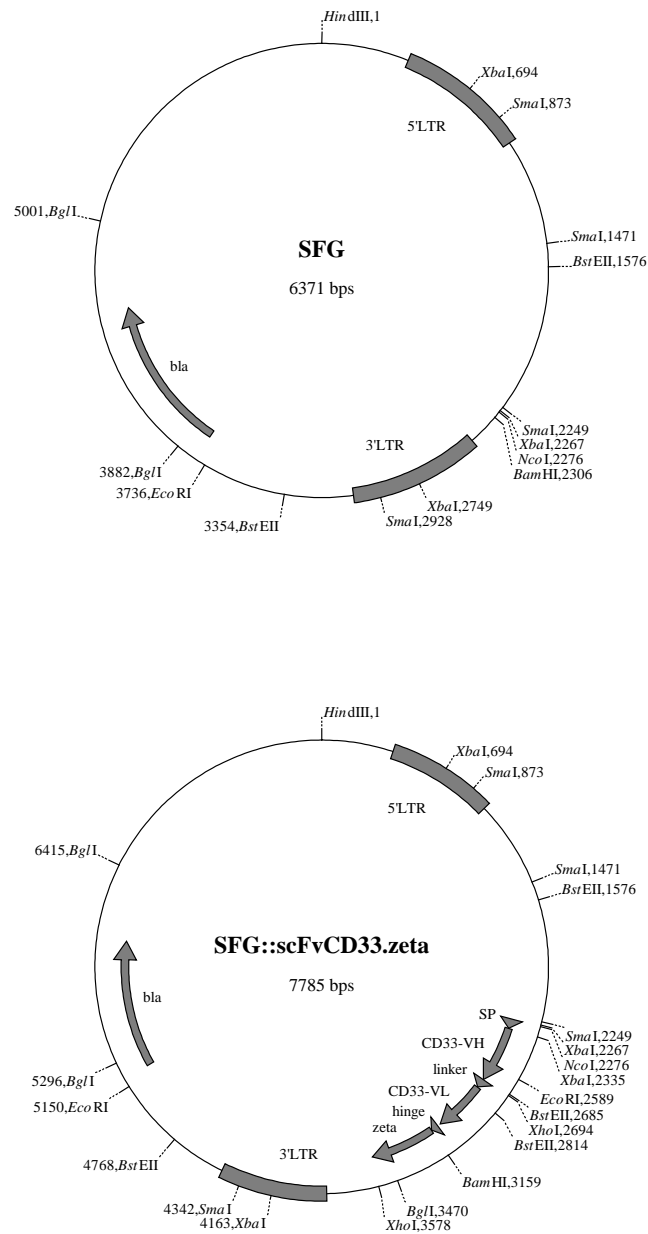
Nach Restriktion mit *Sna*BI und *Xba*I wurde die scFvCD33-Nukleotidsequenz in diesen Vektor inseriert. Der konstruierte Vektor wurde mit pRSV::scFvCD33 $\zeta$  bezeichnet (6943 bp).



*bla*: Ampicillin-Resistenz (schematisch)

## Retroviraler Vektor SFG::scFvCD33 $\zeta$

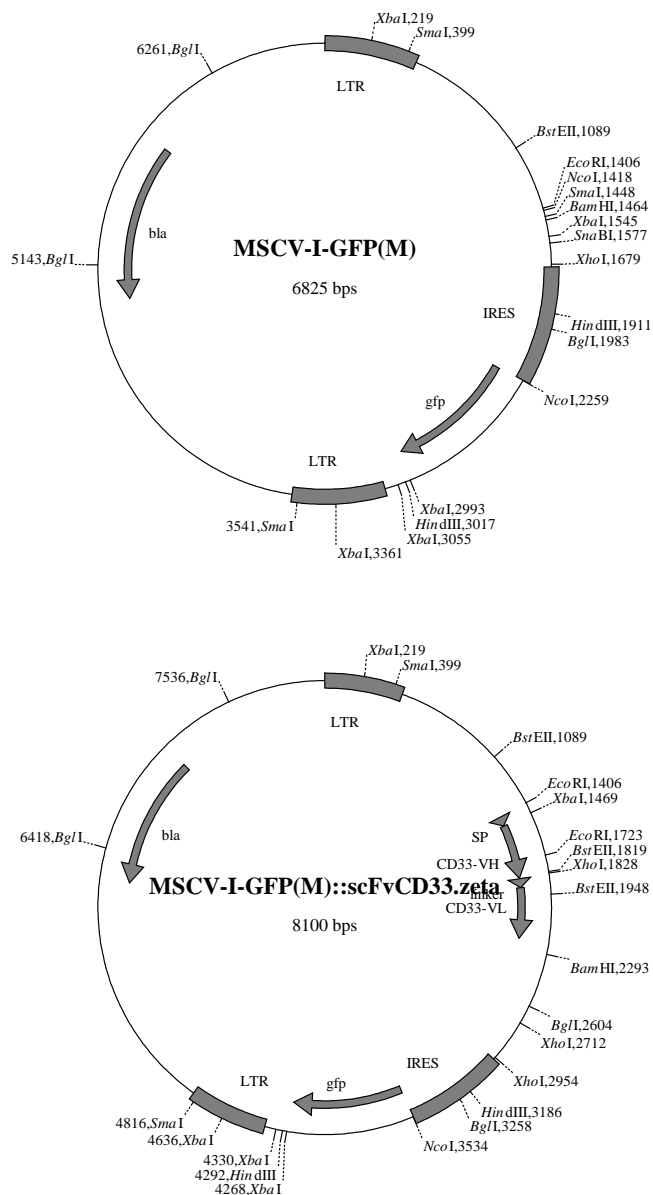
Das Insert scFvCD33 $\zeta$  (1444 bp) im Vektor pRSV::scFvCD33 $\zeta$  wurde nach Restriktion mit *Nco*I und *Hpa*I in den Vektor SFG inseriert, nachdem dieser mit *Bam*HI (anschließende Klenow-Behandlung) und *Nco*I restringiert worden war. Der konstruierte Vektor wurde mit SFG::scFvCD33 $\zeta$  (7785 bp) bezeichnet.



*bla*: Ampicillin-Resistenz (schematisch)

## Retroviraler Vektor MSCV-I-GFP(M)::scFvCD33 $\zeta$

Das Insert scFvCD33 $\zeta$  (1444 bp) im Vektor pRSV::scFvCD33 $\zeta$  wurde nach Restriktion mit *Nco*I (anschließende Klenow-Behandlung) und *Hpa*I in den Vektor MSCV-I-GFP(M) inseriert, nachdem dieser mit *Eco*RI (anschließende Klenow-Behandlung) und *Sna*BI restringiert worden war. Der konstruierte Vektor wurde mit MSCV-I-GFP(M)::scFvCD33 $\zeta$  (8100 bp) bezeichnet.









## Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozent
% /w/v)	Gewichtprozent
A	Adenin
aa	Aminosäure(n)
Abb.	Abbildung
ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
add.	additiv
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AML	akute myeloische Leukämie
Ap	Ampicillin
APC	antigenpräsentierende Zellen
B-CLL	chronische lymphatische Leukämie
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
ccc	„covalently closed circle“
CD	„cluster of differentiation“
CFU	„colony forming unit“
CIAP	„calf intestinal alkaline phosphatase“
cTCR	chimärer T-Zell-Rezeptor
CTL	zytotoxische T-Zellen
Cy5	Cyanin
DAG	Diacylglycerin
DC	dentritische Zelle(n)
DTT	Dithiothreitol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco´s modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	Doppelstrang („double strand“)
EBV	Epstein-Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.= und andere)
FACS	„fluorescenc activated cell sorting“
FCS	„fetal calf serum“
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
G	Guanin
GAM	„goat-anti-mouse“
GFP	„green fluorescent protein“
GO	Gentuzumab Ozogamizin (Mylotarg)
GVHD	„graft-versus-host“-Krankheit

IL	Interleukin
IMDM	„improved“ DMEM
INF	Interferon
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IRES	internes Ribosomeneintrittssignal
ITAM	„immunoreceptor tyrosine-based activation motifs“
K	Base Guanin oder Thymin
kb	Kilobase(n)
kD	Kilodalton
KMT	Knochenmarktransplantation
LAK	lymphokin-aktivierte Killerzelle(n)
LCL	lymphoblastoide Zelllinie(n)
L-Gln	L-Glutamin
LTR	„long terminal repeat“
M	molar; als Base: Adenin oder Cytosin
MACS	magnetsiche Zellseparation
NFAT	„nuclear factor of activated T-cells“
NK-Zellen	Natürliche Killerzelle(n)
NKT-Zellen	Natürliche Killer T-Lymphozyt(en)
oc	„open circle“
o. D.	optische Dichte
PBMC	mononukleäre periphere Blutzelle(n)
pbs	Primerbindungsstelle
PBS	„phosphat buffered saline“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinchlorophyllprotein
PKC	Proteinkinase C
PLC $\gamma$ 1	Phospholipase C- $\gamma$
PS	Polystyrol
R	Base Adenin oder Guanin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“
RT	Raumtemperatur
S	Base Guanin oder Cytosin
scFv	variables Leichkettenfragment
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SP	Signalpeptid
ss	Einzelstrang („single strand“)
T	Thymin
TAA	tumorassoziertes Antigen
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
Tet	Tetracyclin
TMB	Tetramethylbenzidin
TSR	Template Supression Reagent

Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	unit
ü/N	über Nacht
V <sub>H</sub>	variable schwere Kette
V <sub>L</sub>	variable leichte Kette
W	Base Adenin oder Thymin
Y	Base Cytosin oder Thymin
ZAP-70	ζ-assoziiertes Protein 70