



Biologie

**Funktionelle Untersuchung aktivierender NK-Zell Rezeptoren  
durch die Expression chimärer Rezeptoren in verschiedenen  
T-Zellpopulationen**

Inaugural Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

**Bianca Altvater**

aus Minden

**2005**



## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>5</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Antigenerkennung durch T-Lymphozyten .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2 Immuntherapie .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3 Chimäre Rezeptoren .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4 Chimäre Rezeptoren und Kostimulation .....</b>	<b>12</b>
<b>1.4.1 CD28 .....</b>	<b>13</b>
<b>1.4.2 2B4 .....</b>	<b>15</b>
<b>1.4.3 NKG2D (DAP10) .....</b>	<b>17</b>
<b>2 Zielsetzung.....</b>	<b>19</b>
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Konstruktion der chimären Rezeptoren mit NK-Zell-stimulatorischen Domänen.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1.1 Die chimären Rezeptoren 14.G2a-2B4 und 14.G2a-2B4-ζ.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.2 Die chimären Rezeptoren 14.G2a-DAP10 und 14.G2a-DAP10-ζ .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.3 Amplifikation der DNA-Sequenzen .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.4 Klonierung der DNA-Sequenzen in den retroviralen SFG-Vektor .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 Herstellung stabiler Produktionszelllinien.....</b>	<b>25</b>
<b>3.3 Transduktion und Kultivierung von PBMC .....</b>	<b>27</b>
<b>3.3.1 Immunphänotypisierung von PBMC .....</b>	<b>27</b>
<b>3.4 14.G2a-CD28-ζ transduzierte PBMC .....</b>	<b>28</b>
<b>3.4.1 Expression der chimären Rezeptoren und Transduktionseffizienz.....</b>	<b>29</b>
<b>3.4.2 Immunphänotypisierung der 14.G2a-CD28-ζ transduzierten PBMC .....</b>	<b>29</b>
<b>3.4.3 Funktionelle Untersuchungen der 14.G2a-CD28-ζ transduzierten PBMC ...</b>	<b>30</b>
<b>3.4.3.1 14.G2a-CD28-ζ transduzierte PBMC lysieren spezifisch G<sub>D2</sub>-positive Tumorzellen.....</b>	<b>30</b>
<b>3.4.3.2 14.G2a-CD28-ζ transduzierte PBMC sezernieren IFN-γ nach Koinkubation mit G<sub>D2</sub>-positiven Tumorzellen .....</b>	<b>32</b>

3.4.3.3	14.G2a-CD28- $\zeta$ transduzierte PBMC unterscheiden sich von 14.G2a- $\zeta$ transduzierten PBMC durch antigenspezifische Proliferation .....	34
<b>3.5</b>	<b>14.G2a-2B4 und 14-G2a-2B4-<math>\zeta</math> transduzierte PBMC .....</b>	<b>36</b>
<b>3.5.1</b>	<b>Expression der chimären Rezeptoren und Transduktionseffizienz.....</b>	<b>36</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Immunphänotypisierung der transduzierten PBMC.....</b>	<b>36</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Funktionelle Untersuchungen der 14.G2a-2B4 und 14.G2a-2B4-<math>\zeta</math> transduzierten PBMC .....</b>	<b>37</b>
3.5.3.1	14.G2a-2B4- $\zeta$ transduzierte PBMC lysieren spezifisch G <sub>D2</sub> -positive Tumorzellen . .....	37
3.5.3.2	14.G2a-2B4- $\zeta$ transduzierte PBMC sezernieren IFN- $\gamma$ nach Koinkubation mit G <sub>D2</sub> -positiven Tumorzellen .....	39
3.5.3.3	2B4-vermittelte Kostimulation befähigt 14.G2a-2B4- $\zeta$ transduzierte PBMC zur klonalen Proliferation.....	40
<b>3.6</b>	<b>14.G2a-DAP10 und 14-G2a-DAP10-<math>\zeta</math> transduzierte PBMC .....</b>	<b>41</b>
<b>3.6.1</b>	<b>Expression der chimären Rezeptoren und Transduktionseffizienz.....</b>	<b>41</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Immunphänotypisierung der 14.G2a-DAP10 und 14.G2a-DAP10-<math>\zeta</math> transduzierten PBMC .....</b>	<b>41</b>
<b>3.6.3</b>	<b>Funktionelle Untersuchungen der 14.G2a-DAP10 und 14.G2a-DAP10-<math>\zeta</math> transduzierten PBMC .....</b>	<b>43</b>
3.6.3.1	14.G2a-DAP10- $\zeta$ transduzierte PBMC lysieren G <sub>D2</sub> -positive, aber auch G <sub>D2</sub> -negative Tumorzellen.....	43
3.6.3.2	14.G2a-DAP10- $\zeta$ transduzierte PBMC produzieren unspezifisch IFN- $\gamma$ .....	45
<b>3.7</b>	<b>Transduktion und Kultivierung von EBV-CTL.....</b>	<b>46</b>
<b>3.7.1</b>	<b>Immunphänotypisierung von EBV-CTL .....</b>	<b>46</b>
<b>3.8</b>	<b>14.G2a-<math>\zeta</math>, 14.G2a-CD28-<math>\zeta</math>, 14.G2a-2B4 und 14.G2a-2B4-<math>\zeta</math> transduzierte EBV-CTL.....</b>	<b>47</b>
<b>3.8.1</b>	<b>Expression der chimären Rezeptoren und Transduktionseffizienz.....</b>	<b>47</b>
<b>3.8.2</b>	<b>Immunphänotypisierung der transduzierten EBV-CTL.....</b>	<b>48</b>
<b>3.8.3</b>	<b>Funktionelle Untersuchungen der transduzierten EBV-CTL.....</b>	<b>48</b>
3.8.3.1	EBV-CTL lysieren nach Transduktion mit 14.G2a- $\zeta$ , 14.G2a-CD28- $\zeta$ oder 14.G2a-2B4- $\zeta$ spezifisch G <sub>D2</sub> -positive Tumorzellen.....	48
3.8.3.2	EBV-CTL produzieren nach Transduktion mit 14.G2a- $\zeta$ , 14.G2a-CD28- $\zeta$ oder 14.G2a-2B4- $\zeta$ G <sub>D2</sub> -spezifisch IFN- $\zeta$ .....	50

3.8.3.3	CD28- oder 2B4-vermittelte Kostimulation reicht nicht aus, transduzierte EBV-CTL zur klonalen Proliferation anzuregen.....	52
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>53</b>
4.1	Transduktion .....	54
4.2	Phänotyp.....	54
4.3	Tumorspezifische Effektorfunktionen der transduzierten T-Zellen .....	56
4.3.1	Zytotoxizität der transduzierten T-Zellen .....	56
4.3.2	Zytokinsekretion der transduzierten T-Zellen .....	57
4.3.3	Restimulierbarkeit der transduzierten T-Zellen .....	59
4.4	Perspektiven.....	63
<b>5</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>64</b>
5.1	Molekularbiologie.....	64
5.1.1	Oligonukleotidprimer .....	64
5.1.2	RNA-Isolierung aus humanen Zellen .....	64
5.1.3	cDNA-Synthese .....	64
5.1.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	65
5.1.4.1	Standard-PCR.....	65
5.1.4.2	„Splicing by Overlap Extension“-PCR .....	65
5.1.4.3	Reinigung von PCR-Produkten .....	65
5.1.5	Elektrophoretische Trennung von DNA über Tris-Acetat-Gele.....	66
5.1.6	Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen .....	66
5.1.7	Enzymatische Modifikation von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	66
5.1.8	Ligation von DNA in einen Vektor .....	66
5.1.9	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	67
5.1.10	Isolierung von Plasmid-DNA.....	67
5.1.10.1	„Plasmid Mini“-Kit .....	67
5.1.10.2	„Endofree™ Plasmid Maxi“-Kit .....	67
5.1.11	Photometrische Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren .....	67
5.1.12	Sequenzierung.....	67
5.2	Mikrobiologie.....	68
5.2.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	68
5.2.2	Titerbestimmung von Bakterien in Flüssigkultur .....	68

<b>5.2.3</b>	<b>Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>-Zellen.....</b>	<b>68</b>
<b>5.3</b>	<b>Zellbiologie.....</b>	<b>68</b>
<b>5.3.1</b>	<b>Kultivierung von Säugetierzellen.....</b>	<b>68</b>
5.3.1.1	Passagieren von Suspensionszellen.....	69
5.3.1.2	Passagieren von adhärennten Zellen.....	69
5.3.1.3	Zellzahlbestimmung.....	69
5.3.1.4	Konservierung von Säugetierzellen.....	69
5.3.1.5	Auftauen von Säugetierzellen.....	70
5.3.1.6	Dichtegradienten-Zentrifugation von NH <sub>4</sub> -Heparin-Vollblut.....	70
5.3.1.7	Generierung und Kultivierung von PBMC.....	70
5.3.1.8	Generierung und Kultivierung von EBV-CTL.....	70
<b>5.3.2</b>	<b>Transfektion der Phoenix Zellen.....</b>	<b>71</b>
<b>5.3.3</b>	<b>Transfektion der 293T Zellen.....</b>	<b>71</b>
<b>5.3.4</b>	<b>Generierung stabiler PG13- und FLYRD18- Produktionszelllinien.....</b>	<b>72</b>
<b>5.3.5</b>	<b>Beschichtung von Zellkulturplatten mit Antikörpern.....</b>	<b>72</b>
<b>5.3.6</b>	<b>Retrovirale Transduktion humaner Zellen.....</b>	<b>72</b>
5.3.6.1	Beschichtung von 24-Multiwell-Platten mit RetroNectin®.....	72
5.3.6.2	Generierung von Virus-Überstand.....	73
5.3.6.3	Transduktion.....	73
<b>5.4</b>	<b>Durchflusszytometrische Analysen.....</b>	<b>73</b>
<b>5.4.1</b>	<b>Direkte und indirekte Färbung.....</b>	<b>73</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Intrazelluläre Färbung.....</b>	<b>74</b>
<b>5.5</b>	<b>Funktionelle Analysen.....</b>	<b>75</b>
<b>5.5.1</b>	<b>Expansionsanalysen.....</b>	<b>75</b>
<b>5.5.2</b>	<b>Radioaktiver Zytotoxizitäts-Assay.....</b>	<b>75</b>
<b>5.6</b>	<b>Zelllinien.....</b>	<b>76</b>
	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>77</b>
	<b>Referenzen.....</b>	<b>79</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>90</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>92</b>

## Zusammenfassung

Die genetische Modifikation von T-Zellen mit tumorspezifischen chimären Rezeptoren bietet die Möglichkeit, das zelluläre Immunsystem des Menschen auch zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen zu nutzen. Die klinische Anwendbarkeit so modifizierter Zellen wird aber durch eine rasche funktionelle Inaktivierung *in vivo* begrenzt. Eine der möglichen Ursachen für den beobachteten Funktionsverlust der transfundierten T-Zellen könnte das Fehlen adäquater Kostimulation sein. Ein Lösungsansatz besteht in der Konstruktion von chimären Rezeptoren, die zusätzlich zur signaltransduzierenden  $\zeta$ -Kette kostimulatorische Domänen enthalten, die den Bedarf an kostimulatorischen Signalen decken.

Die kostimulatorischen Anforderungen von T-Zellen unterscheiden sich je nach Phänotyp, Aktivierungszustand und Antigenerfahrung. Von antigenerfahrenen Zellpopulationen wie z.B. virusspezifischen zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (CTL) verspricht man sich eine verstärkte Anti-Tumor-Aktivität und langfristige Reaktivierbarkeit der Effektorzellen nach adoptivem Transfer. Für die Konstruktion der kombinierten chimären Rezeptoren sind daher aktivierende und kostimulatorische Rezeptoren von besonderem Interesse, die auf natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), aber auch auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert werden.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, die Bedeutung der CD28-vermittelten Kostimulation in antigenerfahrenen T-Lymphozyten am Beispiel von Epstein-Barr-Virus-spezifischen zytotoxischen T-Zellen (EBV-CTL) durch einen chimären Rezeptor mit integrierter CD28-Signaltransduktionsdomäne zu überprüfen. Anschließend wurden die beiden NK-Zell-Rezeptoren 2B4 und NKG2D/DAP10 auf ihr kostimulatorisches oder aktivierendes Potenzial in polyklonalen T-Zellen des peripheren Bluts (PBMC) und EBV-CTL untersucht. Dazu wurden chimäre Rezeptoren konstruiert, die entweder nur den jeweiligen signaltransduzierenden Rezeptoranteil von 2B4 und NKG2D/DAP10 enthalten oder zusätzlich den signaltransduzierenden Anteil der  $\zeta$ -Kette des T-Zell-Rezeptor-Komplexes (TCR) aufweisen. Die verschiedenen chimären Rezeptoren wurden dann in den beiden T-Zellpopulationen auf die Vermittlung von tumorspezifischen Effektorfunktionen untersucht.

Die verwendeten PBMC und EBV-CTL wurden durchflusszytometrisch auf ihren Immunphänotyp und die erzielten Transduktionseffizienzen untersucht. Durch die Optimierung der Transduktionsmethode konnten Effizienzen von bis zu 89% erreicht

werden. Phänotypisch zeichneten sich die untersuchten PBMC durch einen 50%-80% Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus, gefolgt vom Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit 20%-50%. Die EBV-CTL wurden zum Zeitpunkt der Versuche von einem überwiegenden Anteil an zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen dominiert. Die Transduktion der beiden T-Zellpopulationen mit den chimären Rezeptoren führte nur bei den 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten PBMC zu einer Veränderung des Immunphänotyps. Diese zeigten im Vergleich mit nicht-transduzierten PBMC einen stark erhöhten Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

In funktionellen Analysen der tumorspezifischen Effektorfunktionen zeigte sich, dass mit den chimären Rezeptoren 14.G2a-CD28- $\zeta$ , 14.G2a-2B4- $\zeta$  und 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierte PBMC und mit 14.G2a-CD28- $\zeta$  und 14.G2a-2B4- $\zeta$  transduzierte EBV-CTL antigenpositive Tumorzellen spezifisch lysieren können und nach einer Stimulation über den chimären Rezeptor IFN- $\gamma$  produzieren. Im Gegensatz dazu waren die 14.G2a-2B4 und 14.G2a-DAP10 transduzierten PBMC und die 14.G2a-2B4 transduzierten EBV-CTL nicht in der Lage, antigenpositive Tumorzellen zu lysieren oder nach Koinkubation mit diesen Zellen IFN- $\gamma$  zu produzieren. Damit wurde nachgewiesen, dass nur die chimären Rezeptoren, die auch den signaltransduzierenden Anteil der  $\zeta$ -Kette enthalten, in der Lage sind, T-Zellen zu Effektorfunktionen gegenüber antigenpositiven Tumorzellen zu befähigen. Der Einbau der stimulatorischen Domänen von CD28 oder 2B4 erwies sich dabei nicht als Nachteil. Unerwarteterweise zeigten aber die mit dem chimären Rezeptor 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten PBMC zusätzlich eine Lyse der antigennegativen Zelllinie K562.

Zur Untersuchung der kostimulatorischen Eigenschaften der chimären Rezeptoren 14.G2a-CD28- $\zeta$  und 14.G2a-2B4- $\zeta$  in PBMC und EBV-CTL wurde die Fähigkeit der transduzierten T-Zellen zur klonalen Proliferation nach Stimulation über den chimären Rezeptor überprüft. Wie erwartet ließen sich die zum Vergleich mit dem chimären Rezeptor 14.G2a- $\zeta$  transduzierten PBMC und EBV-CTL nicht durch eine Stimulation mit antigenpositiven Tumorzellen zur Proliferation anregen. Im Gegensatz dazu wurden die 14.G2a-CD28- $\zeta$  und die 14.G2a-2B4- $\zeta$  transduzierten PBMC durch die Koinkubation mit antigenpositiven Tumorzellen ausreichend stimuliert, um eine klonale Proliferation der T-Zellen auszulösen. Damit konnte gezeigt werden, dass neben CD28 auch der NK-Zell-Rezeptor 2B4 in polyklonalen T-Zellen kostimulatorisch wirken kann. Die Untersuchung der transduzierten EBV-CTL zeigte allerdings, dass eine Stimulation über 14.G2a-CD28- $\zeta$  oder 14.G2a-2B4- $\zeta$ , im Gegensatz zu einer Stimulation über den nativen TCR, nicht ausreichend ist, um eine antigenspezifische Proliferation der CTL anzuregen.

## 1 Einleitung

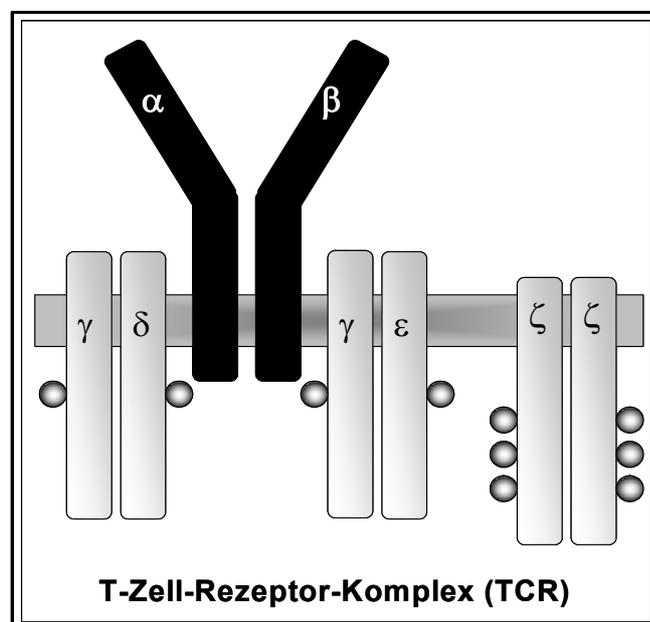
Zum Schutz vor Infektionen durch Viren, Bakterien oder Parasiten besitzt der Mensch ein sehr komplexes zelluläres Immunsystem, das auf den Reaktionen von weißen Blutzellen (Leukozyten) basiert. Obwohl man die verschiedenen Leukozytenarten in Zellen der angeborenen Immunität und der erworbenen (adaptiven) Immunität unterscheidet, sind sie voneinander abhängig und die Übergänge zwischen beiden fließend. Die Zellen der angeborenen Immunität, Granulozyten, Makrophagen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), bilden eine erste, aber unspezifische Abwehr, durch die viele Infektionen schon vor Ausbruch einer Krankheit bekämpft werden können. Besonders NK-Zellen können sehr schnell auf Infektionen reagieren und produzieren Zytokine und Chemokine, mit denen sie an der Steuerung des erworbenen Immunsystems beteiligt sind (Backstrom et al., 2004; Hamerman et al., 2005). Ihre Regulation erfolgt über ein Gleichgewicht von positiven und negativen Signalen, die über eine Reihe von inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren vermittelt werden. Während inhibitorische Rezeptoren konstitutiv exprimierte Liganden erkennen, kann die Expression von Liganden für die aktivierenden Rezeptoren durch Stress oder durch Transformation der Zelle zur Tumorzelle induziert oder verstärkt werden (Lanier, 2005).

Ist das angeborene Immunsystem jedoch nicht in der Lage, die Erreger zu kontrollieren, erfolgt die Aktivierung von adaptiven Immunzellen, den Lymphozyten. Man kann zwei Hauptgruppen von Lymphozyten unterscheiden: die im Knochenmark entstandenen und herangereiften B-Zellen und die ebenfalls im Knochenmark entstandenen, aber im Thymus herangereiften T-Zellen. Beide können eine große Vielfalt von Krankheitserregern spezifisch über die variablen Ketten ihres Antigen-Rezeptors erkennen. Während B-Zellen nach Aktivierung zu Antikörper produzierenden Plasmazellen differenzieren, üben aktivierte T-Zellen zytotoxische oder immunregulatorische Funktionen aus und können in weitere Subpopulationen unterteilt werden. CD8<sup>+</sup> T-Zellen stellen den Hauptteil aller zytotoxischen Lymphozyten, sorgen für die gezielte Zerstörung erkrankter Zellen und rekrutieren über Zytokine wie Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) weitere Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die früher auch als T-Helferzellen bezeichnet wurden, erfüllen durch die Sekretion von stimulierenden oder inhibierenden Zytokinen hauptsächlich immunregulatorische Funktionen. Einige T-Lymphozyten können nach Antigenkontakt zu langlebigen und leicht

reaktivierbaren Gedächtniszellen differenzieren, dadurch wird eine dauerhafte Immunität gewährleistet (Janeway 2002).

## 1.1 Antigenerkennung durch T-Lymphozyten

Die spezifische Antigenerkennung durch T-Lymphozyten erfolgt über ihren T-Zell-Rezeptor-Komplex (TCR) und ist abhängig von der Präsentation der Peptidantigene über Haupthistokompatibilitäts (MHC)-Moleküle. Dafür werden zelluläre Stoffwechselproteine oder exogen von B-Zellen aufgenommene Proteine im Proteasom zu kurzen Peptidfragmenten abgebaut und gebunden an MHC-Molekülen der Klasse I (Stoffwechselproteine) oder II (exogene Proteine) auf der Zelloberfläche präsentiert. So werden im Rahmen einer Infektion auch die Proteine des Erregers präsentiert und dem Immunsystem zugänglich gemacht. Verantwortlich für diese Antigenerkennung durch den TCR ist ein Heterodimer aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette, jeweils bestehend aus einer aminoterminalen, hypervariablen Antigenbindungsdomäne und einer carboxyterminalen, konstanten Transmembrandomäne. Die Signaltransduktion erfolgt anschließend über den nicht-kovalent gebundenen CD3-Komplex. Wie in Abbildung 1.1 zu erkennen ist, setzt sich dieser aus insgesamt sechs Signaltransduktionsmolekülen zusammen, einem CD3 $\zeta$  Homodimer, sowie jeweils einem CD3 $\epsilon\gamma$ - und CD3 $\epsilon\delta$  Heterodimer (Cantrell, 1996).



**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung des T-Zell-Rezeptor-Komplexes (TCR)  $\alpha$ = TCR $\alpha$ -Kette,  $\beta$ = TCR $\beta$ -Kette,  $\gamma$ = CD3 $\gamma$ -Kette,  $\delta$ = CD3 $\delta$ -Kette,  $\epsilon$ = CD3 $\epsilon$ -Kette  $\zeta$ = CD3 $\zeta$ -Kette.

Die Moleküle des CD3-Komplexes enthalten in ihrer zytoplasmatischen Region so genannte ITAM („immunoreceptor tyrosine based activation motif“). Die  $\gamma$ -,  $\epsilon$ - und  $\delta$ -Kette enthalten jeweils ein ITAM, während jede  $\zeta$ -Kette drei ITAM enthält. Nach Stimulierung des TCR werden die Tyrosine in diesen Motiven über die Proteintyrosinkinasen (PTK) Lck und Fyn phosphoryliert. Daran bindet die zytosolische Proteintyrosinkinase ZAP-70 ( $\zeta$ -assoziiertes Protein 70) und wird ebenfalls über Lck vermittelte Phosphorylierung aktiviert. Die aktivierte Kinase ZAP-70 initiiert unterschiedliche Signalwege. Zum einen wird über die GTPase Ras eine Reihe von Kinasen aktiviert (darunter Raf-1 und MAP-Kinase), die für die Bildung des Transkriptionsfaktors AP-1 (Aktivator-Protein 1) verantwortlich sind. Zum anderen wird über die Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) eine Signalkaskade angestoßen, die zur Bildung der Transkriptionsfaktoren NFAT („nuclear factor of activated T cells“) und NF $\kappa$ B („nuclear factor  $\kappa$ B“) führt. Zusammen aktivieren die drei Transkriptionsfaktoren dann die Transkription spezifischer Gene, die Effektorfunktionen der T-Zelle wie Zytokinsekretion und Zytolyse der antigenpositiven Zelle auslösen (Nel, 2002).

## 1.2 Immuntherapie

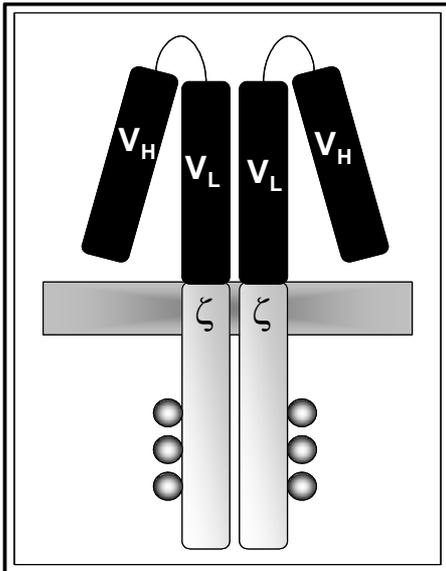
Schon seit vielen Jahren wird versucht, das Immunsystem auch zur Bekämpfung von Krebserkrankungen zu nutzen. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass einige Tumorarten Immunreaktionen auslösen, die meisten jedoch weichen einer Immunantwort aus. Zum Teil werden die Tumorzellen vom Immunsystem nicht als fremd erkannt, da sie keine körperfremden Antigene produzieren. Es gibt aber auch aktive Mechanismen der Tumorzellen um einer Immunantwort zu entgehen, z.B. eine verminderte oder fehlende Expression von für das Immunsystem notwendigen Oberflächenmolekülen. Dies betrifft vor allem kostimulatorische Liganden und MHC-Proteine der Klasse I (Baxevanis und Papamichail, 2004).

Mittlerweile gibt es einige vielversprechende Ansätze zur Immuntherapie von Krebserkrankungen. Die Behandlung mit monoklonalen Antikörpern, z.B. mit dem gegen den B-Zell-Marker CD20 gerichteten Antikörper Rituximab, der unter anderem zur Behandlung der chronisch lymphatischen Leukämie (B-CLL) eingesetzt wird, lieferte einige Erfolge. Leider ist die von den Antikörpern ausgelöste Immunantwort in der Regel nicht stark genug, die Tumorzellen in ausreichendem Maße zu beseitigen und einen langfristigen Therapieerfolg zu gewährleisten (McLaughlin et al., 1998; Byrd et al., 2001).

Bei der zellulären Immuntherapie wird versucht, die Fähigkeit zur Erkennung und Zerstörung von Tumorzellen durch Immunzellen zu verstärken oder zu vermitteln. Bei der adoptiven T-Zell-Therapie werden Immunzellen *in vitro* expandiert, stimuliert oder gentechnisch verändert, um dann nach Retransfusion ihre verstärkten oder erworbenen tumorspezifischen Effektorfunktionen *in vivo* auszuüben. Eine Möglichkeit der adoptiven T-Zell-Therapie ist die Behandlung von virusassoziierten Tumorerkrankungen mit *in vitro* generierten virusspezifischen, zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL). So wird z.B. das Epstein-Barr-Virus (EBV) mit der Entstehung verschiedener Tumoren wie dem Burkitt-Lymphom oder dem Hodgkin-Lymphom in Verbindung gebracht (Rickinson et al., 1996). Doch obwohl erste klinische Erfolge bei der Therapie von Hodgkin-Tumoren mit EBV-CTL erzielt werden konnten (Bollard et al., 2004; Gottschalk et al., 2005), bietet die Behandlung mit virusspezifischen CTL nur begrenzte Anwendungsmöglichkeiten, da der Anteil an derart strikt virusassoziierten Tumorerkrankungen eher gering ist. Neben der Verwendung solcher natürlich vorkommenden tumorspezifischen Zellen bietet die genetische Veränderung von Immunzellen die Möglichkeit, T-Zellen unabhängig von ihrer natürlichen Spezifität zur Erkennung eines Tumorantigens zu befähigen. Dazu wurden die T-Zellen mit so genannten chimären Rezeptoren ausgestattet (Eshhar et al., 1993).

### 1.3 Chimäre Rezeptoren

Chimäre Rezeptoren kombinieren die MHC-unabhängige Spezifität eines Antikörpers mit den potenten Effektorfunktionen von T-Zellen. Die einzige Voraussetzung ist das Vorhandensein eines tumorspezifischen monoklonalen Antikörpers. Die Funktionalität des chimären Rezeptors beruht auf der Fusion eines tumorantigenspezifischen Einzelkettenantikörpers („single chain variable fragment“, scFv) mit der signaltransduzierenden  $\zeta$ -Untereinheit des CD3-Komplexes (Eshhar et al., 1993). Dazu werden die variable leichte Kette ( $V_L$ ) und die variable schwere Kette ( $V_H$ ) des Antikörpers über einen Linker miteinander verbunden. Nach einer humanen Immunglobulin-Domäne (Hinge), die den Abstand zur Zellmembran und die Beweglichkeit der antigenbindenden Ketten erhöht, folgen die Transmembrandomäne und die zytoplasmatische Signaltransduktionsdomäne der  $\zeta$ -Untereinheit des CD3-Komplexes, dargestellt in Abbildung 1.2 (Irving et al., 1991; Letourneur und Klausner, 1991; Moritz und Groner, 1995).



**Abb. 1.2: Schematische Darstellung des chimären Rezeptors (chRec).**  $\zeta$ = CD3 $\zeta$ -Kette,  $V_H$ = variable schwere Kette,  $V_L$ = variable leichte Kette.

Der chimäre Rezeptor enthält insgesamt sechs signaltransduzierende ITAM. Nach der Stimulation des chimären Rezeptors werden wie beim TCR die Tyrosine dieser Motive über Proteintyrosinkinasen phosphoryliert. Über die Kinase ZAP-70 werden die Signalkaskaden initiiert, die zur Bildung der Transkriptionsfaktoren AP-1, NFAT und NF $\kappa$ B führen und darüber die Transkription von Genen aktivieren, die für die Effektorfunktionen benötigt werden (Eshhar et al., 1993; Hwu et al., 1993).

Mittlerweile gibt es eine ganze Reihe von chimären Rezeptoren, die unterschiedliche Tumorantigene erkennen, darunter auch solche für Kohlenhydrat- oder Lipid-basierte Antigene: z.B. HER-2/neu (Stancovski et al., 1993), Folat-bindendes Protein (Hwu et al., 1995), Nierentumor-assoziiertes Antigen (Weijtens et al., 1996), CD19 (Nicholson et al., 1997), CD30 (Hombach et al., 1998), CD33 (Finney et al., 1998), TAG-72 (McGuinness et al., 1999), PSMA (Gong et al., 1999), epitheliales Glykoprotein 2 (Ren-Heidenreich et al., 2000), CEA (Hombach et al., 2000), G<sub>D3</sub> (Yun et al., 2000) und G<sub>D2</sub> (Rossig et al., 2001). Außerdem wurden chimäre Rezeptoren gegen HIV (Roberts et al., 1994, Hege et al., 1996, Bitton et al., 1998) und gegen Antigene, die bei Autoimmunerkrankungen involviert sind, getestet (Annenkov et al., 2000).

Obwohl mit chimären Rezeptoren transduzierte T-Zellen nach adoptivem Transfer in Maus-Tumor-Modellen signifikante Anti-Tumor-Aktivität zeigten (Hwu et al., 1995; Moritz et al., 1994), blieben klinische Studien erfolglos. So wurden die adoptiv transferierten T-Zellen in einer Studie mit einem gegen HIV gerichteten chimären Rezeptor zwar gut vertragen, doch konnte bei keinem der behandelten Patienten ein positiver Therapieeffekt beobachtet werden. Die modifizierten T-Zellen verloren ihre Funktionalität und waren nicht in der Lage, *in vivo* zu persistieren (Walker et al., 2000).

Durch die Verwendung alternativer Vektoren mit verminderter Immunogenität, Kotransfusion antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und verbesserten Kulturbedingungen konnte die Lebensdauer der transfundierten T-Zellen *in vivo* erheblich verlängert werden. Trotzdem war die Fähigkeit zur Zielzelllyse und Zytokinsekretion nach adoptivem Transfer weitgehend aufgehoben (Mitsuyasu et al., 2000). Da die genetisch modifizierten T-Zellen *in vitro* eine effiziente Lyse von HIV-infizierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigten (Roberts et al., 1994), stellte sich die Frage, warum die durch den chimären Rezeptor ausgelöste Signalkaskade nicht in der Lage war, eine komplette Immunantwort der T-Zellen *in vivo* auszulösen. Obwohl ausführliche Daten über die molekularen Mechanismen und Defizite der chRec-vermittelten Signaltransduktion noch fehlen, ist bekannt, dass *in vitro* über den chimären Rezeptor stimulierte T-Zellen nicht fähig sind zu proliferieren (Rossig et al., 2001). Studien mit transgenen Mäusen zeigten darüber hinaus, dass der Aktivierungsstatus der T-Zelle für das Auslösen der Effektorfunktionen über den chimären Rezeptor entscheidend ist. Eine Stimulation über den chimären Rezeptor alleine ist nicht ausreichend, um naive T-Zellen zu Effektorfunktionen einschließlich der klonalen Proliferation anzuregen. Nach einer vorhergehenden Aktivierung über ihren nativen TCR führt jedoch auch eine Stimulation über den chimären Rezeptor zum Auslösen von Zielzelllyse und Zytokinsekretion (Brocker und Karjalainen, 1995). Im Vergleich zum nativen TCR wird über chimäre Rezeptoren also offensichtlich eine defizitäre Aktivierungsantwort ohne antigenspezifische Proliferation ausgelöst, die den beobachteten Funktionsverlust der transfundierten T-Zellen erklärt.

#### **1.4 Chimäre Rezeptoren und Kostimulation**

Eine der möglichen Ursachen für die unzureichende Aktivierbarkeit der T-Zellen über den chimären Rezeptor könnte das Fehlen adäquater Kostimulation sein. So benötigen T-Zellen zum Auslösen einer vollständigen Effektorfunktion zusätzlich zur Stimulation durch den TCR noch weitere Signale. Diese erhalten sie durch kostimulatorische Rezeptoren nach Bindung an deren spezifische Liganden auf der antigenpräsentierenden Zelle (Acuto und Michel, 2003). Bislang am besten charakterisiert ist der kostimulatorische Rezeptor CD28. Doch wurden mittlerweile noch andere Rezeptoren entdeckt, die in der Lage sind, ein kostimulatorisches Signal zu transduzieren. Dazu gehören neben weiteren Moleküle der CD28 Familie wie z.B. ICOS („inducible costimulator“) auch Moleküle der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TFNR)-Familie wie 4-1BB, OX40 und CD27 (Croft et al., 2003; Bertram et al., 2004).

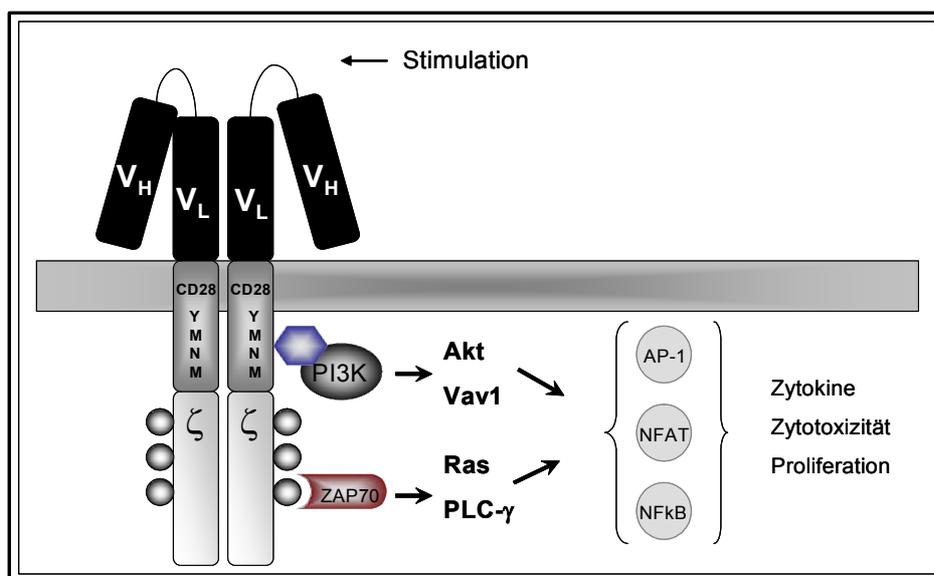
Die T-Zelle scheint im Rahmen der Immunantwort eine Vielzahl von positiven und negativen Signalen zu erhalten, deren Summe ihr Schicksal bestimmt. Dabei haben die T-Zellen je nach Phänotyp, Aktivierungszustand und Antigenerfahrung unterschiedliche kostimulatorische Anforderungen. So scheinen antigenerfahrene T-Zellen von der CD28-vermittelten Kostimulation unabhängig zu sein und werden eher von anderen kostimulatorischen Molekülen beeinflusst (Deeths und Mescher, 1999). Bislang wurden im Rahmen der adoptiven T-Zelltherapie überwiegend unspezifisch stimulierte polyklonale T-Lymphozyten verwendet, die einen hohen Anteil antigenunerfahrener T-Zellen enthalten. Dabei scheint die Funktion der transfundierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Bereitstellung von IFN- $\gamma$  und IL-2 zu bestehen, während den CD8<sup>+</sup> T-Zellen die Hauptrolle bei der Ausübung der tumorspezifischen Effektorfunktionen zukommt (Gyobu et al., 2004). Durch die Verwendung von alternativen Zellpopulationen wie z.B. virusspezifischen zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (CTL) erhofft man sich eine verstärkte Anti-Tumor-Aktivität und langfristige Reaktivierbarkeit der Effektorzellen nach adoptivem Transfer (Rossig et al., 2002; Cooper et al., 2005). Von besonderem Interesse für die Modulation des Aktivitätszustandes antigenerfahrener CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind aktivierende und kostimulatorische Rezeptoren die bei Viruserkrankungen eine große Rolle spielen. Darunter der Rezeptorkomplex NKG2D/DAP10 und der Rezeptor 2B4, die zunächst auf NK-Zellen identifiziert wurden, jedoch auch auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert werden (Groh et al., 2001; Perritt et al., 1999).

#### 1.4.1 CD28

Der CD28-Rezeptor erfüllt eine wichtige Funktion bei der Aktivierung naiver T-Zellen und wird auf allen CD4<sup>+</sup> sowie auf etwa der Hälfte der CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert. Fehlende CD28-Kostimulation führt zu einer reduzierten Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1, NFAT und NF $\kappa$ B, die T-Zellen sind anfälliger für Apoptose und proliferieren weniger (Acuto et al., 2003). Nach Bindung von CD28 an seine Liganden der B7-Familie (CD80/B7-1 und CD86/B7-2) wird das zytoplasmatische Src-Homologie 2 Protein (SH2)-Bindungsmotiv YMNM (Y=Tyrosin, M=Methionin und N=Asparagin) durch die Proteintyrosinkinasen Fyn und Lck phosphoryliert und kann dadurch die regulatorische Untereinheit (p85) der Phosphatidylinositol 3 (PI3)-Kinase binden. Durch die PI3-Kinase werden weitere intrazelluläre Signalmoleküle rekrutiert, darunter die Serin/Threonin-Kinase Akt und der Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor Vav1. Über weitere, noch nicht im Detail bekannte Schritte erfolgt schließlich eine Verstärkung der TCR-vermittelten

Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1, NFAT und NF $\kappa$ B (Acuto und Michel, 2003).

Tumorzellen haben nur ein sehr eingeschränktes Expressionsmuster von kostimulatorischen Liganden wie der B7-Familie, deshalb erhalten transduzierte T-Zellen nach Bindung des chimären Rezeptors an das Tumorantigen in der Regel keine kostimulatorischen Signale. Transfiziert man aber Tumorzellen mit CD80 (B7.1) oder sorgt für eine Quervernetzung des CD28-Rezeptors kommt es zu einer Verstärkung der tumorspezifischen IFN- $\gamma$  und IL-2-Sekretion, sowie zur Proliferation der chRec-transduzierten T-Zellen (Beecham et al., 2000; Hombach et al., 2001). Diese Beobachtungen führten zur Konstruktion von chimären Rezeptoren, die die signaltransduzierenden Rezeptoranteile des CD28-Rezeptors mit der  $\zeta$ -Kette des T-Zell-Rezeptor-Komplexes kombinieren (Abb. 1.3). So kann nach einer Stimulation des chimären Rezeptors neben der aktivierenden Signalkaskade über die  $\zeta$ -Ketten-abhängige Tyrosinkinase ZAP-70 auch die kostimulatorische Signalkaskade über die PI3-Kinase initiiert werden. Stimulation über diese kombinierten Rezeptoren, führte *in vitro*, aber auch im Mausmodell zu einer bis zu zwanzigfach gesteigerten IL-2-Produktion und hohen Proliferationsraten bei weiterhin effizienter Zielzellyse (Finney et al., 1998; Geiger et al., 2001; Hombach et al., 2001; Maher et al., 2002; Haynes et al., 2002; Friedmann-Morvinski et al., 2005).



**Abb. 1.3: Chimärer Rezeptor mit integrierter kostimulatorischer Signaltransduktionsdomäne und vereinfachter Darstellung der Signaltransduktionswege.**  $\zeta$ = CD3 $\zeta$ -Kette,  $V_H$ = variable schwere Kette,  $V_L$ = variable leichte Kette Y= Tyrosin M= Methionin N= Asparagin.

Beim Design kostimulatorischer chimärer Rezeptoren ist zu berücksichtigen, dass die antigene Erfahrung und der Phänotyp der T-Zelle die Abhängigkeit von CD28-vermittelter Kostimulation bestimmen. Während die Bedeutung der CD28-Kostimulation für die primäre Aktivierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen unumstritten ist, liegen über ihre Rolle für die Stimulation CD8<sup>+</sup> T-Zellen hingegen nur unzureichende Erkenntnisse vor. So scheint CD28 bei der Induktion von CD8<sup>+</sup> CTL *in vivo* und bei der zytolytischen Funktion vollständig aktivierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen keine entscheidende Rolle zu spielen (Shahinian et al., 1993). Auch eine Quervernetzung des CD28-Rezeptors hat keinen Einfluss auf aufgereinigte CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Deeths und Mescher, 1997; Laux et al., 2000).

#### 1.4.2 2B4

Der NK-Zell Rezeptor 2B4 (CD244) gehört als Mitglied der CD2-Subfamilie zur Immunglobulin Superfamilie und wird auf allen humanen NK-Zellen, den meisten TCR $\gamma\delta$  T-Zellen, Monozyten, basophilen Granulozyten und einem Teil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert (Boles et al., 1999; Nakajima et al., 1999). Als Ligand wurde das ebenfalls zur CD2-Subfamilie gehörende, über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) in der Membran verankerte Protein CD48 identifiziert, das auf Lymphozyten und Monozyten konstitutiv exprimiert wird (Brown et al., 1998; Kato et al., 1992). Die genauen Mechanismen der Signaltransduktion des 2B4-Rezeptors nach Bindung an seinen Liganden CD48 sind trotz der Identifikation von einigen Proteinen der Signalkaskade zum größten Teil noch unbekannt. 2B4 scheint in den Glykolipid-reichen Bereichen der Zellmembran, den „Lipid-Rafts“, über ein Dicystein-Motiv der Transmembrandomäne konstitutiv an LAT („linker for activated T cells“) gebunden vorzuliegen. Die Bindung von CD48 führt zur Phosphorylierung der vier im zytoplasmatischen Bereich enthaltenen Tyrosine innerhalb der ITSM („immunoreceptor tyrosine-based switch motifs“) [TxYxxV/I] mit anschließender Rekrutierung der PI3-Kinase und des SH2-Region enthaltenden Adapter-Proteins SAP („signaling lymphocytic activation molecule-associated protein“) (Boles et al., 1999; Tangye et al., 1999; Bottino et al., 2000; Chuang et al., 2001; Aoukaty und Tan, 2002). Weitere Moleküle, die an den phosphorylierten 2B4-Rezeptor binden können, sind die SH2-Region enthaltenden Phosphatasen 1 und 2 (SHP-1/2), die SH2-Region enthaltende Inositol-Phosphatase (SHIP) und die Src-Kinasen FynT und Csk (Tangye et al., 1999; Parolini et al., 2000; Eissmann et al., 2005). Während die Signaltransduktion über die PI3-Kinase, SAP und FynT aktivierend oder kostimulatorisch wirkt, sind SHP-1, SHP-2, SHIP und Csk eher aus inhibitorischen Signalwegen bekannt (s. Abb. 1.4)

(Aoukaty und Tan, 2002; Eissmann et al., 2005). Passend dazu wurde 2B4 zunächst als aktivierender Rezeptor beschrieben, der bei NK-Zellen Zytotoxizität und Interferon- $\gamma$  Produktion induziert (Chuang et al., 2000; Nakajima et al., 1999). In weiteren Untersuchungen zeigte sich dann aber, dass die zelluläre Antwort auf eine Stimulation des 2B4-Rezeptor von Zelltyp und Reifungsgrad abhängig ist. So kann 2B4 neben aktivierenden auch kostimulatorische Signale transduzieren und während früher Stadien der NK-Zell Entwicklung sogar inhibitorisch wirken (Sivori et al., 2000; Sivori et al., 2002). Obwohl für 2B4 in T-Zellen bislang keine aktivierende Funktion nachgewiesen werden konnte, wurde bei Versuchen mit zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Maus eine Verstärkung der antigenspezifischen Zytotoxizität und Zytokinsekretion durch 2B4 beobachtet (Nakajima et al., 1999; Lee et al., 2003).

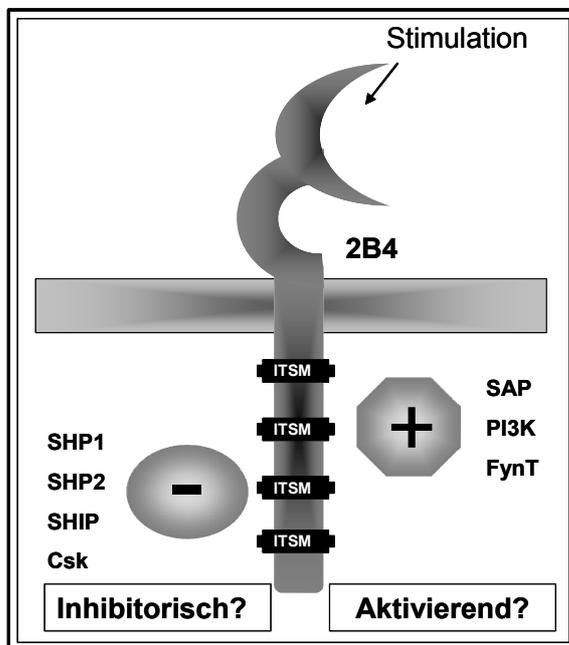


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des 2B4-Rezeptors und möglicher Signaltransduktionsmoleküle.

Mehrere Untersuchungen deuten außerdem daraufhin, dass 2B4 eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Viruserkrankungen einnimmt. So erhöhte sich in HIV-positiven Patienten der Anteil an 2B4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit dem Fortschreiten der Erkrankung und bei an Cytomegalie-Virus (CMV)-erkrankten Patienten konnte 2B4 auch auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden (Peritt et al., 1999; Zaunders et al., 2004). Außerdem wird nach EBV-Infektionen der 2B4-Ligand CD48 auf B-Zellen hochreguliert, und das Fehlen des Adapter-Proteins SAP führt zur Krankheit XLP („X-linked lymphoproliferative syndrome“), die durch eine fehlende Immunkontrolle von EBV-Infektionen charakterisiert ist (Yokoyama et al., 1991; Engel et al., 2003).

### 1.4.3 NKG2D (DAP10)

Der aktivierende NK-Zell Rezeptor NKG2D gehört zur C-Typ Lektin Superfamilie und wird auf allen NK-Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen und auf TCR $\gamma\delta$  T-Zellen konstitutiv exprimiert (Verneris et al., 2004; Raulet, 2003). NKG2D ist in der Lage, verschiedene Liganden zu binden, von denen bislang sechs identifiziert wurden. Dazu gehören die MHC-Klasse-I-ähnlichen Moleküle MICA und MICB, sowie vier Mitglieder der UL-16 Protein bindenden Familie ULBP1-4. Diese Liganden werden normalerweise nicht oder nur in geringem Maße von gesundem Gewebe exprimiert, können aber durch Stress, Infektionen oder in Tumorzellen induziert werden (Groh et al., 1996; Groh et al., 1999; Cosman et al., 2001; Pende et al., 2002; Chalupny et al., 2003). Dadurch können NK-Zellen zelluläre Veränderungen registrieren, die durch ein Pathogen erzeugt werden oder Veränderungen die durch die Transformation von Zellen zu Tumorzellen hervorgerufen werden, ohne dabei eine Spezifität für ein bestimmtes Antigen zu besitzen. NKG2D kann dabei als aktivierender, aber auch als kostimulatorischer Rezeptor agieren (Vivier et al., 2002). Untersuchungen zur Funktion von NKG2D in T-Zellen lassen darauf schließen, dass der Rezeptor in CD8<sup>+</sup> T-Zellen nur ein kostimulatorisches Signal überträgt, die Aktivierung aber weiterhin TCR-abhängig erfolgt (Groh et al., 2001; Maasho et al., 2005). Da NKG2D keine eigene zytoplasmatische Signaltransduktionsdomäne besitzt, bindet der Rezeptor das Adapter-Signalprotein DAP10 über Wechselwirkungen zwischen positiv und negativ geladenen Aminosäuren der Transmembranregionen. Wie in Abbildung 1.4 zu erkennen ist, lagern sich dabei jeweils zwei DAP10-Homodimere mit einem NKG2D-Homodimer zusammen (Garrity et al., 2005).

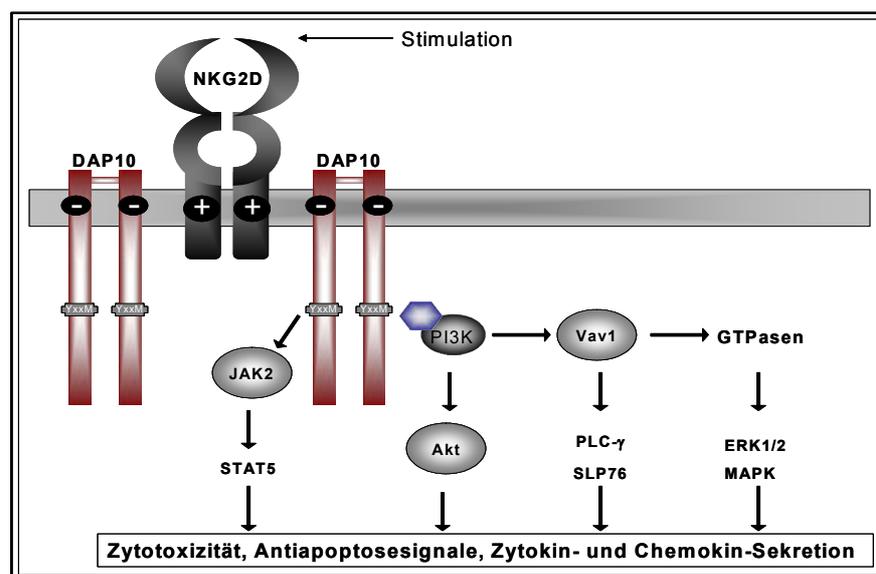


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des NKG2D/DAP10 Rezeptorkomplexes und der Signaltransduktion nach Stimulation.

Die Stimulation von NKG2D initiiert eine Signalkaskade, die letztendlich zur Zytotoxizität und Zytokinsekretion durch die NK-Zelle führt, das Wissen über die einzelnen intrazellulären Schritte ist jedoch noch unvollständig. Bekannt ist, dass nach Phosphorylierung des Tyrosin-basierten SH2-Bindungsmotiv „YINM“ (Y=Tyrosin, I=Isoleucin, N=Asparagin und M=Methionin) in der zytoplasmatischen Domäne von DAP10 die PI3-Kinase über ihre regulatorische Untereinheit p85 rekrutiert wird, gefolgt von der antiapoptotisch wirkenden Serin/Threonin-Kinase Akt. Nach Aktivierung von Vav1 werden über GTPasen der Rho-Familie die Kinasen ERK1/2 („extracellular-signal-regulated-kinase“) und MAPK („Mitogen-activated-protein-kinase“) an der Signaltransduktion beteiligt. Die Aktivierung der Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) und des SH2-Region enthaltende Leukozyten Phosphoprotein 76 (SLP76) ist ebenfalls Vav1 reguliert. Ein zweiter Signalweg verläuft unabhängig von der PI3-Kinase über die Janus-Kinase 2 (JAK2) und den Transkriptionsfaktor STAT5 („signal transducer and activator of transcription“) (Wu et al., 1999; Sutherland et al., 2002; Billadeau et al., 2003; Cella et al., 2004).

## 2 Zielsetzung

Durch die genetische Modifikation mit chimären Rezeptoren werden T-Lymphozyten dazu befähigt, Tumorzellen unabhängig von ihrer natürlichen Spezifität zu erkennen und zu zerstören. Die klinische Anwendbarkeit durch adoptiven Transfer von *in vitro* generierten chRec-transduzierten T-Zellen wird jedoch begrenzt durch die funktionelle Inaktivierung der Zellen *in vivo*. Eine der möglichen Ursachen, das Fehlen von kostimulatorischen Liganden auf Tumorzellen, kann durch die Integration von kostimulatorischen Signaltransduktionsdomänen in den chimären Rezeptor ersetzt werden. Dabei muss jedoch der Phänotyp, Aktivierungszustand und die Antigenerfahrung der verwendeten T-Zellen berücksichtigt werden, durch die sich unterschiedliche kostimulatorische Anforderungen ergeben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst, die Bedeutung der CD28-vermittelten Kostimulation in antigenerfahrenen T-Lymphozyten durch einen kombinierten chimären Rezeptor mit integrierter CD28-Signaltransduktionsdomäne am Beispiel von EBV-CTL zu überprüfen. Anschließend sollten die beiden NK-Zell-Rezeptoren 2B4 und NKG2D/DAP10 auf ihr kostimulatorisches oder aktivierendes Potenzial in T-Zellen untersucht werden. Dazu sollten chimäre Rezeptoren konstruiert werden, die entweder nur aus dem tumorantigenspezifischen Einzelkettenantikörper und dem jeweiligen signaltransduzierenden Rezeptoranteil von 2B4 und NKG2D/DAP10 bestehen oder zusätzlich dazu noch den signaltransduzierenden Anteil der  $\zeta$ -Kette des TCR besitzen. Als Tumorantigen wurde das Gangliosid  $G_{D2}$  ausgewählt. Die vier verschiedenen Konstrukte (14.G2a-2B4, 14.G2a-DAP10, 14.G2a-2B4- $\zeta$  und 14.G2a-DAP10- $\zeta$ ) sollten durch retroviralen Gentransfer zum einen in unspezifisch aktivierten T-Lymphozyten und zum anderen in spezifisch aktivierten EBV-CTL zur Expression gebracht werden. Durch funktionelle Analysen der tumorspezifischen Effektorfunktionen sollte anschließend das aktivierende oder kostimulatorische Potenzial der verschiedenen Rezeptoren in jeder Zellpopulation bestimmt werden.

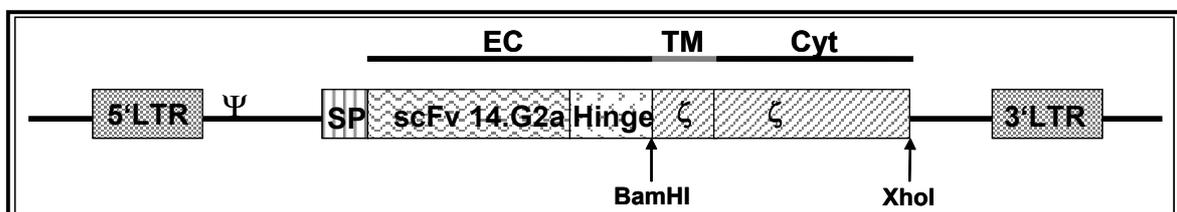
### 3 Ergebnisse

Die in dieser Arbeit konstruierten und eingesetzten chimären Rezeptoren erkennen als Tumorantigen das Gangliosid  $G_{D2}$ , das in hoher Dichte auf der Oberfläche von Neuroblastomzellen exprimiert wird und durch den monoklonalen Hybridomantikörper 14.G2a spezifisch detektierbar ist (Schengrund et al., 1985). Das Neuroblastom ist einer der häufigsten Weichteiltumore im Säuglings- und Kleinkindalter, mit einer bei metastasierten Tumoren oder Rezidiven sehr ungünstigen Prognose. Besonders durch die fehlende Expression von MHC-Proteinen und kostimulatorischen Molekülen auf der Zelloberfläche können Neuroblastomzellen einer Immunabwehr ausweichen (Corrias et al., 2004). Durch die Fusion der 14.G2a-Antigenerkennungsdomäne mit der  $\zeta$ -Kette des T-Zell-Rezeptor-Komplexes wurde ein für Neuroblastomzellen spezifischer chimärer Rezeptor 14.G2a- $\zeta$  konstruiert, mit denen diese Tumorausweichmechanismen teilweise umgangen werden konnten. 14.G2a- $\zeta$  transduzierte T-Lymphozyten zeigten *in vitro* eine spezifische Zielzelllyse und Zytokinsekretion nach Stimulation mit  $G_{D2}$ -positiven Neuroblastomzellen, durch das Fehlen von kostimulatorischen Signalen waren sie aber nicht fähig, als Antwort auf die Stimulation über den 14.G2a- $\zeta$  Rezeptor zu proliferieren (Rossig et al., 2001).

Für die chimären Rezeptoren 14.G2a- $\zeta$  und 14.G2a-CD28- $\zeta$  lagen zu Beginn dieser Arbeit bereits stabile Produktionszelllinien vor. Die chimären Rezeptoren 14.G2a-2B4, 14.G2a-DAP10, 14.G2a-2B4- $\zeta$  und 14.G2a-DAP10- $\zeta$  wurden vor der Herstellung der stabilen Produktionszelllinien in den retroviralen SFG-Vektor kloniert. Alle Rezeptoren wurden zunächst in aus dem peripheren Blut gesunder Spender gewonnenen unspezifisch aktivierten T-Zellen (PBMC=“peripheral blood monocyctic cells“) überprüft, bevor ihre Funktionalität in antigenerfahrenen EBV-CTL untersucht wurde.

### 3.1 Konstruktion der chimären Rezeptoren mit NK-Zell-stimulatorischen Domänen

Zur Untersuchung der aktivierenden oder kostimulatorischen Eigenschaften der NK-Zell-Rezeptoren 2B4 und NKG2D in T-Lymphozyten wurden zunächst ihre signaltransduzierenden Anteile, allein oder in Kombination mit der  $\zeta$ -Kette, in den retroviralen Vektor SFG:14.G2a kloniert. Da NKG2D keine eigene Signaltransduktionsdomäne besitzt, wurde das Adapterprotein DAP10 zur Klonierung ausgewählt. Die Anordnung der kostimulatorischen Domänen proximal der  $\zeta$ -Kette hatte sich in vorausgegangenen Untersuchungen bewährt (Finney et al., 1998) und wurde deshalb beibehalten. Der replikationsdefekte SFG-Vektor enthält zwei LTR-Regionen („Long Terminal Repeats“), die für Promotor- und Enhancer-Sequenzen kodieren und die Integration der transkribierten viralen DNA in das zelluläre Genom ermöglichen. Die Sequenz für den chimären Rezeptor ersetzt dabei die Gene für viruseigene Proteine (s. Abb. 3.1). Die Sequenz kodiert zunächst für ein Signalpeptid, das während des Transports zur Zellmembran abgespalten wird. Danach folgt das scFv („single chain Fragment variabel“), bestehend aus der variablen leichten Kette und der variablen schweren Kette des tumorspezifischen Antikörpers 14.G2a, die über einen Linker (Oligopeptid) miteinander verbunden sind. Die Hinge-Domäne verbessert die Flexibilität und die Antigenbindung des scFv. Der signaltransduzierende Anteil der  $\zeta$ -Kette einschließlich der Transmembrandomäne wird von zwei Restriktionsenzym-Schnittstellen flankiert und lässt sich durch einen Verdau des Vektors mit den Enzymen BamHI und XhoI entfernen. Da die beiden Enzyme spezifische Überhänge („cohesive ends“) erzeugen, ist eine gerichtete Klonierung in den SFG-Vektor möglich. Dies erlaubt einen Austausch der signaltransduzierenden Rezeptoranteile ohne Neuklonierung der Antigenbindungsdomäne.



**Abb. 3.1: Schematische Darstellung der 14.G2a- $\zeta$  Expressionskassette und der LTR-Regionen des SFG-Vektors.** Über die beiden Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI ist ein gerichteter Austausch des signaltransduzierenden Rezeptoranteils möglich. *LTR=Long Terminal Repeats*,  $\Psi$ =*Verpackungssignal*, *SP=Signalpeptid*, *scFv=single chain Fragment variabel*,  $\zeta$ = $\zeta$ -Kette, *EC=Extrazelluläre Region*, *TM=Transmembran-Region*, *Cyt=Zytoplasma-Region*.

### 3.1.1 Die chimären Rezeptoren 14.G2a-2B4 und 14.G2a-2B4- $\zeta$

Die publizierte cDNA des zur CD2-Subfamilie gehörenden humanen NK-Zell-Rezeptors 2B4 umfasst 1457 Basenpaare (Bp). Das offene Leseraster von 1095 Bp kodiert für ein 365 Aminosäuren (As) großes Transmembranprotein. Die Proteinsequenz ist in Abbildung 3.2 dargestellt und enthält nach dem Signalpeptid (18 As) in der extrazellulären Domäne (204 As) acht vermutliche Glykosylierungsstellen. Die 24 As der Transmembrandomäne verankern das Protein in der Zellmembran, während die 119 As der zytoplasmatischen Domäne über vier Tyrosine innerhalb der ITSM („immunoreceptor tyrosine based switch motif“) für die Signaltransduktion verantwortlich sind (Boles et al., 1999).

<u>MLGQVVTLILLLLLLKVYQ</u> QKGCQGSADHVVSISGVPLQLQ	40 As
PNSIQTKVDSIAWKKLLPSQNGFHHILKWE <u>NGS</u> LPS <u>NTSN</u>	80 As
DRFSFIVK <u>NLS</u> LLIKAAQQQDSGLYCLEVTSISGKVQTAT	120 As
FQVFVFDKVEKPRLQGGQKILDRGRCQVALSCLVSRD <u>GNV</u>	160 As
<u>S</u> YAWYRGSKLIQTAG <u>NLT</u> YLDEEVDI <u>NGT</u> HTYTC <u>NVS</u> NPV	200 As
SWESHTL <u>NLT</u> QDCQNAHQEFRE <u>WPFLVIVILSALFLGTL</u>	240 As
<u>ACFCVWRRRKRKEKQSETSPKEFL</u> <u>TIYEDV</u> KDLKTRRNHEQ	280 As
EQTFFGGGS <u>TIYSMT</u> QSQSSAPTSQEPAY <u>TLYSLI</u> QPSRK	320 As
SGSRKRNHSPSFNS <u>TIYEVI</u> GKSQPKAQNPARLSRKELEN	360 As
FDVYS	365 As

**Abb. 3.2: Aminosäure-Sequenz des humanen NK-Zell-Rezeptors 2B4.** Das Signalpeptid ist unterstrichen, die vermutlichen Glykosylierungsstellen sind umrahmt, die Transmembrandomäne ist schwarz unterlegt, während die vier ITSM umrahmt und grau unterlegt sind (Genbank Accession No. AF107761).

Zur Konstruktion der chimären Rezeptoren 14.G2a-2B4 und 14.G2a-2B4- $\zeta$  wurden die insgesamt 143 Aminosäuren der Transmembrandomäne und der zytoplasmatischen Domäne des 2B4-Rezeptors ausgewählt. Die Konstruktion des chimären Rezeptors 14.G2a-2B4- $\zeta$  erforderte außerdem die Verknüpfung mit dem signaltransduzierenden Anteil der  $\zeta$ -Kette. Deren cDNA kodiert für ein 163 As großes Transmembranprotein, mit einem Signalpeptid von 21 As und einer sehr kurzen extrazellulären Domäne von 9 As, die durch die 21 As der Transmembrandomäne mit den 112 As der zytoplasmatischen, signaltransduzierenden Domäne verbunden ist (Weissman et al 1988).

### 3.1.2 Die chimären Rezeptoren 14.G2a-DAP10 und 14.G2a-DAP10- $\zeta$

Die publizierte cDNA des NKG2D Adapterproteins DAP10 umfasst 504 Bp und das offene Leseraster von 282 Bp kodiert für eine 93 As großes Transmembranprotein. Die Proteinsequenz ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Das Protein besteht aus einem 19 As langen Signalpeptid und einer 25 As großen extrazellulären Domäne. Während die 21 As der Transmembrandomäne das Protein in der Zellmembran verankern, ist die 28 As große zytoplasmatische Domäne über ein Tyrosin-basiertes Motiv (YINM) für die Signaltransduktion verantwortlich (Chang et al., 1999).

MIHLGHILFLLLLPVAAAQTTPGERSSSLPAFYPGTSGSCS	40 As
GCGSLSLPLLAGLVAAADAVASLLIVGAVFLCARPRRSPAQ	80 As
EDGKVYINMPGRG	93 As

**Abb. 3.3: Aminosäure-Sequenz des NKG2D-Adaptorproteins DAP10.** Das Signalpeptid ist unterstrichen, die Transmembrandomäne ist schwarz unterlegt, während das Tyrosin-basierte Motiv umrahmt und grau unterlegt ist. (Genebank Accession No. AF172929).

Zur Konstruktion der chimären Rezeptoren 14.G2a-DAP10 und 14.G2a-DAP10- $\zeta$  wurden die insgesamt 49 Aminosäuren der Transmembrandomäne und der zytoplasmatischen Domäne des DAP10-Proteins ausgewählt. Die Konstruktion des chimären Rezeptors 14.G2a-DAP10- $\zeta$  erforderte außerdem die Verknüpfung mit der 112 As großen zytoplasmatischen Domäne der  $\zeta$ -Kette.

### 3.1.3 Amplifikation der DNA-Sequenzen

Zur Amplifikation der gewünschten DNA-Sequenz wurden geeignete Oligonukleotidprimer ausgewählt, die zur Klonierung in den SFG-Vektor die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme BamHI (G\*GATTC) im 5'-Bereich und XhoI im 3'-Bereich (C\*TCGAG) an die amplifizierte DNA-Sequenz anfügten. Da in der benötigten cDNA-Sequenz von 2B4 bereits eine BamHI-Schnittstelle vorhanden war, musste die Klonierung der 2B4-basierten Rezeptoren über einen Zwischenschritt mit einem weiteren Restriktionsenzym und einem zweiten Vektor erfolgen. Der 2B4 5'-Primer enthält deshalb vor der BamHI-Schnittstelle die Erkennungssequenz für EcoRI (G\*AATTC). Die Konstruktion der chimären Rezeptoren 14.G2a-2B4- $\zeta$  und 14.G2a-DAP10- $\zeta$  erforderte außerdem die Verknüpfung mit dem signaltransduzierenden Anteil der  $\zeta$ -Kette. Die Amplifikation der DNA-Sequenz der 112 As des signaltransduzierenden Anteils der  $\zeta$ -Kette erfolgte mit spezifischen Oligonukleotidprimern, wobei der 3'-Primer die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym XhoI enthielt. Zur Verknüpfung der DNA-Sequenz von 2B4 oder DAP10 mit der DNA-Sequenz der  $\zeta$ -Kette in einer „Splicing

by Overlap Extension“-PCR wurden zusätzlich bispezifische Primer benötigt, die zum einen den 3'-Bereich von 2B4 oder DAP 10 und zum anderen den 5'-Bereich der  $\zeta$ -Kette binden (Abb. 3.4).



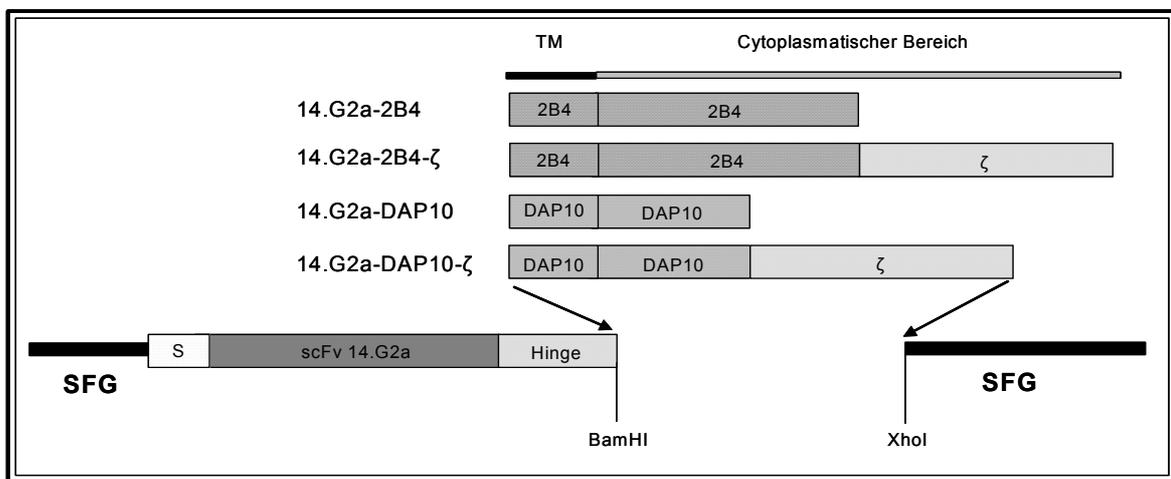
**Abb. 3.4: Primersequenzen und schematische Darstellung der Bindungsstellen.** TM=Transmembrandomäne, Cyt=Zytoplasmatische Domäne.

Die DNA-Sequenz für die Transmembrandomäne und den signaltransduzierenden Anteil des chimären Rezeptors 14.G2a-2B4 wurde in einer Standard-PCR mit dem 5'EcoRI/BamHI-2B4-Primer und dem 3'2B4-XhoI-Primer aus cDNA amplifiziert. Der chimäre Rezeptor 14.G2a-DAP10 wurde ebenfalls in einer Standard-PCR mit dem 5'BamHI-DAP10-Primer und dem 3'DAP10-XhoI-Primer amplifiziert. Für die chimären Rezeptoren 14.G2a-2B4- $\zeta$  und 14.G2a-DAP10- $\zeta$  wurde zunächst die DNA-Sequenz der zytoplasmatische Domäne der  $\zeta$ -Kette mit dem 5'Zeta-Primer und dem 3'Zeta-XhoI-Primer amplifiziert. Anschließend erfolgte die Amplifikation der DNA-Sequenz von 2B4 mit dem 5'EcoRI/BamHI-2B4-Primer und dem 3'2B4-Zeta-Primer, und der DNA-Sequenz von DAP10 mit dem 5'BamHI-DAP10-Primer und dem 3'DAP10-Zeta-Primer. In der „Splicing by Overlap Extension“-PCR erfolgte schließlich die Verknüpfung der Sequenzen zu 2B4- $\zeta$  und DAP10- $\zeta$ , wobei die beiden zu verknüpfenden DNA-Moleküle zunächst für einige Zyklen sowohl Template als auch Primer darstellten. Anschließend wurde das so verknüpfte DNA-Molekül mit dem 5'EcoRI/BamHI-2B4-Primer oder 5'BamHI-DAP10-Primer und dem 3'Zeta-XhoI-Primer amplifiziert.

### 3.1.4 Klonierung der DNA-Sequenzen in den retroviralen SFG-Vektor

Die amplifizierten DNA-Sequenzen für die chimären Rezeptoren 14.G2a-2B4 und 14.G2a-2B4- $\zeta$  wurden zunächst mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI verdaut und in den mit den gleichen Enzymen behandelten pRSV-Vektor kloniert. Nach einer Vermehrung der Plasmide in *E. coli* und anschließender Plasmidpräparation wurden die gewünschten Sequenzen über einen partiellen Verdau aus dem pRSV-Vektor mit den

Restriktionsenzymen BamHI und XhoI ausgeschnitten. Dazu wurde die Menge des Restriktionsenzym BamHI und die Inkubationszeit so angepasst, dass das Restriktionsenzym nicht an beiden Erkennungssequenzen schneiden konnte. Durch die Auftrennung in einem Agarosegel konnten die Fragmente in der erwarteten Größe ausgeschnitten und aufgereinigt werden. Anschließend erfolgte die Subklonierung in den ebenfalls mit BamHI und XhoI behandelten SFG-Vektor. Die amplifizierten DNA-Sequenzen für die chimären Rezeptoren 14.G2a-DAP10 und 14.G2a-DAP10- $\zeta$  wurden mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI verdaut und anschließend in den SFG-Vektor kloniert (Abb. 3.5). Die klonierten Nukleotidsequenzen wurden durch eine Sequenzierung überprüft.

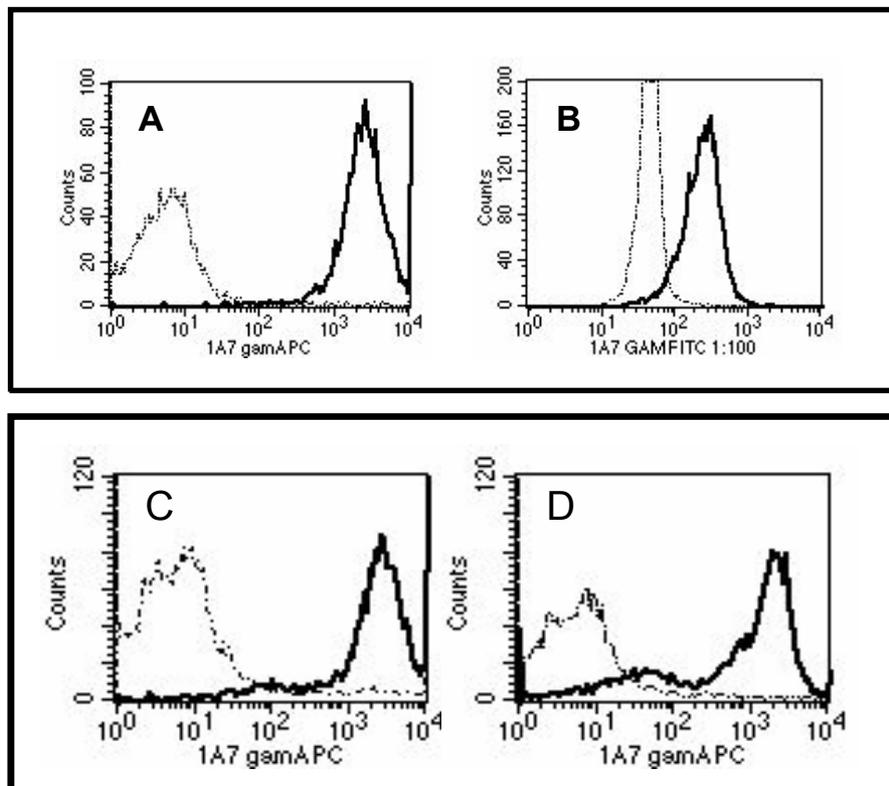


**Abb. 3.5: Schematische Darstellung der Subklonierung in den SFG-Vektor über die BamHI-XhoI Schnittstellen.** *TM=Transmembrandomäne, Cyt=zytoplasmatische Domäne, SP=Signalpeptid, scFv=single chain fragment variabel.*

### 3.2 Herstellung stabiler Produktionszelllinien

Nach Klonierung der chimären Rezeptoren in den SFG-Vektor wurde zur Vervielfältigung der Retroviren eine Produktionszelllinie benötigt, die die retroviralen Gene *gag*, *pol* und *env* enthält, jedoch kein Verpackungssignal  $\Psi$  besitzt. Damit werden von dieser Linie alle für die Replikation, Verpackung und Infektion notwendigen viralen Proteine produziert, doch erst das Verpackungssignal  $\Psi$  auf dem SFG-Vektor erlaubt die Anlagerung der viralen RNA an Nukleokapsidmoleküle sich bildender Viruspartikel (Mann et al., 1983). In dieser Arbeit wurden verschiedene Produktionszelllinien zur Herstellung von retrovirushaltigem Überstand verwendet. Zur Herstellung der stabilen Produktionszelllinien wurden zunächst Phoenix eco bzw. amphi Zellen mit den verschiedenen chimären Rezeptoren transient transfiziert (Kinsella et al., 1996). Der anschließend von diesen Zellen produzierte retrovirale Überstand mit ecotropem bzw.

amphotropem Wirtsspektrum wurde zur stabilen Transduktion der Produktionszelllinien PG13 bzw. FLYRD18 benutzt. PG13 ist ein Derivat der murinen Fibroblastenzelllinie TK-NIH-3T3 die das Hüllprotein des Gibbonaffen Leukämievirus (GALV) exprimiert und dadurch Retroviren mit amphotropem Wirtsspektrum produziert (Miller et al., 1991). FLYRD18 ist ein Derivat der humanen Fibrosarkomlinie HT1080 die das Hüllprotein des feline endogenen Virus RD114 exprimiert und dadurch ebenfalls Retroviren mit amphotropem Wirtsspektrum produziert (Cosset et al., 1995). Der von den transduzierten PG13 und FLYRD18 Zellen produzierte Virusüberstand wurde anschließend zur Transduktion der T-Zellen genutzt. Die Herkunft des retrovirushaltigen Überstandes hatte keinen Einfluss auf die Aktivität der chimären Rezeptoren in den transduzierten T-Zellen. Durch eine Färbung mit dem 14.G2a-spezifischen Antikörper 1A7 konnte die Expression der chimären Rezeptoren auf den Produktionszelllinien überprüft werden. Für die Produktionszelllinien PG13/14.G2a-2B4 und PG13/14.G2a-2B4- $\zeta$  konnte eine Oberflächenexpression von 98% bzw. 93% bestimmt werden. Auch für die Produktionszelllinien FLYRD18/14.G2a-DAP10 und FLYRD18/14.G2a-DAP10- $\zeta$  konnte eine starke Oberflächenexpression von 95% bzw. 90% nachgewiesen werden (s. Abb. 3.6).



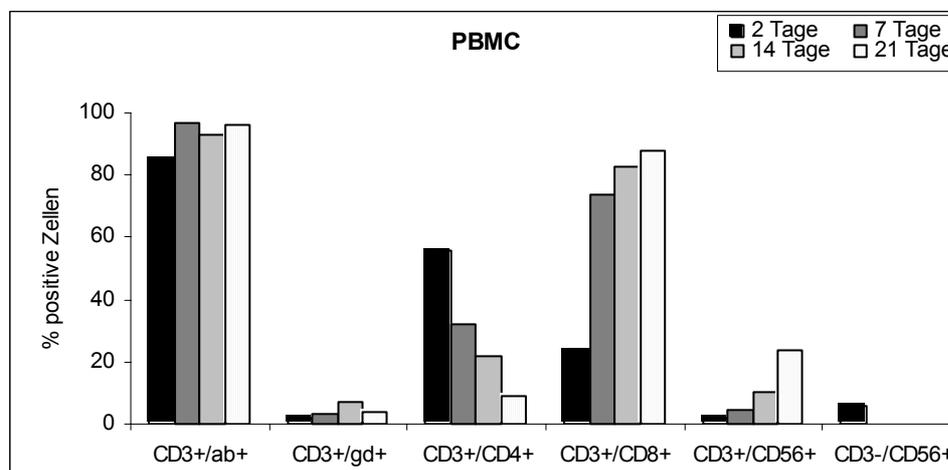
**Abb. 3.6:** Transduktionseffizienzen der Produktionszelllinien PG13/14.G2a-2B4 (A), PG13/14.G2a-2B4- $\zeta$  (B), FLYRD18/14.G2a-DAP10 und FLYRD18/14.G2a-DAP10- $\zeta$ . Die Kontrollfärbung mit einem IgG<sub>1</sub>-Isotyp-Antikörper wurden mit einer gestrichelten Linie dargestellt, während die 1A7-Färbung mit einer durchgezogenen Linie dargestellt wurde. Der in A, C und D verwendete gam-APC Farbstoff besitzt eine höhere Fluoreszenzintensität als der für B verwendete gam-FITC-Farbstoff.

### 3.3 Transduktion und Kultivierung von PBMC

Da Retroviren nur in das Genom sich teilender Zellen integrieren können, wurden die T-Zellen zunächst aktiviert. Die aus dem Blut gesunder Spender isolierten PBMC wurden vor der Transduktion für 48 Stunden unspezifisch mit immobilisierten CD3- und CD28-Antikörpern aktiviert und für die Transduktion anschließend 48-72 Stunden im retrovirushaltigen Überstand der jeweiligen Produktionszelllinien kultiviert. Die Expression der chimären Rezeptoren auf der Zelloberfläche wurde über eine Färbung mit dem 14.G2a-spezifischen Antiidiotyp-Antikörper 1A7 in einer durchflusszytometrischen Analyse bestimmt.

#### 3.3.1 Immunphänotypisierung von PBMC

Zur phänotypischen Charakterisierung der verwendeten T-Zellen wurde die Expression typischer Oberflächenantigene untersucht. Analysiert wurden vor allem die T-Zell-Marker CD3, CD4 und CD8, aber auch das für NK-Zellen oder NK-T-Zellen typische Oberflächenantigen CD56. Zusätzlich wurden die verwendeten Linien teilweise auf den Anteil an TCR $\gamma\delta$  T-Zellen überprüft. Die phänotypische Charakterisierung der kultivierten PBMC ist in Abbildung 3.7 am Beispiel einer Zelllinie zu vier verschiedenen Zeitpunkten der Kultur dargestellt.



**Abb. 3.7: Immunphänotypisierung der PBMC zu vier verschiedenen Zeitpunkten der Kultur.** Durch den Aktivierungsreiz und die Kultivierung in IL-2-haltigem Medium proliferierten bevorzugt CD8<sup>+</sup> T-Zellen. *ab*=TCR $\alpha\beta$  *gd*=TCR $\gamma\delta$ .

An Tag 0 (nicht dargestellt) enthielten die isolierten PBMC neben den CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch noch Anteile von B-Zellen, Granulozyten, TCR $\gamma\delta$  T-Zellen und NK-Zellen. Durch die Koinkubation mit den immobilisierten Antikörpern gegen CD3 und CD28 und der damit verbundenen Stimulation des TCR erhielten die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen den

für die Transduktion benötigten Aktivierungsreiz. Wie in Abbildung 3.7 zu sehen ist, enthielten die PBMC an Tag 2 etwa 80% CD3+ TCR $\alpha\beta$  T-Zellen, von denen der größte Teil CD4+ koexprimiert. Der Anteil an CD3+ CD56+ NK-T-Zellen, TCR $\gamma\delta$  T-Zellen und CD3- CD56+ NK-Zellen lag zusammen bei etwa 6%, wobei der Anteil der NK-Zellen mit etwa 4% am größten war. Durch die Kultivierung der PBMC in IL-2-haltigem Medium ab dem Zeitpunkt der Transduktion begannen die T-Zellen zu proliferieren. Diese Kulturbedingungen begünstigt vor allem die Proliferation von CD8+ T-Zellen, so dass der Anteil der CD4+ T-Zellen in der Kultur kontinuierlich abnahm. Während NK-Zellen unter diesen Kulturbedingungen nicht wachsen konnten, nahm der Anteil an NK-T-Zellen und TCR $\gamma\delta$  T-Zellen leicht zu. Die in dieser Arbeit generierten PBMC-Linien wurden spätestens an Tag 14 nach Aktivierung phänotypisch charakterisiert (Tab. 3.1). Die Kulturen wurden zu diesem Zeitpunkt von CD3+ CD8+ T-Zellen dominiert mit im Mittel 74,8% [ $\pm 8,4\%$ ], gefolgt von den CD3+ CD4+ T-Zellen mit im Mittel 27,7% [ $\pm 7,4\%$ ]. Der Anteil an CD3- CD56+ NK-Zellen war nur noch minimal, während der Anteil an CD3+ CD56+ NK-T-Zellen und TCR $\gamma\delta$  T-Zellen beim Vergleich der Spender zum Teil starke Schwankungen zeigte.

**Tab. 3.1: Immunphänotypisierung verschiedener 14 Tage alter PBMC-Linien.**

Oberflächenmarker	PBMC-Linien						Mittelwert
	A	B	C	D	E	F	
CD3+/CD4+	16,5%	21,5%	37,0%	36,0%	26,0%	29,0%	<b>27,7%</b>
CD3+/CD8+	86,0%	82,5%	60,0%	71,0%	76,0%	73,0%	<b>74,8%</b>
CD3+/CD56+	10,0%	10,0%	2,0%	2,0%	6,0%	3,0%	<b>5,5%</b>
CD3-/CD56+	0,4%	0,2%	0,3%	0,3%	0,6%	0,3%	<b>0,4%</b>
CD3+/ $\gamma\delta$ +	5,0%	6,6%	n.b.	n.b.	2,0%	4,0%	<b>4,4%</b>

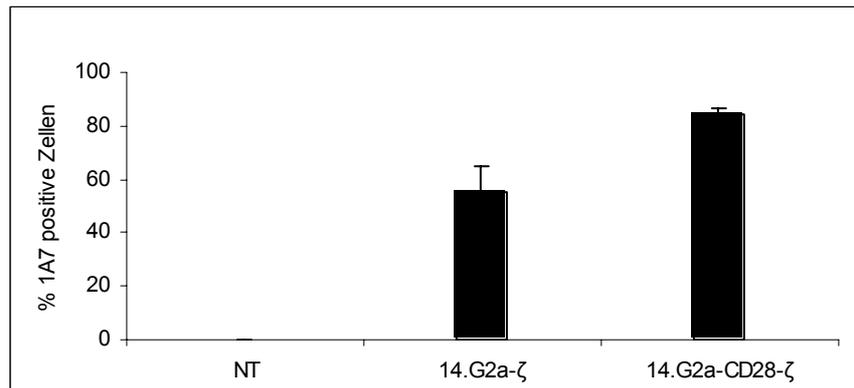
n.b.=nicht bestimmt

### 3.4 14.G2a-CD28- $\zeta$ transduzierte PBMC

Die aus dem Blut gesunder Spender isolierten PBMC wurden wie beschrieben (s. 3.3) aktiviert und mit dem retrovirushaltigen Überstand der Produktionszelllinie FLYRD18/14.G2a-CD28- $\zeta$  transduziert. Zur Kontrolle wurden PBMC mit dem retrovirushaltigen Überstand der Produktionszelllinie FLYRD18/14.G2a- $\zeta$  transduziert.

### 3.4.1 Expression der chimären Rezeptoren und Transduktionseffizienz

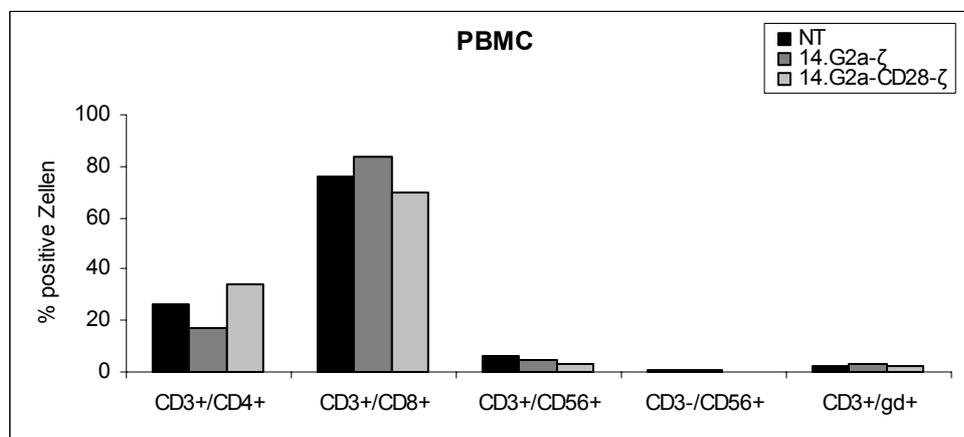
Wie Abbildung 3.8 zeigt, konnte durch die Oberflächenfärbung mit dem 14.G2a-spezifischen Antikörper 1A7 für die Transduktion mit dem chimären Rezeptor 14.G2a- $\zeta$  eine Transduktionseffizienz von bis zu 65% [55±10] durchflusszytometrisch ermittelt werden und für den chimären Rezeptor 14.G2a-CD28- $\zeta$  eine Transduktionseffizienz von bis zu 87% [84±2]. Die stabile Expression der chimären Rezeptoren wurde durch wiederholte durchflusszytometrische Analysen bestätigt.



**Abb. 3.8: Transduktionseffizienzen der PBMC nach retroviralem Transfer der chimären Rezeptoren.** Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Transduktionseffizienzen für 14.G2a- $\zeta$  und 14.G2a-CD28- $\zeta$  (n=5).

### 3.4.2 Immunphänotypisierung der 14.G2a-CD28- $\zeta$ transduzierten PBMC

Der Vergleich des Immunphänotyps von transduzierten und nicht-transduzierten PBMC sollte eine Veränderung der Zusammensetzung der Zellpopulationen durch die Expression der chimären Rezeptoren ausschließen. Wie Abbildung 3.9 an dem Beispiel einer Linie zeigt, gab es nur geringfügige Schwankungen in der Expression der verschiedenen Oberflächenmarker. Die Expression der chimären Rezeptoren 14.G2a- $\zeta$  und 14.G2a-CD28- $\zeta$  hatte also keinen Einfluss auf den Phänotyp der untersuchten T-Zellen.



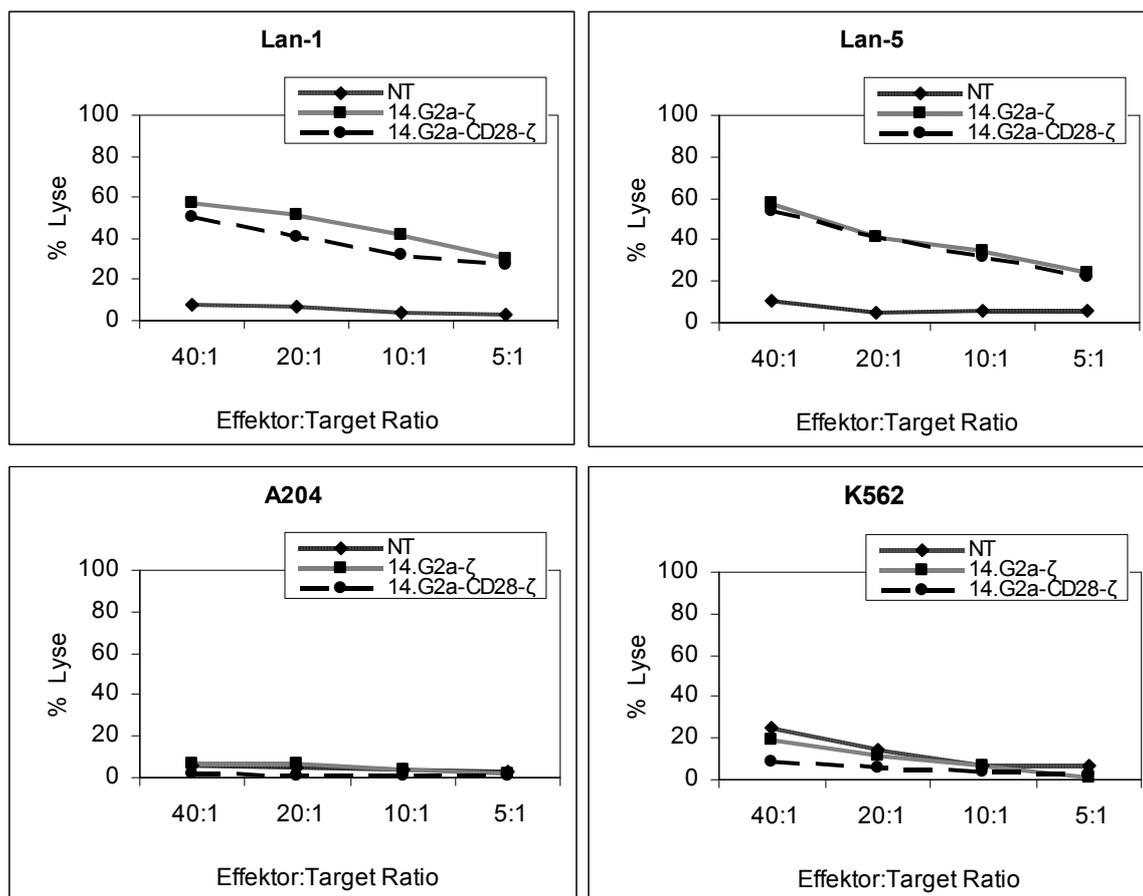
**Abb. 3.9: Vergleich der Immunphänotypen der transduzierten und nicht-transduzierten PBMC.** Die 14 Tage alten PBMC unterscheiden sich nur geringfügig in der Expression der wichtigsten T-Zell-Marker.

### 3.4.3 Funktionelle Untersuchungen der 14.G2a-CD28- $\zeta$ transduzierten PBMC

Nach erfolgreicher Transduktion der PBMC und dem durchflusszytometrischen Nachweis der Oberflächenexpression der chimären Rezeptoren wurden funktionelle Untersuchungen bezüglich Zytotoxizität, Zytokin-Sekretion und Proliferation durchgeführt.

#### 3.4.3.1 14.G2a-CD28- $\zeta$ transduzierte PBMC lysieren spezifisch $G_{D2}$ -positive Tumorzellen

Eine typische Effektorfunktion aktivierter T-Zellen ist ihre Fähigkeit, antigenpositive Zellen zu erkennen und zu lysieren. In einem  $^{51}\text{Chrom}$ -Assay werden die Zielzellen durch die Inkorporation von radioaktivem Chrom markiert. Werden die so markierten Zellen in einer anschließenden Koinkubation mit den Effektorzellen durch diese lysiert, wird radioaktives Chrom in das Medium abgegeben. Die Messung des Überstandes bietet dann die Möglichkeit, die Zytotoxizität der Effektorzellen zu quantifizieren. Deshalb wurden die 14.G2a-CD28- $\zeta$  transduzierten PBMC mit verschiedenen  $^{51}\text{Chrom}$ -markierten,  $G_{D2}$ -positiven (Lan-1 und Lan-5) und  $G_{D2}$ -negativen (A204 und K562) Tumorzelllinien koinkubiert. Zum Vergleich wurden nicht-transduzierte und 14.G2a- $\zeta$  transduzierte PBMC ebenfalls mit den  $^{51}\text{Chrom}$ -markierten Tumorzelllinien koinkubiert. Aus dem freigesetzten radioaktiven Chrom wurde anschließend die spezifische Zielzelllyse bestimmt. Abbildung 3.10 zeigt, dass nur die  $G_{D2}$ -positiven Neuroblastomzelllinien Lan-1 und Lan-5 von den 14.G2a- $\zeta$  und den 14.G2a-CD28- $\zeta$  transduzierten PBMC lysiert wurden, während die  $G_{D2}$ -negative Rhabdomyosarkomzelllinie A204 nicht lysiert wurde. Die nicht-transduzierten PBMC zeigten weder gegen die Neuroblastomzellen noch gegen die Rhabdomyosarkomzellen eine zytotoxische Aktivität. Die ebenfalls  $G_{D2}$ -negative Leukämiezelllinie K562 ist wegen der fehlenden Expression von MHC-Molekülen besonders anfällig für eine unspezifische Lyse durch z.B. NK-Zellen. Sowohl die nicht-transduzierten als auch die 14.G2a- $\zeta$  und die 14.G2a-CD28- $\zeta$  transduzierten PBMC zeigten selbst bei der höchsten Effektor zu Target Ratio von 40:1 nur eine geringfügige unspezifische Zytotoxizität gegenüber den K562-Zellen. In Tabelle 3.2 wird die spezifische Zielzelllyse von  $G_{D2}$ -positiven Tumorzelllinien durch 14.G2a-CD28- $\zeta$  transduzierte PBMC mit der durch nicht-transduzierte oder 14.G2a- $\zeta$  transduzierte PBMC für verschiedene Spender verglichen. Dabei zeigt sich eine vergleichbare Zielzelllyse der beiden chimären Rezeptoren 14.G2a- $\zeta$  und 14.G2a-CD28- $\zeta$ .



**Abb. 3.10: Analyse der zytotoxischen Eigenschaften 14.G2a-CD28- $\zeta$  transduzierter PBMC im  $^{51}\text{Chrom}$ -Assay.** Die Effektorzellen wurden mit den  $^{51}\text{Chrom}$ -markierten Tumorzellen für 4 Stunden mit Effektor zu Target Ratios von 40:1 bis 5:1 koinkubiert. Nur die 14.G2a- $\zeta$  und 14.G2a-CD28- $\zeta$  transduzierten PBMC waren in der Lage,  $G_{D2}$ -positive Tumorzellen spezifisch zu lysieren. Die Effizienz der Zytolyse unterschied sich nicht zwischen 14.G2a- $\zeta$  und 14.G2a-CD28- $\zeta$  transduzierten PBMC.

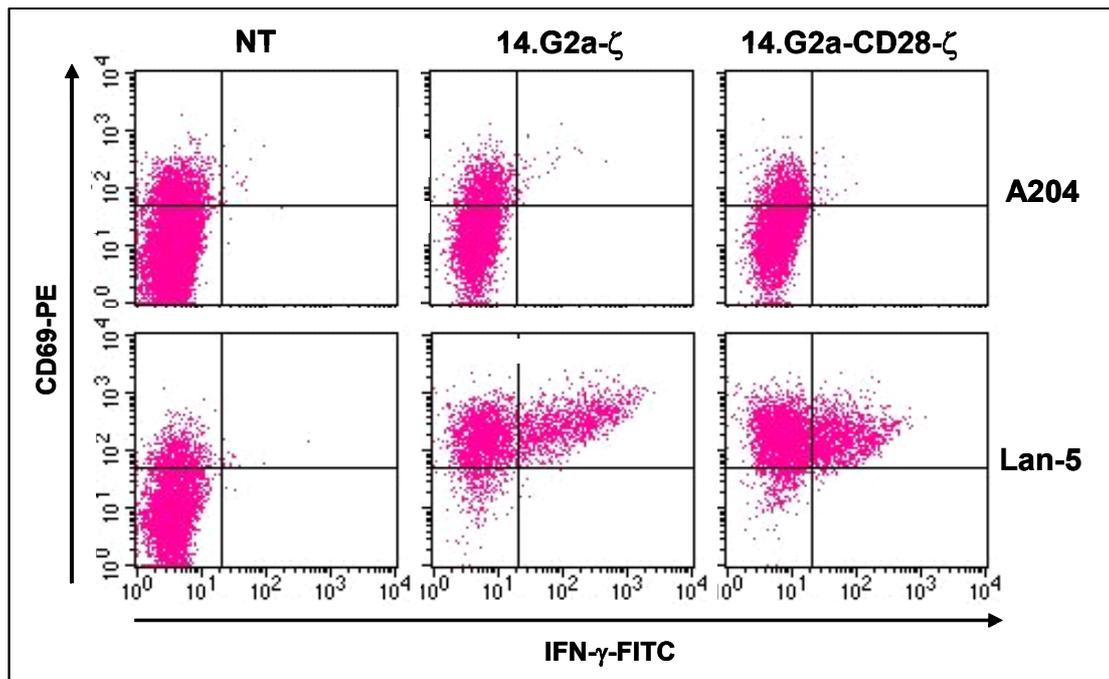
**Tab. 3.2: Zytotoxizität der transduzierten PBMC gegen  $G_{D2}$ -positive Tumorzellen bei einer Effektor:Target-Ratio von 40:1.**

Linie	Tumorzellen	NT	14.G2a- $\zeta$	14.G2a-CD28- $\zeta$
A	Lan-1	11%	57%	57%
	Lan-5	8%	57%	50%
B	Lan-1	7%	42%	50%
	Lan-5	6%	50%	62%
C	Lan-1	7%	54%	58%
	Lan-5	4%	39%	53%
D	Lan-1	4%	44%	43%
	Lan-5	5%	35%	45%

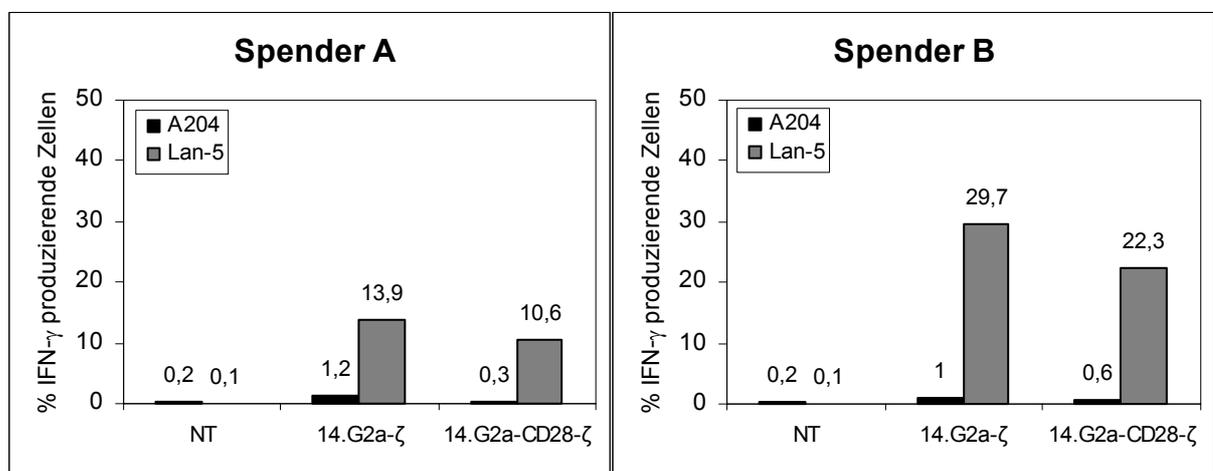
### 3.4.3.2 14.G2a-CD28- $\zeta$ transduzierte PBMC sezernieren IFN- $\gamma$ nach Koinkubation mit G<sub>D2</sub>-positiven Tumorzellen

Eine weitere wesentliche Funktion aktivierter T-Zellen ist die Sekretion von Zytokinen nach dem Kontakt mit einer antigenpositiven Zelle. Die Sekretion des Zytokins Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) führt zu einer Verstärkung der zellulären und humoralen Immunantwort, es steigert die Phagozytose von Makrophagen und hat eine wichtige Funktion bei der Reifung CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen. Die IFN- $\gamma$  Sekretion der 14.G2a-CD28- $\zeta$  transduzierten PBMC wurde durchflusszytometrisch nach einer intrazellulären Färbung der Zellen mit einem IFN- $\gamma$ -Antikörper bestimmt. Dazu wurden die transduzierten PBMC zunächst mit der G<sub>D2</sub>-positiven Neuroblastomzelllinie Lan-5 und zur Kontrolle mit der G<sub>D2</sub>-negativen Rhabdomyosarkomzelllinie A204 inkubiert. Die Sekretion des von den PBMC produzierten IFN- $\gamma$  wurde durch die Zugabe von BrefeldinA inhibiert und die Zellmembran anschließend für den IFN- $\gamma$ -Antikörper permeabilisiert. Durch die Färbung der Zellen mit dem 14.G2a-spezifischen Antikörper 1A7 und einem Antikörper gegen den T-Zell-spezifischen Oberflächenmarker CD3 konnten im Durchflusszytometer gezielt die transduzierten Zellen auf ihre IFN- $\gamma$  Produktion untersucht werden. Zusätzlich wurden die Zellen mit dem Aktivierungsmarker CD69 gefärbt. Zum Vergleich wurden nicht-transduzierte und 14.G2a- $\zeta$  transduzierte PBMC mit den Tumorzelllinien koinkubiert und anschließend intrazellulär gefärbt.

Wie man in den Abbildungen 3.11 und 3.12 erkennen kann, produzierten nur die 14.G2a- $\zeta$  und die 14.G2a-CD28- $\zeta$  transduzierten PBMC nach einer Aktivierung durch die G<sub>D2</sub>-positiven Neuroblastomzellen IFN- $\gamma$ . Die Koinkubation mit den G<sub>D2</sub>-negativen A204 führte nicht zu einer Aktivierung und damit einhergehender IFN- $\gamma$  Produktion der transduzierten PBMC. Die nicht-transduzierten PBMC wurden weder durch Lan-5 noch durch A204 aktiviert. Beim Vergleich der beiden Spender in Abbildung 3.12 zeigt sich, dass der Anteil an IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen für beide Rezeptoren zwischen den Spendern starke Schwankungen zeigte. So war der Anteil an IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen bei Spender A mit 13,9% (14.G2a- $\zeta$ ) bzw. 10,6% (14.G2a-CD28- $\zeta$ ) um die Hälfte geringer als bei Spender B mit 29,7% (14.G2a- $\zeta$ ) bzw. 22,3% (14.G2a-CD28- $\zeta$ ). Außerdem ist der Anteil an IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen für die mit 14.G2a-CD28- $\zeta$  transduzierten PBMC bei den beiden untersuchten Spendern um ein Drittel geringer als bei den 14.G2a- $\zeta$  transduzierten PBMC.



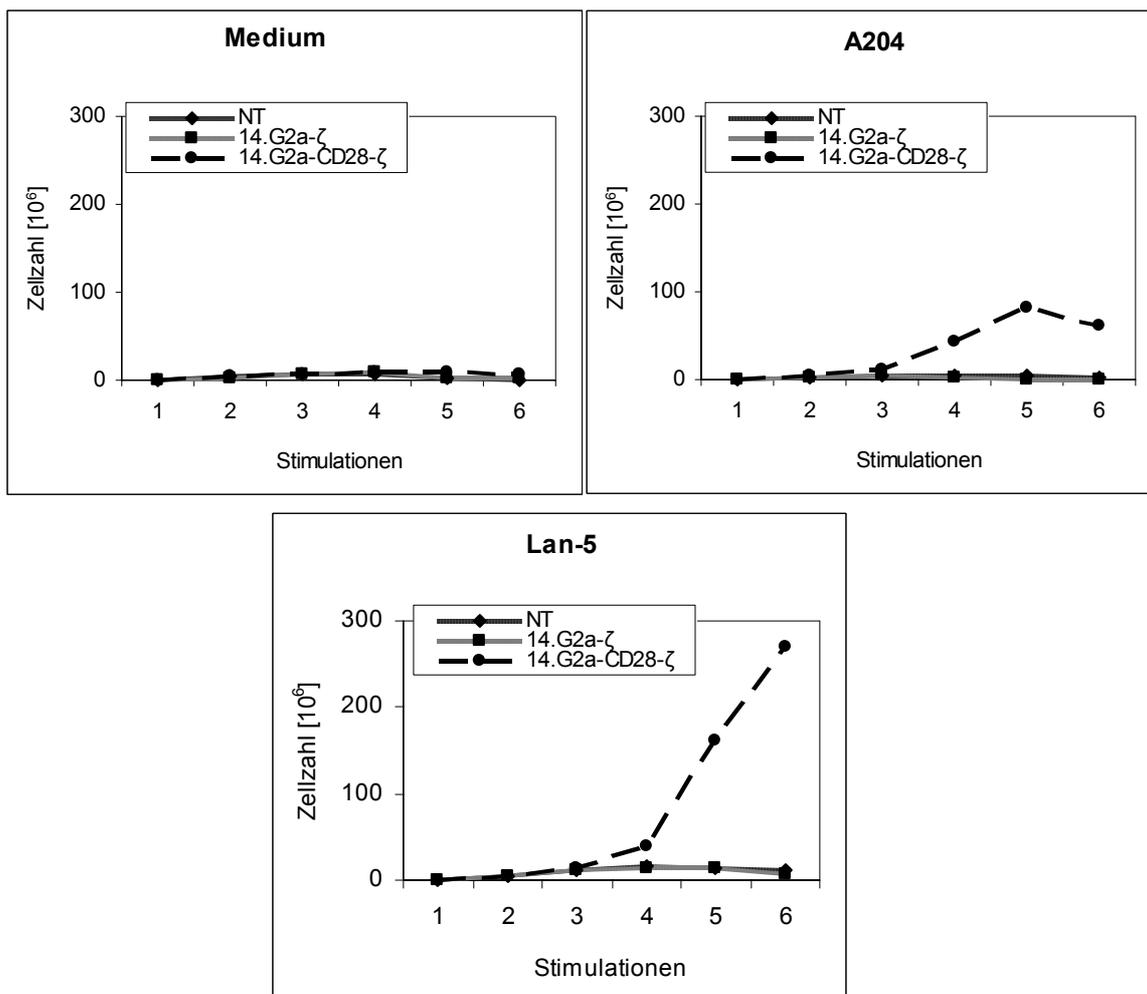
**Abb. 3.11: Intrazelluläre IFN- $\gamma$  Färbung der 14.G2a-CD28- $\zeta$  transduzierten PBMC.** Transduzierte und nicht-transduzierte PBMC wurden nach einer Koinkubation mit Lan-5 bzw. A204 permeabilisiert und gefärbt. Für 14.G2a- $\zeta$  und 14.G2a-CD28- $\zeta$  sind ausschließlich die CD3+ 1A7+ Zellen dargestellt, bei den nicht-transduzierten die CD3+. Aufgetragen in den Dot Blots ist der Aktivierungsmarker CD69 gegen den IFN- $\gamma$ -Antikörper.



**Abb. 3.12: Vergleich der intrazellulären IFN- $\gamma$  Färbung zweier Spender.** Für 14.G2a- $\zeta$  und 14.G2a-CD28- $\zeta$  wurden ausschließlich die CD3+ 1A7+ T-Zellen gemessen, bei den nicht-transduzierten die CD3+ T-Zellen.

### **3.4.3.3 14.G2a-CD28- $\zeta$ transduzierte PBMC unterscheiden sich von 14.G2a- $\zeta$ transduzierten PBMC durch antigenspezifische Proliferation**

Eine vollständige Effektorantwort aktivierter T-Zellen schließt neben der Zielzelllyse und der Sekretion von Zytokinen auch eine klonalen Proliferation der Zellen ein. Während Zielzelllyse und Zytokinsekretion auch schon im Rahmen einer unvollständigen Aktivierung ausgelöst werden können, benötigen T-Zellen zur klonalen Proliferation eine Verstärkung des durch die  $\zeta$ -Kette des TCR vermittelten Aktivierungssignals. Diese Verstärkung kann durch eine Reihe von verschiedenen positiv regulierenden Signalen vermittelt werden. Von besonderer Bedeutung sind dabei kostimulatorische Rezeptoren. Die Fähigkeit der 14.G2a-CD28- $\zeta$  transduzierten PBMC zur klonalen Proliferation nach Antigenkontakt wurde durch eine wöchentliche Stimulation mit Tumorzellen untersucht. Zur Kontrolle wurde die Expansion der Zellen ohne Stimulation überprüft. Die Proliferation der transduzierten PBMC wurde durch das Auszählen der lebenden Zellen nach einer Anfärbung der toten Zellen mit Trypanblau bestimmt. Zum Vergleich wurden nicht-transduzierte und 14.G2a- $\zeta$  transduzierte PBMC mit den Tumorzelllinien koinkubiert und wöchentlich gezählt. Da die 14.G2a-CD28- $\zeta$  transduzierten PBMC schon durch die Kultivierung in IL-2-haltigem Medium sehr stark proliferierten, wurden vor Beginn der ersten Stimulation alle untersuchten PBMC für fünf Tage ohne IL-2 kultiviert, um den noch vorhandenen Proliferationsreiz durch die unspezifische Aktivierung mit den immobilisierten CD3- und CD28-Antikörpern und der IL-2-Stimulation während der Transduktion aufzuheben. Wie in Abbildung 3.13 zu sehen ist, sind die 14.G2a-CD28- $\zeta$  transduzierten PBMC in der Lage, nach Stimulation mit den G<sub>D2</sub>-positiven Neuroblastomzellen Lan-5 zu proliferieren. Ohne Stimulation fehlt eine Proliferation der Zellen, die Stimulation mit den Rhabdomyosarkomzellen A204 lässt die Zellen bis zur fünften Restimulation proliferieren, bleibt aber in der induzierten Expansion deutlich geringer als nach der Stimulation mit den Lan-5 Zellen. 14.G2a- $\zeta$  transduzierte und nicht-transduzierte PBMC konnten weder mit den Lan-5 Zellen noch mit den A204 Zellen expandiert werden.



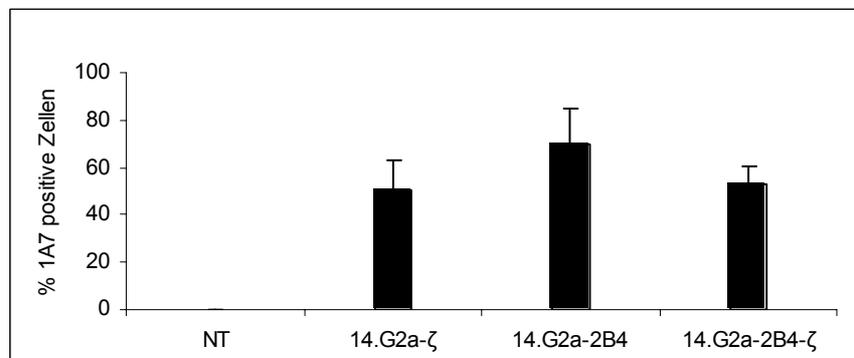
**Abb. 3.13: Expansion der 14.G2a-CD28- $\zeta$  transduzierten PBMC nach Antigenkontakt.** Die PBMC wurden wöchentlich mit Lan-5, A204 oder nur Medium restimuliert. Die Expansion der Zellen wurde wöchentlich ermittelt, tote Zellen dabei durch eine Färbung mit Trypanblau ausgeschlossen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei.

### 3.5 14.G2a-2B4 und 14-G2a-2B4- $\zeta$ transduzierte PBMC

Die PBMC wurden wie beschrieben aktiviert (s. 3.3). Zur Transduktion wurden anschließend die retrovirushaltigen Überstände der generierten Produktionszelllinien FLYRD18/14.G2a- $\zeta$ , PG13/SFG:14.G2a-2B4 und PG13/SFG:14.G2a-2B4- $\zeta$  eingesetzt.

#### 3.5.1 Expression der chimären Rezeptoren und Transduktionseffizienz

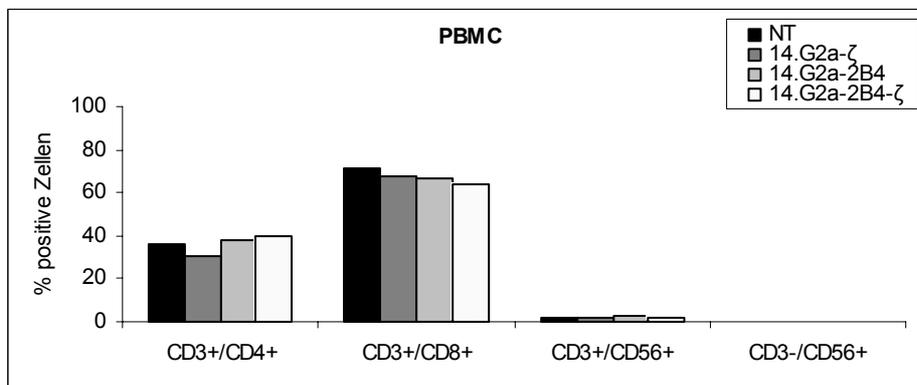
Die durchflusszytometrische Analyse der transduzierten PBMC zeigte, dass für den chimären Rezeptor 14.G2a- $\zeta$  eine Transduktionseffizienz von bis zu 65% [51 $\pm$ 12] und für den chimären Rezeptor 14.G2a-2B4 eine Transduktionseffizienz von bis zu 83% [70 $\pm$ 15] erzielt werden konnte. Für die Transduktion mit dem chimären Rezeptor 14.G2a-2B4- $\zeta$  war eine Transduktionseffizienz von bis zu 67% [53 $\pm$ 7] nachweisbar (Abb. 3.14).



**Abb. 3.14: Transduktionseffizienzen der 14.G2a-2B4 und 14.G2a-2B4- $\zeta$  transduzierten PBMC.** Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Transduktionseffizienzen für die verschiedenen chimären Rezeptoren (n=7).

#### 3.5.2 Immunphänotypisierung der transduzierten PBMC

Durch den Vergleich des Immunphänotyps von transduzierten und nicht-transduzierten Zellen konnte eine Veränderung der Zellen durch die Expression der chimären Rezeptoren ausgeschlossen werden. Wie Abbildung 3.15 an dem Beispiel einer Linie zeigt, gab es auch hier nur sehr geringfügige Schwankungen in der Expression der verschiedenen Oberflächenmarker.



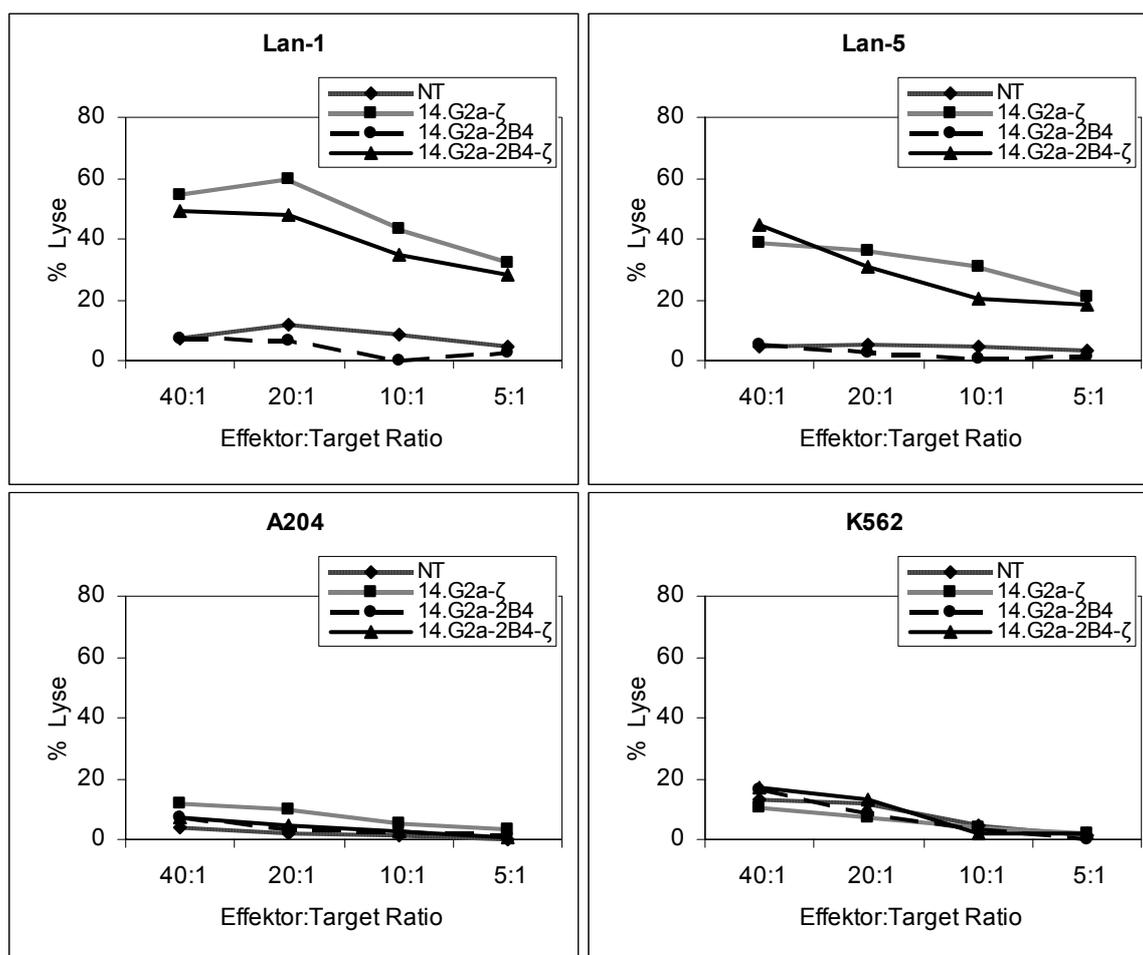
**Abb. 3.15: Vergleich der Immunphänotypen der transduzierten und nicht-transduzierten PBMC.** Die 14 Tage alten PBMC unterscheiden sich nur geringfügig in der Expression der wichtigsten T-Zell-Marker.

### **3.5.3 Funktionelle Untersuchungen der 14.G2a-2B4 und 14.G2a-2B4- $\zeta$ transduzierten PBMC**

Nach erfolgreicher Transduktion und dem durchflusszytometrischen Nachweis der Oberflächenexpression der chimären Rezeptoren, wurden die funktionellen Untersuchungen bezüglich Zytotoxizität, Zytokin-Sekretion (IFN- $\gamma$ ) und klonaler Proliferation auch mit den 14.G2a-2B4 und 14.G2a-2B4- $\zeta$  transduzierten PBMC durchgeführt.

#### **3.5.3.1 14.G2a-2B4- $\zeta$ transduzierten PBMC lysieren spezifisch G<sub>D2</sub>-positive Tumorzellen**

Wie Abbildung 3.16 zeigt, wurden von den radioaktiv markierten Tumorzellen nur die G<sub>D2</sub>-positiven Neuroblastomzelllinien Lan-1 und Lan-5 von den 14.G2a- $\zeta$  und den 14.G2a-2B4- $\zeta$  transduzierten PBMC lysiert, nicht-transduzierte und 14.G2a-2B4 transduzierte PBMC waren nicht in der Lage, Lan-1 oder Lan-5 Zellen zu erkennen und zu lysieren. Die G<sub>D2</sub>-negative Rhabdomyosarkomzelllinie A204 wurde weder von den transduzierten PBMC noch von den nicht-transduzierten PBMC erkannt. Auch die NK-Zell sensitive Leukämiezelllinie K562 konnte selbst bei der höchsten Effektor zu Target Ratio von 40:1 in den Effektorzellen eine nur unwesentliche zytotoxische Aktivität hervorrufen. In Tabelle 3.3 wird die spezifische Zielzellyse von G<sub>D2</sub>-positiven Tumorzelllinien durch 14.G2a-2B4 und 14.G2a-2B4- $\zeta$  transduzierte PBMC mit der durch nicht-transduzierte oder 14.G2a- $\zeta$  transduzierte PBMC für verschiedene Spender verglichen. Dabei sieht man, genau wie in Abbildung 3.16, eine sehr ähnliche Zielzellyse der beiden chimären Rezeptoren 14.G2a- $\zeta$  und 14.G2a-2B4- $\zeta$ , während der chimäre Rezeptor 14.G2a-2B4 bei keinem Spender in der Lage war, spezifisch G<sub>D2</sub>-positive Zellen zu erkennen und zu lysieren. Die Integration der Signaltransduktionsdomäne von 2B4 hatte also keinen Einfluss auf Spezifität und Ausmaß der zytolytischen Effektorantwort. In Abwesenheit der  $\zeta$ -Kette weist 2B4 allein keine T-Zell-stimulierenden Eigenschaften auf.



**Abb. 3.16:** Analyse der zytotoxischen Eigenschaften 14.G2a-2B4 und 14.G2a-2B4- $\zeta$  transduzierter PBMC im  $^{51}\text{Chrom}$ -Assay. Die Effektorzellen wurden mit den  $^{51}\text{Chrom}$ -markierten Tumorzellen für 4 Stunden mit Effektor:Target Ratios von 40:1 bis 5:1 koinkubiert. Nur die 14.G2a- $\zeta$  und 14.G2a-2B4- $\zeta$  transduzierten PBMC waren in der Lage,  $\text{G}_{\text{D}2}$ -positive Tumorzellen spezifisch zu lysieren.

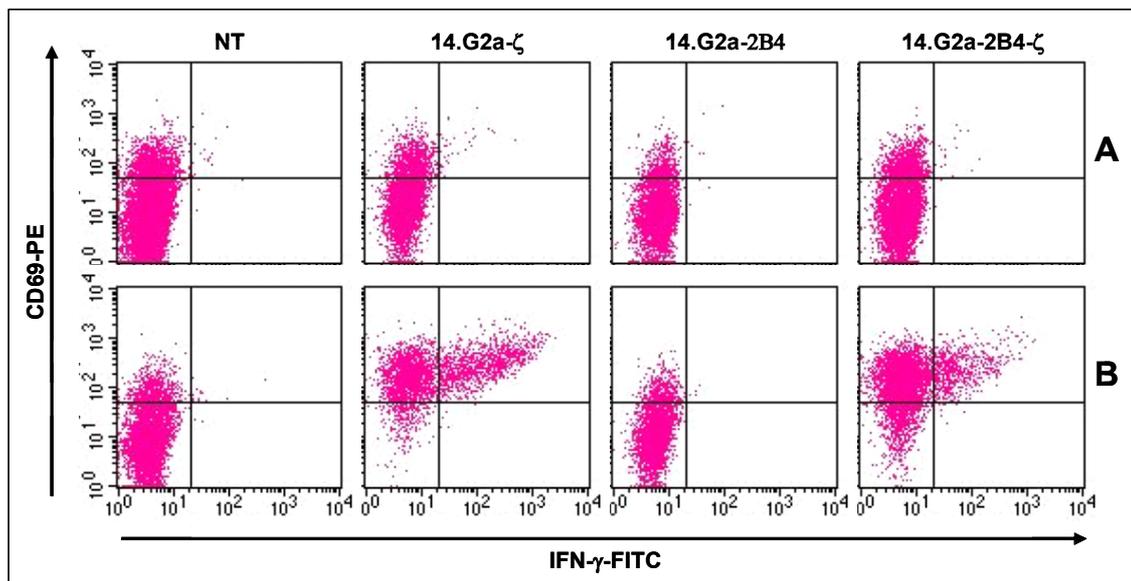
**Tab. 3.3:** Zytotoxizität der transduzierten PBMC gegen  $\text{G}_{\text{D}2}$ -positive Tumorzellen bei einer Effektor:Target-Ratio von 40:1.

Linie	Tumorzellen	NT	14.G2a- $\zeta$	14.G2a-2B4	14.G2a-2B4- $\zeta$
A	Lan-1	7%	54%	7%	47%
	Lan-5	4%	39%	5%	45%
B	Lan-1	4%	44%	3%	47%
	Lan-5	5%	35%	3%	47%
C	Lan-1	11%	57%	n.b.	48%
	Lan-5	8%	57%	n.b.	40%

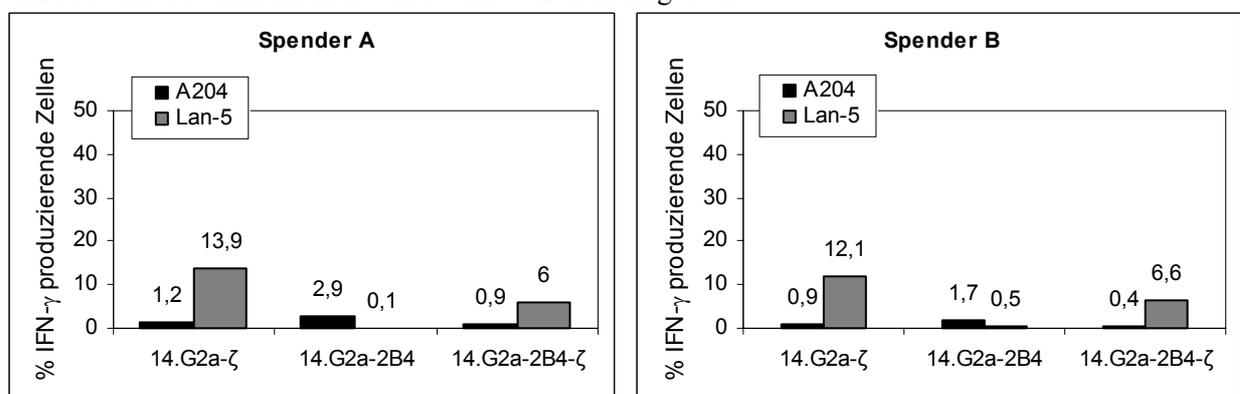
n.b.= nicht bestimmt

### 3.5.3.2 14.G2a-2B4- $\zeta$ transduzierte PBMC sezernieren IFN- $\gamma$ nach Koinkubation mit G<sub>D2</sub>-positiven Tumorzellen

Die Analyse der IFN- $\gamma$  Produktion wurde wie in Abschnitt 3.4.3.2 beschrieben durchgeführt. Wie in den Abbildungen 3.17 und 3.18 zu erkennen ist, produzierten nur die 14.G2a- $\zeta$  und die 14.G2a-2B4- $\zeta$  transduzierten PBMC nach einer Aktivierung durch die G<sub>D2</sub>-positiven Zellen IFN- $\gamma$ , während die Koinkubation mit den G<sub>D2</sub>-negativen A204 nicht zu einer Aktivierung und damit einhergehender IFN- $\gamma$  Produktion der transduzierten PBMC führte. Die nicht-transduzierten und 14.G2a-2B4 transduzierten PBMC wurden weder durch Lan-5 noch durch A204 aktiviert. Der Vergleich zwischen den beiden Spendern in Abbildung 3.18 zeigt, dass der Anteil an IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen für den chimären Rezeptor 14.G2a-2B4- $\zeta$  um etwa die Hälfte geringer ausfiel, als für den chimären Rezeptor 14.G2a- $\zeta$ .



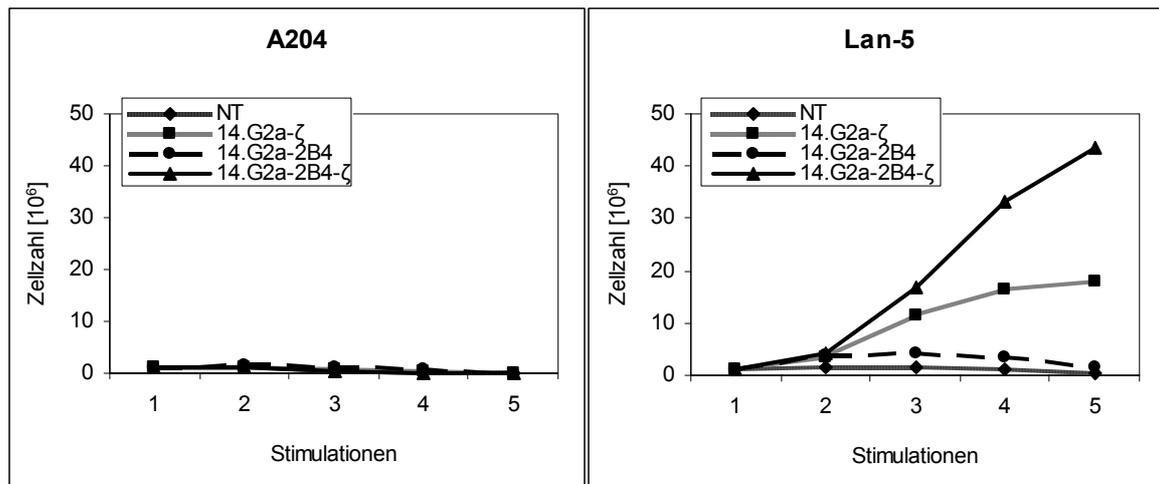
**Abb. 3.17: Intrazelluläre IFN- $\gamma$  Färbung der 14.G2a-2B4 und 14.G2a-2B4- $\zeta$  transduzierten PBMC.** Die 14.G2a- $\zeta$ , 14.G2a-2B4 und 14.G2a-2B4- $\zeta$  transduzierten PBMC wurden nach einer Koinkubation mit A204 (A) bzw. Lan-5 (B) permeabilisiert und gefärbt. Für die transduzierten PBMC sind ausschließlich die CD3+ 1A7+ Zellen dargestellt.



**Abb. 3.18: Vergleich der intrazellulären IFN- $\gamma$  Färbung zweier Spender.** Für die transduzierten PBMC wurden ausschließlich die CD3+ 1A7+ Zellen gemessen.

### 3.5.3.3 2B4-vermittelte Kostimulation befähigt 14.G2a-2B4- $\zeta$ transduzierte PBMC zur klonalen Proliferation

Die Versuche zur Expansion wurden wie in Abschnitt 3.4.3.3 beschrieben durchgeführt. Da 14.G2a-2B4 und 14.G2a-2B4- $\zeta$  genau wie die 14.G2a- $\zeta$  transduzierte PBMC einen IL-2-Entzug nicht tolerierten, wurde hier darauf verzichtet. Wie man in Abbildung 3.19 sehen kann, konnten die 14.G2a-2B4- $\zeta$  transduzierten PBMC durch eine Stimulation über den chimären Rezeptor mit den G<sub>D2</sub>-positiven Neuroblastomzellen expandiert werden. Für die 14.G2a- $\zeta$  transduzierten PBMC zeigte sich eine geringfügige Expansion nach Stimulation mit den Lan-5 Zellen, diese war jedoch in allen Experimenten um mindestens die Hälfte geringer als die Expansion der 14.G2a-2B4- $\zeta$  transduzierten PBMC. Die 14.G2a-2B4 transduzierten PBMC hingegen konnten unter diesen Bedingungen nicht expandiert werden. Aufgrund der bisher erzielten Ergebnisse ist anzunehmen, dass, obwohl eine Stimulation über den Rezeptor 2B4 nicht aktivierend wirkt, durch die Signaltransduktionsdomäne von 2B4 im chimären Rezeptor 14.G2a-2B4- $\zeta$  ein ausreichendes, kostimulatorisches Signal transduziert werden kann.



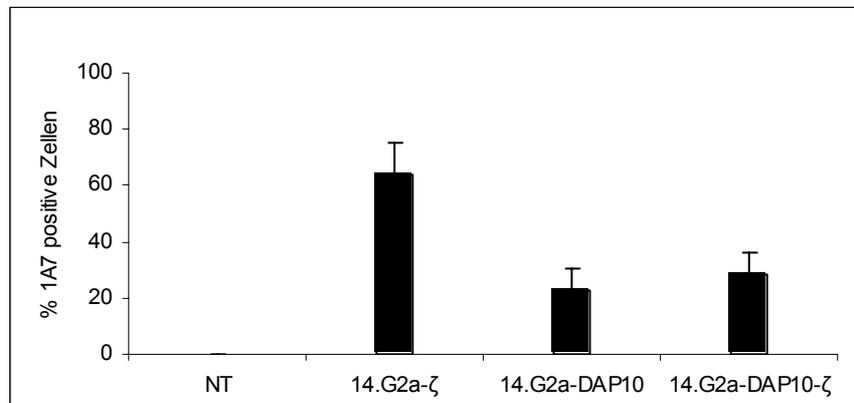
**Abb. 3.19: Expansion der 14.G2a-2B4 und 14.G2a-2B4- $\zeta$  transduzierten PBMC nach Antigenkontakt.** Die PBMC wurden wöchentlich mit Lan-5 oder A204 restimuliert. Die Expansion der Zellen wurde wöchentlich ermittelt, tote Zellen dabei durch eine Färbung mit Trypanblau ausgeschlossen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von fünf.

### 3.6 14.G2a-DAP10 und 14.G2a-DAP10- $\zeta$ transduzierte PBMC

Die aktivierten PBMC wurden mit den retrovirushaltigen Überständen der generierten Produktionszelllinien FLYRD18/SFG:14.G2a- $\zeta$ , FLYRD18/SFG:14.G2a-DAP10 und FLYRD18/SFG:14.G2a-Dap10- $\zeta$  transduziert (vgl. Abschnitt 3.3).

#### 3.6.1 Expression der chimären Rezeptoren und Transduktionseffizienz

Für die Transduktion mit dem chimären Rezeptor 14.G2a-DAP10 konnte eine stabile Transduktionseffizienz von bis zu 40% [23 $\pm$ 8] und mit dem chimären Rezeptor 14.G2a-DAP10- $\zeta$  eine stabile Transduktionseffizienz von bis zu 44% [29 $\pm$ 8] ermittelt werden. Für die Transduktion mit dem chimären Rezeptor 14.G2a- $\zeta$  war eine stabile Transduktionseffizienz von bis zu 86% [64 $\pm$ 12] nachweisbar (Abb. 3.20).

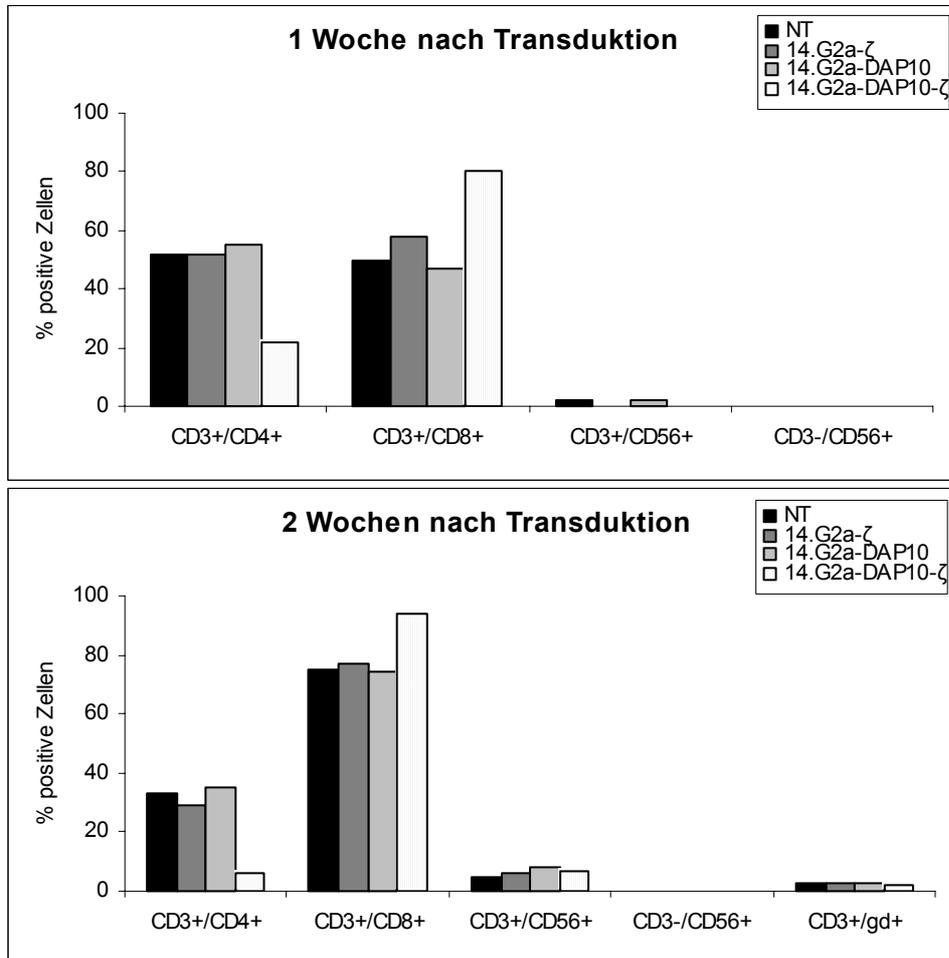


**Abb. 3.20: Transduktionseffizienzen der 14.G2a-DAP10 und 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten PBMC.** Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Transduktionseffizienzen für die verschiedenen chimären Rezeptoren (n=6).

#### 3.6.2 Immunphänotypisierung der 14.G2a-DAP10 und 14.G2a-DAP10- $\zeta$ transduzierten PBMC

Im Unterschied zu den vorher untersuchten chimären Rezeptoren zeigte der Vergleich des Immunphänotyps von transduzierten und nicht-transduzierten PBMC eine Veränderung der Verteilung der T-Zellsubpopulationen für die 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten PBMC. Während eine Woche nach der Transduktion die nicht-transduzierten, die 14.G2a- $\zeta$  transduzierten und auch die 14.G2a-DAP10 transduzierten PBMC einen Immunphänotyp zeigten, bei dem die Anteile der CD4<sup>+</sup> T-Zellen ungefähr dem Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen entsprach, sah man für die 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten PBMC einen etwa 80%igen Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 3.21). Zwei Wochen nach der Transduktion lag dieser Anteil bei mehr als 95%. Die Expression des chimären Rezeptors 14.G2a-DAP10- $\zeta$  führt innerhalb von zwei Wochen zu einem fast reinen CD8<sup>+</sup> Immunphänotyp. Die Expression des chimären Rezeptors 14.G2a-DAP10 hatte dagegen keinen Einfluss auf den Phänotyp

der PBMC, dieser war zu jedem Zeitpunkt der Kultur mit dem Phänotyp der nicht-transduzierten PBMC vergleichbar.



**Abb. 3.21:** Vergleich des Immunphänotyps der 14.G2a-DAP10 und 14.G2a-DAP10-ζ transduzierten PBMC eine Woche und zwei Wochen nach Transduktion am Beispiel einer Linie. Schon eine Woche nach der Transduktion lag der Anteil an CD8+ T-Zellen der 14.G2a-DAP10-ζ transduzierten PBMC bei mehr als 80%.

### **3.6.3 Funktionelle Untersuchungen der 14.G2a-DAP10 und 14.G2a-DAP10- $\zeta$ transduzierten PBMC**

Die 14.G2a-DAP10 und 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten PBMC wurden nach Überprüfung der Transduktionseffizienz bezüglich ihrer Effektorfunktionen Zytotoxizität und Zytokin-Sekretion (IFN- $\gamma$ ) untersucht. Ihre Fähigkeit nach Stimulation mit antigenpositiven Tumorzellen zu proliferieren, wurde wegen der Änderung des Immunphänotyps und der im Folgenden beschriebenen hohen Unspezifität der 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten PBMC nicht untersucht.

#### **3.6.3.1 14.G2a-DAP10- $\zeta$ transduzierte PBMC lysieren G<sub>D2</sub>-positive, aber auch G<sub>D2</sub>-negative Tumorzellen**

Die Koinkubation der 14.G2a-DAP10 und 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten PBMC mit <sup>51</sup>Chrom markierten, G<sub>D2</sub>-positiven und G<sub>D2</sub>-negativen Tumorzellen zeigte eine hohe unspezifische Zytotoxizität der 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten PBMC gegen G<sub>D2</sub>-negative Tumorzelllinien. Auffällig war dabei die hohe unspezifische Zytotoxizität gegen die NK-Zell sensitive Linie K562 (Tab. 3.4). In Abbildung 3.22 ist am Beispiel eines Versuches die Zielzelllyse nach Koinkubation von 14.G2a- $\zeta$ , 14.G2a-DAP10 und 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten PBMC mit den beiden G<sub>D2</sub>-positiven Neuroblastomzelllinien Lan-1 und JF und zwei G<sub>D2</sub>-negativen Zelllinien, der lymphoblastoiden B-Zelllinie Raji und der Leukämiezelllinie K562 zu sehen. Die Lan-1 und JF Zellen wurden nur von den 14.G2a- $\zeta$  und den 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten PBMC erkannt und lysiert, dabei scheinen die 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten PBMC die Neuroblastomzellen genauso gut oder besser als die 14.G2a- $\zeta$  transduzierten PBMC lysieren zu können (siehe auch Tabelle 3.4). Obwohl auch die 14.G2a- $\zeta$  transduzierten PBMC die NK-Zell-sensitive Linie K562 bei der höchsten Effektor zu Target Ratio von 40:1 schwach lysierten, fällt besonders die hohe unspezifische Zytotoxizität der 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten PBMC gegenüber den K562-Zellen auf. Die 14.G2a-DAP10 transduzierten PBMC waren weder in der Lage die G<sub>D2</sub>-positiven Zellen zu lysieren, noch zeigten sie eine unspezifische Zytotoxizität gegen die K562-Zellen. Die Zelllinie Raji ist nur wenig sensitiv für eine NK-Zell vermittelte Lyse und wurde auch von den 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten PBMC nicht erkannt.

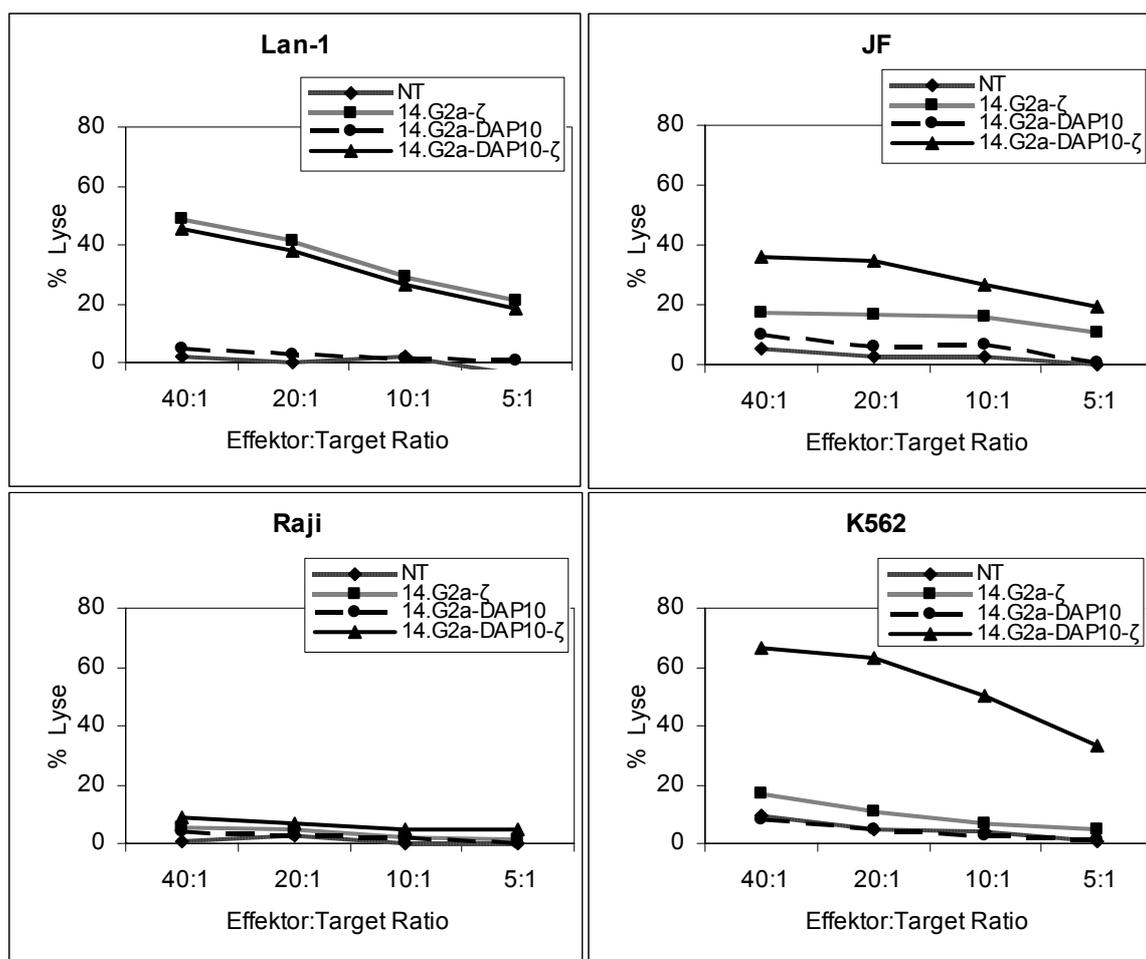


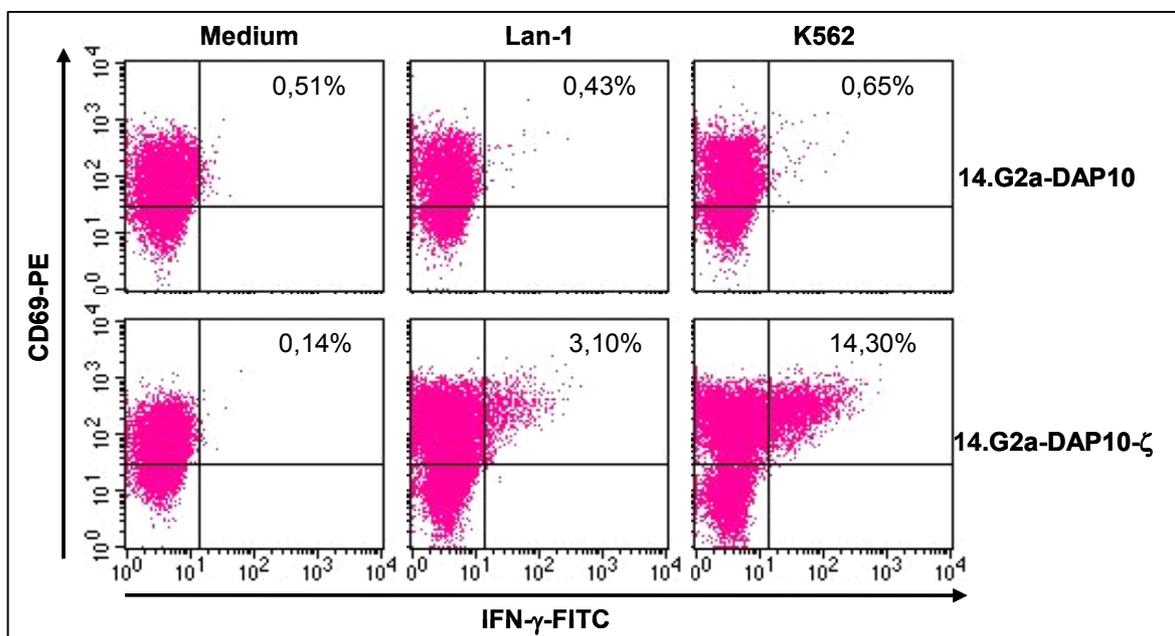
Abb. 3.22: Analyse der zytotoxischen Eigenschaften 14.G2a-DAP10 und 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierter PBMC im  $^{51}\text{Chrom}$ -Assay. Die Effektorzellen wurden mit den  $^{51}\text{Chrom}$ -markierten Tumorzellen für 4 Stunden mit Effektor:Target Ratios von 40:1 bis 5:1 inkubiert.

Tab. 3.4: Zytotoxizität der transduzierten PBMC Tumorzellen bei einer Effektor:Target-Ratio von 40:1.

Linie	Tumorzellen	NT	14.G2a- $\zeta$	14.G2a-DAP10	14.G2a-DAP10- $\zeta$
A	Lan-1	2%	49%	4%	45%
	JF	6%	18%	10%	36%
	<b>K562</b>	<b>10%</b>	<b>17%</b>	<b>8%</b>	<b>66%</b>
B	Lan-1	0%	51%	9%	37%
	JF	10%	48%	8%	72%
	<b>K562</b>	<b>8%</b>	<b>13%</b>	<b>9%</b>	<b>49%</b>
C	Lan-1	5%	42%	8%	49%
	JF	7%	39%	8%	47%
	<b>K562</b>	<b>8%</b>	<b>4%</b>	<b>18%</b>	<b>41%</b>
D	Lan-1	0%	29%	13%	46%
	<b>K562</b>	<b>8%</b>	<b>13%</b>	<b>17%</b>	<b>69%</b>

### 3.6.3.2 14.G2a-DAP10- $\zeta$ transduzierte PBMC produzieren unspezifisch IFN- $\gamma$

Die durchflusszytometrische Bestimmung der IFN- $\gamma$  Produktion der 14.G2a-DAP10 und 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten PBMC bestätigte die Ergebnisse der Zytotoxizitätsversuche. Erneut zeigte sich die unspezifische Aktivierung der 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten PBMC durch eine Stimulation mit K562 Zellen. Wie man in Abbildung 3.23 sehen kann, war die IFN- $\gamma$  Produktion der 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten PBMC nach der Stimulation mit K562 Zellen mehr als viermal so stark, als nach der Stimulation mit den Lan-1 Zellen. Die 14.G2a-DAP10 transduzierten PBMC wurden weder durch eine Stimulation mit den Lan-1 Zellen, noch durch eine Stimulation mit den K562 Zellen aktiviert.



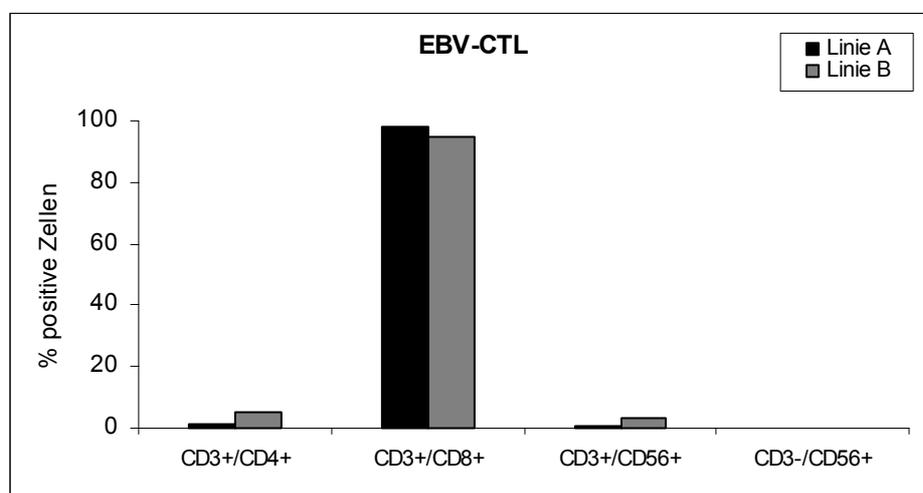
**Abb. 3.23: Intrazelluläre IFN- $\gamma$  Färbung der 14.G2a-DAP10 und 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten PBMC.** Die 14.G2a-DAP10 und 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten PBMC wurden nach einer Koinkubation mit Lan-1 bzw. K562 permeabilisiert und gefärbt. Für die transduzierten PBMC sind ausschließlich die CD3+ 1A7+ Zellen dargestellt. Aufgetragen in den Dot Blots ist der Aktivierungsmarker CD69 gegen den IFN- $\gamma$ -Antikörper. Es zeigte sich eine unspezifische IFN- $\gamma$  Produktion der 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten PBMC nach Stimulation mit K562 Zellen.

### 3.7 Transduktion und Kultivierung von EBV-CTL

Zur Transduktion von EBV-CTL wurden zunächst PBMC aus dem Blut gesunder Spender isoliert und wöchentlich mit bestrahlten autologen LCL (Lymphoblastoide Zelllinie, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Cliona Rooney, USA) stimuliert. Die Transduktion erfolgte dann 24 Stunden nach der dritten Restimulation. Die Effizienz der Transduktion wurde mit dem Antikörper 1A7 durchflusszytometrisch überprüft.

#### 3.7.1 Immunphänotypisierung von EBV-CTL

Auch die aus PBMC generierten EBV-CTL enthielten zu Beginn der Kultur neben CD8+ T-Zellen auch noch CD4+ T-Zellen und Anteile von B-Zellen, Granulozyten, TCR $\gamma\delta$  T-Zellen und NK-Zellen. Durch die wöchentliche Stimulation mit den autologen LCL wurden ausschließlich EBV-spezifische, zytotoxische T-Zellen zur Proliferation angeregt. Zum Zeitpunkt der fünften Restimulation, zu dem die EBV-CTL für die Versuche eingesetzt wurden, zeigte sich für alle Spender ein überwiegend CD3+ CD8+ Phänotyp. In Abbildung 3.24 ist die phänotypische Charakterisierung von zwei EBV-CTL-Linien nach der fünften Restimulation dargestellt. Der Anteil der CD8+ T-Zellen lag bei mehr als 95%, die Linien enthielten nur noch wenige CD4+ T-Zellen (weniger als 5%) und geringe Mengen an NK-T-Zellen (weniger als 3%).



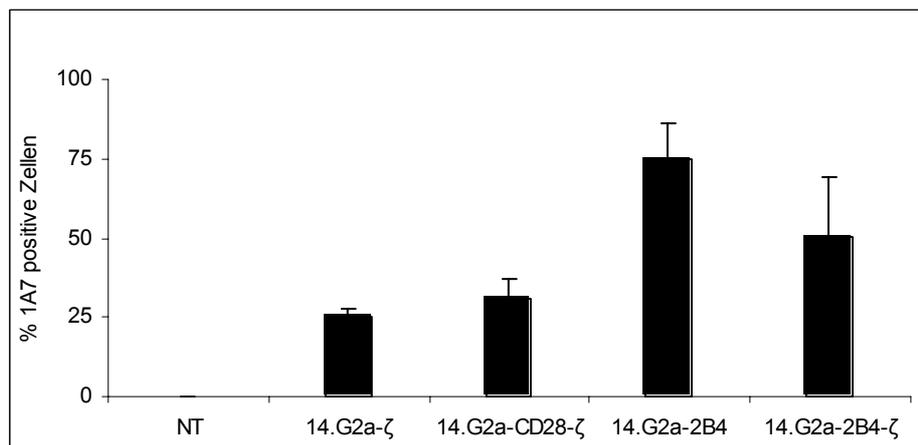
**Abb. 3.24: Immunphänotypisierung von EBV-CTL-Linien.** In den Linien überwog der Anteil an CD3+ CD8+ T-Zellen, während der Anteil an CD3+ CD4+ T-Zellen nur noch sehr gering war.

### 3.8 14.G2a- $\zeta$ , 14.G2a-CD28- $\zeta$ , 14.G2a-2B4 und 14.G2a-2B4- $\zeta$ transduzierte EBV-CTL

Die durch die wöchentliche Stimulation mit autologen LCL generierten EBV-spezifischen CTL wurden mit dem retrovirushaltigen Überstand der jeweiligen Produktionszelllinien für die chimären Rezeptoren transduziert.

#### 3.8.1 Expression der chimären Rezeptoren und Transduktionseffizienz

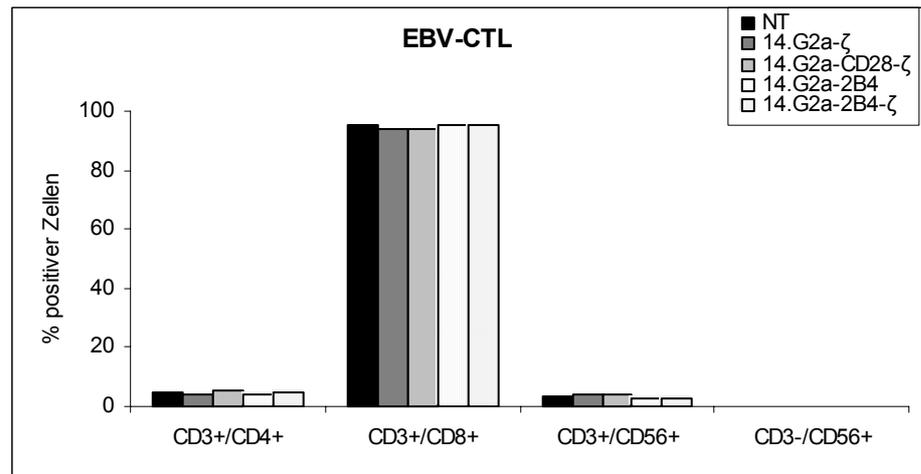
Die Expression der chimären Rezeptoren und die erzielte Transduktionseffizienz wurde durch die Oberflächenfärbung mit dem 14.G2a-spezifischen Antikörper 1A7 überprüft. Wie Abbildung 3.25 zeigt, konnte für 14.G2a- $\zeta$  eine stabile Transduktionseffizienz von bis zu 28% [25 $\pm$ 3] erzielt werden und für 14.G2a-CD28- $\zeta$  eine Transduktionseffizienz von bis zu 40% [31 $\pm$ 7]. Für 14.G2a-2B4 wurde eine Transduktionseffizienz von bis zu 86% [75 $\pm$ 11] und für 14.G2a-2B4- $\zeta$  von bis zu 76% [50 $\pm$ 19] ermittelt.



**Abb. 3.25: Transduktionseffizienzen der EBV-CTL nach retroviralem Transfer der chimären Rezeptoren.** Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Transduktionseffizienzen für 14.G2a- $\zeta$ , 14.G2a-CD28- $\zeta$ , 14.G2a-2B4 und 14.G2a-2B4- $\zeta$  (n=3).

### 3.8.2 Immunphänotypisierung der transduzierten EBV-CTL

Durch den Vergleich des Immunphänotyps von transduzierten und nicht-transduzierten EBV-CTL sollte eine Veränderung der Zellen durch die Expression der chimären Rezeptoren ausgeschlossen werden. Abbildung 3.26 zeigt am Beispiel einer Linie, dass die Expression der verschiedenen Oberflächenmarker nur geringfügig zwischen den nicht-transduzierten und transduzierten EBV-CTL schwankte. Die Expression der chimären Rezeptoren hatte also keinen Einfluss auf den Phänotyp der untersuchten T-Zellen.



**Abb. 3.26: Vergleich der Immunphänotypen der transduzierten und nicht-transduzierten EBV-CTL.** Die nach der fünften Stimulation untersuchten EBV-CTL unterscheiden sich nur sehr geringfügig in der Expression der wichtigsten T-Zell-Marker.

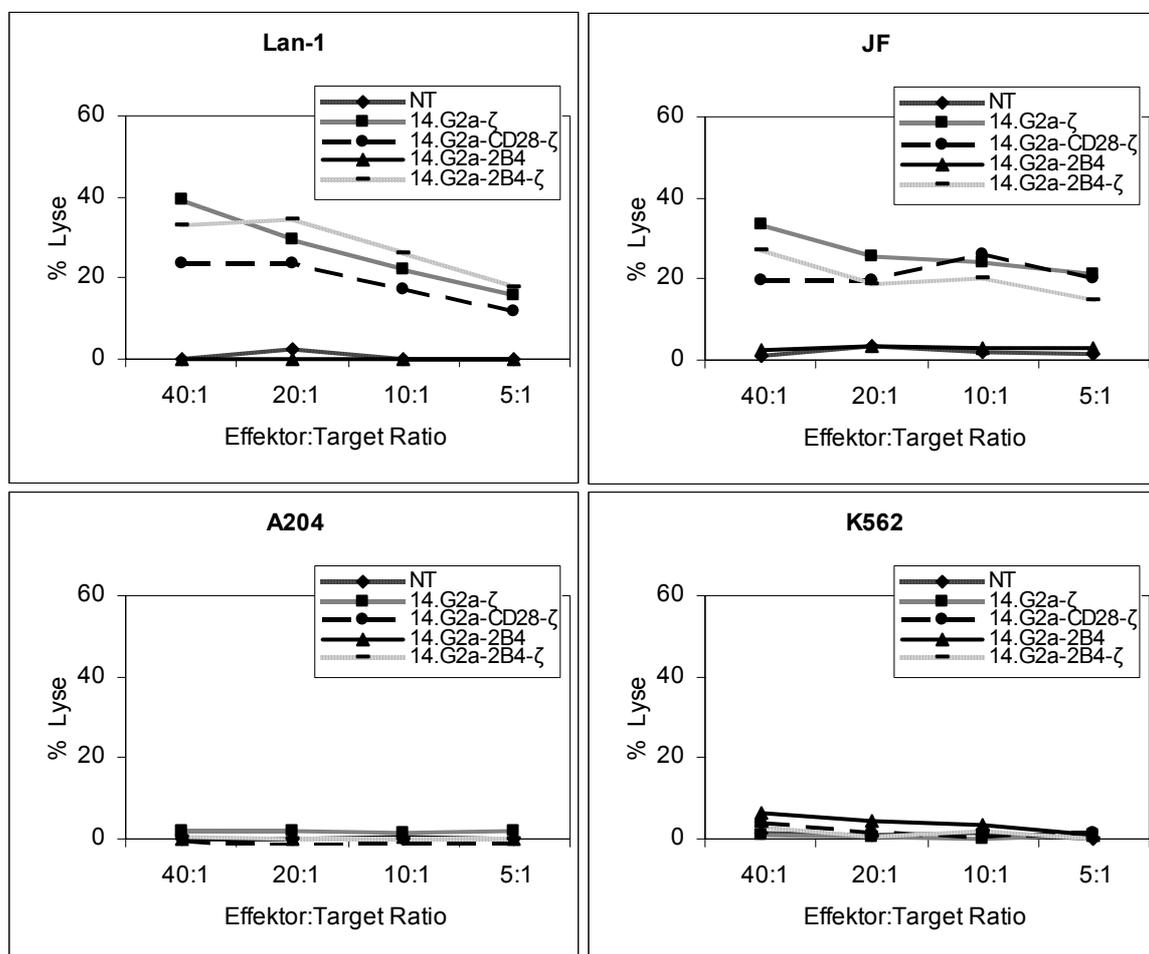
### 3.8.3 Funktionelle Untersuchungen der transduzierten EBV-CTL

Nach der durchflusszytometrischen Analyse der Oberflächenexpression der chimären Rezeptoren, wurden die 14.G2a-ζ, 14.G2a-CD28-ζ, 14.G2a-2B4 und 14.G2a-2B4-ζ transduzierten EBV-CTL auf ihre Effektorfunktionen bezüglich Zytotoxizität, Zytokinsekretion (IFN-γ) und klonaler Proliferation untersucht.

#### 3.8.3.1 EBV-CTL lysieren nach Transduktion mit 14.G2a-ζ, 14.G2a-CD28-ζ oder 14.G2a-2B4-ζ spezifisch G<sub>D2</sub>-positive Tumorzellen

Die transduzierten EBV-CTL wurden wie in Abschnitt 3.4.3.1 beschrieben mit <sup>51</sup>Chrom markierten Tumorzellen inkubiert und ihre zytotoxischen Eigenschaften mittels Quantifizierung des freigesetzten radioaktiven Chrms analysiert. Wie Abbildung 3.27 zeigt, wurden genau wie bei den 14.G2a-ζ, 14.G2a-CD28-ζ und 14.G2a-2B4-ζ transduzierten PBMC nur die G<sub>D2</sub>-positiven Neuroblastomzelllinien Lan-1 und Lan-5 von den transduzierten EBV-CTL lysiert, wobei der chimäre Rezeptor 14.G2a-2B4 ohne den signaltransduzierenden Anteil der ζ-Kette wieder nicht in der Lage war, Tumorzellen zu

lysieren. Die  $G_{D2}$ -negative Rhabdomyosarkomzelllinie A204 wurde von den Effektorzellen nicht erkannt, und die nicht-transduzierte EBV-CTL konnten weder die Neuroblastomzellen noch die Rhabdomyosarkomzellen lysieren. Die NK-Zell-sensitive Leukämiezelllinie K562 rief selbst bei der höchsten Effektor zu Target Ratio von 40:1 in den Effektorzellen nur eine unwesentliche zytotoxische Aktivität hervor. In Tabelle 3.5 wird die spezifische Zielzelllyse von  $G_{D2}$ -positiven Tumorzelllinien durch die transduzierten EBV-CTL mit der durch nicht-transduzierte oder 14.G2a- $\zeta$  transduzierte EBV-CTL für verschiedene Spender verglichen. Dabei sieht man eine sehr ähnliche Lyseeffizienz der chimären Rezeptoren 14.G2a- $\zeta$ , 14.G2a-CD28- $\zeta$  und 14.G2a-2B4- $\zeta$ . Vergleichbar mit den in PBMC erhobenen Daten hat eine Kostimulation durch CD28 oder 2B4 keinen Einfluss auf die chRec-vermittelte spezifische Zielzelllyse.



**Abb. 3.27: Analyse der zytotoxischen Eigenschaften der transduzierten EBV-CTL im  $^{51}\text{Chrom}$ -Assay.** Die Effektorzellen wurden mit den  $^{51}\text{Chrom}$ -markierten Tumorzellen für 4 Stunden mit Effektor:Target Ratios von 40:1 bis 5:1 kokubiert. Nur die 14.G2a- $\zeta$ , 14.G2a-CD28- $\zeta$  und 14.G2a-2B4- $\zeta$  transduzierten EBV-CTL waren in der Lage  $G_{D2}$ -positive Tumorzellen spezifisch zu lysieren.

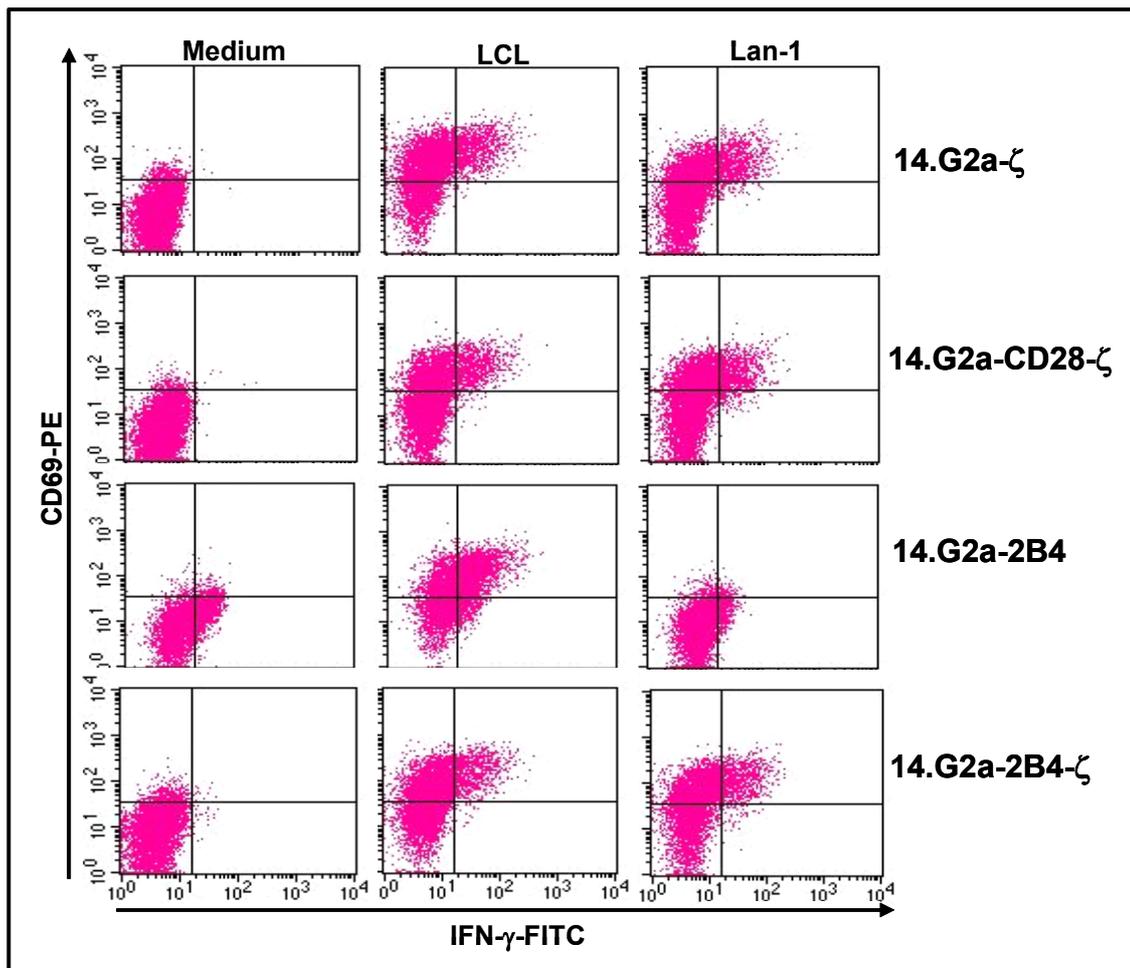
**Tab. 3.5: Zytotoxizität der transduzierten EBV-CTL gegen G<sub>D2</sub>-positive Tumorzellen bei einer Effektor:Target-Ratio von 40:1.**

Linie	Tumorzellen	NT	14.G2a-ζ	14.G2a-CD28-ζ	14.G2a-2B4	14.G2a-2B4-ζ
A	Lan-1	0%	39%	24%	0%	33%
	JF	1%	33%	19%	2,4%	27%
B	Lan-1	7%	23%	31%	7,3%	59%
	Lan-5	4%	30%	22%	1,2%	58%
C	Lan-1	0%	39%	22%	n.b.	34%
	Lan-5	0%	35%	60%	n.b.	33%

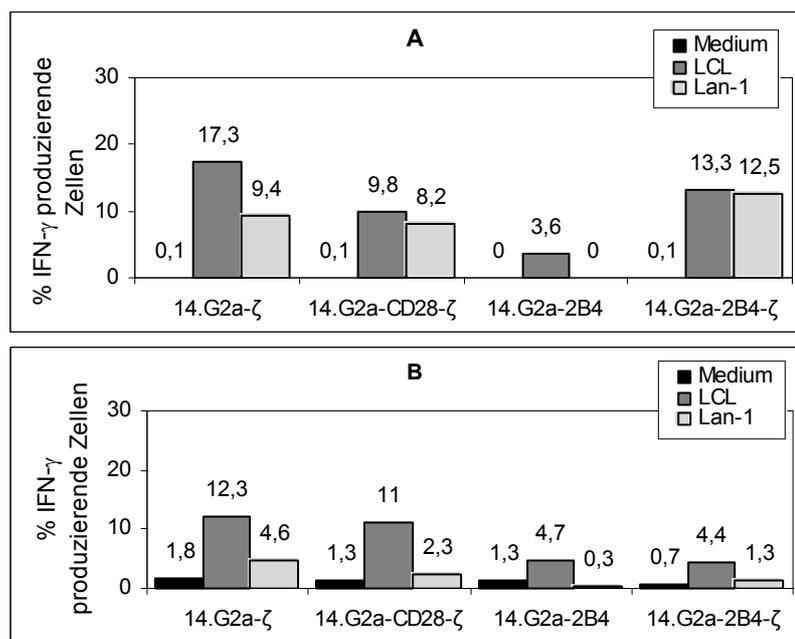
n.b.=nicht bestimmt

### 3.8.3.2 EBV-CTL produzieren nach Transduktion mit 14.G2a-ζ, 14.G2a-CD28-ζ oder 14.G2a-2B4-ζ G<sub>D2</sub>-spezifisch IFN-ζ

Zur durchflusszytometrischen Analyse der IFN-γ Sekretion von 14.G2a-CD28-ζ transduzierten EBV-CTL nach Koinkubation mit antigenpositiven Tumorzellen wurden 14.G2a-ζ und 14.G2a-CD28-ζ transduzierten EBV-CTL zunächst mit der G<sub>D2</sub>-positiven Neuroblastomzelllinie Lan-1 und zur Kontrolle nur in Medium inkubiert. Durch eine Koinkubation mit autologen LCL wurde außerdem die Virusspezifität der transduzierten EBV-CTL überprüft. Wie man in den Abbildungen 3.28 und 3.29 an der starken IFN-γ Produktion nach Stimulation mit den autologen LCL sehen kann, waren die transduzierten EBV-CTL über ihre natürliche Spezifität für EBV-infizierte Zellen in hohem Maße aktivierbar. Doch auch die Stimulation über die chimären Rezeptoren 14.G2a-ζ, 14.G2a-CD28-ζ und 14.G2a-2B4-ζ führte zu einer messbaren IFN-γ Produktion. Dabei blieb die Aktivierung der Zellen über den nativen T-Zell-Rezeptor durch autologe LCL der Aktivierung über den jeweiligen chimären Rezeptor durch G<sub>D2</sub>-positive Tumorzellen deutlich überlegen. 14.G2a-2B4 transduzierte EBV-CTL ließen sich nur durch eine Stimulation mit LCL zu einer IFN-γ Produktion anregen. Ein Unterschied in der Aktivierung zwischen den chimären Rezeptoren ist aufgrund der starken Schwankungen zwischen den Spendern nicht bestimmbar.



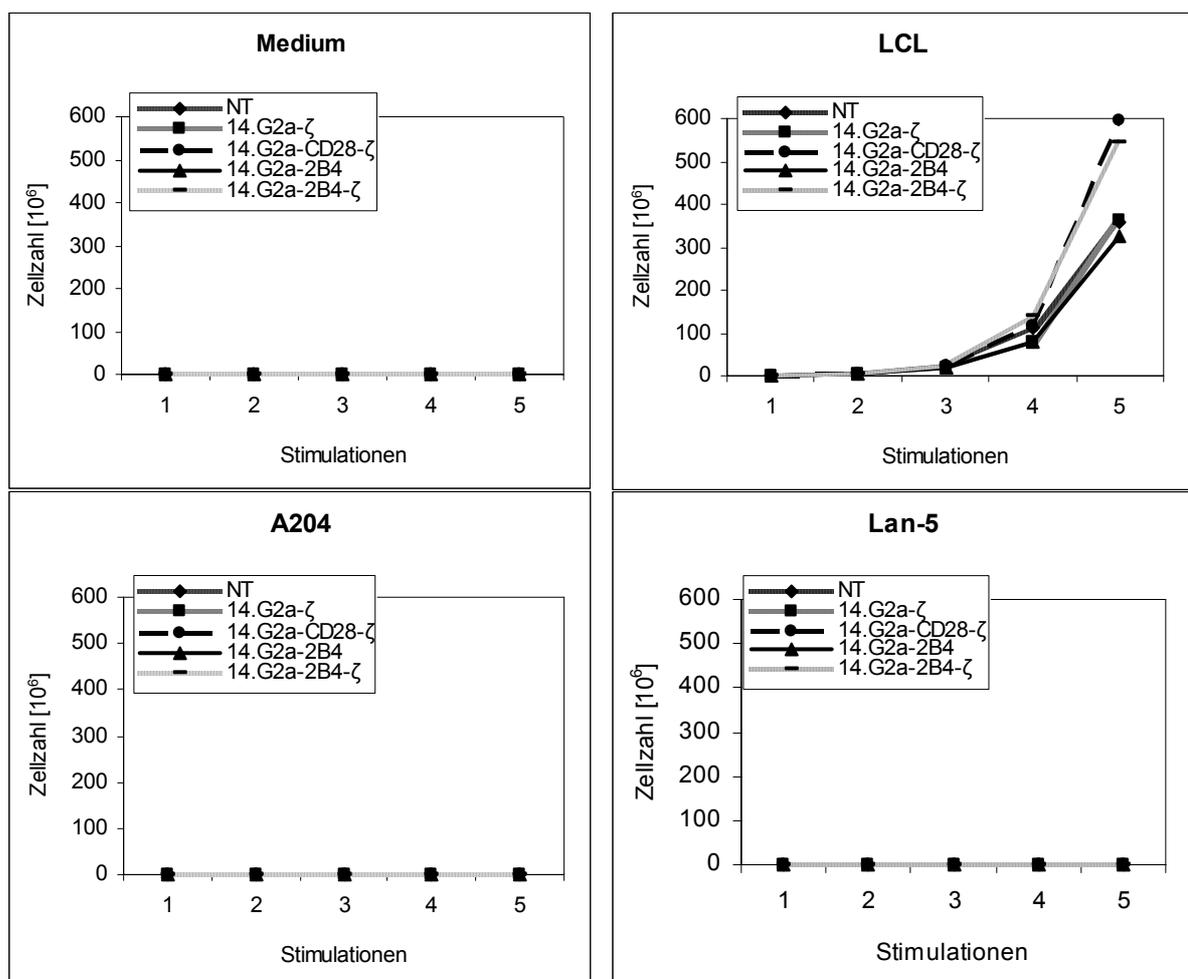
**Abb. 3.28: Intrazelluläre IFN- $\gamma$  Färbung der transduzierten EBV-CTL.** Die 14.G2a- $\zeta$ , 14.G2a-CD28- $\zeta$ , 14.G2a-2B4 und 14.G2a-2B4- $\zeta$  transduzierten CTL wurden nach einer Koinkubation mit Lan-1 bzw. autologen LCL permeabilisiert und gefärbt. Für die transduzierten EBV-CTL sind ausschließlich die CD3+ 1A7+ Zellen dargestellt.



**Abb. 3.29: Vergleich der intrazellulären IFN- $\gamma$  Färbung zweier Spender.** Es wurden ausschließlich die CD3+ 1A7+ EBV-CTL analysiert.

### 3.8.3.3 CD28- oder 2B4-vermittelte Kostimulation reicht nicht aus, transduzierte EBV-CTL zur klonalen Proliferation anzuregen

Die Fähigkeit der mit den verschiedenen chimären Rezeptoren transduzierten EBV-CTL zur klonalen Proliferation nach Antigenkontakt wurde durch eine wöchentliche Stimulation mit Lan-5 Zellen oder autologen LCL untersucht. Zur Kontrolle wurde die Expansion der Zellen ohne Stimulation überprüft. Abbildung 3.30 zeigt, dass keiner der verwendeten chimären Rezeptoren in der Lage war, einen vollständigen Aktivierungsreiz zu transduzieren. Während nicht-transduzierte und transduzierte EBV-CTL gleichermaßen durch eine Stimulation mit autologen LCL zu großen Zellzahlen expandiert werden konnten, reichte die Stimulation mit den Lan-5 Zellen nicht aus, die transduzierten EBV-CTL zur klonalen Proliferation anzuregen. Im Unterschied zu den Ergebnissen mit den PBMC versetzt die Kostimulation über CD28 oder 2B4 virusspezifische CTL also nicht in die Lage, nach Stimulation über den chimären Rezeptor zu proliferieren.



**Abb. 3.30: Expansion der transduzierten EBV-CTL nach Antigenkontakt.** Die EBV-CTL wurden wöchentlich mit Lan-5, A204, autologen LCL oder nur Medium restimuliert. Die Expansion der Zellen wurde wöchentlich ermittelt, tote Zellen dabei durch eine Färbung mit Trypanblau ausgeschlossen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei.

## 4 Diskussion

Die zelluläre Immuntherapie bietet die Möglichkeit, das komplexe und äußerst effektive Immunsystem des Menschen auch zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen zu nutzen. Das Hauptziel ist dabei die Herstellung langlebiger, durch Tumorzellen reaktivierbarer Effektorzellen. Die genetische Modifikation von T-Zellen mit chimären Rezeptoren befähigt sie unabhängig von ihrer natürlichen Spezifität zur Erkennung eines Tumorantigens. Die verminderte Expression von MHC-Molekülen, durch die Tumorzellen erfolgreich dem zellulären Immunsystem ausweichen, wird dabei umgangen. Damit erlauben chimäre Rezeptoren das Erkennen von Tumorantigenen, die nicht im MHC-Kontext präsentiert werden können, wie z.B. das für Neuroblastomzellen typische Gangliosid G<sub>D2</sub> (Rossig et al., 2001). Leider blieben bislang alle klinischen Studien mit adoptiv transferierten, chRec-transduzierten T-Zellen erfolglos (Walker et al., 2000; Mitsuyasu et al., 2000). Da Tumorzellen in der Regel ein sehr eingeschränktes Expressionsmuster von kostimulatorischen Liganden aufweisen, ist das Fehlen von kostimulatorischen Signalen eine sehr wahrscheinliche Ursache für den Funktionalitätsverlust der chRec-transduzierten T-Zellen *in vivo*. Ein Lösungsansatz bestand in der Konstruktion von chimären Rezeptoren, die zusätzlich zur signaltransduzierenden  $\zeta$ -Kette kostimulatorische Domänen enthalten, um den Bedarf an kostimulatorischen Signalen zu decken. Die Stimulation über einen solchen chimären Rezeptor, der zur Kostimulation die Signaltransduktionsdomäne des CD28-Rezeptors enthielt, war im Mausmodell tatsächlich in der Lage, alle Anforderungen an die Aktivierung naiver T-Zellen zu erfüllen (Friedmann-Morvinski et al., 2005). Doch während die Bedeutung der CD28-vermittelten Kostimulation für die Aktivierung naiver T-Zellen unumstritten ist, scheint sie bei der antigenspezifischen Reaktivierung zytotoxischer T-Zellen keine entscheidende Rolle zu spielen (Shahinian et al., 1993; Deeth und Mescher, 1999). Dabei haben sich gerade antigenerfahrene, virusspezifische T-Zellen als potente Effektorzellen bei der Behandlung von virusassoziierten Tumorerkrankungen erwiesen (Bollard et al., 2004; Gottschalk et al., 2005). Doch obwohl die Transduktion mit chimären Rezeptoren EBV- und CMV-spezifischen CTL zu vergleichbaren Effektorfunktionen gegen ihr natives Ziel und gegen Tumorzellen verhalf (Rossig et al., 2002; Heemskeerck et al., 2004), wurde eine vollständige Aktivierung nur durch die Präsentation des Tumorantigens von professionellen Antigen präsentierenden Zellen erzielt (Rossig et al., 2005). Somit scheinen auch antigenerfahrene CTL von kostimulatorischen

Signalen abhängig zu sein. In dieser Arbeit wurden nun chimäre Rezeptoren mit unterschiedlichen Signaltransduktionsdomänen auf ihr Potenzial untersucht, nicht nur relativ antigenunerfahrene PBMC, sondern auch antigenerfahrene EBV-CTL vollständig zu aktivieren.

#### **4.1 Transduktion**

Eine entscheidende Voraussetzung für das Auslösen einer effektiven Antitumorantwort über chimäre Rezeptoren ist eine ausreichende Oberflächenexpression des Rezeptors auf einem möglichst hohen Anteil der T-Zellen. Während die PBMC vor der Transduktion für 48 Stunden unspezifisch über CD3- und CD28-Antikörper aktiviert wurden, mussten die EBV-CTL zunächst wöchentlich mit autologen bestrahlten LCL stimuliert werden. Als optimaler Zeitpunkt für die Transduktion der EBV-CTL hatte sich in vorangegangenen Studien der Tag nach der dritten Restimulation ergeben (Rossig et al., 2002). Durch eine Optimierung der Transduktionsmethode konnten durch die Oberflächenfärbungen mit dem 14.G2a-spezifischen Antikörper 1A7 durchflusszytometrisch stabile Transduktionseffizienzen von mindestens 25% und im besten Fall von bis zu 89% nachgewiesen werden. Zum größten Teil lagen die Transduktionseffizienzen sowohl für die PBMC als auch für die EBV-CTL bei Werten zwischen 40% und 70%. Für alle Konstrukte wurde also eine adäquate Genexpression erreicht. Das erlaubte eine Vergleichbarkeit der mit den untersuchten Rezeptoren erhobenen Ergebnisse.

#### **4.2 Phänotyp**

T-Lymphozyten können in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterschieden werden, die sich in Bezug auf Zytokinsekretion und Zytotoxizität unterscheiden. Während CD8<sup>+</sup> T-Zellen den Hauptteil aller zytotoxischen Lymphozyten stellen, erfüllen CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Zytokinsekretion hauptsächlich immunregulatorische Funktionen (Janeway, 2002). So kam bei den bislang im Rahmen der adoptiven T-Zelltherapie verwendeten unspezifisch aktivierten polyklonalen T-Zellen den CD8<sup>+</sup> T-Zellen die Hauptrolle bei der Ausübung der tumorspezifischen Effektorfunktionen zu, während die Funktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Bereitstellung von IFN- $\gamma$  und IL-2 bestand (Gyobu et al., 2004). Zur Einordnung der untersuchten T-Zellen in einen überwiegend zytotoxischen, oder aber immunregulatorischen Phänotyp wurden die T-Zellen durch eine Untersuchung der Expression von verschiedenen Oberflächenantigenen charakterisiert.

Dazu wurde zum einen der Anteil an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt, zum anderen aber auch der Anteil an NK-Zellen oder NK-T-Zellen, sowie bei den PBMC der Anteil an TCR $\gamma\delta$  T-Zellen. NK-Zellen, NK-T-Zellen und TCR $\gamma\delta$  T-Zellen sind bekannt dafür, dass sie *in vitro* verschiedene Tumorzelllinien unspezifisch lysieren können (Lanier, 2005; Veneris et al., 2004; Chen und Letvin, 2003), daher war eine Bestimmung des Anteils dieser Zellen in den untersuchten T-Zell-Kulturen für die Auswertung der in den Versuchen erzielten Ergebnissen von Bedeutung.

Die PBMC, aber auch die EBV-CTL, beginnen mit einem Immunphänotyp der kurz nach der Isolation der T-Zellen durch einen überwiegenden Anteil an CD4 koexprimierenden T-Zellen charakterisiert ist. Sowohl die unspezifische Aktivierung der PBMC, als auch die spezifische Stimulation der EBV-CTL mit autologen LCL begünstigt vor allem die Proliferation von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die Untersuchungen zu den tumorspezifischen Effektorfunktionen der T-Zellen erfolgte frühestens eine Woche nach der Transduktion. Zu diesem Zeitpunkt zeichneten sich die PBMC durch einen bis zu 80%igen CD8<sup>+</sup> Phänotyp aus, gefolgt vom Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit 20% - 50%. Die EBV-CTL wurden hingegen von den CD8<sup>+</sup> T-Zellen dominiert, der Anteil an CD4<sup>+</sup> T-Zellen lag bei weniger als 5%. Für beide T-Zell-Kulturen lag der Anteil an NK-Zellen unter 1%, während der Anteil an NK-T-Zellen oder TCR $\gamma\delta$  T-Zellen für alle Spender bei unter 10% lag und damit vernachlässigbar war. Damit zeichneten sich also die EBV-CTL, aber auch die PBMC zum Zeitpunkt der Versuche durch einen überwiegenden Anteil an zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus.

Der Vergleich des Immunphänotyps von transduzierten und nicht-transduzierten T-Zellen sollte eine mögliche Veränderung der Zellen durch die Expression der chimären Rezeptoren sichtbar machen. Dazu wurden die T-Zellen nach der Transduktion auf die Expression der verschiedenen Oberflächenantigene untersucht und miteinander verglichen. Während die Expression der chimären Rezeptoren 14.G2a- $\zeta$ , 14.G2a-CD28- $\zeta$ , 14.G2a-2B4, 14.G2a-2B4- $\zeta$  und 14.G2a-DAP10 keinen Einfluss auf den Immunphänotyp der untersuchten T-Zellen ausübte, zeigte sich nach der Transduktion der PBMC mit dem chimären Rezeptor 14-G2a-DAP10- $\zeta$  eine auffällige Veränderung des Phänotyps der transduzierten T-Zellen. Im Vergleich mit nicht-transduzierten PBMC zeigten die 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierte PBMC einen stark erhöhten Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Da der Phänotyp der 14.G2a-DAP10 transduzierten PBMC zu jedem Zeitpunkt mit dem Phänotyp der nicht-transduzierten PBMC übereinstimmte, muss der erhöhte Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei den 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten PBMC durch die Kombination von DAP10

und  $\zeta$  verursacht werden. Möglicherweise wird durch die Kombination der beiden Signaltransduktionsdomänen ein Stimulations-unabhängiges Signal transduziert, das den Proliferationsreiz der unspezifischen CD3- und CD28-vermittelten Aktivierung besonders in den CD8+ T-Zellen verstärkt.

### **4.3 Tumorspezifische Effektorfunktionen der transduzierten T-Zellen**

Typische frühe Effektorfunktionen aktivierter T-Zellen sind Zytotoxizität und die Produktion von Zytokinen nach dem Erkennen einer antigenpositiven Zelle. Dabei erfolgt die Rezeptor-vermittelte Zielzelllyse unabhängig von Kostimulation, während die Produktion von Zytokinen durch Kostimulation verstärkt werden kann (Hombach et al., 2001). Eine vollständige Effektorfunktion schließt jedoch auch die Expansion der T-Zellen nach Antigenkontakt mit ein. Dazu brauchen die T-Zellen eine kostimulatorische Verstärkung des durch die  $\zeta$ -Kette vermittelten Signals. Diese erhalten sie durch kostimulatorische Rezeptoren nach Bindung an deren spezifische Liganden auf antigenpräsentierenden Zellen (Acuto und Michel., 2003), oder durch die Kombination einer kostimulatorischen Signaltransduktionsdomäne mit dem signaltransduzierenden Anteil der  $\zeta$ -Kette in einem chimären Rezeptor (Maher et al., 2002; Finney et al., 2004).

#### **4.3.1 Zytotoxizität der transduzierten T-Zellen**

Zur Untersuchung ihrer tumorspezifischen Zielzelllyse wurden die transduzierten PBMC und EBV-CTL in einem  $^{51}\text{Chrom}$ -Assay mit  $\text{G}_{\text{D}2}$ -positiven oder  $\text{G}_{\text{D}2}$ -negativen Tumorzellen koinkubiert. Dabei zeigte sich, dass die Signaltransduktionsdomänen der beiden NK-Zell-Rezeptoren 2B4 und NKG2D/DAP10 nicht ausreichen, die Erkennung und Lysierung von  $\text{G}_{\text{D}2}$ -positiven Tumorzellen zu vermitteln. Weder 14.G2a-DAP10 und 14.G2a-2B4 transduzierte PBMC noch 14.G2a-2B4 transduzierte EBV-CTL ließen sich durch eine Stimulation über den chimären Rezeptor zur Lyse der antigenpositiven Zielzellen anregen. Im Gegensatz dazu konnten die chimären Rezeptoren, die auch den signaltransduzierenden Anteil der  $\zeta$ -Kette enthalten, sowohl PBMC als auch EBV-CTL zur Erkennung und Lysierung von antigenpositiven Tumorzellen befähigen. So zeigten die chimären Rezeptoren 14.G2a-CD28- $\zeta$  und 14.G2a-2B4- $\zeta$  im Vergleich mit 14.G2a- $\zeta$  in PBMC und in EBV-CTL eine sehr ähnliche Zielzelllyse von  $\text{G}_{\text{D}2}$ -positiven Tumorzellen.  $\text{G}_{\text{D}2}$ -negative Tumorzellen wurden durch die transduzierten T-Zellen nicht erkannt und nicht-transduzierte T-Zellen zeigten keine Lyse von Tumorzellen. Damit konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation über die NK-Zell-Rezeptoren 2B4 oder NKG2D/DAP10

alleine nicht zu einer Aktivierung von T-Zellen führen kann, sondern höchstens kostimulatorisch wirkt.

Das Einfügen der signaltransduzierenden Domänen von CD28 oder 2B4 proximal zur  $\zeta$ -Kette hatte in den untersuchten T-Zellpopulationen keinen positiven oder negativen Einfluss auf die durch die  $\zeta$ -Kette vermittelte Zytotoxizität. Dagegen führte das Einfügen der signaltransduzierenden Domäne von DAP10 proximal zur  $\zeta$ -Kette neben der spezifischen Lyse von  $G_{D2}$ -positiven Tumorzellen zu einer starken, unspezifischen Zytotoxizität der 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten PBMC gegen verschiedene  $G_{D2}$ -negative Tumorzelllinien, besonders aber gegen die für NK-Zellen sensitive Linie K562. Nur die lymphoblastoide B-Zelllinie Raji, von der bekannt ist, dass sie keinen der bislang bekannten NKG2D-Liganden exprimiert (Pende et al., 2002), wurde von den 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten T-Zellen nicht lysiert. Dies weist daraufhin, dass möglicherweise NKG2D bei der durch 14.G2a-DAP10- $\zeta$  induzierten Lyse von  $G_{D2}$ -negativen Tumorzellen eine Rolle gespielt hat.

#### 4.3.2 Zytokinsekretion der transduzierten T-Zellen

Die Produktion und Sekretion von  $IFN-\gamma$  durch T-Zellen wird als ein wichtiges Maß für die Aktivierung und Verstärkung der zellulären und humoralen Immunantwort *in vivo* während einer Infektion angesehen (Brigl et al., 2003; Schaible und Kaufmann, 2000). Generell kann die  $IFN-\gamma$  Produktion in transduzierten T-Zellen auch schon durch die alleinige Signaltransduktion über die  $\zeta$ -Kette durch Stimulation des chimären Rezeptors ausgelöst werden (Rossig et al., 2001; Rossig et al., 2002). In Versuchen mit aufgereinigten  $CD4+$  und  $CD8+$  T-Zell-Kulturen konnte außerdem gezeigt werden, dass eine CD28-vermittelte Kostimulation nur in  $CD4+$  T-Zellen eine Verstärkung der  $IFN-\gamma$  Produktion vermittelt (Hombach et al., 2001). Die Produktion von  $IFN-\gamma$  der transduzierten PBMC und EBV-CTL wurde in dieser Arbeit durchflusszytometrisch in einer intrazellulären Färbung bestimmt. Das bietet im Vergleich zu einem ELISA den Vorteil, sich im Durchflusszytometer gezielt die  $IFN-\gamma$ -Produktion der transduzierten T-Zellen anzeigen zu lassen, so dass unterschiedliche Transduktionseffizienzen vernachlässigbar sind.

Die Analyse der Zellen bestätigte die Ergebnisse der Zytotoxizitätsuntersuchungen. Erneut zeigte sich, dass die Signaltransduktionsdomänen der beiden NK-Zell-Rezeptoren 2B4 und NKG2D/DAP10 nicht ausreichen, um eine Erkennung und die damit einhergehende  $IFN-\gamma$  Produktion von  $G_{D2}$ -positiven Tumorzellen zu vermitteln. Weder 14.G2a-DAP10 und 14.G2a-2B4 transduzierte PBMC noch 14.G2a-2B4 transduzierte EBV-CTL ließen sich

durch eine Stimulation über den chimären Rezeptor zur IFN- $\gamma$  Produktion anregen. 14.G2a-CD28- $\zeta$  oder 14.G2a-2B4- $\zeta$  transduzierte PBMC und EBV-CTL zeigten hingegen eine ähnliche, zum Teil aber auch etwas schwächere IFN- $\gamma$  Produktion als 14.G2a- $\zeta$  transduzierte T-Zellen. Erneut konnte nur für die chimären Rezeptoren, die auch den signaltransduzierenden Anteil der  $\zeta$ -Kette enthielten, eine Aktivierung durch antigenpositive Tumorzellen beobachtet werden. Dabei scheint durch die signaltransduzierenden Domänen von CD28 oder 2B4 keine zusätzliche Stimulation vermittelt zu werden, da weder 14.G2a-CD28- $\zeta$  noch 14.G2a-2B4- $\zeta$  transduzierte PBMC oder EBV-CTL stärker IFN- $\gamma$  produzierten als 14.G2a- $\zeta$ .

Zur Kontrolle der Virusspezifität wurden alle transduzierten EBV-CTL zusätzlich auf ihre Fähigkeit zur IFN- $\gamma$  Produktion nach Stimulation mit autologen LCL untersucht. Die Expression der chimären Rezeptoren hatte keinen Einfluss auf die virusspezifische Produktion von IFN- $\gamma$ , da die transduzierten T-Zellen weiterhin über ihren nativen TCR aktiviert werden konnten.

Leider bestätigte sich auch für die IFN- $\gamma$  Produktion, neben einer spezifischen Aktivierung durch G<sub>D2</sub>-positive Tumorzellen eine starke, unspezifische Reaktion der 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten PBMC gegen die NK-Zell sensitive Zelllinie K562. Eine mögliche Ursache für die Unspezifität der 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten T-Zellen könnte eine Quervernetzung des nativen NKG2D-Rezeptors mit der Transmembrandomäne des chimären Rezeptors sein. Dabei wirkt die Signaltransduktion über DAP10 im chimären Rezeptor 14.G2a-DAP10 alleine nicht aktivierend. Erst die Kombination mit der  $\zeta$ -Kette im chimären Rezeptor 14.G2a-DAP10- $\zeta$  führt zu einer Aktivierung der T-Zellen. Die Transmembrandomäne wurde zusammen mit der Signaltransduktionsdomäne aus dem DAP10-Protein kloniert. Da NKG2D keine eigene Signaltransduktionsdomäne besitzt, lagert sich der Rezeptor mit dem Adapter-Signalprotein DAP10 über Wechselwirkungen zwischen negativ und positiv geladenen Aminosäuren der Transmembranregion zusammen (Garrity et al., 2005). Dabei sind alleine die Transmembrandomänen von NKG2D und DAP10 für die Assoziation der Moleküle verantwortlich (Rosen et al., 2004; Wu et al., 2000). Da die B-Zelllinie Raji weder G<sub>D2</sub> noch einen der NKG2D-Liganden exprimiert (Pende et al., 2002), konnte sie von den 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten PBMC trotz Quervernetzung des chimären Rezeptors mit dem nativen NKG2D nicht erkannt werden. NKG2D bindet verschiedene Liganden, die normalerweise nicht oder nur in geringem Maße von gesundem Gewebe exprimiert werden, die aber durch Stress, Infektionen oder in

Tumorzellen induziert werden können. Bislang wurden sechs dieser Liganden identifiziert, zu ihnen gehören die MHC-Klasse-I-ähnlichen Moleküle MICA und MICB, aber auch vier Mitglieder der ULBP-Familie (Groh et al., 1996; Groh et al., 1999; Cosman et al., 2001; Pende et al., 2002; Chalupny et al., 2003). Da NKG2D nur auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert wird, wurde zur Überprüfung der Hypothese eine reine CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation mit dem chimären Rezeptor 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduziert. Für diese 14.G2a-DAP10- $\zeta$  transduzierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte im <sup>51</sup>Chrom-Assay eine unspezifische Lyse von K562 Zellen nicht mehr beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Der chimäre Rezeptor 14.G2a-DAP10 hat sich in den bisherigen Versuchen zur Zytotoxizität und Produktion von IFN- $\gamma$  durch die transduzierten T-Zellen als nicht funktionell erwiesen, da eine Stimulation über diesen Rezeptor nicht zur Aktivierung der T-Zellen führt. 14.G2a-DAP10- $\zeta$  zeigte zwar eine antigenspezifische Zielzelllyse und war in der Lage nach Antigenerkennung IFN- $\gamma$  zu produzieren, könnte aber durch seine unspezifische Aktivität in einer adoptiven T-Zelltherapie schwer einschätzbare Nebenwirkungen hervorrufen, z.B. durch Autoimmunität. Daher wurden keine weitere Untersuchungen von mit diesen Rezeptoren transduzierten T-Zellen durchgeführt.

### **4.3.3 Restimulierbarkeit der transduzierten T-Zellen**

Neben einer effizienten Zielzelllyse und einer starken Zytokin Produktion zur Rekrutierung von weiteren Effektorzellen des Immunsystems ist die klonale Proliferation die wichtigste Fähigkeit von T-Zellen, um Infektionen zu bekämpfen. Auch in der adoptiven T-Zell-Therapie spielt die Proliferation der tumorspezifischen T-Zellen eine große Rolle für die effektive Kontrolle der Tumorerkrankung. Obwohl auch ohne Kostimulation hohe Effizienzen bei der tumorspezifischen Zielzelllyse und IFN- $\gamma$  Produktion durch chRec-transduzierte T-Zellen erzielt werden konnten, wurde eine tumorspezifische klonale Proliferation erst durch den Einbau von kostimulatorischen Domänen proximal zur  $\zeta$ -Kette erreicht (Hombach et al., 2001; Maher et al., 2002; Finney et al., 2004; Pule et al., 2005). Die Fähigkeit der transduzierten PBMC und EBV-CTL zur klonalen Proliferation nach Antigenkontakt wurde durch eine wöchentliche Stimulation mit G<sub>D2</sub>-positiven oder G<sub>D2</sub>-negativen Tumorzellen untersucht.

In Übereinstimmung mit den bisher veröffentlichten Daten zu chimären Rezeptoren mit CD28-vermittelter Kostimulation konnten die 14.G2a-CD28- $\zeta$  transduzierten PBMC durch die Stimulation mit G<sub>D2</sub>-positiven Tumorzellen zu großen Zellzahlen expandiert werden. Dadurch wurde gezeigt, dass die kostimulatorische Domäne von CD28 in dem verwendeten chimären Rezeptor funktionell aktiv ist. Im Gegensatz dazu war die Stimulation über den chimären Rezeptor in 14.G2a-CD28- $\zeta$  transduzierten EBV-CTL jedoch nicht ausreichend, eine Expansion der T-Zellen auszulösen. Da sich die EBV-CTL durch eine Stimulation mit autologen LCL sehr gut expandieren ließen, lag ein genereller Funktionsverlust der CTL durch die *in vitro* Kultur nicht vor.

EBV-CTL exprimieren konstitutiv den CD28-Rezeptor und können dadurch mit den auf LCL exprimierten Liganden CD80 und CD86 interagieren, deshalb kann eine Bedeutung der CD28-vermittelten Kostimulation für die antigenspezifische Proliferation der EBV-CTL nicht ausgeschlossen werden (Appay et al., 2002). Trotzdem gibt es Hinweise, dass antigenerfahrene CD8<sup>+</sup> T-Zellen eher von anderen kostimulatorischen Molekülen beeinflusst werden (Deaths und Mescher, 1999). Deshalb wäre eine Abhängigkeit der EBV-CTL von anderen oder auch zusätzlichen kostimulatorischen Signalen denkbar.

Zusätzlich zu CD28 wurden noch weitere Moleküle entdeckt, die in der Lage sind, kostimulatorische Signale zu transduzieren. So induziert ein weiteres Mitglied der CD28-Familie, ICOS („inducible costimulator“), zwar in Bezug auf die IL-2 Produktion ein eindeutig schwächeres Signal als CD28, ist aber dafür für die Induktion von anderen Zytokinen von Bedeutung (Rudd und Schneider, 2003). Kostimulatorische Signale können aber auch durch Mitglieder der TRAF-bindenden Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNFR) Familie und ihre Liganden transduziert werden. Die meisten dieser TNF-Rezeptoren werden erst auf aktivierten T-Zellen exprimiert, mit Ausnahme von CD27. Dieser Rezeptor wird zwar schon auf naiven T-Zellen exprimiert, sein Ligand CD70 wird jedoch erst von aktivierten T-Zellen, B-Zellen oder Dendritischen Zellen präsentiert. Seine Aufgabe wird weniger in der Expansion von T-Zellen vermutet, als vielmehr in der Vermittlung von Überlebenssignalen (Hendriks et al., 2003). Zwei weitere Rezeptoren, von denen bekannt ist, dass sie kostimulatorische Signale in T-Zellen transduzieren können, sind OX40 und 4-1BB. Während OX40 nur von aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert wird und daher für die Expansion der überwiegend CD8<sup>+</sup> EBV-CTL vermutlich keine Rolle spielt (Weinberg et al., 1998), wird 4-1BB auf aktivierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>T-Zellen exprimiert (Bertram et al., 2004). Da jedoch keine der verwendeten LCL-Linien den 4-

1BB Liganden exprimiert, erscheint es unwahrscheinlich, dass 4-1BB zur EBV-spezifischen Expansion der CTL notwendig ist.

Da der chimäre Rezeptor 14.G2a-2B4 sich in den Versuchen bezüglich Zytotoxizität und IFN- $\gamma$  Produktion für die Aktivierung von T-Zellen als nicht geeignet erwiesen hat, überrascht es wenig, dass eine Stimulation über 14.G2a-2B4 nicht ausreicht, transduzierte PBMC oder EBV-CTL zur Proliferation anzuregen. Die Kombination der 2B4-Signaltransduktionsdomäne mit der  $\zeta$ -Kette im chimären Rezeptor 14.G2a-2B4- $\zeta$  führte hingegen zu einer tumorspezifischen Proliferation von transduzierten PBMC. Damit konnte gezeigt werden, dass der NK-Zell-Rezeptor 2B4 in unspezifisch aktivierten, polyklonalen T-Zellen kostimulatorische Signale transduziert.

Bislang wurden für den Rezeptor 2B4 verschiedene und zum Teil scheinbar widersprüchliche Funktionen beschrieben. Wie Untersuchungen in NK-Zellen zeigten, ist die zelluläre Antwort auf eine Stimulation durch den 2B4-Rezeptor von Zelltyp und Reifungsgrad abhängig. So wirkt eine Stimulation über 2B4 aktivierend oder kostimulatorisch und während früher Stadien der NK-Zell Entwicklung sogar inhibitorisch (Nakajima et al., 1999; Chuang et al., 2000; Sivori et al., 2000; Sivori et al., 2002). Zusätzlich wurde die Möglichkeit diskutiert, dass 2B4 von den NK-Zellen auch als Ligand zur Stimulation von CD48 exprimierenden T-Zellen genutzt wird, wobei das kostimulatorische Signal in den T-Zellen über CD48 transduziert werden soll (Assarsson et al., 2004).

Die verschiedenen für 2B4 beschriebenen Funktionen schließen sich aber nicht gegenseitig aus. So beruht z.B. die aktivierende oder inhibierende Funktion des Rezeptors auf der Bindung von aktivierenden oder inhibierenden Signaltransduktionsmolekülen an die Phosphorylierungsstellen innerhalb der ITSM. Während das aktivierende Adaptermolekül SAP an alle vier ITSM binden kann, erfolgt eine Bindung der inhibitorischen Signaltransduktionsmoleküle SHP-1 und-2, sowie SHIP nur an das dritte ITSM (Eissmann et al., 2005). Ein Überschuss an SAP verhindert die Bindung der inhibitorischen Moleküle, während zu wenig oder kein SAP nur eine inhibitorische Funktion des Rezeptors erlaubt. So war in unreifen NK-Zellen, in denen die Stimulation über 2B4 inhibitorisch wirkt, keine Expression von SAP detektierbar. Hingegen wurde SHP-1 konstitutiv exprimiert (Sivori et al., 2002). Die aktivierende oder inhibitorische Funktion des 2B4-Rezeptors scheint also von der Verfügbarkeit des SAP-Moleküls abzuhängen. Das erlaubt eine Modulation der 2B4-transduzierten Signale durch die Expression von SAP.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit den transduzierten PBMC reichte eine Stimulation über den chimären Rezeptor nicht aus, 14.G2a-2B4- $\zeta$  transduzierte EBV-CTL zu expandieren. Auch in diesem Fall wurde ein genereller Funktionsverlust durch die *in vitro* Kultur mit einer Expansion der CTL nach Stimulation durch autologe LCL ausgeschlossen. Eigentlich wurde erwartet, dass 2B4 eine kostimulatorische oder sogar aktivierende Funktion in EBV-CTL ausübt. Bisher publizierte Daten ließen vermuten, dass der Rezeptor 2B4 eine wichtige Aufgabe bei der Kontrolle von EBV-Infektionen erfüllt. So wird der Ligand CD48 nach einer EBV-Infektion auf B-Zellen hochreguliert und die Inaktivität des Adapterproteins SAP in XLP-Patienten („X-linked lymphoproliferative syndrome“) führt zu einer fehlenden Immunkontrolle von EBV-Erkrankungen. Dabei wird aufgrund einer Mutation im SAP-Gen das SAP-Protein nicht-funktional oder gar nicht exprimiert (Yokoyama et al., 1991; Engel et al., 2003). Außerdem zeigte eine Untersuchung mit SAP-defizienten CTL aus XLP-Patienten eine stark verminderte Aktivität gegen EBV-infizierte Zielzellen (Dupré et al., 2005).

Zwar wurde die Expression von SAP in den transduzierten EBV-CTL nicht überprüft, doch scheint es wenig wahrscheinlich, dass ein Fehlen von SAP für die nicht ausreichende Funktionalität des chimären Rezeptors 14.G2a-2B4- $\zeta$  verantwortlich ist. Besonders da die in dieser Arbeit generierten EBV-CTL eine unverminderte IFN- $\gamma$  Produktion nach Stimulation mit LCL zeigten.

Eine Möglichkeit, warum weder die 14.G2a-CD28- $\zeta$  noch die 14.G2a-2B4- $\zeta$  transduzierten EBV-CTL nach Stimulation mit G<sub>D2</sub>-positiven Tumorzellen proliferieren, könnte die hohe Aktivierungsschwelle der EBV-CTL sein. So benötigen virusspezifische CTL zur klonalen Proliferation ein extrem starkes über den T-Zell-Rezeptor vermitteltes Signal (Topp et al., 2003). Die virusspezifische Stimulation mit LCL in Anwesenheit von exogenem IL-2 erfüllt diese Anforderungen, doch wurde berichtet, dass die über den chimären Rezeptor vermittelten Signale auch in der Anwesenheit von Kostimulation schwächer sind, als der über den T-Zell-Rezeptor vermittelte Aktivierungsreiz (Pule et al., 2005).

#### 4.4 Perspektiven

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse geben einen zusätzlichen Einblick in die Komplexität der T-Zell Aktivierung. Die starke unspezifische Aktivität des chimären Rezeptor 14.G2a-DAP10- $\zeta$  führte dazu, dass das kostimulatorische Potenzial von NKG2D nicht untersucht wurde. Zur Überprüfung, ob diese unspezifische Aktivität tatsächlich durch eine Quervernetzung des chimären Rezeptors mit dem nativen NKG2D hervorgerufen wurde, wäre es möglich, einen weiteren chimären Rezeptor zu konstruieren. Dieser würde nur noch die Signaltransduktionsdomäne von DAP10 enthalten, während die Transmembrandomäne eines anderen Moleküls verwendet wird, z.B. aus CD28. Da NKG2D und DAP10 sich nur über die Transmembrandomäne miteinander verbinden können, wäre somit die Möglichkeit einer Quervernetzung zwischen dem chimären Rezeptor und NKG2D ausgeschlossen.

Durch die Expansion von 14.G2a-2B4- $\zeta$  transduzierten PBMC nach Stimulation über den chimären Rezeptor konnte für 2B4 eindeutig eine kostimulatorische Funktion in PBMC nachgewiesen werden. Das Entfernen des dritten inhibitorischen ITSM aus der Sequenz des chimären Rezeptors könnte eventuell dazu beitragen, einen chimären Rezeptor zu entwickeln, der in der Lage ist, auch EBV-CTL vollständig zu aktivieren.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, verschiedene kostimulatorische Domänen in einem chimären Rezeptor zu kombinieren. So wurde z.B. ein funktioneller chimärer Rezeptor konstruiert, der die Signaltransduktionsdomänen von CD28, OX40 und der  $\zeta$ -Kette kombiniert (Pule et al., 2005).

Zum Erreichen eines potenten Anti-Tumoreffekts durch genetisch modifizierte T-Zellen muss ein chimärer Rezeptor die kostimulatorischen Anforderungen der jeweils verwendeten T-Zellpopulation berücksichtigen. Durch die Entdeckung von neuen kostimulatorischen Molekülen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der T-Zelldifferenzierung oder auch -aktivierung eine Rolle spielen, wird es jedoch möglich sein, die chimären Rezeptoren den Bedürfnissen von verschiedenen Effektor-Populationen anzupassen.

## **5 Material und Methoden**

### **5.1 Molekularbiologie**

#### **5.1.1 Oligonukleotidprimer**

Alle für diese Arbeit benutzten Primer (Primersequenzen s. Anhang) wurden von der Firma Invitrogen hergestellt. Zur Überprüfung der ausgewählten Primersequenzen wurden über das Internet zugängliche Programme wie Primer3 benutzt ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)).

#### **5.1.2 RNA-Isolierung aus humanen Zellen**

Zelluläre RNA wurde über eine Säule mit dem „RNeasy“-Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers isoliert und ihre Qualität anschließend photometrisch bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

#### **5.1.3 cDNA-Synthese**

Das Enzym Reverse Transkriptase nutzt einzelsträngige RNA als Matrize für die Synthese eines komplementären DNA-Stranges (cDNA) in Anwesenheit eines Primers. Diese cDNA bildet dann in einer anschließenden PCR die Matrize. Die Verwendung von Oligo(dT)-Primern gewährleistet, dass die Kern-kodierte mRNA-Population in cDNA umgeschrieben wird. Für die cDNA-Synthese wurden 1µg RNA, 1µl 50µM Oligo(dT) und 1µl 10mM dNTP Mix mit nukleasefreiem Wasser auf 12µl ergänzt. Der Reaktionsansatz wurde 5 min bei 65°C inkubiert, anschließend kurz auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 6µl Reaktionsmix (4µl 5x Puffer, 2µl 0,1M DTT) für 2 min bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von 1µl (200U) Reverser Transkriptase (Superscript™ II) wurde erneut für 50 min bei 42°C inkubiert. Gelagert wurde die cDNA bei -20°C. Alle benutzten Lösungen und Enzyme stammten von Invitrogen.

## 5.1.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

### 5.1.4.1 Standard-PCR

<u>PCR-Ansatz</u>	<u>Reaktionsprogramm (30 Zyklen)</u>
1x PCR-Puffer	1 min 94°C
je 250µM von jedem dNTP	1 min 45-60°C (Primer abhängig)
0,5µM der spezifischen Oligonukleotidprimer	2 min 72°C
1 U Pfu-Polymerase	
100-300ng cDNA-Template	

Das PCR-Gemisch wurde auf Eis angesetzt. Die Reaktion lief anschließend in einem Thermocycler mit Deckelheizung ab (z.B. Primus, MWG Biotech AG). Vor Beginn des ersten Zyklus wurde die DNA 4 min bei 94°C denaturiert und die letzte Polymerisationsphase wurde zur Erhöhung der Ausbeute an Vollängen-DNA um 10 min verlängert. Es wurde ausschließlich die Pfu-Polymerase (MBI Fermentas) benutzt, die im Gegensatz zur Taq-Polymerase eine geringere Fehlerquote aufweist.

### 5.1.4.2 „Splicing by Overlap Extension“-PCR

Um zwei unabhängige DNA-Moleküle an einer exakt definierten Stelle miteinander zu verknüpfen, wurde zunächst eines der DNA-Moleküle in einer Standard-PCR mit einem spezifischen 5'-Primer und einem bispezifischen 3'-Primer amplifiziert. Dabei besaß der bispezifische 3'-Primer sowohl eine Spezifität für das Ende des einen DNA-Moleküls, als auch eine Spezifität für den Anfang des zweiten, zu verknüpfenden DNA-Moleküls, welches nur mit spezifischen Primern amplifiziert wurde. Die „Splicing by Overlap Extension“, also die Verknüpfung der beiden DNA-Moleküle erfolgte anschließend in einer modifizierten Standard-PCR, bei der die beiden DNA-Moleküle zunächst für sieben Zyklen sowohl Template als auch Primer darstellten. Nach diesen sieben Zyklen wurden der 5'-Primer des ersten Moleküls, sowie der 3'-Primer des zweiten Moleküls hinzugegeben und das verknüpfte DNA-Molekül amplifiziert.

### 5.1.4.3 Reinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem „Jetquick Gel Extraction“-Kit (Genomed) nach Anweisung des Herstellers.

### 5.1.5 Elektrophoretische Trennung von DNA über Tris-Acetat-Gele

#### 5x Ladepuffer

15% Ficoll  
50 mM EDTA  
0,5% SDS  
0,05% Bromphenolblau  
0,05% Xylencyanol

#### Tris-Acetat (TAE) Puffer

40 mM Tris-Acetat  
1mM EDTA  
pH 8,0

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA wurde für Flachbett-Agarosegele 0,8 – 1,5% Agarose in TAE-Puffer geschmolzen und vor dem Erstarren mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen Ladepuffer versetzt und bei einer Spannung von 80 V im Gel aufgetrennt. Zur Längenabschätzung wurde die „100bp+500bp Ladder“ (O’RangeRuler™, MBI Fermentas) als Standard mitgeführt. Als Laufpuffer diente TAE-Puffer. Die Gele wurden auf einer UV-Durchlichtapparatur sichtbar gemacht und mit einer CCD-Kamera dokumentiert (Gel Doc 2000, Biorad). Alle benutzten Chemikalien stammten von den Firmen Applichem, Serva oder Merck.

### 5.1.6 Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen

Das gewünschte DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und gewogen. Anschließend erfolgte die Aufreinigung mit dem „Jetquick Gel Extraction“ Kit (Genomed) nach Anweisung des Herstellers.

### 5.1.7 Enzymatische Modifikation von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen und spalten spezifische 4 -8 Nukleotide lange DNA-Sequenzen. Dabei können abhängig von der jeweiligen Restriktionsendonuklease, glatte Enden oder 3’-, bzw. 5’-überhängende Enden entstehen. Da ihre Aktivität in hohem Maße vom pH-Wert und der Salzkonzentration des Reaktionsansatzes abhängig ist, wurden die von den Herstellerfirmen (MBI Fermentas; Promega) mitgelieferten spezifischen Puffersysteme für die Reaktion verwendet. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min – 4 Std beim jeweiligen Temperaturoptimum des verwendeten Enzyms inkubiert.

### 5.1.8 Ligation von DNA in einen Vektor

#### Reaktionsansatz

1x Ligase Puffer  
2000U T4-Ligase  
100ng Vektor  
xng PCR-Produkt (variabel)  
ad 20µl H<sub>2</sub>O

Die Insert- und Vektorfragmente wurden nach dem Restriktionsverdau und anschließender Aufreinigung in unterschiedlichen Insert/Vektor-Ratios (3:1, 5:1 und 7:1) zur Ligation mit

der T4-Ligase (MBI Fermentas) eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde 1 Std bei RT inkubiert und anschließend zur Transformation von *E. coli* eingesetzt.

### 5.1.9 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zu einem aufgetautem Aliquot kompetenter Zellen wurden 1-5  $\mu$ l DNA gegeben, sorgfältig gemischt und für 15-60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf einer Selektions-Platte - LB-Nährboden mit 100 $\mu$ g/ml Ampicilin (Sigma) - ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

### 5.1.10 Isolierung von Plasmid-DNA

#### 5.1.10.1 „Plasmid Mini“-Kit

Diese Methode wurde zur Isolierung von bis zu 100 $\mu$ g Plasmid-DNA aus *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers (Qiagen) durchgeführt.

#### 5.1.10.2 „Endofree™ Plasmid Maxi“-Kit

Diese Methode wurde zur Isolierung von bis zu 500 $\mu$ g endotoxinfreier Plasmid-DNA aus *E. coli* DH5 $\alpha$  nach Angaben des Herstellers (Qiagen) durchgeführt.

### 5.1.11 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:

dsDNA: o.D.<sub>260</sub>=1 entspricht einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml

Oligonukleotide: o.D.<sub>260</sub>=1 entspricht einer Konzentration von 33  $\mu$ g/ml

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

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

### 5.1.12 Sequenzierung

Die Sequenzierung von in Plasmiden inserierter doppelsträngiger DNA wurde von MWG-Biotech (Ebersberg) durchgeführt und erfolgte durch ein nicht-radioaktives Verfahren mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden.

## 5.2 Mikrobiologie

### 5.2.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

LB-Medium  
1% Trypton  
0,5% Hefeextrakt  
1% NaCl

LB-Nährboden  
1,5% Agar-Agar  
in LB-Nährmedium

Die auf LB-Nährmedium ausgestrichenen Bakterien (*E. coli* K12 Stamm DH5 $\alpha$ , Invitrogen) wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Vermehrung wurde eine Bakterienkolonie gepickt, in 2ml LB-Medium überführt, dem nach Anforderung des Vektors Antibiotika (Ampicilin 50 $\mu$ g/ml) zugesetzt wurde und in einer Rollvorrichtung über Nacht bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Alle benutzten Chemikalien stammten von den Firmen Applichem und Merck.

### 5.2.2 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 *E. coli* entspricht eine o.D. von 0,1 einem Lebendtiter von ca.  $2 \times 10^7$  Zellen/ml.

### 5.2.3 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Kompetente *E. coli* Zellen wurden mit dem „Z-Competent *E. coli* Transformation“-Kit (ZymoResearch) nach den Angaben hergestellt und in 20 $\mu$ l Aliquots bei -80°C gelagert.

## 5.3 Zellbiologie

### 5.3.1 Kultivierung von Säugetierzellen

Die Zellen wurden in geeigneten Kunststoffgefäßen, Zellkulturschalen und Gewebekulturflaschen (Greiner), oder Multiwell-Platten (Nunc), bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Feuchtbrutschrank (Fa. Hereaus) kultiviert. Das jeweilige Kulturmedium und die verwendeten Zusätze richteten sich nach dem Zelltyp, während das Kulturvolumen sich nach der Größe des Zellkulturgefäßes richtete. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Kulturmedien und das L-Glutamin von Gibco (Invitrogen) und das FCS von Perbio (Hyclone) bezogen. Die Chemikalien stammten von Applichem, Merck oder Serva.

### 5.3.1.1 Passagieren von Suspensionszellen

Die Zellen wurden in ein Röhrchen (BD Falcon) überführt, darin 5 min bei 420g (RT) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in frischem Kulturmedium resuspendiert, gezählt und die gewünschte Menge Zellen in einem geeigneten Zellkulturgefäß weiter kultiviert.

### 5.3.1.2 Passagieren von adhärennten Zellen

#### Cell Dissoziation Solution

0,04M Tris-HCl

1mM EDTA

0,15M NaCl

pH 7,4

Nach dem Entfernen des Kulturmediums wurden 2-3ml „Cell Dissoziation Solution“ zum Ablösen zu den adhärennten Zellen gegeben. Die Zellen wurden 5 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und die Zellsuspension nach Zugabe von 5ml Kulturmedium in ein Röhrchen (BD Falcon) überführt. Danach wurden sie 5 min bei 420g (RT) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert, gezählt und die gewünschte Menge in einem geeigneten Zellkulturgefäß weiter kultiviert.

### 5.3.1.3 Zellzahlbestimmung

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde zum Anfärben der toten Zellen mit Trypanblau (Gibco, Invitrogen) versetzt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

### 5.3.1.4 Konservierung von Säugetierzellen

#### Einfrriermedium

10% DMSO

50% FCS (Hyclone, Perbio)

40% Kulturmedium (Hyclone, Perbio)

bei -20°C lagern

Nach Bestimmen der Zellzahl wurden die Zellen 5 min bei 420g (RT) abzentrifugiert und  $\sim 10 \times 10^6$  Zellen in 1ml Einfriermedium resuspendiert und in Cryo.S-Röhrchen (Greiner Cellstar) mit Hilfe einer Isopropanol gefüllten Einfrier-Box (Nalgene™ Cryo Container) bei -80°C eingefroren. Nach 2 Tagen wurden die gefrorenen Zellen in eine Tiefkühlung mit flüssigem N<sub>2</sub> (-196°C) überführt. Die tiefgefrorenen Kulturen sind mehrere Jahre haltbar.

### **5.3.1.5 Auftauen von Säugetierzellen**

Die tiefgefrorenen Zellen wurden rasch im Wasserbad (37°C) aufgetaut und in Kulturmedium überführt. Danach wurde 5 min bei 420g (RT) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium resuspendiert und in einem geeigneten Zellkulturgefäß kultiviert.

### **5.3.1.6 Dichtegradienten-Zentrifugation von NH<sub>4</sub>-Heparin-Vollblut**

Zur Isolierung von mononukleären peripheren Blutzellen (PBMC) aus Vollblut, wurde das Blut zunächst in einem Verhältnis von 1:1 mit Kulturmedium ohne Zusätze gemischt. In ein 50ml Röhrchen (BD Falcon) wurden ca. 12ml Lymphoprep™ (Axis-Shield, Norwegen) vorgelegt und mit dem Blut-Medium-Gemisch überschichtet. Die Separation gemäß der Dichte erfolgte anschließend über eine Zentrifugation von 20 min bei 420g (RT) ohne Bremse. Mit einer Transferpipette ließen sich die abgesonderten PBMC in ein weiteres 50ml Röhrchen überführen. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit Kulturmedium ohne Zusätze und anschließender Zentrifugation wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und gezählt. Die PBMC wurden entweder direkt weiter verwendet oder in Einfriermedium überführt und bei -80°C bzw. -196°C gelagert.

### **5.3.1.7 Generierung und Kultivierung von PBMC**

PBMC wurden zunächst über eine Dichtegradienten-Zentrifugation aus NH<sub>4</sub>-Heparin-Vollblut isoliert und in Kulturmedium mit einer Dichte von  $2 \times 10^6$  Zellen pro Well auf einer mit CD3- (Ortho Biotech) und CD28-Antikörpern (BD, Pharmingen) beschichteten 24-Multiwell-Platte für 48 Std bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> unspezifisch aktiviert. Dann wurden die Zellen geerntet, gewaschen und in Kulturmedium mit rekombinantem humanem (rh) IL-2 (Immunotools) weiter kultiviert.

### **5.3.1.8 Generierung und Kultivierung von EBV-CTL**

Zur Generierung von Epstein-Barr-Virus (EBV)-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) wurden zunächst PBMC aus Vollblut isoliert und anschließend in Kulturmedium mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml auf einer 24-Multiwell-Platte ausgesät. Diese Zellen wurden anschließend mit  $5 \times 10^4$  bei 30Gy bestrahlten Zellen einer autologen lymphoblastoiden Zelllinie (LCL) (zur Verfügung gestellt von Cliona Rooney, USA) pro Well für 9-12 Tage kultiviert, wobei nach 7 Tagen jeweils 1ml Medium ausgetauscht wurde. Für alle weiteren Stimulationen wurden die Zellen erneut in Kulturmedium mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml auf einer 24-Multiwell-Platte

ausgesät und mit  $2,5 \times 10^5$  bei 30Gy bestrahlten LCL für 7 Tage kultiviert. Ab der dritten Stimulation wurde als Kulturmedium eine 1:1 Mischung aus RPMI 1640 (Hyclone, Perbio) und Clicks (Irvine Scientific) mit den üblichen Zusätzen an FCS und L-Glutamin verwendet. Außerdem wurden die Zellen zweimal wöchentlich mit rhIL-2 stimuliert.

### 5.3.2 Transfektion der Phoenix Zellen

#### Reaktionsansatz

19,5µl Transfektionsreagenz

9,75µg Plasmid-DNA

ad 650µl serumfreies Kulturmedium

Jeweils die Hälfte einer 75cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflasche mit 80% konfluenten Phoenix amphi bzw. Phoenix eco Zellen wurde auf eine 6-Multiwell-Platte verteilt (pro Well 2ml) und für 24 Std kultiviert. Zur Transfektion der Phoenix-Zellen wurde je 6-Multiwell-Platte ein Reaktionsansatz hergestellt. Dazu wurde das Kulturmedium vorgelegt und mit der Transfektionsreagenz Genejuice™ (Novagen) sorgfältig gemischt. Nach Zugabe der Plasmid-DNA wurde der Ansatz für 15-45 min bei RT inkubiert und anschließend tropfenweise (100µl/Well) gleichmäßig auf die Zellen verteilt und erneut für 24 Std kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium durch 1ml IMDM (20% FCS) pro Well ersetzt und zur Virusproduktion für 24 Std bei 32°C inkubiert. Danach wurde der virushaltige Überstand abgenommen, durch einen 0,45µm-Filter (Nunc) filtriert um Zellreste zu entfernen und als 1ml Aliquots bei -80°C gelagert. Insgesamt wurde für die anschließende Generierung einer stabilen Produktionszelle virushaltiger Überstand von drei Platten benötigt.

### 5.3.3 Transfektion der 293T Zellen

#### Reaktionsansatz

30µl Transfektionsreagenz

10µg Plasmid-DNA

ad 500µl serumfreies Kulturmedium

$1,5 \times 10^6$  293T Zellen wurden in 5ml Kulturmedium in einer Zellkulturschale ausgesät und für 24 Std kultiviert. Zur Transfektion wurde je Zellkulturschale ein Reaktionsansatz hergestellt. Dazu wurde das Kulturmedium vorgelegt und mit der Transfektionsreagenz Genejuice (Novagen) sorgfältig gemischt. Nach Zugabe der Plasmid-DNA, bestehend aus drei Plasmiden, dem PeqPam3(-env) Plasmid (kodierend für MoMLV *gag/pol*), dem RDF-Plasmid (kodierend für RD114 *env*) und dem SFG-Vektor (kodierend für chRec) in einer Ratio von 2:3:3 (gesamt DNA 10µg) wurde der Ansatz für 15 min bei RT inkubiert, anschließend tropfenweise gleichmäßig auf die Zellen verteilt und für weitere 48 Std

kultiviert. Der virushaltige Überstand wurde dann an zwei aufeinander folgenden Tagen abgenommen, filtriert und bei -80°C gelagert.

### **5.3.4 Generierung stabiler PG13- und FLYRD18- Produktionszelllinien**

Für die Generierung stabiler Produktionszelllinien wurden PG13 bzw. FLYRD18 Zellen in einer 6-Multiwell-Platte ausgesät und für 24 Std kultiviert. Ein zu 50% konfluentes Well wurde ausgewählt, um mit dem virushaltigen Überstand der jeweiligen Phoenix-Zellen transduziert zu werden. Dazu wurde das Kulturmedium der PG13 bzw. FLYRD18 Zellen gegen ein Aliquot des virushaltigen Überstands, dem Protaminsulfat zugesetzt wurde (4µg/ml), ausgetauscht. Im Rhythmus von 12-24 Std, etwa 8-14 Tage lang, wurde nun immer wieder frischer virushaltiger Überstand und Protaminsulfat zu den Zellen gegeben. Während der Transduktion wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und bei starkem Zellwachstum geerntet und verdünnt ausgesät. Nach Abschluss der Transduktion wurden die Produktionszelllinien in Gewebekulturflaschen überführt, expandiert und Aliquots bei -196°C gelagert.

### **5.3.5 Beschichtung von Zellkulturplatten mit Antikörpern**

Zur Stimulation von T-Zellen mit Antikörpern wurden diese vorher in der Zellkulturplatte immobilisiert. Dazu wurden die Antikörper auf eine Konzentration von 1µg/ml in bidestilliertem Wasser verdünnt, auf die jeweilige Zellkultur-Platte gegeben (500µl Antikörper-Lösung pro Well einer 24-Multiwell-Platte, bzw. 50µl Antikörper-Lösung pro Well einer 96-Multiwell-Platte) und für 2-4 Std bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Vor dem Gebrauch wurden die Platten mit Kulturmedium gewaschen.

### **5.3.6 Retrovirale Transduktion humaner Zellen**

#### **5.3.6.1 Beschichtung von 24-Multiwell-Platten mit RetroNectin®**

RetroNectin® (TaKaRa, Cambrex) ist ein rekombinantes humanes Fibronektinfragment CH-296 und verstärkt durch Koloalysierung von Zellen und Viruspartikeln den retroviralen Gentransfer (Hananberg *et al.*, 1996). Für die retrovirale Transduktion von T-Zellen wurden 24-Multiwell-Platten (nicht für die Zellkultur vorbehandelt) mit 5µg/cm<sup>2</sup> RetroNectin® nach Anweisung des Herstellers beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Vor Gebrauch wurde die RetroNectin®-Platte mit serumhaltigem Kulturmedium gewaschen.

### 5.3.6.2 Generierung von Virus-Überstand

Zur Transduktion humaner Zellen wurde zunächst Virus-Überstand von den zuvor generierten Produktionszelllinien geerntet. Dazu wurden die Produktionszelllinien in einer 75cm<sup>2</sup> Gewebekulturflasche bis zu einer 90% Konfluenz kultiviert und nach einem Mediumwechsel auf IMDM mit 20% FCS für 16 – 24 Std bei 32°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Der virushaltige Überstand wurde geerntet, filtriert und zu 1ml in Eppendorfgefäßen aliquotiert. Diese Aliquots wurden für 90min bei 14000g (4°C) zentrifugiert und anschließend 900µl Überstand verworfen. Die restlichen 100µl wurden kräftig gemischt und auf 1ml Aliquots vereinigt. Die Aliquots wurden direkt zur Transduktion eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

### 5.3.6.3 Transduktion

Die Transduktion humaner Zellen erfolgte entweder mit Virusüberstand der 293T Zellen, dazu wurde der Überstand vor dem Aussähen der Zellen auf der RetroNectin® beschichteten 24-Multiwell-Platte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> vorinkubiert und insgesamt sieben mal alle 45 min gewechselt, oder mit konzentriertem Virusüberstand der Produktionszelllinien. Pro Well wurden 0,75 – 1x10<sup>6</sup> Zellen in Kulturmedium mit rhIL-2 auf der RetroNectin® beschichteten 24-Multiwell-Platte ausgesäht und mit 1ml Virusüberstand bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 48 – 72 Std inkubiert. Nach der Transduktion wurden die Zellen geerntet, gewaschen und in Kulturmedium mit rhIL2 weiter kultiviert. Die Transduktion der EBV-CTL erfolgte einen Tag nach der dritten Stimulation, während die PBMC vorher mit CD3- und CD28-Antikörpern für 48 Std unspezifisch aktiviert wurden.

## 5.4 Durchflusszytometrische Analysen

### 5.4.1 Direkte und indirekte Färbung

#### Waschpuffer

2% FCS (Fetal Calf Serum)  
in PBS (Phospho Buffered Saline)

#### Fixierpuffer

1% PFA (Paraformaldehyd)  
in PBS

Die Durchflusszytometrie (Fluorescent Activated Cell Sorting – FACS) dient der quantitativen Analyse von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen auf Einzelzellebene mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper. In dieser Arbeit wurden für die Phänotypisierungen und die intrazellulären Färbungen, wenn nicht anders angegeben, monoklonale, murine, an Fluorescein-Isotiozyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex (PerCP), oder Allophycocyanin (APC) gekoppelte

Antikörper (BD) gegen die beschriebenen Oberflächenmarker bzw. intrazellulären Proteine und dazu passende Isotyp-Kontrollen verwendet. Zur Bestimmung der Oberflächenexpression der transduzierten chimären Rezeptoren wurde der ungekoppelte, monoklonale, murine Antikörper 1A7 (Titan Pharmaceuticals) mit einem zweiten aus der Ziege stammenden, APC-gekoppelten, Antikörper (BD) detektiert. Die Zellen wurden einmal gewaschen, in 100µl Waschpuffer aufgenommen und für 20 min bei RT im Dunkeln mit den gewünschten Antikörpern inkubiert. Bei der direkten Färbung wurden die Zellen nach erneutem Waschen in 200µl Fixierpuffer gelöst. Bei der indirekten Färbung wurde die Zellen wieder in 100µl Waschpuffer aufgenommen und für 15 min bei RT im Dunkeln mit dem gegen den ersten Antikörper gerichteten, markierten zweiten Antikörper inkubiert, bevor sie nach dem Waschen ebenfalls in 200µl Fixierpuffer gelöst wurden. Die gefärbten Zellen wurden bei 4°C gelagert und an einem FACS-Calibur (BD) mit der Software Cell Quest Pro (BD) gemessen.

#### **5.4.2 Intrazelluläre Färbung**

Zur Detektion von intrazellulären Proteinen muss die Zellmembran zunächst permeabilisiert und das Zellinnere für die gewünschten Antikörper zugänglich gemacht werden. Die intrazelluläre Färbung erfolgte nach dem Protokoll des „FastImmune Intracellular Cytokine Detection“-Kit (BD) mit den darin enthaltenen Lyse und Permeabilisierungslösungen. Zur Stimulation wurden  $1 \times 10^6$  T-Zellen mit  $1 \times 10^6$  bei 30Gy bestrahlten Antigen-positiven (Lan-5) oder –negativen (A204) Tumorzellen für 2 Std. inkubiert und nach Zugabe von 40µl (0,5µg/µl) des Sekretionsinhibitors BrefeldinA (Sigma) für weitere 4 Std inkubiert. Vor der intrazellulären Färbung wurden die Zellen zunächst in einer indirekten Färbung mit dem für den chimären Rezeptor spezifischen Antikörper 1A7 gefärbt und mit dem aus der Ziege stammenden, APC-gekoppelten, Zweit-Antikörper detektiert. Nach der Permeabilisierung wurden dann über eine direkte Färbung die gewünschten intrazellulären Proteine detektiert.

## 5.5 Funktionelle Analysen

### 5.5.1 Expansionsanalysen

Durch Stimulation mit antigenpositiven (Lan-5) oder –negativen (A204) Tumorzelllinien wurde die Expansionsfähigkeit von transduzierten T-Zell-Kulturen nach Aktivierung über den chimären Rezeptor untersucht. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  transduzierte T-Zellen mit  $1 \times 10^6$  bei 30 Gy bestrahlte Tumorzellen in Kulturmedium mit rhIL-2 für jeweils 7 Tage koinkubiert und anschließend nach einer Anfärbung der toten Zellen mit Trypanblau die lebenden Zellen ausgezählt. Die Stimulation wurde 4-6 Mal alle 7 Tage wiederholt.

### 5.5.2 Radioaktiver Zytotoxizitäts-Assay

$1-2 \times 10^6$  Tumorzellen wurden mit 50-100  $\mu\text{l}$   $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  (entspricht 100  $\mu\text{Ci} = 3,7 \text{ MBq}$ ) für 60-90 min inkubiert und anschließend 5-mal mit Kulturmedium gewaschen. Die T-Zellen und die  $^{51}\text{Cr}$ -markierten Tumorzellen wurden dann in verschiedenen Ratios in eine 96-Multiwell-Platte gesät. Um eine komplette Zytolyse der Zielzellen 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 Tumorzellen gegeben. Durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Kulturmedium wurde die spontane Zytolyse der Tumorzellen überprüft. Die Koinkubation erfolgte 4 Std bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ . Danach wurde je 50  $\mu\text{l}$  Überstand in eine 96-well-Sample Platte (Fa. Wallac) überführt. Zu diesem Überstand wurde je 150  $\mu\text{l}$  „Opti Phase Super Mix“ (Fa. Wallac) gegeben. Die Platte wurde mit Klebefolie (Fa. Wallac) verschlossen und 2 min geschüttelt. Die erfolgte  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung wurde anschließend im 1450 Microbeta Trilux (Fa. Wallac) ermittelt. Die Menge des gemessenen Chrms ist dabei proportional zur Zytolyseeffizienz. Die spezifische Lyse wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Spezifische Zytolyse (in \%)} = \frac{{}^{51}\text{Cr-Freisetzung der Probe} - \text{Spontanlyse}}{{}^{51}\text{Cr-Maximalfreisetzung} - \text{Spontanlyse}} \times 100$$

## 5.6 Zelllinien

### 293T

Derivat der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK-293 (Pear et al., 1993).

### Phoenix eco/ampho

Derivate der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK-293, können Viren mit ecotropem bzw. amphotropem Wirtsspektrum produzieren (Kinsella et al., 1996).

### PG13

Derivat der murinen Fibroblastenzelllinie TK-NIH 3T3, exprimieren das Hüllprotein des Gibbonaffen Leukämievirus (GALV) und können dadurch Viren mit amphotropem Wirtsspektrum produzieren (Miller et al., 1991).

### FLYRD18

Derivat der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080, exprimieren das Hüllprotein des felines endogenen Virus RD114 und können dadurch Viren mit amphotropem Wirtsspektrum produzieren (Cosset et al., 1995).

### JF

Humane Neuroblastomzelllinie, G<sub>D2</sub><sup>+</sup> (freundlich zur Verfügung gestellt von M. Brenner, Houston, USA).

### Lan-1

Humane Neuroblastomzelllinie, G<sub>D2</sub><sup>+</sup> (freundlich zur Verfügung gestellt von R. Seeger, Los Angeles, USA).

### Lan-5

Humane Neuroblastomzelllinie, G<sub>D2</sub><sup>+</sup> (freundlich zur Verfügung gestellt von R. Seeger, Los Angeles, USA).

### A204

Humane Rhabdomyosarkomzelllinie, G<sub>D2</sub><sup>-</sup> (Giard et al., 1973).

### K562

Humane Chronische Myeloische Leukämiezelllinie, hoch sensitives Ziel für NK-Zellen, G<sub>D2</sub><sup>-</sup> (Lozzio et al., 1973).

### Raji

Humane lymphoblastoide B-Zelllinie, G<sub>D2</sub><sup>-</sup> (Pulvertaft et al., 1964)

### LCL

Epstein-Barr-Virus transformierte lymphoblastoide Zelllinien (Leibold et al., 1975) gesunder Spender (freundlich zur Verfügung gestellt von C. Rooney, Houston, USA).

## Abkürzungen

AP-1	Aktivator-Protein 1
APC	Allophycocyanin
As	Aminosäuren
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H I
B-CLL	B-Zell chronische lymphatische Leukämie
Bp	Basenpaar
CD	Cluster of Differentiation
chRec	Chimärer Rezeptor
CMV	Cytomegalie-Virus
CTL	Zytotoxische T-Zellen
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleotide
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-Linked-Immunsorbent-Assay
ERK	Extracellular signal Regulated Kinase
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein-Isothiozyanat
gam	“goat anti-mouse”
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL2	Interleukin 2
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motiv
ITSM	Immunoreceptor Tyrosine based Switch Motiv
JAK	Janus-Kinase
LB	Luria-Broth
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
MAP	Mitogen Activated Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
N <sub>2</sub>	Stickstoff

NaCl	Natriumchlorid
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells
NFkB	Nuclear Factor kB
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NT	Nicht-Transduziert
PBMC	Peripheral Blood Monocytic Cells
PBS	Phospho Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex
PFA	Paraformaldehyd
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLC- $\gamma$	Phospholipase $\gamma$
PTK	Proteintyrosinkinase
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAP	Signaling lymphocytic activation molecule-Associated Protein
scFv	single chain Fragment variabel
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SH2	Src-Homology-domain 2
SHIP	SH2-Region enthaltende Inositol-Phosphatase
SHP	SH2-Region enthaltende Phosphatasen
SLP76	SH2-Region enthaltendes Phosphoprotein 76
STAT	Signal-Transducer and Activator of Transcription
Std	Stunden
TAE	Tris-Acetat
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
XhoI	<i>Xanthomonas holicicola</i> I
XLP	X-linked Lymphoproliferative Syndrome
ZAP-70	$\zeta$ -assoziiertes Protein 70

## Referenzen

- Acuto O, Michel F.** CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol.* 2003 Dec;3 (12):939-51. Review.
- Acuto O, Mise-Omata S, Mangino G, Michel F.** Molecular modifiers of T cell antigen receptor triggering threshold: the mechanism of CD28 costimulatory receptor. *Immunol Rev.* 2003 Apr;192:21-31. Review.
- Annenkov A, Chernajovsky Y.** 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.* 2000 Apr;7(8):714-22.
- Aoukaty A, Tan R.** Association of the X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP/SH2D1A with 2B4, a natural killer cell-activating molecule, is dependent on phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem.* 2002 Apr;277(15):13331-7.
- Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, Ogg GS, King A, Lechner F, Spina CA, Little S, Havlir DV, Richman DD, Gruener N, Pape G, Waters A, Easterbrook P, Salio M, Cerundolo V, McMichael AJ, Rowland-Jones SL.** Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med.* 2002 Apr;8(4):379-85.
- Assarsson E, Kambayashi T, Schatzle JD, Cramer SO, von Bonin A, Jensen PE, Ljunggren HG, Chambers BJ.** NK cells stimulate proliferation of T and NK cells through 2B4/CD48 interactions. *J Immunol.* 2004 Jul 1;173(1):174-80.
- Backstrom E, Kristensson K, Ljunggren HG.** Activation of natural killer cells: underlying molecular mechanisms revealed. *Scand J Immunol.* 2004 Jul-Aug;60(1-2):14-22. Review.
- Baxevanis CN, Papamichail M.** Targeting of tumor cells by lymphocytes engineered to express chimeric receptor genes. *Cancer Immunol Immunother.* 2004 Oct;53(10):893-903. Review.
- Beecham EJ, Ma Q, Ripley R, Junghans RP.** Coupling CD28 co-stimulation to immunoglobulin T-cell receptor molecules: the dynamics of T-cell proliferation and death. *J Immunother.* 2000 Nov-Dec;23(6):631-42.
- Bertram EM, Dawicki W, Watts TH.** Role of T cell costimulation in anti-viral immunity. *Semin Immunol.* 2004 Jun;16(3):185-96. Review.
- Bertram EM, Lau P, Watts TH.** Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-mediated costimulation: 4-1BB ligand influences T cell numbers late in the primary response and regulates the size of the T cell memory response following influenza infection. *J Immunol.* 2002 Apr 15;168(8):3777-85.
- Billadeau DD, Upshaw JL, Schoon RA, Dick CJ, Leibson PJ.** NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway. *Nat Immunol.* 2003 Jun;4(6):557-64.

- Bitton N, Verrier F, Debre P, Gorochov G.** Characterization of T cell-expressed chimeric receptors with antibody-type specificity for the CD4 binding site of HIV-1 gp120. *Eur J Immunol.* 1998 Dec;28(12):4177-87. Erratum in: *Eur J Immunol* 1996 Feb;29(2):725.
- Boles KS, Nakajima H, Colonna M, Chuang SS, Stepp SE, Bennett M, Kumar V, Mathew PA.** Molecular characterization of a novel human natural killer cell receptor homologous to mouse 2B4. *Tissue Antigens.* 1999 Jul.; 54(1):27-34.
- Bollard CM, Aguilar L, Straathof KC, Gahn B, Huls MH, Rousseau A, Sixbey J, Gresik MV, Carrum G, Hudson M, Dilloo D, Gee A, Brenner MK, Rooney CM, Heslop HE.** Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus+ Hodgkin's disease. *J Exp Med.* 2004 Dec 20;200(12):1623-33.
- Bottino C, Augugliaro R, Castriconi R, Nanni M, Biassoni R, Moretta L, Moretta A.** Analysis of the molecular mechanism involved in 2B4-mediated NK cell activation: evidence that human 2B4 is physically and functionally associated with the linker for activation of T cells. *Eur J Immunol.* 2000 Dec;30(12):3718-22.
- Brigl M, Bry L, Kent SC, Gumperz JE, Brenner MB.** Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol.* 2003 Dec;4(12):1230-7
- Brocker T, Karjalainen K.** Signals through T cell receptor-zeta chain alone are insufficient to prime resting T lymphocytes. *J Exp Med.* 1995 May 1;181(5):1653-9.
- Brown MH, Boles K, van der Merwe PA, Kumar V, Mathew PA, Barclay AN.** 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J. Exp. Med.* 1998 Dec.; 188(11):2083-90.
- Byrd JC, Murphy T, Howard RS, Lucas MS, Goodrich A, Park K, Pearson M, Waselenko JK, Ling G, Grever MR, Grillo-Lopez AJ, Rosenberg J, Kunkel L, Flinn IW.** Rituximab using a thrice weekly dosing schedule in B-cell chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma demonstrates clinical activity and acceptable toxicity. *J Clin Oncol.* 2001 Apr 15;19(8):2153-64.
- Cantrell D.** T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:259-74. Review.
- Cella M, Fujikawa K, Tassi I, Kim S, Latinis K, Nishi S, Yokoyama W, Colonna M, Swat W.** Differential requirements for Vav proteins in DAP10- and ITAM-mediated NK cell cytotoxicity. *J Exp Med.* 2004 Sep 20;200(6):817-23.
- Chalupny JN, Sutherland CL, Lawrence WA, Rein-Weston A, Cosman D.** ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 May 23;305(1):129-35.
- Chen ZW, Letvin NL.** Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2 T cells: a new paradigm. *Trends Immunol.* 2003 Apr;24(4):213-9. Review.

- Chuang SS, Kim MH, Johnson LA, Albertsson P, Kitson RP, Nannmark U, Goldfarb RH, Mathew PA.** 2B4 stimulation of YT cells induces natural killer cell cytolytic function and invasiveness. *Immunology*. 2000 Jul;100(3):378-83.
- Chuang SS, Kumaresan PR, Mathew PA.** 2B4 (CD244)-mediated activation of cytotoxicity and IFN-gamma release in human NK cells involves distinct pathways. *J Immunol*. 2001 Dec;167(11):6210-6.
- Cooper LJ, Al-Kadhimi Z, Serrano LM, Pfeiffer T, Olivares S, Castro A, Chang WC, Gonzalez S, Smith D, Forman SJ, Jensen MC.** Enhanced antilymphoma efficacy of CD19-redirected influenza MP1-specific CTLs by cotransfer of T cells modified to present influenza MP1. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1622-31.
- Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, Kubin M, Chalupny NJ.** ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*. 2001 Feb;14(2):123-33.
- Cosset FL, Takeuchi Y, Battini JL, Weiss RA, Collins MK.** High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J. Virol*. 1995 Dec.; 69(12):7430-6.
- Corrias MV, Faulkner LB, Pistorio A, Rosanda C, Callea F, Piccolo MS, Scaruffi P, Marchi C, Lacitignola L, Occhino M, Gambini C, Tonini GP, Haupt R, De Bernardi B, Pistoia V, Garaventa A.** Detection of neuroblastoma cells in bone marrow and peripheral blood by different techniques: accuracy and relationship with clinical features of patients. *Clin Cancer Res*. 2004 Dec 1;10(23):7978-85.
- Croft M.** Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003 Jun-Aug;14(3-4):265-73. Review
- Deeths MJ, Mescher MF.** B7-1-dependent co-stimulation results in qualitatively and quantitatively different responses by CD4+ and CD8+ T cells. *Eur J Immunol*. 1997 Mar;27(3):598-608.
- Deeths MJ, Mescher MF.** ICAM-1 and B7-1 provide similar but distinct costimulation for CD8+ T cells, while CD4+ T cells are poorly costimulated by ICAM-1. *Eur J Immunol*. 1999 Jan;29(1):45-53.
- Dupre L, Andolfi G, Tangye SG, Clementi R, Locatelli F, Arico M, Aiuti A, Roncarolo MG.** SAP controls the cytolytic activity of CD8+ T cells against EBV-infected cells. *Blood*. 2005 Jun 1;105(11):4383-9
- Eissmann P, Beauchamp L, Wooters J, Tilton JC, Long EO, Watzl C.** Molecular basis for positive and negative signaling by the natural killer cell receptor 2B4 (CD244). *Blood*. 2005 Jun;105(12):4722-9.
- Engel P, Eck MJ, Terhorst C.** The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nat Rev Immunol*. 2003 Oct;3(10):813-21. Review.

- Eshhar Z, Waks T, Gross G, Schindler DG.** 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.* 1993 Jan 15;90(2):720-4.
- Finney HM, Lawson AD, Bebbington CR, Weir AN.** Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *J Immunol.* 1998 Sep 15;161(6):2791-7.
- Finney HM, Akbar AN, Lawson AD.** Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain. *J Immunol.* 2004 Jan 1;172(1):104-13.
- Friedmann-Morvinski D, Bendavid A, Waks T, Schindler D, Eshhar Z.** Redirected primary T cells harboring a chimeric receptor require costimulation for their antigen-specific activation. *Blood.* 2005 Apr 15;105(8):3087-93.
- Garrity D, Call ME, Feng J, Wucherpfennig KW.** The activating NKG2D receptor assembles in the membrane with two signaling dimers into a hexameric structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 May 24;102(21):7641-6.
- Geiger TL, Nguyen P, Leitenberg D, Flavell RA.** Integrated src kinase and costimulatory activity enhances signal transduction through single-chain chimeric receptors in T lymphocytes. *Blood.* 2001 Oct 15;98(8):2364-71.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP.** In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 1973 Nov.; 51(5):1417-23.
- Gong MC, Latouche JB, Krause A, Heston WD, Bander NH, Sadelain M.** Cancer patient T cells genetically targeted to prostate-specific membrane antigen specifically lyse prostate cancer cells and release cytokines in response to prostate-specific membrane antigen. *Neoplasia.* 1999 Jun;1(2):123-7.
- Gottschalk S, Heslop HE, Rooney CM.** Adoptive immunotherapy for EBV-associated malignancies. *Leuk Lymphoma.* 2005 Jan;46(1):1-10. Review.
- Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T.** Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 29;93(22):12445-50.
- Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T.** Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jun 8;96(12):6879-84.
- Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T.** Costimulation of CD8alpha T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol.* 2001 Mar;2(3):255-60.

- Gyobu H, Tsuji T, Suzuki Y, Ohkuri T, Chamoto K, Kuroki M, Miyoshi H, Kawarada Y, Katoh H, Takeshima T, Nishimura T.** Generation and targeting of human tumor-specific Tc1 and Th1 cells transduced with a lentivirus containing a chimeric immunoglobulin T-cell receptor. *Cancer Res.* 2004 Feb 15;64(4):1490-5.
- Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL.** NK cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2005 Feb;17(1):29-35. Review.
- Haynes NM, Trapani JA, Teng MW, Jackson JT, Cerruti L, Jane SM, Kershaw MH, Smyth MJ, Darcy PK.** Single-chain antigen recognition receptors that costimulate potent rejection of established experimental tumors. *Blood.* 2002 Nov 1;100(9):3155-63.
- Heemskerk MH, Hoogeboom M, Hagedoorn R, Kester MG, Willemze R, Falkenburg JH.** Reprogramming of virus-specific T cells into leukemia-reactive T cells using T cell receptor gene transfer. *J Exp Med.* 2004 Apr 5;199(7):885-94.
- Hege KM, Cooke KS, Finer MH, Zsebo KM, Roberts MR.** Systemic T cell-independent tumor immunity after transplantation of universal receptor-modified bone marrow into SCID mice. *J Exp Med.* 1996 Dec 1;184(6):2261-9.
- Hendriks J, Xiao Y, Borst J.** CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool. *J Exp Med.* 2003 Nov 3;198(9):1369-80.
- Hombach A, Heuser C, Sircar R, Tillmann T, Diehl V, Pohl C, Abken H.** 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.* 1998 Mar 15;58(6):1116-9.
- Hombach A, Schneider C, Sent D, Koch D, Willemsen RA, Diehl V, Kruis W, Bolhuis RL, Pohl C, Abken H.** 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.* 2000 Oct 1;88(1):115-20.
- Hombach A, Sent D, Schneider C, Heuser C, Koch D, Pohl C, Seliger B, Abken H.** 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.* 2001 Mar 1;61(5):1976-82.
- Hombach A, Wiczarkowicz A, Marquardt T, Heuser C, Usai L, Pohl C, Seliger B, Abken H.** 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.* 2001 Dec 1;167(11):6123-31.
- Hwu P, Shafer GE, Treisman J, Schindler DG, Gross G, Cowherd R, Rosenberg SA, Eshhar Z.** Lysis of ovarian cancer cells by human lymphocytes redirected with a chimeric gene composed of an antibody variable region and the Fc receptor gamma chain. *J Exp Med.* 1993 Jul 1;178(1):361-6.

- Hwu P, Yang JC, Cowherd R, Treisman J, Shafer GE, Eshhar Z, Rosenberg SA.** In vivo antitumor activity of T cells redirected with chimeric antibody/T-cell receptor genes. *Cancer Res.* 1995 Aug 1;55(15):3369-73.
- Irving BA, Weiss A.** The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell.* 1991 Mar 8;64(5):891-901.
- Janeway CA, Travers P.** Immunologie. *Spektrum Akademischer Verlag*, 2002, 5.Auflage.
- Kato K, Koyanagi M, Okada H, Takanashi T, Wong YW, Williams AF, Okumura K, Yagita H.** CD48 is a counter-receptor for mouse CD2 and is involved in T cell activation. *J. Exp. Med.* 1992 Nov.; 176(5):1241-9.
- Kinsella TM, Nolan GP.** Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Hum. Gene Ther.* 1996 Aug.; 7(12):1405-13.
- Kumaresan PR, Mathew PA.** Structure of the human natural killer cell receptor 2B4 gene and identification of a novel alternative transcript. *Immunogenetics.* 2000 Sep.; 51(11):987-92.
- Lanier LL.** NK cell recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:225-74. Review.
- Laux I, Khoshnan A, Tindell C, Bae D, Zhu X, June CH, Effros RB, Nel A.** Response differences between human CD4(+) and CD8(+) T-cells during CD28 costimulation: implications for immune cell-based therapies and studies related to the expansion of double-positive T-cells during aging. *Clin Immunol.* 2000 Sep;96(3):187-97.
- Lee KM, Bhawan S, Majima T, Wei H, Nishimura MI, Yagita H, Kumar V.** Cutting edge: the NK cell receptor 2B4 augments antigen-specific T cell cytotoxicity through CD48 ligation on neighboring T cells. *J Immunol.* 2003 May;170(10):4881-5.
- Leibold W, Flanagan TD, Menezes J, Klein G.** Induction of Epstein-Barr virus-associated nuclear antigen during in vitro transformation of human lymphoid cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 1975 Jan.; 54(1):65-8.
- Letourneur F, Klausner RD.** T-cell and basophil activation through the cytoplasmic tail of T-cell-receptor zeta family proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Oct 15;88(20):8905-9.
- Lozzio CB, Lozzio BB.** Cytotoxicity of a factor isolated from human spleen. *J. Natl. Cancer Inst.* 1973 Feb.; 50(2):535-8.
- Maasho K, Opoku-Anane J, Marusina AI, Coligan JE, Borrego F.** NKG2D is a costimulatory receptor for human naive CD8+ T cells. *J Immunol.* 2005 Apr 15;174(8):4480-4.
- Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, Riviere I, Sadelain M.** Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol.* 2002 Jan;20(1):70-5.

- Mann R, Mulligan RC, Baltimore D.** Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell.* 1983 May;33(1):153-9.
- Mathew PA, Garni-Wagner BA, Land K, Takashima A, Stoneman E, Bennett M, Kumar V.** Cloning and characterization of the 2B4 gene encoding a molecule associated with non-MHC-restricted killing mediated by activated natural killer cells and T cells. *J. Immunol.* 1993 Nov.; 151(10):5328-37.
- McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heyman MR, Bence-Bruckler I, White CA, Cabanillas F, Jain V, Ho AD, Lister J, Wey K, Shen D, Dallaire BK.** Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol.* 1998 Aug;16(8):2825-33
- McGuinness RP, Ge Y, Patel SD, Kashmiri SV, Lee HS, Hand PH, Schlom J, Finer MH, McArthur JG.** Anti-tumor activity of human T cells expressing the CC49-zeta chimeric immune receptor. *Hum Gene Ther.* 1999 Jan 20;10(2):165-73.
- Miller AD, Garcia JV, von Suhr N, Lynch CM, Wilson C, Eiden MV.** Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J. Virol.* 1991 May; 65(5):2220-4.
- Mitsuyasu RT, Anton PA, Deeks SG, Scadden DT, Connick E, Downs MT, Bakker A, Roberts MR, June CH, Jalali S, Lin AA, Pennathur-Das R, Hege KM.** Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4zeta gene-modified autologous CD4(+) and CD8(+) T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Blood.* 2000 Aug 1;96(3):785-93.
- Moritz D, Groner B.** 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.* 1995 Oct;2(8):539-46.
- Moritz D, Wels W, Mattern J, Groner B.** Cytotoxic T lymphocytes with a grafted recognition specificity for ERBB2-expressing tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 May 10;91(10):4318-22.
- Nakajima H, Cella M, Langen H, Friedlein A, Colonna M.** Activating interactions in human NK cell recognition: the role of 2B4-CD48. *Eur. J. Immunol.* 1999 May; 29(5):1676-83.
- Nel AE.** T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse. *J Allergy Clin Immunol.* 2002 May;109(5):758-70. Review.
- Nicholson IC, Lenton KA, Little DJ, Decorso T, Lee FT, Scott AM, Zola H, Hohmann AW.** Construction and characterisation of a functional CD19 specific single chain Fv fragment for immunotherapy of B lineage leukaemia and lymphoma. *Mol Immunol.* 1997 Nov-Dec;34(16-17):1157-65.

- Parolini S, Bottino C, Falco M, Augugliaro R, Giliani S, Franceschini R, Ochs HD, Wolf H, Bonnefoy JY, Biassoni R, Moretta L, Notarangelo LD, Moretta A.** X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *J Exp Med.* 2000 Aug;192(3):337-46.
- Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D.** Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1993 Sep.; 90(18):8392-6.
- Pende D, Rivera P, Marcenaro S, Chang CC, Biassoni R, Conte R, Kubin M, Cosman D, Ferrone S, Moretta L, Moretta A.** Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res.* 2002 Nov 1;62(21):6178-86.
- Peritt D, Sesok-Pizzini DA, Schretzenmair R, Macgregor RR, Valiante NM, Tu X, Trinchieri G, Kamoun M.** C1.7 antigen expression on CD8+ T cells is activation dependent: increased proportion of C1.7+CD8+ T cells in HIV-1-infected patients with progressing disease. *J Immunol.* 1999 Jun.; 162(12):7563-8.
- Poggi A, Venturino C, Catellani S, Clavio M, Miglino M, Gobbi M, Steinle A, Ghia P, Stella S, Caligaris-Cappio F, Zocchi MR.** Vdelta1 T lymphocytes from B-CLL patients recognize ULBP3 expressed on leukemic B cells and up-regulated by trans-retinoic acid. *Cancer Res.* 2004 Dec 15;64(24):9172-9.
- Pule MA, Straathof KC, Dotti G, Heslop HE, Rooney CM, Brenner MK.** A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Mol Ther.* 2005 Nov;12(5):933-41. Epub 2005 Jun 23.
- Pulvertaft JV.** Cytology of Burkitt's tumor (african lymphoma). *Lancet.* 1964 Feb 1;39:238-40.
- Raulet DH.** Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol.* 2003 Oct;3(10):781-90. Review.
- Raulet DH.** Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol.* 2004 Oct;5(10):996-1002. Review.
- Ren-Heidenreich L, Hayman GT, Trevor KT.** Specific targeting of EGP-2+ tumor cells by primary lymphocytes modified with chimeric T cell receptors. *Hum Gene Ther.* 2000 Jan 1;11(1):9-19.
- Ren-Heidenreich L, Mordini R, Hayman GT, Siebenlist R, LeFever A.** Comparison of the TCR zeta-chain with the FcR gamma-chain in chimeric TCR constructs for T cell activation and apoptosis. *Cancer Immunol Immunother.* 2002 Oct;51(8):417-23.
- Rickinson AB, Lee SP, Steven NM.** Cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus. *Curr Opin Immunol.* 1996 Aug;8(4):492-7. Review.

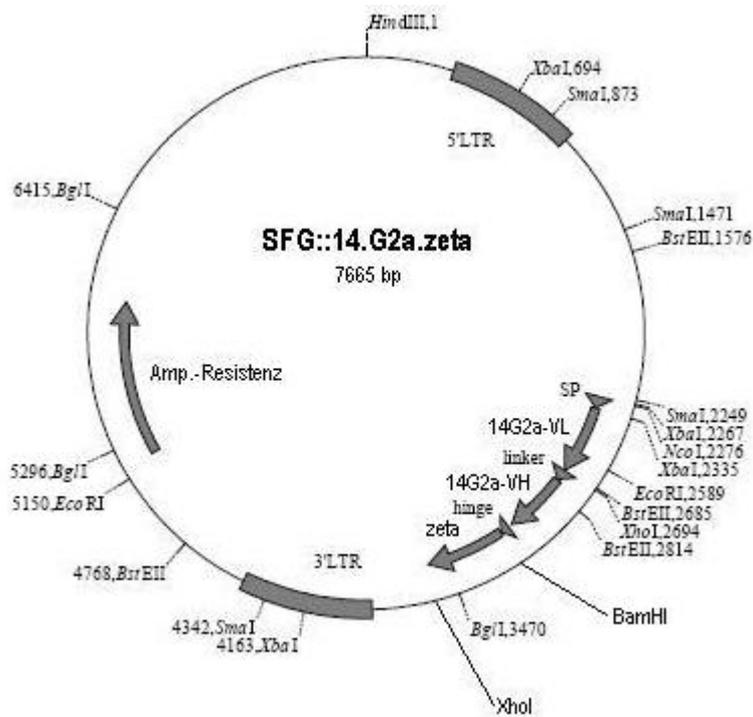
- Roberts MR, Qin L, Zhang D, Smith DH, Tran AC, Dull TJ, Groopman JE, Capon DJ, Byrn RA, Finer MH.** Targeting of human immunodeficiency virus-infected cells by CD8+ T lymphocytes armed with universal T-cell receptors. *Blood*. 1994 Nov 1;84(9):2878-89.
- Rosen DB, Araki M, Hamerman JA, Chen T, Yamamura T, Lanier LL.** A Structural basis for the association of DAP12 with mouse, but not human, NKG2D. *J Immunol*. 2004 Aug 15;173(4):2470-8.
- Rossig C, Bollard CM, Nuchtern JG, Merchant DA, Brenner MK.** Targeting of G(D2)-positive tumor cells by human T lymphocytes engineered to express chimeric T-cell receptor genes. *Int J Cancer*. 2001 Oct 15;94(2):228-36.
- Rossig C, Bollard CM, Nuchtern JG, Rooney CM, Brenner MK.** Epstein-Barr virus-specific human T lymphocytes expressing antitumor chimeric T-cell receptors: potential for improved immunotherapy. *Blood*. 2002 Mar 15;99(6):2009-16.
- Rossig C, Pscherer S, Baer A, Altvater B, Pule M, Rooney CM, Brenner MK, Juergens H, Vormoor J.** Target antigen expression on a professional antigen-presenting cell induces superior proliferative anti-tumor T cell responses via chimeric receptors. *Journal of Immunotherapy, in print*:2005.
- Rudd CE, Schneider H.** Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2003 Jul;3(7):544-56.
- Schaible UE, Kaufmann SH.** CD1 molecules and CD1-dependent T cells in bacterial infections: a link from innate to acquired immunity? *Semin Immunol*. 2000 Dec;12(6):527-35. Review.
- Schatzle JD, Sheu S, Stepp SE, Mathew PA, Bennett M, Kumar V.** Characterization of inhibitory and stimulatory forms of the murine natural killer cell receptor 2B4. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A*. 1999 Mar.; 96(7):3870-5.
- Schengrund CL, Repman MA, Shochat SJ.** Ganglioside composition of human neuroblastomas. Correlation with prognosis. A Pediatric Oncology Group Study. *Cancer*. 1985 Dec 1;56(11):2640-6.
- Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, Kundig TM, Kishihara K, Wakeham A, Kawai K, Ohashi PS, Thompson CB, Mak TW.** Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science*. 1993 Jul 30;261(5121):609-12.
- Sivori S, Parolini S, Falco M, Marcenaro E, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A.** 2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation. *Eur J Immunol*. 2000 Mar;30(3):787-93.
- Sivori S, Falco M, Marcenaro E, Parolini S, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A.** Early expression of triggering receptors and regulatory role of 2B4 in human natural killer cell precursors undergoing in vitro differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2002 Apr;99(7):4526-31.

- Stancovski I, Schindler DG, Waks T, Yarden Y, Sela M, Eshhar Z.** Targeting of T lymphocytes to Neu/HER2-expressing cells using chimeric single chain Fv receptors. *J Immunol.* 1993 Dec 1;151(11):6577-82.
- Sutherland CL, Chalupny NJ, Schooley K, VandenBos T, Kubin M, Cosman D.** UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol.* 2002 Jan 15;168(2):671-9.
- Tangye SG, Lazetic S, Woollatt E, Sutherland GR, Lanier LL, Phillips JH.** Cutting edge: human 2B4, an activating NK cell receptor, recruits the protein tyrosine phosphatase SHP-2 and the adaptor signaling protein SAP. *J Immunol.* 1999 Jun.; 162(12):6981-5.
- Topp MS, Riddell SR, Akatsuka Y, Jensen MC, Blattman JN, Greenberg PD.** Restoration of CD28 expression in CD28- CD8+ memory effector T cells reconstitutes antigen-induced IL-2 production. *J Exp Med.* 2003; 198(6):947-55.
- Verneris MR, Karami M, Baker J, Jayaswal A, Negrin RS.** Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8+ T cells. *Blood.* 2004 Apr 15;103(8):3065-72.
- Vivier E, Tomasello E, Paul P.** Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition? *Curr Opin Immunol.* 2002 Jun;14(3):306-11. Review.
- Walker RE, Bechtel CM, Natarajan V, Baseler M, Hege KM, Metcalf JA, Stevens R, Hazen A, Blaese RM, Chen CC, Leitman SF, Palensky J, Wittes J, Davey RT Jr, Falloon J, Polis MA, Kovacs JA, Broad DF, Levine BL, Roberts MR, Masur H, Lane HC.** Long-term in vivo survival of receptor-modified syngeneic T cells in patients with human immunodeficiency virus infection. *Blood.* 2000 Jul 15;96(2):467-74.
- Weijtens ME, Willemsen RA, Valerio D, Stam K, Bolhuis RL.** Single chain Ig/gamma gene-redIRECTED human T lymphocytes produce cytokines, specifically lyse tumor cells, and recycle lytic capacity. *J Immunol.* 1996 Jul 15;157(2):836-43.
- Weinberg AD, Vella AT, Croft M.** OX-40: life beyond the effector T cell stage. *Semin Immunol.* 1998 Dec;10(6):471-80. Review
- Weissman AM, Hou D, Orloff DG, Modi WS, Seuanez H, O'Brien SJ, Klausner RD.** Molecular cloning and chromosomal localization of the human T-cell receptor zeta chain: distinction from the molecular CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Dec;85(24):9709-13.
- Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, Phillips JH.** An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science.* 1999 Jul 30;285(5428):730-2.

- Yokoyama S, Staunton D, Fisher R, Amiot M, Fortin JJ, Thorley-Lawson DA.** Expression of the Blast-1 activation/adhesion molecule and its identification as CD48. *J. Immunol.* 1991 Apr.; 146(7):2192-200.
- Yun CO, Nolan KF, Beecham EJ, Reisfeld RA, Junghans RP.** Targeting of T lymphocytes to melanoma cells through chimeric anti-GD3 immunoglobulin T-cell receptors. *Neoplasia.* 2000 Sep-Oct;2(5):449-59.
- Zaunders JJ, Dyer WB, Wang B, Munier ML, Miranda-Saksena M, Newton R, Moore J, Mackay CR, Cooper DA, Saksena NK, Kelleher AD.** Identification of circulating antigen-specific CD4+ T lymphocytes with a CCR5+, cytotoxic phenotype in an HIV-1 long-term nonprogressor and in CMV infection. *Blood.* 2004 Mar.; 103(6):2238-47.

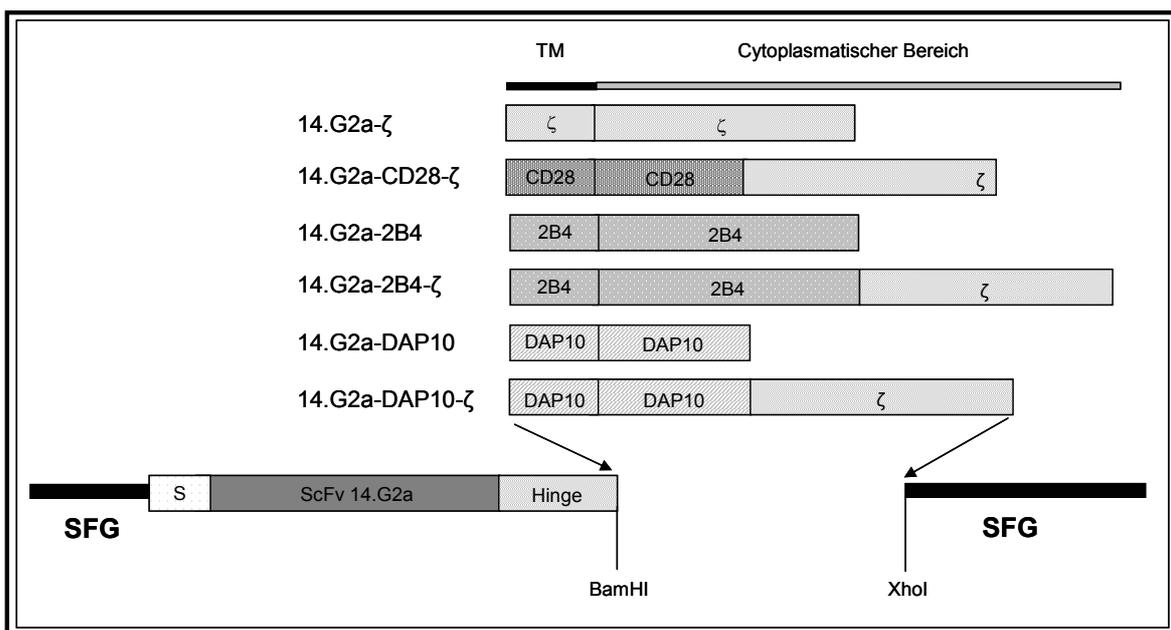
## Anhang

### Vektor: SFG:14.G2a-ζ



### Schematische Darstellung der Signaltransduktionsdomänen

Die verschiedenen Signaltransduktionsdomänen wurden über die BamHI und XhoI Schnittstellen in den retroviralen SFG-Vektor kloniert.



**Oligonukleotidprimer**

Primer	Sequenz
5'Zeta	AGA GTG AAG TTC AGC AGG AGC GCA
3'Zeta XhoI	GAT CAC <u>CTC GAG</u> TGG CTG TTA GCG AGG
5'EcoRI 2B4	ACT GCG <b>AAT TCC GGA TCC</b> TTG GCC GTT TTT GGT GAT C
3'2B4 XhoI	GAT CAC <u>CTC GAG</u> CTA GGA ATA AAC ATC AAA GTT C
3'2B4 Zeta	<b>TGC GCT CCT GCT GAA CTT CAC TCT</b> GGA ATA AAC ATC AAA GTT C
5'BamHI DAP10	ACT GCG <b>GAT CCT</b> CTC TCT CTG CCG CTC
3'DAP10 XhoI	GAT CAC <u>CTC GAG</u> GGA GGG TCA GCC CCT
3'DAP10 Zeta	<b>TGC GCT CCT GCT GAA CTT CAC TCT</b> GCC CCT GCC TGG CAT GTT GAT GTA

XhoI-Schnittstelle – unterstrichen

BamHI-Schnittstelle – ***Fett und Kursiv***

EcoRI-Schnittstelle – **Fett**

Zum Schluss möchte ich allen herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Prof. Dr. Jürgens für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung der Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens.
- Prof. Dr. Weber, für die Übernahme des Erstgutachtens und die freundliche Aufnahme.
- Dr. Claudia Rössig für ihre fachliche Unterstützung und ihre Begeisterungsfähigkeit.
- Allen Kolleginnen und Kollegen in der Pädiatrischen Hämatologie/Onkologie und dem KMT-Zentrum für das angenehme Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft.
- Sibylle Pscherer und Silke Landmeier für die stete Hilfsbereitschaft und die hervorragende Zusammenarbeit.
- Dr. Susanne Duwe für ihre fachliche Hilfe und die guten Ideen.
- Allen Blutspendern, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.
- Meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums und ihre bedingungslose Unterstützung.

