

Generierung einer Maus mit Antigen Rezeptor transgenen T-Zellen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Olga Hahn (geb.Makhnatkina)

aus Minsk (Weissrussland)

Köln, April 2011

Berichterstatter: Prof. Dr. Jens Brüning
Prof. Dr. Hinrich Abken
Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Günter Plickert
Tag der Disputation: 12. April 2011

Abstract

Adoptive T cell therapy with chimeric antigen receptor (CAR) modified T cells combines the specificity of antibodies, capacity of lymphocytes to tumor-penetrating and the potential of activated T cells for the elimination of tumor cells. By this method CAR modified activated effector cells develop specific cytolytic effects towards the tumor. In contrast to cell culture experiments, the process of tumor elimination in mice models can be analyzed in the context of interaction between the established tumor and the immune system.

The aim of this work was to generate a transgenic mouse with conditional expression of a CAR with specificity for carcinoembryonic antigen (CEA) on T-cells to get a model for such investigations. The transgenic mouse was generated by transfection of embryonic stem cells using the *Cre/loxP* system. Both CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocyte express the CAR. Transgenic animals also show no phenotype or tissue-specific differences to wild-type mice and have no shorter life than normal mice. The mice are immunocompetent in the presence of CAR T-cells. After pre-activation of the isolated CAR bearing T lymphocytes, they were activated *in vitro* by CEA⁺ tumor cells measured by IFN- γ secretion. Resting T cells do not lyse *in vitro* CEA⁺ tumor cells.

Transplanted CEA⁺ tumor cells were rejected by the anti-CEA-CAR transgenic animals. Wild-type mice, which were transferred with the CAR transgenic T cells, also did not develop the tumor. By renewed challenge with tumor antigen the transgenic animals also did not develop tumor with the lower antigen expression.

This mouse model offers the opportunity to study questions about the antigen-specific activation, tolerance and auto-immunity of T cells with specificity for an auto-antigen.

Inhaltsverzeichnis

Abstract

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Immuntherapie mit durch Chimären Antigen Rezeptor (CAR) modifizierten T-Zellen	1
1.2	Drei Generationen der CAR.....	4
1.3	Carcinoembryonales Antigen (CEA).....	8
1.4	Die CAR transgene Maus als Modell für die adoptive Immuntherapie.....	9
1.5	Zielsetzung	13
2	Material	14
2.1	Stammlösungen und Puffer	14
2.2	Größenmarker für die Gel-Elektrophorese.....	15
2.3	Medien und Medienzusätze für Bakterienkultur.....	15
2.4	Bakterienstämme.....	15
2.5	Zelllinien	16
2.6	Mauslinien.....	17
2.7	Medien und Medienzusätze für die Zellkultur	17
2.8	Antikörper	19
2.9	Restriktionsendonukleasen und Restriktionspuffer.....	20
2.10	Oligonukleotide.....	20
2.11	Vektoren.....	21
3	Methoden	22
3.1	DNS-Präparation	22
3.1.1	Mini-Präparation von Plasmid-DNS durch Bindung an eine Anionenaustauscher-Säule.....	22
3.1.2	Midi-Präparation von Plasmid-DNS durch Bindung an eine Anionenaustauscher-Säule.....	22
3.1.3	Schnellpräparation der Plasmid-DNS nach der Koch-(boeling) Methode	23
3.2	Enzymatische Reaktionen mit doppelsträngiger DNS.....	23

3.2.1	DNS-Spaltung mit Restriktionsenzymen.....	23
3.2.2	Ligation von DNS-Doppelsträngen	24
3.2.3	Reinigung und Konzentrationsbestimmung von DNS.....	24
3.3	Bakterienkultur.....	26
3.3.1	Herstellung chemokompetenter E.coli DH5 α Bakterien	26
3.3.2	DNS-Transformation chemokompetenter Bakterien	27
3.4	Plasmid-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode	27
3.5	Zellkultur.....	28
3.5.1	Auftauen von Zellen	29
3.5.2	Gelatinisieren von Gewebekulturschalen	29
3.5.3	Kultivierung von embryonaler Stammzellkultur	29
3.5.4	Präparation von embryonalen Maus-Fibroblasten (EF-Zellen).....	30
3.5.5	Inaktivieren von Fibroblasten-Zellen.....	31
3.5.6	Passagieren von ES-Zellen oder EF-Zellen	31
3.5.7	Ablösen und Vereinzeln adhärenter Zellen	31
3.5.8	Einfrieren von Zellen	32
3.5.9	Stabile Transfektion der ES-Zellen durch Elektroporation	32
3.5.10	Selektion der neomycinresistenten ES-Zellklone	33
3.5.11	Isolierung von ES-Zellklonen.....	33
3.6	Murine ES Analyse	34
3.6.1	Präparieren und Verdauen von genomischer DNS in 96-Well-Platten	34
3.6.2	Genotypisierung mittels Southern Blot.....	34
3.6.3	Expansion von positiven ES-Zell Klonen.....	36
3.7	Generierung chimärer Mäuse aus embryonalen Stammzellen.....	37
3.8	Testen der chimären Mäuse auf Keimbahntransmission	37
3.9	Genotypisierung der mutanten Mauslinien	38
3.10	Zucht von konditionellen R26 ⁺ /cag-car/Cre <i>Knock in</i> Tg Mäusen	38
3.11	Isolierung muriner T-Lymphozyten.....	38
3.12	Präparation von murinen T-Zellen aus dem Blut für die FACS-Analyse.....	39
3.13	Immunfluoreszenz (FACS)-Analysen.....	40
3.14	Kokultivierung mit Antigen-positiven Tumorzellen.....	40
3.15	XTT-basierender Zytotoxizitätstest	41
3.16	Enzym-gekoppelter Immunadsorbanttest (ELISA).....	42

3.17	Tumorinduktion durch s.c. Injektion.....	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Klonierung des Vektors mit dem anti-CEA-CAR #1015 SCA431-Fc-CD28-CD3 ζ	46
4.2	Modifikation der ES-Zellen	49
4.3	Etablierung und Genotypisierung der mutanten Mauslinie	51
4.3.1	Kreuzung der transgenen Tiere.....	51
4.3.2	Genotypisierung der ROSA26+/cag-car/Cre Maus	55
4.4	Analyse der CAR transgenen Mäuse	56
4.4.1	Histologische Analyse der ROSA26+/cag-car/Cre Maus.....	56
4.4.2	Expression des CARs in T- Zellen transgener Tiere	57
4.5	Funktionelle Charakterisierung der transgenen SCA431-Fc-CD28-CD3 ζ exprimierenden T-Zellen.....	61
4.5.1	Ko-Inkubation ruhender CAR exprimierenden T-Zellen mit CEA+ C15A3 Tumorzellen	61
4.5.2	T-Zellen Aktivierung nach der Ko-Inkubation prä-aktivierten transgenen T-Zellen mit CEA+ C15A3 Tumorzellen.....	62
4.5.3	Spezifische Zytolyse CEA+ C15A3 Tumorzelllinie nach der Ko-Inkubation mit CAR transgenen T-Zellen nach der Prä-Aktivierung <i>in vitro</i>	63
4.5.4	Anti-Tumor Aktivität der CAR transgenen T-Zellen <i>in vivo</i>	64
5	Diskussion	70
	Zusammenfassung	77
	Anhang.....	78
	Literaturverzeichnis	89

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)
AK	Antikörper
AmpR	Ampicillin-Resistenzgen
APC	Allophycocyanin
ATCC	engl.: American type culture collection
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CAG	engl.: a combination of chicken beta-actin promoter and cytomegalovirus immediate-early enhancer
CAR	Chimärer Antigen Rezeptor
CD	engl.: Cluster of differentiation
CEA	engl.: Carcinoembryonic antigen
CH2/3	engl.: constant region 2/3 of heavy chain
CMV	engl.: Cytomegalovirus
Cre	engl.: causes recombination
ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser
D-MEM	engl.: Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
(e)GFP	engl.: (enhanced) Green Fluorescent Protein
ELISA	engl.: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
EF-Zellen	embryonale Feederzellen
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflusszytometrie; engl.: Fluorescence Activated Cell Sorting
Fc	engl.: crystallisable fragment
FCS	engl.: fetal calf serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung, engl.: gravitational acceleration

GMP	engl.: good manufacturing practice
IC	engl.: intracellular (Domain)
IFN-γ	Interferon gamma
Ig	Immunoglobulin
IL-2/10	Interleukin 2/10
IRES	engl.: Intraribosomal Entry Side
ITAM	engl.: immunoreceptor tyrosine-based activation motif
kb	kilo-Basenpaare
LA	engl.: long arm
LB	engl.: Lysogeny broth
LIF	engl.: Leukemia inhibitory factor
Lκ	engl.: Kappa Leader (peptide)
Lox/p	engl.: locus of X-over P1
LTR	engl.: Long Terminal Repeat
MACS®	engl.: Magnetic Activated Cell Sorting
MFI	engl.: Mean Fluorescence Intensity
MHC	engl.: Major Histocompatibility Complex
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
mRNA	engl.: messenger Ribonucleic Acid
neoR	Neomycin-Resistenzgen
ng	Nanogramm
NF-κB	nuklearer Faktor κ B
OD	optische Dichte
ori	engl.: origin of replication
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	engl.: Phosphate Buffered Saline
PCR	engl.: Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PMS	Phenazin Methosulfat
PKS	Protein Tyrosin-Kinase
R26	ROSA 26 Locus
ROSA	engl.: reverse orientation splice acceptor β -gal).
rpm	engl.: revolutions per minute

RPMI	engl.: Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
SA	engl.: short arm
s.c.	subkutan
SCA	engl.: single-chain antibody
scFv	engl.: single chain fragment of variable region
SDS	engl.: Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SSC	engl.: saline sodium citrate
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAE	Tris-HCl/ Acetat/ EDTA Puffer
TBS	engl.: Tris-buffered Saline (vgl.Tris)
TCR	engl.: T-Cell Receptor
Tg	Transgen
TGF-β	engl.: Transforming Growth Factor Beta
TIL	Tumor-infiltrierender Lymphozyt
TM	Transmembran (-Domäne)
TNF	Tumornekrose Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u	engl.: Unit
UV	ultraviolett
VH/L	engl.: variable region of heavy/light chain
WHO	engl.: World Health Organization
WT	Wildtyp
XTT	Natrium ^{3'} -[1-[(Phenylamino)Karbonyl]-3,4-Tetrazolium]-bis(4-Methoxy-6- itro) Benzensulfonsäurehydrat
ZAP-70	engl.: zeta associated protein

1 Einleitung

Krebserkrankungen sind weltweit für ca. 7,6 Mio. Todesfälle jährlich verantwortlich. Bis 2030 wird eine weitere Zunahme auf etwa 17 Mio. prognostiziert (WHO 2010). Besonders in den Industrienationen steht Krebs als Todesursache nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen an zweiter Stelle. Die verschiedenen Krankheitsbilder maligner Erkrankungen besitzen vielfältige Ausprägungen hinsichtlich ihrer Ursachen, Pathologie, klinischer Symptome, Therapiesensibilität und Heilungschancen.

1.1 Immuntherapie mit durch Chimären Antigen Rezeptor (CAR) modifizierten T-Zellen

Obwohl eine frühe Krebsdiagnose macht es möglich, die Neoplasien in einem operablen Stadium zu erfassen, und die chirurgische Entfernung von Tumoren heute besser als vor 10 Jahren funktioniert, bleibt die Mortalität bei Krebserkrankungen weiterhin hoch. Das therapeutische Ziel besteht vordringlich darin, die hohe Anzahl der Krebstoten durch die Kombination verschiedener Therapieansätze zu senken. Neben konventionellen Ansätzen wie Operation, Bestrahlung und Chemotherapie werden zunehmend alternative Strategien wie die Immuntherapie zur Behandlung der Patienten eingesetzt. Eine Immuntherapie zielt darauf ab, die Spezifität des Immunsystems in der Erkennung und die lytische Aktivität für die Zerstörung von Tumoren auszunutzen. Dabei ergibt sich jedoch das Problem, dass T-Zellen tolerant sind gegenüber Tumorzellen und nicht als fremd erkennen. Die Tumorzellen exprimieren zwar „Tumor-assoziierte Antigene“, die jedoch toleriert werden, sodass keine effektive Immunantwort erfolgt. Die adoptive zelluläre Immuntherapie mit modifizierten T-Zellen bietet die Möglichkeit, die Erkennung definierter Antigene durch rekombinante T-Zellen-Rezeptoren zu vermitteln und dadurch das äußerst effektive zelluläre Immunsystem des Menschen zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen zu nutzen.

Das Hauptziel der adoptiven Immuntherapie ist die Transplantation langlebiger, durch Tumorzellen aktivierbarer Effektorzellen. Dieses kann dadurch erreicht werden, dass nach Gentransfer Chimäre Antigen Rezeptoren (CAR) in T-Zellen exprimiert werden, die MHC-unabhängig zur Erkennung eines Tumorantigens

befähigt sind. Die MHC-unabhängige Erkennung des Antigens ist von Vorteil, da in vielen Tumorzellen keine MHC-Präsentation mehr stattfindet. Dazu kann bei CAR durch die Fusion kostimulatorischer Signaldomänen eine fehlende Kostimulation aufrechterhalten werden, wenn Tumorzellen die Expression kostimulatorischer Liganden verlieren. Somit wird eine mögliche Anergie modifizierter T-Zellen abgewendet und eine Modifikation der Effektorfunktionen durch Kostimulation erzielt. Eine definierte Spezifität wird den T-Zellen durch Expression eines rekombinanten CAR auf der Zelloberfläche verliehen. Durch Verwendung eines Antikörpers im extrazellulären Teil des CARs als Bindedomäne wird die Spezifität für ein definiertes Antigen erzielt und die MHC Restriktion der T-Zellen-Erkennung umgangen. Der intrazelluläre Teil des CARs trägt eine oder mehrere Signaldomänen, die die T-Zellen aktivieren. Die Funktionalität dieser Rezeptoren beruht auf der Fusion eines Einzelkettenantikörpers („single chain variable fragment“, scFv) mit der signaltransduzierenden ζ -Untereinheit des CD3-Komplexes (Eshhar et al., 1993). Ein scFv-Antikörper besteht aus der variablen leichten Kette (VL) und der variablen schweren Kette (VH) eines Antikörpers, die über einen Linker miteinander verbunden werden. Die Stabilität der Expression rekombinanter Rezeptoren wird durch die Insertion einer Gelenkregion zwischen der antigenbindenden scFv-Domäne und der Signaldomäne entscheidend erhöht (Moritz et al., 1995; Hombach et al., 1998). Solch eine Gelenkregion besteht beispielsweise aus dem konstanten Fc-Anteil des humanen IgG₁ einschließlich der hinge Region. Zudem ist es entscheidend, dass eine stabile Expression der CAR auf der Oberfläche von T-Lymphozyten erreicht wird. Dieses wird durch die extrazelluläre Brückendomäne und die Ausbildung von Cystein-Brücken beeinflusst. Zusätzlich kann diese Domäne zur Detektion rekombinanter Rezeptoren auf der Zelloberfläche von transduzierten T-Lymphozyten genutzt werden, da häufig keine anti-idiotypischen Antikörper gegen die scFv-Domäne zur Verfügung stehen. Es folgen die Transmembrandomäne und die zytoplasmatische Signaltransduktionsdomäne des CD3-Komplexes (Abb.1). Die bevorzugt verwendete Signaldomäne ist die aus T-Zellen entnommene CD3 ζ Kette, die mit zusätzlichen kostimulatorischen Signalketten, beispielsweise aus CD28, OX40 oder 4-1BB, kombiniert werden kann (Review: Eshhar, 2008).

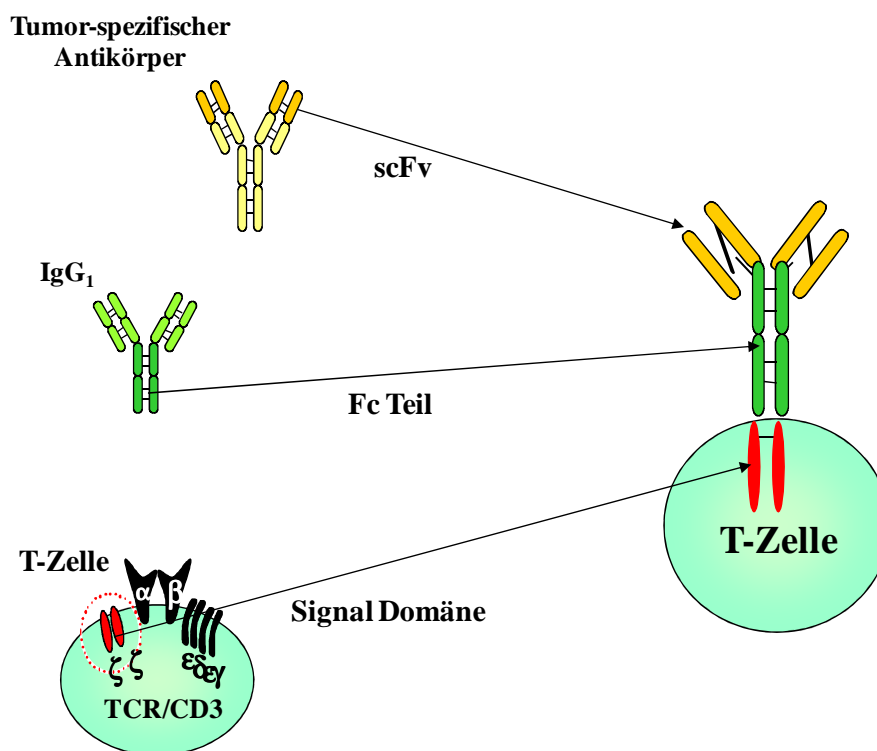


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines chimären Antigen Rezeptors. Die Antigen-bindende Domäne des CARs wird von der Einzelketten-Bindedomäne (scFv) eines monoklonalen Antikörpers mit definierter Spezifität abgeleitet. Der konstante Fc-Anteil eines IgG₁ stellt die Verbindung zu der intrazellulären CD3 ζ Signaldomäne her.

Das Ziel einer Krebstherapie ist die gezielte Zerstörung der malignen Zellen ohne Beeinträchtigung des gesunden Gewebes. Dadurch könnten gravierende Nebenwirkungen vermieden oder zumindest eingeschränkt werden. Wie in Dudley et al. 2008 gezeigt, eignen sich zelluläre Therapien zur Kombination mit klassischen Chemo- oder Strahlentherapien, da sie aufgrund der geringen systemischen Toxizität eine niedrige zusätzliche Belastung des Patienten bezeugen. In dieser Studie hat die Kombinationstherapie von aus Tumorgewebe gewonnenen Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) mit hoch dosiertem IL-2 bei über 50 % der Patienten mit metastasierendem Myelom nach, durch Chemotherapie bedingter Lymphodepletion zu partieller oder vollständiger Rückbildung des Tumors geführt. Die dabei verabreichten TIL hatten unbekannte Spezifitäten gegen den Tumor. Wünschenswert wären jedoch die hochwertigen tumorspezifischen zytotoxischen T-Zellen, einerseits, um eine unerwünschte Auto-Reaktivität der modifizierten T-Zellen zu vermeiden, und andererseits, da sie im Patienten lange überleben und zum Teil weiter proliferieren (Abb.2).

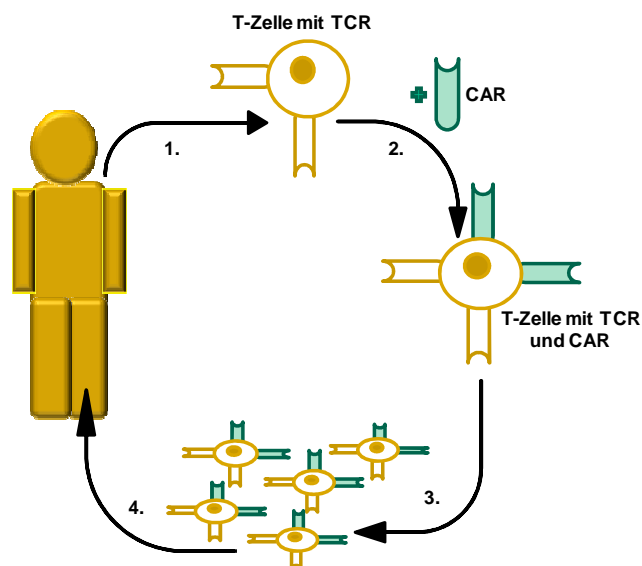


Abbildung 2: Schema des adoptiven Transfers genetisch modifizierter T-Zellen. T-Zellen werden aus dem Blut der Patienten isoliert (1.) und außerhalb des Körpers genetisch modifiziert-retroviral mit CAR ausgestattet (2.). Modifizierte CAR tragende T-Zellen werden unter GMP Bedingungen in ausreichender Menge hergestellt, ihre Wirksamkeit und Reinheit werden untersucht (3.). Nach der myeloablativen Lymphodepletion werden die CAR ausgestatteten T-Zellen zu dem Patient reimplantiert (4.).

Für die Expression der CAR ist ein Gentransferverfahren notwendig, das eine effiziente Transduktion von T-Lymphozyten ermöglicht. Bevorzugt werden hierfür retrovirale Vektoren benutzt, die für humane T-Zellen optimiert sind (Weijtens et al., 1998). Interessanterweise werden sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen sowie NK-Zellen mit Hilfe der CAR MHC-unabhängig und antigenspezifisch zytolytisch aktiv (Hombach et al., 2001; Charo et al., 2008). Durch eine Vielzahl verschiedener scFv sind die CAR in der Lage, spezifisch die Zielsubstanzen zu erkennen und zu binden. Da die Bindedomäne ein Antikörper ist, können neben Peptid-Antigenen auch nicht klassische T-Zell-Antigene erkannt werden, wie Kohlenhydrate.

1.2 Drei Generationen der CAR

CAR können den T-Zellen verschiedene Signale in Abhängigkeit von den intrazellulären Signaldomänen vermitteln. T-Zellen, die nur das primäre Signal durch die CD3 ζ Kette erhalten, sind in der Lage, effektiv Zytotoxizität zu vermitteln. Nach Bindung des Antigens an die scFv Domäne und nach Kreuzvernetzung des CARs auf der T-Zell Oberfläche wird die Induktion der zellulären Aktivierung von der

intrazellulären CD3 ζ -Signaltransduktionsdomäne vermittelt, die über drei Immunorezeptor-Tyrosin-Aktivierungs-Motive (ITAM) verfügt. Die Signaltransduktion ist von den ITAM-Aminosäuremotiven abhängig (Cambier et al., 1995). Die Phosphorylierung ITAMs Tyrosine durch die Protein Tyrosin-Kinase (PTK) leitet die Phosphorylierung weiterer Signalproteine wie ZAP-70 (Zeta-assoziiertes Protein) ein, die die Signale weiter stromabwärts transportieren (Straus et al., 1992; Van Oers et al., 1996). Die Zellen mit dem CAR, der ausschließlich die CD3 ζ Signaldomäne enthält, sind jedoch durch eine erhöhte Anfälligkeit für den Aktivierungs-induzierten Zelltod und geringe Persistenz *in vivo* gekennzeichnet (Wang et al., 2007). Rezeptoren mit lediglich der CD3 ζ Kette als signalgebender Domäne werden als CAR „erster Generation“ bezeichnet.

Durch Integration intrazellulärer kostimulatorischer Signaldomänen in den chimären CD3 ζ Rezeptor bekommt die Rezeptor-tragende T-Zelle ein kostimulatorisches Signal zusätzlich zu dem CD3 ζ Signal. CAR „zweiter Generation“ besitzen eine (z.B. CD3 ζ -CD28) und CAR „dritter Generation“ besitzen zwei (z.B. CD3 ζ -CD28-OX40) kostimulatorische Signalketten zusätzlich zur CD3 ζ Kette. Dies ist vor allem dann notwendig, wenn Zielzellen die Liganden für kostimulatorische Moleküle nicht exprimieren, wie es bei vielen Tumoren der Fall ist. Durch Kombination kostimulatorischer Signalketten erhält man eine optimierte Anti-Tumor-Aktivität der T-Zellen (Review: Abken et al., 2002).

Die klonale Expansion antigenspezifischer naiver T-Zellen benötigt ein zweites, kostimulatorisches Signal. Da Tumorzellen in der Regel ein sehr eingeschränktes Expressionsmuster kostimulatorischer Liganden aufweisen, führt das Fehlen von kostimulatorischen Signalen zu einer unvollständigen Aktivierung der CAR T-Zellen. Ein Lösungsansatz besteht in der Konstruktion von chimären Rezeptoren, die zusätzlich zur signaltransduzierenden CD3 ζ Kette eine kostimulatorische Domäne enthalten, bevorzugt die CD28 Domäne. Die Bindung an seine Liganden B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) auf der das Antigen präsentierenden Zelle bewirkt gemeinsam mit der TCR-Bindung eine erhöhte Produktion von IL-2, welche die klonale Expansion der T-Lymphozyten ermöglicht (Coyel et al., 2001). Die CD28 vermittelte Kostimulation zu einem CD28-CD3 ζ CAR verstärkt auch die IFN- γ Produktion (Hombach et al., 2001). Die Produktion und Sekretion von IFN- γ durch T-Zellen ist ein Maß für die Aktivierung und Verstärkung der zellulären Immunantwort. Die IFN- γ Produktion kann in T-Zellen durch die alleinige

Kreuzvernetzung des CARs ausgelöst werden, wobei die Signaltransduktion über die CD3 ζ Kette stattfindet. Die Stimulation durch einen chimären CD28-CD3 ζ Rezeptor war im Mausmodell in der Lage, die vollständige Aktivierung naiver T-Zellen zu erzielen (Friedmann-Morvinski et al., 2005). Die Stimulation der CD28 Domäne ist für die IL-2 Sekretion notwendig (Hombach et al., 2001). Zudem vermittelt die Aktivierung der T-Zelle über das CD28 Molekül die Transkription von bcl-2 und bcl-xL, deren Produkte den apoptotischen Zelltod der Effektorzelle verhindern. Eine verminderte Anfälligkeit für AICD der Rezeptor-tragenden T-Zellen bei der CD28-CD3 ζ intrazellulären CAR Domäne ist nachgewiesen (Emtage et al., 2008). Die Aktivierung des CD28 Korezeptors durch B7 stimuliert PI3-K und Lck-Kinase, welche zusammen mit PKC den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren, die an den Promoter des IL-2 Gens binden (Schraven et al., 1999). Die TGF-vermittelte Inhibition der Proliferation von T-Zellen am Tumorort, welche zur Unterdrückung der Immunantwort beiträgt, wird durch das kombinierte CD28-CD3 ζ Signal überwunden (Koehler et al., 2007). Dies führt zu einer größeren therapeutischen Effektivität der durch CAR kostimulierten T-Zellen *in vivo* (Emtage et al., 2008).

Ein anderer Kostimulator der gleichen Familie, OX40, vermittelt ein Signal, welches die Zytokin-Produktion steigert (Baum et al., 1994), das Überleben der Zellen durch Induktion der Expression von Bcl-2 und Bcl-xL fördert (Rogers et al., 2001), die klonale Expansion naiver CD4⁺ T-Zellen induziert (Gramaglia et al., 1998) und die Bildung der Gedächtniszellen aus Effektor T-Zellen fördert (Maxwell et al., 2000).

Finney et al., 2004 zeigten, dass im Vergleich verschiedener kostimulatorischer Signaldomänen in Kombination mit der CD3 ζ Signalkette in einem CAR die CD28 Signaldomäne ruhende T-Zellen besser aktiviert als OX40 oder 4-1BB. Um die zusätzlichen Vorteile der Stimulation durch Moleküle, die in späteren T-Zell-Entwicklungsstadien relevant sind, zu nutzen, besteht die Möglichkeit, CAR mit den drei intrazellulären Signalketten, beispielsweise von CD28, CD3 ζ und OX40, zu verwenden. Die Verwendung von CAR „erster Generation“ wurde in ersten klinischen Studien evaluiert. Dabei wurde eine geringe Persistenz der Rezeptor-tragenden Zellen *in vivo* festgestellt. Korrelierend damit wurde bei nur wenigen Patienten ein objektiver Rückgang der Tumorlast beobachtet (Kershaw et al., 2006; Park et al., 2007; Till et al., 2008). Da die klinische Wirksamkeit mit der Persistenz der T-Zellen einher geht, werden CAR „zweiter Generation“ mit den Signalketten von CD28 und CD3 ζ zur kombinierten Stimulation der adoptiv transferierten

T-Zellen verwendet, was das Überleben der Zellen verlängern soll. Die bessere Eignung dieser Rezeptoren in einem CEA+ Tumormodell wurde durch Voruntersuchungen demonstriert (Emtage et al., 2008). Darüber hinaus wird der Verwendung eines CARs „dritter Generation“ hohes Potenzial beigemessen. In diesem Zusammenhang wurde in einem präklinischen Modell von der Eliminierung großer etablierter Tumore durch T-Zellen mit Rezeptor-vermittelten Signalen von CD28, 4-1BB und CD3 ζ berichtet (Carpenito et al., 2009). Der CD28-CD3 ζ -OX40 CAR zeigt eine bevorzugte Stimulation der Effektor Memory Zellen (Ederer et al., nicht publiziert). Drei Generationen von CAR sind schematisch in der Abb.3 dargestellt.

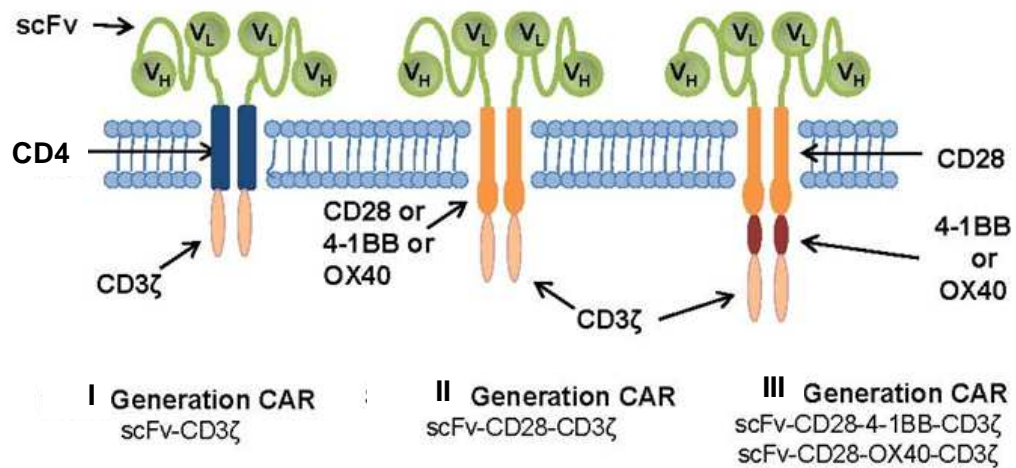


Abbildung 3: Die drei Generationen der CAR. Die erste Generation CAR (I) besteht aus einem single chain Fragment (scFv), der sich an das Antigen bindet und aus einer schweren (VH) und einer leichten Kette (VL) besteht. In diesem CAR ist nur CD3 ζ Signalkette vorhanden. In der zweiten Generation CAR (II) sind intrazellulär zusätzlich zum CD3 ζ einer der Domänen CD28, 4-1BB oder OX40 vorhanden. Die dritte Generation CAR (III) hat intrazellulär drei Domänen: CD28-4-1BB-CD3 ζ oder CD28-CD3 ζ -OX40.

1.3 Carcinoembryonales Antigen (CEA)

Das Auffinden molekularer Unterschiede zwischen Normalzellen und Krebszellen bildet nicht nur die Grundlage zum Verständnis von malignen Transformationen, sondern eröffnet auch neue Wege zur Entwicklung von geeigneten Zielstrukturen zur Eliminierung von Tumorzellen. Innerhalb der letzten Jahrzehnte wurde eine Vielzahl Tumor-assoziiertes-Antigene (TAA) mit Hilfe immunologischer Methoden identifiziert (Sadelain et al., 2009). Derartige Antigene wurden auf der Oberfläche, im Zytoplasma und im Zellkern von Tumorzellen nachgewiesen. Häufig werden auf der Zelloberfläche exprimierte Tumor-assoziierte-Antigene proteolytisch gespalten, sodass diese im Serum von Tumorpatienten nachweisbar sind. Das Carcinoembryonale Antigen (CEA) ist eines dieser Tumor-assoziierten Antigene. Die CEA Genfamilie gehört zur Immunoglobulin-Superfamilie und wird von 29 Genen kodiert. Zur CEA Untergruppe gehören die dem CEA verwandten Zelladhäsionsproteine, die auf zahlreichen epithelialen, endothelialen und hämatopoetischen exprimiert werden (sogenannte Carcinoembryonic Antigen Cell Adhesion Molecule, abgekürzt CEACAM). Alternatives Splicing führt zu zahlreichen weiteren, dem CEA verwandten Proteinen, die nicht nur bei Zelladhäsion, sondern auch bei der Neoangiogenese eine Rolle spielen (Wagener C. et al, 2000). Das Protein CEA ist ein durch posttranslationale Modifikation hochgradig glykosiliertes, 200 kDa integrales Membranprotein. Physiologischerweise wird CEA in den ersten sechs Monaten vom Fetus in großen Mengen im Bereich des Darmes, des Pankreas und der Leber exprimiert. Ein Erwachsener hat eine geringe CEA Expression im Darm, aber hohe Expression auf Adenokarzinomen. Dort ist ein extrazelluläres Adhäsionsmolekül, das eine Rolle bei der Interaktion der Tumorzellen untereinander und der Kommunikation der Karzinomzellen mit dem peritumoralen Gewebe spielt (Oikawa S. et al, 1989). CEA wird als Zielantigen für den Einsatz von monoklonalen Antikörpern verwendet (Chan und Stanners, 2004; Blumenthal et al., 2005). CEA ist bei Tumoren häufig überexprimiert.

Die klinische Hauptanwendung des CEA liegt in der Beurteilung des Serumwertes im Langzeitverlauf zur Prognoseeinschätzung (Goldstein und Mitchell, 2005). So weisen bleibend hohe CEA Werte nach der chirurgischen Entfernung eines kolorektalen Tumors und besonders ein Wiederanstieg auf ein rezidivierendes Krankheitsgeschehen hin (Thompson et al., 1991). Dieses wird somit oft bereits zu einem Zeitpunkt erkennbar, an dem klinische Untersuchungen und bildgebende

Verfahren noch keinen Hinweis auf ein Rezidiv liefern. Eine Erhöhung des Serumwertes für CEA über die Obergrenze von 2,5 ng/ml ist jedoch nicht nur bei Tumoren des Gastrointestinaltrakts, sondern auch bei einer Reihe von anderen Neoplasien und bei entzündlichen Erkrankungen der Leber oder der Gallenblase zu erwarten.

1.4 Die CAR transgene Maus als Modell für die adoptive Immuntherapie

Mäuse sind neben den Menschen die am besten untersuchte Spezies der Säugetiere. Durch das vollständig sequenzierte Genom des Menschen und der Maus können vergleichende Studien zu neuen Erkenntnissen führen. Etwa 99 % aller identifizierten Gene der Maus besitzen ein homologes Gen im humanen Genom, von denen wiederum etwa 96 % in einem vergleichbaren Kontext angeordnet sind. 80 % der Gene der Maus haben dabei genau eine Entsprechung im humanen Genom. Dies zeigt, dass die Maus als Modellorganismus für die Entwicklung des Menschen geeignet ist, auch wenn sicherlich nicht alle gewonnenen Erkenntnisse unmittelbar übertragbar sind.

Die Entwicklung von Methoden zur Manipulation von Mausembryonen in den letzten Jahren führte zu einer immer häufigeren Verwendung transgener Maus-Modelle. Bereits 1974 konnte gezeigt werden, dass sich in die frühe Blastozyste injizierte Teratokarzinom-Zellen an der Entwicklung des Mausembryos beteiligen können und auf diese Weise chimäre Tiere erzeugt werden können. Die Entdeckung, dass die Injektion gereinigter DNS in den Pronukleus einer befruchteten Eizelle zur stabilen Transformation der Zellen einer neugeborenen Maus führen kann, ermöglichte die Generierung der ersten, ein Transgen exprimierenden Maus. Ein weiterer wichtiger Schritt war die Isolierung und Vermehrung pluripotenter embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) und die Entdeckung, dass sich diese nach Injektion in frühe Embryonen zu allen Zelltypen des adulten Tiers, inklusive Zellen der Keimbahn, entwickeln können. Durch retroviralen Gentransfer in embryonale Stammzellen und anschließende Injektion der modifizierten Zellen in Maus-Blastozysten wurden chimäre Tiere geschaffen, welche die exogene DNS stabil in Keimzellen integriert hatten. Durch homologe Rekombination können Gene in ES-Zellen gezielt manipuliert werden. Der entscheidende Grund für die Verwendung der ES-Zellen ist ihre Kapazität, sich in allen Geweben der drei Keimblätter zu

differenzieren. Embryonale Stammzellen können zudem als reine Population undifferenzierter Zellen über lange Zeiträume in Kultur gehalten und expandiert werden. Im Gegensatz zu Tumorzelllinien behalten sie in hohen Passagenzahlen einen normalen Karyotyp. ES-Zellen behalten ihre Pluripotenz, wenn sie auf „feeder“ Zellen (EF-Zellen) und unter Zugabe von Leukemia Inhibitory Factor (LIF), das die Differenzierung von ES-Zellen inhibiert, kultiviert werden.

Ein großer Fortschritt konnte durch die Entwicklung des *Cre/loxP*-Systems gemacht werden zur Erzielung eines zell- und entwicklungspezifischen *knock-in* oder *out* eines Gens. Die sequenzspezifische Cre-Rekombinase katalysiert die Rekombination zwischen zwei spezifischen Erkennungsstellen. Diese sogenannten *loxP*-Elemente (locus of crossover) bestehen aus einer asymmetrisch gerichteten Kernregion (8 bp) und zwei flankierenden palindromen Wiederholungen (13 bp). Abhängig von der Orientierung zweier *loxP*-Elemente zueinander führt das Rekombinationsereignis zur Deletion oder Inversion des *loxP*-flankierten DNS-Segmentes. Die Cre-Rekombinase ist in der Lage, DNS-Sequenzen, die von *loxP*-Seiten flankiert sind, spezifisch zu rekombinieren und zu entfernen. Um ein Zielgen oder ein Stück DNS mit Hilfe des *Cre/loxP*-Systems konditional auszuschneiden, müssen zunächst durch „Gene Targeting“ zwei *loxP*-Elemente so in die Ziel-DNS eingebracht werden, dass sie das Gen flankieren. In Abwesenheit von Cre bleibt diese gefloxt DNS-Sequenz intakt. Die Rekombinase Cre wird transgen in einer zweiten Maus exprimiert (Abb.4). Durch Kreuzung der Cre transgenen Maus mit der Maus mit gefloxter DNS wird in den Nachkommen die Rekombination zwischen den zwei *loxP*-Elementen nur in den Zellen erzeugt, in denen die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des spezifischen Promoters exprimiert. Diese Zellen exprimieren anschließend das Zielgen, da die Stopp-Kassette die Transkription nicht mehr verhindert. Die Zellen, wo die Rekombination nicht stattgefunden hat, exprimieren kein Transgen.

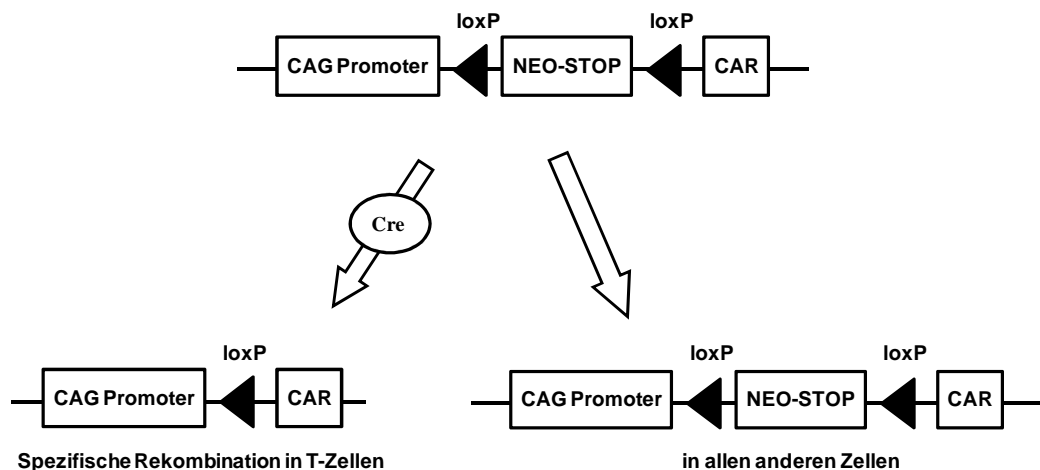


Abbildung 4: Schematische Darstellung *Cre/loxP* System. Der CAR soll konditional in T-Zellen exprimiert werden. Deswegen wurde in den ROSA26 Locus die Expressionskassette NEO-STOP-CAR eingebracht. Zu Beginn dieser Kassette steht eine loxP flankierte transkriptionsterminierende Sequenz, die ein Neomycinresistenzgen und ein STOP Signal enthält, danach folgt die cDNS des CARs. Nach der Verpaarung mit der Cre-Maus, die die Cre-Rekombinase in T-Zellen exprimiert, werden in T-Zellen das Neomycinresistenzgen und die STOP-Kassette durch die Cre vermittelte Rekombination ausgeschnitten, was die Transkription der CAR unter der Kontrolle des CAG Promoters ermöglicht. Andere Zellen exprimieren kein CAR aufgrund der STOP-Kassette vor dem Target-Gen.

Die gezielte Mutagenese von Genen mittels provozierter homologer Rekombination wird als „Gene Targeting“ bezeichnet. Dafür wird ein Konstrukt, das Sequenzhomologien zum Zielgen und einen positiven Selektionsmarker, häufig das Neomycin-Resistenzgen (Geneticin G418), enthält, in ES-Zellen eingeführt. Die Neo-Resistenz erlaubt ES-Zellen, die das Konstrukt stabil in ihr Genom integriert haben, unter Selektionsbedingungen zu überleben. Die selektierten ES-Zellen werden in Blastozysten injiziert und in den Uterus von scheinträchtigen Mäusen transferiert. Die geborenen Chimären werden mit Wildtyp Mäusen verpaart. So wird festgestellt, ob während der Embryoentwicklung aus genetisch veränderten ES-Zellen Keimbahnzellen hervorgegangen sind. Heterozygote Tiere werden miteinander verpaart mit dem Ziel, Homozygote Mäuse zu generieren. Diese Technologie ermöglicht die gezielte Inaktivierung von endogenen Genen (*knock-out*), die Insertion neuer ausgewählter Gene oder DNS-Fragmente in einen bestimmten Locus unter die Kontrolle eines endogenen Promoters (*knock-in*), sowie Veränderungen wie Punktmutationen und chromosomale Neuordnungen. Ein Problem könnte sein, dass das deletierte Gen während der Embryogenese essentiell ist oder die Insertion eines

neuen Genes (*knock-in*) letale Konsequenzen hervorbringen kann. Um diese Nachteile zu umgehen, wurde das konditionale „Gene Targeting“ entwickelt. Diese Technik ermöglicht die Entfernung der Selektionskassetten sowie die Aktivierung oder Inaktivierung der Genexpression *in vitro* oder *in vivo* in definierten Zellen und/oder Geweben. Zusätzlich ermöglicht das konditionale „Gene Targeting“ die An- oder Ausschaltung der Genexpression zum gewünschten Entwicklungszeitpunkt. Dieser Prozess verhindert die embryonale Letalität, die durch die Veränderung des Genoms hervorgerufen werden könnte. Da es nur bei der gleichzeitigen Expression der Cre-Rekombinase und der geflochten DNS-Sequenz in einer Zelle gemeinsam zu einer Rekombination kommen kann, ist es möglich, diesen Zeitpunkt durch das Verwenden von gewebs- oder zelltypspezifischen *Cre*-Promotoren zu bestimmen. Zur konditionalen Anschaltung des Zielgens kommt es, wenn die geflochte und die Cre-Maus miteinander gekreuzt werden. Nach Kreuzung beider Mausstämmen induziert die gewebespezifische Aktivierung der Cre-Rekombinase die Rekombination zwischen den zwei *loxP*-Elementen im Zielgen.

In transgenen Mausmodellen unerwünscht sind Einflüsse regulatorischer Elemente des Insertionsortes auf das Expressionsverhalten der ins Genom eingebrachten Gene. Als besonders geeigneter Integrationsort wurde der ROSA26-Locus ausgewählt, der in der Maus ubiquitär exprimiert und für das „Gene Targeting“ leicht zugänglich ist. ROSA steht hierbei für „reverse orientation splice acceptor β -gal“. Folgende weitere Eigenschaften führten zur Wahl dieses Locus:

(1) Der ROSA26-Locus zeichnet sich durch mittelstarke Transkriptionsaktivität im gesamten Organismus und vor allem in den Zellen des hämatopoetischen Systems aus, sowohl während der Embryogenese als auch in der adulten Maus (Zambrowicz et al., 1997) und ist universell zugänglich.

(2) Die Inaktivierung der ROSA26-Transkripte führt zu keiner phänotypischen Veränderung (Zambrowicz et al., 1997). Dadurch eignet sich dieser Locus für die Generierung transgener Knock-In Mauslinien (Farley et al., 2000; Rideout et al., 2000).

(3) Mittels homologer Rekombination lassen sich Transgene mit hoher Effizienz in den Locus integrieren (Soriano, 1999; Srinivas et al., 2001; Nyabi et al., 2009) und weisen ein Expressionsmuster auf, das der Expression des ROSA26-Gens entspricht (Soriano, 1999; Mao et al., 2001).

(4) Verschiedene Studien konnten durch die Generierung von Cre-Reporterlinien verdeutlichen, dass der ROSA26-Locus zugänglich für die Aktivität von Cre-Rekombinasen ist (Soriano, 1999; Srinivas et al., 2001; Nyabi et al., 2009).

(5) Die Insertion einer für den ROSA26-Locus etablierten Stopp-Kassette (Buch et al., 2005) bewirkt die Eliminierung endogener Transkriptionsaktivität. Der ROSA26-Locus ist offensichtlich von Gen-Silencing-Effekten abgegrenzt.

1.5 Zielsetzung

Mausmutanten stellen wichtige Modelle für menschliche Krankheiten dar. Dies gilt in besonderem Maße für die Immunforschung.

Im Rahmen dieser Arbeit soll in T-Zellen konditional ein chimärer Antigen Rezeptor zweiter Generation mit CD3-CD28 Signalkette Spezifität gegen das CEA Tumor Antigen exprimiert werden.

Aus Sicht der adaptiven Immuntherapie ergab sich die argumentative Notwendigkeit zur Erzeugung transgener Mausmodelle für die Beantwortung der folgenden Fragen:

1. Hat die transgene CAR Expression in T-Zellen einen morphologischen oder physiologischen Einfluss auf die Entwicklung der Maus?
2. Exprimieren alle ruhenden T-Zellen den CAR?
3. Wird eine Immunantwort gegen CEA+ Tumorzellen induziert?
4. Wird die Zytokinproduktion der CAR T-Zellen durch Serum-Tumor Antigen CAR-spezifisch induziert?
5. Erfolgt eine Tumorabstoßung nach der Injektion von CEA+ Tumorzelllinien in der transgenen und der Wildtyp Maus?

Die Generierung der CAR transgenen Maus soll dazu beitragen, in einem Tier-Modell einen klinischen Einsatz von chimären Antigen T-Zell Rezeptoren in der adoptiven Immuntherapie zu evaluieren.

2 Material

2.1 Stammlösungen und Puffer

ABTS-Puffer

4,1 g CH_3COONa ; 3,9 g NaH_2PO_4 ; mit ddH_2O auf 500 ml auffüllen (bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ lagern)

Hybridisierungspuffer für Southern Blot (pH 7,2)

7 % SDS 10 mM ; 0,25 M NaHPO_4 ; 1 mM EDTA ; 1 % BSA

PBS

8,0 g/l NaCl entspricht 137 mM; 0,2 g/l KCl entspricht 2,7 mM; 1,44 g/l Na_2HPO_4 entspricht 10 mM oder 2,68 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,24 g/l KH_2PO_4 entspricht 2 mM; pH 7,4 (mit HCl einstellen)

PBS/T

PBS mit 0,1% (v/v) Tween®-20 (Merck, Darmstadt)

SSC-Puffer (saline sodium citrate) (20x)

175,3g NaCl entspricht 3 M; 88,2 g Na-Citrat (Trinatriumcitrat) entspricht 0,3 M; 800ml H_2O zufügen, pH 7 einstellen, bis 1L H_2O zufügen

TAE-Puffer (50x)

242g Tris-HCl entspricht 2 M; 57,1 ml/l Eisessig; 100ml EDTA entspricht 50 m M, pH 8,5

Tris-HCl

10 mM Tris-Base, eingestellt mit 37 %-iger Salzsäure auf pH 8,4

Ethidiumbromid

(Sigma, Deisenhofen)

Ethidiumbromid wird in ddH_2O in einer Stammlösung zu 10 mg/ml angesetzt.

2.2 Größenmarker für die Gel-Elektrophorese

DNS-Größenmarker, (MBI Fermentas GeneRuler™, Hannover)

Größenstandard	doppelsträngige DNS-Fragmentgröße (in bp)
1 kb DNS Ladder	14 Fragmente: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250
100bp DNS Ladder	10 Fragmente: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100
MassRuler™ DNS Ladder, High Range, ready-to-use	9 Fragmente: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500
MassRuler™ DNS Ladder, Low Range, ready-to-use	11 Fragmente: 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80

2.3 Medien und Medienzusätze für Bakterienkultur

Alle Nährmedien wurden vor Gebrauch 20 min bei 120 °C autoklaviert. Hitzelabile Zusätze wie Antibiotika wurden steril filtriert und dem Medium erst nach dem Autoklavieren zugegeben.

LB-Medium

10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefe-Extrakt; 10 g/l NaCl

LB-Agar

1l LB-Medium; 15 g Bacto-Agar

Ampicillin

Zur Selektion Ampicillin-resistenter Bakterienstämme wurden 0,1mg Ampicillin (Merck, Darmstadt) pro ml LB-Medium eingesetzt.

Kanamycin

Zur Selektion Kanamycin-resistenter Bakterienstämme wurden 0,25mg Kanamycin (Sigma; Deisenhofen) pro ml LB-Medium eingesetzt.

2.4 Bakterienstämme

E.coli DH5α

(Woodcock et al., 1989) F-, endA1, hsdR17 (rκ-, mκ-) supE44, thi-1, lambda-, recA1, gyrA96, Φ 80 d lacZ δ M15

2.5 Zelllinien

293T

(Pear, 1993) Derivat von 293-Zellen, die das SV40 large T-Antigen exprimiert. Die Zellen werden in RPMI 1640-Medium (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), 10 % (v/v) FCS und 1 % (w/v) Penizillin, Streptomycin kultiviert.

C15A3

Stabil CEA-exprimierende MC38-Transfektoma Zelllinie. Die Zellen werden in RPMI 1640 Medium (Dutch Modification) 10 % (v/v) FCS und 1 % (w/v) Penizillin, Streptomycin kultiviert.

Maus ES-Zellen

Bruce 4 männliche embryonale Stammzellen der 18. Passage wurden freundlicherweise von der AG Prof. Dr. J. Brüning, Institut für Genetik, Uni Köln, zur Verfügung gestellt.

Maus EF-Zellen

Neomycin resistent embryonale Fibroblastenzellen aus der Maus, als „Feeder-Zellen“ der 0. bis 3. Passage benutzt, wurden freundlicherweise von AG Prof. Dr. J. Brüning, Institut für Genetik, Uni Köln, zur Verfügung gestellt.

Maus T-Lymphozyten

Die Lymphozyten wurden aus der Milz gewonnen, indem die isolierten T-Lymphozyten in MACS getrennt und anschließend in RPMI 1640-Medium (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), 10 % (v/v) FCS, 1% (w/v) Penizillin, Streptomycin und IL-2 (400 U/ml) kultiviert wurden.

MC38

CEA-negative murine kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie der Maus des Stamms B6. Die Zellen werden in RPMI 1640-Medium (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), 10 % (v/v) FCS und 1 % (w/v) Penizillin, Streptomycin kultiviert.

2.6 Mauslinien

CD4-Cre

Transgene Mäuse aus der hauseigenen Zucht Institut für Genetik

Fellfarbe: schwarz

C57BL/6

Wildtyp Mäuse stammen von Charles River , Sulzfeld, oder aus der hauseigenen Zucht, Fellfarbe: schwarz

2.7 Medien und Medienzusätze für die Zellkultur

Alle Medien wurden mit FCS, Penizillin (50 IE/ml) und Streptomycin (50 µg/ml) versetzt. Bei einer Kontamination mit Mycoplasmen wurde 10 µg/ml MycoKill (PAA Laboratories GmbH), gegen Penizillin bzw. Streptomycin-resistente Bakterien Gentamycin und bei Kontaminationen mit Hefen 0,5 µg/ml Fungizone eingesetzt.

BSA (Rinderserumalbumin)

(Roth)

β-Mercaptoethanol

(Sigma)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

(Gibco, Paisley, UK)

Formulierung mit 4500 mg/l Glykose, L-Glutamin und Natriumbicarbonat, Pyridoxalhydrochlorid durch Pyrodixinhydrochlorid ersetzt.

Einfriermedium

80% FCS; 20 DMSO

ES-Zellen Medium (für embrionale maus Stammzellen)

500 ml DMEM (+Glucose); 90 ml FCS; 6 ml MEM nicht essentielle Aminosäuren (100x); 6 ml Glutamine (200 mM); 6 ml Na-pyruvat (100 mM); 2,4 ml LIF (500U/ml)); 1,2 ml β-Mercaptoethanol (50 mM); 6 ml Penizillin-Streptomycin (100x; 200 mM)

Feeder Medium (für Maus primäre Fibroblasten)

500 ml DMEM (Glutamax); 75ml FCS; 6 ml Na-pyruvat (100 mM); 6 ml MEM nicht essentielle Aminosäuren (100x); 6 ml Penizillin-Streptomycin (100x; 200 mM)

Fetales Kälberserum (FCS)

(Biochrom KG, Berlin)

Fungizone

(GibcoBRL) 250µg/ml Amphotericin B,
Eingesetzte Konzentration: 0,5µg/ml Medium

Gelatine

(Sigma Aldrich, Steinheim) 2% (w/v)
Eingesetzte Konzentration: 0,1% (w/v) PBS

Geneticin (G418)

(Gibco, Paisley, UK) 50mg/ml H₂O
Eingesetzte Konzentration: 200µg/ml ES-Medium

MycoKill

(PAA Laboratories GmbH)
Eingesetzte Konzentration: 10 µg/ml Medium

Penizillin-Streptomycin

(GibcoBRL, Eggenheim)
Penizillin 50 IE/ml Medium, Streptomycin 50 µg/ml Medium

Phenol-Chlorophorm-Isopropanol

(Roth)

Propidiumiodid

(Sigma, Deisenhofen)

RPMI 1640 Medium

(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
Formulierung mit L-Glutamin und Natriumbicarbonat

RPMI 1640 (Dutch Modification)

Glutamin (4mM) in RPMI 1640 (dutch modification ohne L-Glutamin) + 50 µM β-Mercaptoethanol und Na-Pyruvat (1 mM)

Tween 80

(Roth)

2.8 Antikörper

Antikörper	aus	Spezifität	Herkunft
anti-mouse CD28	Hamster	Klon-Nr.: 37.51	PharMingen, Hamburg
anti-mous CD3e	Hamster	Klon-Nr.: 145-2C11	PharMingen, Hamburg
anti human IgG ₁	Ziege	polyklonal	Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham USA
anti mouse IgG ₁	Ziege	Klon-Nr.:15H6	Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham USA
anti-mouse CD3-PE	Hamster	Klon-Nr.:145-2C11	Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham USA
anti-mouse CD4-APC	Rate	Klon-Nr.: GK1.5	Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham USA
anti-mouse CD8-APC	Hamster	Klon-Nr.:53-6.7	Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham USA
Anti-maus CD19-APC	Rate	Klon-Nr.:1D3	eBioscience, Frankfurt
Anti-mouse NK-1.1 -APC	Maus	Klon-Nr.:Pk136	eBioscience, Frankfurt

2.9 Restriktionsendonukleasen und Restriktionspuffer

Name des Enzyms und Konzentration	Schnittstelle	Inkubationspuffer	Herkunft
<i>AscI</i> 10U/ μ l	5'-GG↓CGCGCC-3' 3'-CCGCGC↑GG-5'	NEB Puffer	BioLabs
<i>AsiI</i> 10U/ μ l	5'-GCGAT↓CGC-3' 3'-CGC↑TAGCG-5'	NEB Puffer	BioLabs
<i>EcoRI</i> 10-50/ μ l	5'-G↓AATTC-3' 3'-CTTAA↑G-5'	EcoRI Puffer	Fermentas
<i>EcoRV</i> 50U/ μ l	5'-GAT↓ATC-3' 3'-CTA↑TAG-5'	Buffer R	Fermentas

Puffer NEB: 50mM CH₃COOK, 20mM CH₃COOTris; 10mM Mg(CH₃COO)₂, 1mM DTE; pH 7.9

EcoRI Puffer: 50mM Tris-HCl; 10mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 0.002% Triton-X-100; 0.1mg/ml BSA; pH 8.2

Buffer R: 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl and 0.1 mg/ml BSA; pH 8.5

2.10 Oligonukleotide

(MWG-Biotech AG, Ebersberg)

Name vom Primer	Sequenz	Verwendungszweck	
		Typisierung	Sequenzierung
#136 p-Bullet 3' seq neu-AS	5'-cgt act ata ggc ttc agc tgg tga tat ttg -3'		x
#251 mIgG ₁ -S	5'-aac tgg gag gca gga aat act ttc acc-3'		x
#334 BW431-26-AscI-S	5'-tat agg cgc gcc acc atg gat ttt cag gtg cag att ttc agc ttc ctg-3'		x
#335 mOx40-AscI-AS	5'-tat agg cgc gcc tca gat ctt ggc cag agt aaa gtg tgc gtc-3'		x
#336 mCD3-AcsI-AS	5'-tat agg cgc gcc tta gcg agg ggc cag ggt ctg cat-3'		x
#568 Rosa-Type-forw	5'-aaa gtc gct ctg agt tgt tat c-3'	x	

Name vom Primer	Sequenz	Verwendungszweck	
		Typisierung	Sequenzierung
#569 Rosa-Type-rev-WT	5'-gat atg aag tac tgg gct ctt-3'	x	
#570 Rosa-REV-CAGs	5'-tgt cgc aaa tta act gtg aat c-3'	x	
CD4Cre	5'-ccc aac caa caa gag ctc-3'	x	
CD4 Cre2	5'-ccc aga aat gcc aga tta cg-3'	x	

2.11 Vektoren

In dieser Arbeit wurden Vektoren verwendet, die sich in ROSA26 Locus integrieren können. Sie verfügen neben den regulatorischen Stellen *loxP* und dem Resistenzgen (Amp^R), NeoR-STOP Kasette, „short arm of homology“ (SAH) und „long arm of homology“ (LAH) für die Integration in ROSA26, Diphtheria-Toxin (DTA) Sequenz für negative Selektion, „splicing acceptor site“ (SA), IRES, EGFP Marker, die unter den CAG oder CD4-Promoter stehen.

STOP-EGFP-ROSA-CAGs (#1013)

Targeting Vektor hat CAG-Promoter, 2 *loxP* Stellen, die NeoR-STOP Kasette flankieren, IRES und GFP Domäne.

Institut für Genetik, Universität zu Köln

STOP-EGFP-ROSA-CAGs-SCA431-mIgG₁-mCD28-mCD3zeta (#1015)

Vektor für CAR mit Einzelkettenbindedomäne des murinen anti-CEA scFv SCA431, muriner IgG₁-Fc Domäne sowie muriner CD28 Transmembran- und Signaldomäne und N-terminaler CD3 ζ Signaldomäne wird nach der Cre/LoxP Rekombination unter CAG-Promoter exprimiert

Labor für Tumorgenetik, konstruiert von Volha Makhnatkina

STOP-EGFP-ROSA-CD4s-SCA431-mIgG-mCD28-mCD3zeta (#1011)

Vektor für CAR mit Einzelkettenbindedomäne des murinen anti-CEA scFv SCA431, muriner IgG₁-Fc Domäne sowie muriner CD28 Transmembran- und Signaldomäne und N-terminaler CD3 ζ Signaldomäne wird nach der Cre/LoxP Rekombination unter CD4-Promoter exprimiert.

Labor für Tumorgenetik, konstruiert von Nadin Fein

3 Methoden

3.1 DNS-Präparation

3.1.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNS durch Bindung an eine Anionenaustauscher-Säule

(peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)

Zur Präparation kleinerer Mengen hoch reiner DNS für Sequenzierungen oder Klonierungen wurde das oben beschriebene Kit verwendet. Das Volumen der Übernachtskulturen betrug zwischen 1,5 und 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin. Am Vorabend der Präparation wurde das Medium mit zuvor gezüchteten Bakterienkolonien angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Die Plasmid-Präparationen erfolgten nach Herstellerprotokoll. Eluierte DNS wurde kurzfristig bei 4°C oder längerfristig bei -20°C gelagert.

3.1.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNS durch Bindung an eine Anionenaustauscher-Säule

(QuiaFilter Midi Kit, Quiagen, Hilden)

Eine 50 ml Bakterien-Übernachtskultur wurde 20min bei 5000x g 4 °C sedimentiert und in 4 ml Puffer P1 (50 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Für die effektive Lyse der Bakterien ist es wichtig, das Sediment durch Mischen vollständig zu resuspendieren. Daraufhin wurden 4 ml Puffer P2 (200 mM NaOH; 1 % SDS) zugegeben und vorsichtig gemischt, damit die genomische DNS nicht geschert wird. Nach 5 minütiger Inkubation bei RT wurde die Lösung mit 4 ml eiskaltem Puffer P3 (3M Kaliumacetat, pH 5,5) neutralisiert. Das Lysat wurde für 10 Minuten bei RT inkubiert. Das Zell-Lysat wurde durch Filtration (Qiafilter) von Bakterentrümmern, Proteinen und genomischer DNS befreit und auf die vorher mit 4 ml Puffer QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7; 15% (v/v) Ethanol; 0,15 % (v/v) Triton-X-100) äquilibrierte Anionenaustauschersäule (Quagen-tip 500) gegeben. Die beladene Säule wurde 2x mit je 10 ml Puffer QC (1M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7; 15 % (v/v) Isopropanol) gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNS erfolgte mit 5 ml Puffer QF (1,25 M NaCl; 50mM Tris-Cl, pH 8,5; 15% (v/v)

Isopropanol). Danach wurde die Plasmid-DNS durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol und anschließender 30 minütiger Zentrifugation bei 15.000x g, 4°C präzipitiert, mit 2 ml 70 %igem Ethanol gewaschen. Die sedimentierte Plasmid-DNS wurde bei RT getrocknet und schließlich in 150 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,4 aufgenommen. Aufbewahrt wurde die DNS entweder kurzfristig bei 4°C oder längerfristig bei -20 °C.

3.1.3 Schnellpräparation der Plasmid-DNS nach der Koch-(boeling)

Methode

(Holmes und Quigley, 1981)

Eine 1,5 ml Bakterien-Übernachtskultur wurde 3 Minuten bei 1100x g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zell-Sediment in 400 µl STET-Lösung (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA; 5 % (v/v) Triton-X-100; 0,1 M NaCl) resuspendiert. Die Suspension wurde mit 25 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml) durchmischt, 30 Sekunden gekocht und anschließend für 10 Minuten bei 13.000x g bei RT zentrifugiert. Die Plasmid-DNS im Überstand wurde durch Zugabe von 40 µl 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 420 µl Isopropanol präzipitiert und durch Zentrifugation 15 Minuten bei 13.000x g bei RT sedimentiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 1 ml 70%igem (v/v) Ethanol wurde die DNS an der Luft getrocknet und in 20 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,4 resuspendiert. Verbliebene RNA wurde durch Zugabe von 0.5 µg/µl RNaseA restrigiert.

3.2 Enzymatische Reaktionen mit doppelsträngiger DNS

3.2.1 DNS-Spaltung mit Restriktionsenzymen

Eine Restriktions-Enzymeinheit U ist definiert als die Menge Enzym, die 1 µg DNS des Phagen Lambda in einer Stunde vollständig verdaut. Für analytische und präparative Zwecke wurde die zu restrigierende DNS mit 2-3 Einheiten Restriktionsenzym pro µg DNS bei den vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen (in der Regel 37°C) für 1 h bis über Nacht inkubiert. Das Reaktionsvolumen betrug dabei mindestens das Zehnfache des Volumens der zugesetzten Enzym/Glycerin-Lösung. Bei Doppelrestriktion wurden Enzyme mit gleichem Pufferanspruch gemeinsam zugegeben; andernfalls wurde zuerst die Restriktionsspaltung mit dem Enzym und Puffer niedriger Ionenstärke durchgeführt,

und nach Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation erfolgte die Restriktionsspaltung mit dem zweiten Enzym und entsprechendem Puffer höherer Ionenstärke. Bei Plasmid-DNS aus Minipräparationen, die mit RNA verunreinigt war, wurde der Reaktion 0.5 µg/µl RNaseA zugesetzt. Zur Größenbestimmung und Reinigung der Fragmente wurde die DNS über ein Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.2 Ligation von DNS-Doppelsträngen

Isolierte DNS-Fragmente mit kohäsiven überlappenden Enden wurden in einem 3 bis 5-fach molaren Überschuss mit linearisierter Vektor-DNS gemischt. Nach der Zugabe von 2 Units T4-DNS-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim) und 1/10 Volumen 10fach Ligationspuffer wurde der Reaktionsansatz über Nacht bei 14°C inkubiert (T3000 Thermocycler, Biometra GmbH, Goettingen). Das Gesamtvolumen betrug zwischen 10 und 20 µl. Anschließend wurde der Ligationsansatz zur Transformation von kompetenten Bakterien eingesetzt oder ein Teil längerfristig bei -20°C gelagert.

3.2.3 Reinigung und Konzentrationsbestimmung von DNS

Phenol/Chloroform-Extraktion der linearisierten DNS

(Chomczynski und Sacchi, 1987)

Zu dem 300 µl restrigierten Ansatz wurden 300 µl Phenol/Chloroform (1:1) unter dem Abzug zugefügt, gemischt und 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Trennung der zwei Phasen konnte man gut sehen. Die Oberphase mit DNS wurde in einen neuen 1,5 ml Eppendorf-Gefäß abgenommen und 300 µl Isopropanol wurden zugefügt, nach der leichten Vermischung wurde die Mischung 30 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol (70 %) zu dem Sediment wurde die linearisierte DNS für die weitere Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Agarose-Gelelektrophorese

(Sub Cell GT / Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad Laboratories, München)

Zur analytischen und präparativen Auftrennung der DNS wurden horizontale Agarosegele mit TAE-Puffersystem verwendet. Die DNS Proben wurden mit 6x

Beladungspuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt und mittels Gelelektrophorese für 0,5 bis 1,5 h bei 8 bis 12 V pro cm Gelbreite aufgetrennt. Zum Anfärben der DNS wurde der 1%igen (w/v) Agaroselösung 2 µl Ethidiumbromid pro 100 ml zugesetzt. Die Analyse erfolgte unter UV-Licht (245 nm) durch Vergleich mit dem Größenstandard.

Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarose

(QIAquick®, Qiagen, Hilden)

Die Auftrennung und Aufreinigung mittels Restriktionsspaltung für die Klonierung erzeugter DNS-Fragmente erfolgte durch die präparative Agarose-Gelelektrophorese. Anschließend wurde die gewünschte Bande unter UV-Licht (245 nm) identifiziert, ausgeschnitten und das Gewicht des Gelstücks bestimmt. Die Gelpräparation von maximal 400 mg erfolgte nach Herstellerprotokoll. Eluierte DNS-Fragmente wurden unmittelbar weiterverarbeitet oder kurzfristig bei 4 °C gelagert.

Photometrische Bestimmung

(Gene Quant RNA/DNS Calculator, Pharmacia, Freiburg)

Zur Bestimmung der Konzentration einer wässrigen Nukleinsäure-Lösung wurde mittels eines Foto-Spektrometers die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gegen Tris-HCl als Leerwert gemessen. Der Reinheitsgrad der Lösung wurde durch den Extinktionskoeffizienten E_{260}/E_{280} abgeschätzt. Reine DNS-Lösungen besitzen einen Quotienten von 1,8. Bei 1 cm Strahlengang entspricht eine $OD_{260nm} = 1$ der Nukleinsäure-Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNS.

Mengenabschätzung im Agarosegel im Vergleich zu Markerbanden

(MassRuler™ DNS Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot)

Bei dieser Methode ist eine Mengenabschätzung bei gleichzeitiger Identifikation der präparierten DNS möglich. Die zirkuläre DNS wurde dafür durch Restriktions-Endonukleasen linearisiert und in einem 1%igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt. Unter dem UV-Licht (245 nm) wurde die Intensität der DNS-Banden mit Marker-DNS-Banden gleicher Größe und bekannter Konzentration verglichen.

3.3 Bakterienkultur

3.3.1 Herstellung chemokompetenter *E.coli* DH5 α Bakterien

(modifiziert nach Hanahan, 1983)

Am Vorabend des Herstellungstages wurden 5 ml LB-Medium ohne Antibiotika mit 10 μ l DH5 α aus einem Aliquot der zuvor benutzten kompetenten Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Am Versuchstag wurden jeweils 200 ml LB-Medium ohne Antibiotika in 1l-Erlenmeyerkolben mit 2 ml Vorkultur angeimpft und im Schüttler bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD 590 nm von maximal 0,4 (gegen LB-Medium) wachsen gelassen. Nach Erreichen der optimalen Dichte kühlten die Kulturen auf Eis mindestens 10 min ab. Von diesem Zeitpunkt an wurden alle Arbeitsschritte auf Eis und im 4 °C-Kühlraum ausgeführt. Die Bakterien wurden in einer vorgekühlten Zentrifuge 10 min bei 1600x g und 4 °C abzentrifugiert. Zur Verminderung zu hoher Beschleunigungsbelastungen wurden die Brems- und Beschleunigungswerte der Zentrifuge (Avanti® J-E, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) herabgesetzt. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 10 ml eiskaltem CaCl₂-Puffer (60 mM CaCl₂-Dihydrat 10mM PIPES 15 % (w/v) Glycerin, pH 7) vorsichtig gelöst und durch langsames Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Weitere 10 ml Puffer wurden hinzugegeben und bei 4 °C und 1100x g 7 min ab zentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Überstands wurde die Resuspension wie oben beschrieben wiederholt und die Bakteriensuspension 30 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte 7 min eine weitere Zentrifugation bei 4 °C und 1100x g. Der Überstand wurde verworfen und die Bakteriensediment in 4 ml Puffer wie beschrieben resuspendiert. Die vereinigte Bakteriensuspension wurde zu jeweils 100 μ l aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Alle Materialien waren sterilisiert und wurden ab dem Vortag des Versuchstages bei 4 °C gelagert. Die erzeugte Kompetenz wurde durch Transformation mit jeweils 10 und 100 pg des Plasmids pUC19 (Invitrogen GmbH, Darmstadt) getestet und mittels Auswählen der Kolonien bestimmt. Die Kompetenz betrug zwischen 10⁶ und 10⁷ Colony-forming units pro μ g DNS.

3.3.2 DNS-Transformation chemokompetenter Bakterien

(Hanahan 1983)

Bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerte kompetente Bakterien ($100\text{ }\mu\text{l}$ pro $1,5\text{ ml}$ Reaktionsgefäß) wurden auf Eis aufgetaut und mit 5 bis $10\text{ }\mu\text{l}$ des Ligationsansatzes oder 10 - 50 ng der Plasmid-DNS gemischt. Anschließend wurden die Bakterien 30 min auf Eis und für 90 Sekunden bei 42°C inkubiert. Danach wurden die Bakterien sofort 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von $600\text{ }\mu\text{l}$ LB-Medium (ohne Antibiotikum) wurden die Bakterien 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 200 rpm inkubiert. Am Ende wurde aus jedem Eppendorf-Gefäß das Gesamtvolumen entnommen und auf Ampicillin-haltige LB-Agarplatten ausgestrichen.

3.4 Plasmid-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode

(ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, ABI-Prism Sequencer, Applied Biosystems, Warrington, GB)

Die DNS-Sequenzierung wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Das Prinzip dieses enzymatischen Verfahrens beruht auf dem Einbau von fluoreszenzmarkierten $2'$, $3'$ Didesoxy-Nukleotiden (ddNTPs) in einen durch die DNS-Polymerase I neu synthetisierten DNS-Strang. Dies führt zum Abbruch der Synthese, da die für die Kettenverlängerung benötigte $3'$ -Hydroxylgruppe im Didesoxy-Nukleotid fehlt. Auf diese Weise wird die Polymerisierung selektiv bei A, C, G oder T terminiert. Es entsteht eine Vielzahl von unterschiedlich langen DNS-Fragmenten, die sich durch ein fixes $5'$ -Ende und ein variables, basenspezifisches $3'$ -Ende auszeichnen. Durch den Einsatz von vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (A: di-chloro Rhodamin 6G [R6G]; C di-chloro-carboxy X Rhodamin [ROX]; G di-chloro Rhodamin 110 [R110]; T di-chloro-tetramethyl Rhodamin [TAMRA]) können alle vier enzymatischen Sequenzierreaktionen gleichzeitig in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Durch Gelelektrophorese in einem denaturierenden Polyacrylamidgel werden die unterschiedlich langen DNS-Fragmente getrennt.

Reaktionsansatz für die Sequenzreaktion:

x µl Matrizen-DNS (150-300 ng)
 2 µl Sequenzierungs-Oligonukleotide (10 pmol)
 0,5 µl Terminator-Ready-Reaction-Mix
 5 µl 5x Puffer
 x µl ddH₂O 1 µl Matrizen-DNS (100-200 ng)

Σ 10 µl

Der Reaktionsansatz wurde nach folgendem PCR-Programm amplifiziert. Es wurden 30 Zyklen mit einem spezifischen Temperaturprofil in einem programmierbaren Heizblock (UNO II, Biometra®) durchgeführt:

1. Hitzedenaturierung:	96 °C	60 Sekunden
2. Hitzedenaturierung:	96 °C	30 Sekunden
3. Anlagerung der Oligonukleotide:	50 °C	15 Sekunden
4. Polymerisation (je nach Länge):	60 °C	240 Sekunden
90 Reaktionszyklen (2.-4.)		
5. Kühlung	4 °C	

Zur Präzipitation der amplifizierten DNS wurde die Probe in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 80 µl ddH₂O, 1/10 Volumen (10 µl) 3 M Na-Acetat (pH 5,2) mit Dextran-Blau und 3 Volumen (300 µl) Ethanol abs. gemischt und für 10 min bei RT gefällt. Die DNS wurde durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 10.000x g und 4 °C sedimentiert. Im Anschluss daran wurde das DNS-Sediment mit 250 µl 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und erneut bei 4 °C, 10.000x g, 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment bei RT getrocknet. Die Auswertung der Sequenzierreaktion erfolgte am ABI-Prism Sequencer (Applied Biosystems).

3.5 Zellkultur

Allgemeine Kulturbedingungen

Alle Zellkulturarbeiten wurden in Laboren der Sicherheitsstufe I oder II unter einer Sterilbank der Sicherheitsklasse II (Fa. Heraeus) durchgeführt. Die Zellen wurden in

Inkubatoren (Fa. Heraeus) unter 5 %iger oder 10 %iger (v/v) CO₂-Versorgung bei 37 °C und 95 %iger bis 100%iger Luftfeuchtigkeit kultiviert. Kulturgefäße, Medien, Zusätze und Lösungen wurden nach dem Autoklavieren oder Sterilfiltrieren unter sterilen Bedingungen gehandhabt. Vor Gebrauch wurden die verwendeten Medien sowie Wasch- und andere Lösungen auf die geeignete Temperatur vorgewärmt oder abgekühlt.

3.5.1 Auftauen von Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden sofort in 9 ml warmes Kulturmedium überführt. Die Zellen wurden 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Sediment in der benötigten Menge Kulturmedium resuspendiert und auf Zellkulturschalen verteilt.

3.5.2 Gelatinisieren von Gewebekulturschalen

Die Gewebekulturschalen wurden für 10-30 min mit einer 0.1% (w/v) Gelatinelösung in PBS überschichtet, anschließend wurde die Lösung wieder abgenommen.

3.5.3 Kultivierung von embryonaler Stammzellkultur

Murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Linie Bruce 4 aus C57/B16 Mäusen und die murine embryonale Fibroblasten-Zellen (EF-Zellen) wurden freundlicherweise von AG Brüning, Institut für Genetik, Uni Köln, zur Verfügung gestellt.

ES-Zellen müssen mit größter Sorgfalt in Kultur gehalten werden, damit sie ihren embryonalen Charakter bewahren. Eine ungewollte Differenzierung der pluripotenten Zellen in spezifische Zelltypen muss vermieden werden. Es hat sich bewährt, ausschließlich mit Plastikpipetten zu arbeiten, um einer Kontamination durch organische Lösungsmittel oder Spülmittelreste vorzubeugen.

Die ES-Zellen wurden in ES-Medium auf 10 cm - 6 cm Zellkulturschalen oder auf 96-well Platten bei 37 °C und 10 % CO₂ kultiviert. Die ES-Zellen wurden zur Erhaltung ihrer Pluripotenz auf mitotisch inaktivierten primären, embryonalen Maus-Fibroblasten (EF), als Feeder-Zellen bezeichnet, kultiviert, täglich versorgt und jeden zweiten Tag je nach Dichte 1:3 verdünnt und neu ausgesät. Die Fibroblasten wurden

aus Mausembryonen isoliert, dreimal passagiert und mit Mitomycin C behandelt, um ihre Zellteilung zu verhindern, damit sie die ES-Zellen in der Ko-Kultur nicht überwachsen. Die ES-Zellen erhielten jeden Tag frisches ES-Medium. Die Morphologie der ES-Zellen wurde jeden Tag überprüft. Unter optimalen Bedingungen wachsen ES-Zellen als tropfenförmige Kolonien mit regelmäßigem Rand. In der Kolonie sind nur schwer Einzelzellen zu identifizieren, da ES-Zellen in engem Zell-Zell-Kontakt wachsen.

3.5.4 Präparation von embryonalen Maus-Fibroblasten (EF-Zellen)

Da bei der Kultivierung der transfizierten ES-Zellen zur Selektion Neomycin (G418) als Selektionsmarker verwendet wurde, müssen die Fibroblasten ebenfalls eine Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum besitzen. Zur Präparation dieser Zellen wurden deswegen Embryonen verwendet, die aus Verpaarungen von Wildtyp und einer transgenen Mauslinie, des Genotyps *cd44*^{-/-} (eine Neomyzinkassette führte in diesen Mäusen zum Funktionsverlust des *cd44*-Gens) stammten (Schmits et al., 1997). Schwangere Mäuse wurden durch cervikale Dislokation getötet, das Abdomen mit 70% (v/v) Ethanol desinfiziert und median an der Peritonealhöhle aufgeschnitten. Der Uterus duplex mit den Implantationen wurde entnommen und in eiskaltes PBS überführt. Die weitere Präparation erfolgte unter dem Binokular unter sterilen Bedingungen. Mit einer Schere wurde der Uterus zwischen den einzelnen Implantationen durchtrennt. Nach Entfernen des Uterusgewebes und der embryonalen Hüllen (Dottersack und Amnion) wurden der Kopf und die inneren Organe der Embryonen abgetrennt. Das restliche Rumpfgewebe wurde mit der Schere zerkleinert und in 1x Trypsin für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit einer 5 ml Pipette vereinzelt und anschließend wurden die Zellen durch ein Zellsieb (40 µm) in ein vorbereitetes 50 ml Röhrchen mit frischem EF-Medium überführt. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden 2 ml Fibroblasten-Kulturmedium pro 1 ml Trypsin eingesetzt. Die Zellen wurden durch 5 min Zentrifugieren bei 1200 rpm pelletiert, in frischem Medium resuspendiert und pro Embryo auf eine 15 cm Gewebekulturschale bei 37 °C kultiviert. Nach 24 h wurde das Kulturmedium gewechselt. Nach drei Tagen waren die EF-Zellen konfluent gewachsen und wurden passagiert. Nach 3 Passagen wurden die Kulturen seneszent und konnten nicht mehr zur Ko-Kultur mit ES-Zellen verwendet werden.

3.5.5 Inaktivieren von Fibroblasten-Zellen

Nachdem das Kultivierungsmedium von der 15 cm Gewebekulturschale, auf der die EF-Zellen konfluent gewachsen waren, abgesaugt worden war, wurden die Zellen in 10 ml EF-Medium mit MMC (1mg/ml) für 2,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das EF-Medium mit MMC abpipettiert, zweimal mit 1xPBS gespült, die Zellen mit 1% Trypsin-Lösung abgelöst, bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert und in EF-Medium resuspendiert oder eingefroren. Die inaktivierten Fibroblasten einer 15 cm Platte konnte man auf drei 10 cm Kulturschalen, drei 6well Kulturschalen oder drei 96well Gelatine-beschichtete Platten verteilen. Nach ca. 2-4 Stunden bildeten EF-Zellen nach Adhäsion einen dichten 'Monolayer', dann konnten die ES-Zellen zur Kultivierung auf die inaktivierten Fibroblasten gegeben werden.

3.5.6 Passagieren von ES-Zellen oder EF-Zellen

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und 5 min mit 1 % Trypsin bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch Resuspendieren vereinzelt, anschließend in Zell-Kulturmedium aufgenommen und bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in frisches Kulturmedium aufgenommen, im Verhältnis 1:3 verdünnt und entweder auf gelatinisierten (EF-Zellen) oder auf mit bereits ausplattierten inaktivierten primären Fibroblasten (ES-Zellen) Gewebekulturschalen verteilt.

3.5.7 Ablösen und Vereinzeln adhärenter Zellen

Das Ablösen und Vereinzeln von ES-Zellen und Feeder wurde mit Hilfe einer Trypsin -Lösung durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um inhibierende Medienbestandteile (FCS) zu entfernen. Danach wurde Trypsin-Lösung auf die Zellen gegeben, damit diese gerade bedeckt waren (z.B. 3 ml für eine 10 cm Schale). Nach 5 min Inkubation bei 37 °C und gelegentlichem Klopfen der Schale, um Zellaggregate mechanisch aufzulösen, wurde die Reaktion mit serumhaltigem Medium abgestoppt und die Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vollständig vereinzelt. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (5 min, 1200 rpm) und in neuem Medium in der gewünschten Konzentration resuspendiert.

3.5.8 Einfrieren von Zellen

Die trypsinisierte Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen und bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO) aufgenommen, auf Kryoröhrchen verteilt und direkt auf Eis gestellt. Um den Stoffwechsel der Zellen zu verlangsamen, wurden sowohl die Kryoröhrchen als auch das Einfriermedium bis kurz vor Gebrauch auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden zunächst bei -80 °C eingefroren und nach 24 Stunden in flüssigen Stickstoff umgelagert.

3.5.9 Stabile Transfektion der ES-Zellen durch Elektroporation

Durch Elektroporation kann Plasmid-DNS effizient in Zellen eingebracht werden. Um zu gewährleisten, dass sich die ES-Zellen in einer logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurden sie 3 Tage vor der Elektroporation passagiert und auf 10 cm Gewebeflasche wachsen gelassen. Am Tag der Elektroporation wurde das ES-Medium 4 Stunden vor der Elektroporation gewechselt, direkt vor der Elektroporation wurden die ES-Zellen mit PBS gewaschen und 3 min mit 5 ml 1% Trypsin bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde es durch Resuspendieren vereinzelt, in 10 ml ES-Medium aufgenommen und bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 10 ml frisches ES-Medium aufgenommen, auf eine mit Gelatine beschichtete Gewebekulturschale gegeben und 30 min 37 °C inkubiert. In dieser Zeit heften sich die EF-Zellen an die Oberfläche der Gewebekulturschale. Somit konnten die ES-Zellen durch Spülen von den Fibroblasten getrennt werden. Die ES-Zell-Suspension wurde abgenommen, zweimal mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen und die Anzahl der Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur Elektroporation wurden zweimal 10^7 Zellen in 400 µl eiskaltem Elektroporationspuffer (farblose RPMI ohne alles) aufgenommen, mit 400µl (40 mg) linearisierten Plasmid-DNS vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben (gesamtes Volumen 800 µl). Zur Herstellung transgener ES-Zellklone mit stabiler Integration des Transgenkonstrukts wurden 40 mg des linearisierten, isolierten Plasmids #1015 nach *AsisI*-Restriktionsspaltung (etwa 18 kb) elektroporiert. Ungefähr 60-80% der neomycinresistenten Klone werden Plasmid-DNS stabil in das Genom aufnehmen (Torres und Kühn, 1997). Die Elektroporation wurde mit folgenden Parametern durchgeführt: BioRad Gene Pulser, 230 V und 500 mF. Die elektroporierten Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert, in

40 ml ES-Medium (ohne Selektionsantibiotikum) aufgenommen, auf vier 10 cm Gewebekulturschalen mit EF-Zellen ausgesät und bei 37 °C, 10 % CO₂ inkubiert.

3.5.10 Selektion der neomycinresistenten ES-Zellklone

Die Neomycin-Selektion der ES-Zellen begann am Tag 2 nach der Elektroporation. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und Selektionsmedium (250 µg/ml G418 in ES-Medium) zugegeben. Das Selektionsmedium wurde jeden Tag durch frisches Medium ersetzt. Nach vier Tagen begannen die ES-Klone, die das Neomycin-Resistenzgen nicht stabil in das Genom integriert hatten, abzusterben. Die Selektion dauerte bis Tag 9.

3.5.11 Isolierung von ES-Zellklonen

Am Tag 10 nach der Elektroporation und G418 Selektion wurden die einzelnen neomycinresistenten ES-Zellen, die während dieser Zeit große Kolonien gebildet hatten einzeln isoliert und auf die neu Platte verteilt. Die einzelnen Kolonien sollten scharf begrenzt, aber nicht flach sein. Die 10 cm Zellkulturschale mit den Klonen wurde nach zweimaligem Waschen mit 12 ml PBS überschichtet. Die Kolonien wurden mit einer 40 µl-Pipette unter dem Mikroskop isoliert, in 25 µl kaltes Trypsin pro Vertiefung einer 96-well Platte überführt und im Inkubator 3 bis 5 min lösen lassen. Durch Zugabe von 100 µl warmen ES-Medium wurde der Trypsinierung gestoppt und durch pipettieren die Zellen vereinzelt. 50 µl der Zellsuspension wurden auf einer gelatinierten 96-well Platte mit 150 µl ES-Medium für die Southern Blot Analyse der Zellen ausgesät. Die restlichen 100 µl der ES-Zellsuspension wurde auf zweimal 96-well Platten mit 100 µl ES-Medium auf EF-Zellen (Masterplatten) für die Erhaltung der Zelllinie aufgeteilt. Masterplatten dienen dem Expandieren der einzelnen ES-Zellklone. Das Selektionsmedium wurde alle 24 h gewechselt und nach ca. fünf Tagen waren die ES-Zellklone konfluent gewachsen. Die ES-Zellklone wurden mit PBS gewaschen und Medium (40 ml Kulturmedium und 80 ml Einfriermedium pro ES-Zellklon) wurde zugegeben. Die zwei Masterplatten wurden anschließend bei -80 °C aufbewahrt.

3.6 Murine ES Analyse

3.6.1 Präparieren und Verdauen von genomischer DNS in 96-Well-Platten

Homolog rekombinierte ES-Zell-Klone wurden mit Hilfe von Southern Blot identifiziert. Zunächst wurde genomische DNS aus ES-Zellen in 96-Well Platten isoliert. Hierzu wurden die konfluent bewachsenen Platten mit 50 µl pro well Lysepuffer/Proteinase K (10 mM Tris pH 7,5; 10 mM EDTA 10 mM NaCl; 0,5 % Sarcosyl; 2 mg/ ml Proteinase K (frisch dazugeben)) versetzt. In einer feuchten Kammer wurden die Zellen über Nacht bei 56 °C lysiert. Am nächsten Tag wurden die Platten 5 min gekühlt und dann die DNS mit 100 µl pro well Isopropanol gefällt. Beim Schütteln über 1 h bei Raumtemperatur wurde die DNS als weiße Fäden sichtbar, der Überstand wurde vorsichtig abgekippt. Die DNS wurde zweimal mit je 150 µl pro well 70 % Ethanol gewaschen. Für die Restriktionsspaltung wurde die DNS bei 37 °C getrocknet, um Ethanolreste abzdampfen und dann direkt in je 20 µl pro well TE-Puffer mit RNase gelöst und mit 15 µl Restriktionsspaltungsmix gemischt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Bei Bedarf wurde am nächsten Tag nochmals frisches Restriktionsenzym zugegeben. Positive, d.h. homolog rekombinierte ES-Zell Klone wurden mit Hilfe eines Southern Blots identifiziert.

Restriktionsspaltungsmix pro well:

- 3, 5µl *EcoRI* Puffer (10x)
- 2 µl *EcoRI* Enzym (50U/µl)
- 0,01 µl DTT (1M)
- 0,02 µl Spermidin (0,5M)
- 0,35 µl BSA (100x)
- 9,12 µl ddH₂O

3.6.2 Genotypisierung mittels Southern Blot

(Feinberg und Vogelstein, 1983)

Die verdauten DNS-Proben wurden neben dem Marker auf ein frisch vorbereitetes 0,8 %iges (w/v) TE-Agarosegel aufgetragen und bei 30 V über Nacht aufgetrennt. Das Gel wurde dann mit einem beiliegenden Lineal unter UV-Licht fotografiert.

Die im Agarosegel aufgetrennten DNS-Fragmente wurden depuriniert und denaturiert. Dazu wurde das Gel zunächst in 0,25 N HCl im Kühlraum für 30 min geschwenkt, dann wurde der Blott im 0,4 M NaOH Lösung aufgebaut. Eine Nylon-Membran (Hybond N+, Amersham, Braunschweig) und Whatman-Papiere wurden in entsprechender Größe zugeschnitten. Für den Aufbau der Blot-Apparatur wurde das Gel auf eine Whatman-Papier-„Brücke“, getränkt in 0,4 M NaOH, luftblasenfrei plaziert. Der Transfer der DNS auf eine positiv geladene Nylon-Membran wurde durch Kapillarkräfte erzielt. Dabei wurde die Membran auf das Gel und darauf eine Schicht Zellulosepapier gelegt. Durch Kapillarkräfte wurde die Flüssigkeit aus dem Gel in die Zellulose gesaugt und dabei die DNS aus dem Gel auf die Membran transferiert. Für den Transfer der DNS auf eine Nylon-Membran wurde eine Blot-Apparatur, wie in folgender Abbildung dargestellt, aufgebaut:

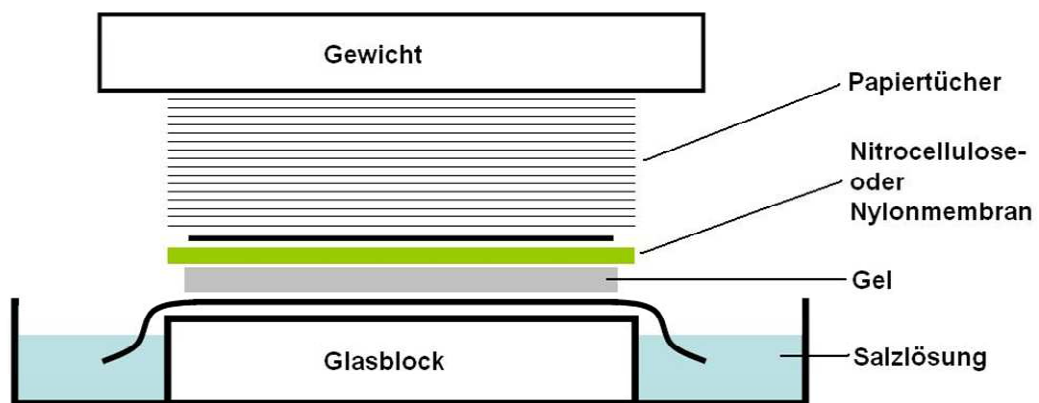


Abbildung 5: Aufbauschema eines Southern Blots, von unten nach oben: Schale mit 0,4 M NaOH; dicke schwarze Linie-Ende von 1 Lage Whatman-Papier reinhängen; Gel; Membrane; 2 Lagen Whatman-Papier; 1 Packung Tücher; Gewicht

Danach wurden die Geltaschen auf der Membran markiert, die Membran wird abgenommen, 20 min in 2x SSC-Lösung geschüttelt und auf Filterpapier getrocknet. Die DNS wurde auf der Membran durch Backen zwischen 2x Whatman-Papier Blätter bei 72-80 °C mindestens 30 min immobilisiert.

Mit Hilfe einer radioaktiv-markierten Sonde werden die DNS-Fragmente spezifisch markiert und können anschließend auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. Für die Markierung der Sonden mit [α - 32 P]-dCTP wurde das Megaprime DNS labelling System der Firma Amersham verwendet. Die DNS-Sonde (100-200 ng) wurde zusammen mit 2 μ l Primerlösung 5 min denaturiert. Nach dem Abkühlen auf

Eis wurden 2,5 µl Reaktionspuffer (10x), 2,5 µl dNTPs (ohne dCTP), 1 µl BCA Polymerase sowie 25 mCi [α - 32 P]-dCTP (2,5µl) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde in einem Endvolumen von 25 µl 60 min bei 56 °C inkubiert. Nach der Reaktion wurde zu dem Ansatz 100µl TE-Puffer zugegeben und der Ansatz über Microspin S-300 Säulen (Amersham) aufgereinigt.

Um die spezifische Aktivität der radioaktiv markierten Sonde zu bestimmen, wurde 1 µl der aufgereinigten Sonde in 2 ml Scintillationsflüssigkeit gegeben und in einem Beta-Counter gemessen. Die Sonde sollte eine spezifische Aktivität von mehr als 10^8 cpm/µg DNS aufweisen und in der Hybridisierungsreaktion in mindestens 10^6 cpm/ml Lösung vorliegen. Der Sonde wurden 100 µl Lachsspermien DNS zugegeben, der Ansatz wurde 5 min bei 95 °C denaturiert und dann auf Eis abgekühlt. Die Membran wurde zunächst in 20 ml einer Prehybridisierungslösung in einer drehenden Röhre eingesetzt und mindestens 4 h bei 65 °C prehybridisiert. Danach wurde die durch Aufkochen denaturierte DNS-Sonde hinzugegeben und die Membran wurde über Nacht bei 65 °C hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde die Membran zweimal 15 min bei 56 °C in Waschlösung I (2x SSC, 0.1 % SDS) und danach 30 min bei 56 °C in Waschlösung II (1x SSC, 0.1 % SDS) gewaschen. Die Radioaktivität der Membran wurde nach dem Waschvorgang mit einem Handmonitor überprüft und gegebenenfalls wurde der Waschschrift wiederholt. Dann wurde die Membran auf einem Filterpapier getrocknet, mit Klarsichtfolie umhüllt und über Nacht in einer Kassette mit einem Röntgenfilm exponiert. Die Expositionsdauer hängt grundsätzlich von der Stärke des zu erwartenden Signals ab. DNS-Sonden, die an die Membran gebunden sind, können entfernt werden, um diese mit einer weiteren Sonde zu hybridisieren. Dafür wurde die zuvor hybridisierte Sonde in 0,1x SDS bei 95 °C von der Membran gewaschen.

3.6.3 Expansion von positiven ES-Zell Klonen

Positive ES-Zell-Klone wurden auf der 96-Well Platte identifiziert und expandiert. So wurden sie zuerst von der originalen 96-Well Masterplatte auf eine frische 96-Well Platte übertragen. Nach Anwachsen auf der Platte wurden sie in eine 24-Well Platte, von dort auf eine 6 cm Platte und danach auf eine 10 cm Platte transferiert. Dort wurden sie so lange herangezogen, bis sich mindestens vier 10 cm

Platten des positiven Klons ergaben. Eine Platte wurde zur Injektion in Blastozysten verwendet, die anderen wurden eingefroren und im Stickstofftank gelagert.

3.7 Generierung chimärer Mäuse aus embryonalen Stammzellen

Die Herstellung von chimären Mäusen aus den manipulierten ES-Zellen wurden in den Labors und Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Jens Brüning im Institut für Genetik, Köln durchgeführt.

Bei CB20 Mäusen wurde durch Hormonbehandlung eine Superovulation induziert, damit für die Experimente genügend Blastozysten gewonnen werden konnten. Um Blastozysten zu gewinnen, wurden weibliche, superovulierte Tiere in der Nacht der Ovulation mit fertilen Männchen verpaart. Mittels plug check wurde am nächsten Morgen kontrolliert, ob es zur Verpaarung gekommen war. War dies der Fall, wurden 3,5 Tage post coitum die Tiere getötet und die Blastozysten aus dem Uterus gespült. Zehn Tage vor der geplanten Blastozysteninjektion wurden die ausgewählten ES-Zell-Klone aufgetaut und expandiert. Eine Einzelzellsuspension von je 12 positiven ES-Zellen wurde in jede frisch gewonnene Blastozyste (CB20) mikroinjiziert. Hierfür wurde ein Versuchsaufbau mit mikromanipulierbaren Glaskapillaren unter Mikroskopkontrolle verwendet. Nach der Injektion der ES-Zellen wurden die Blastozysten noch einige Stunden *in vitro* kultiviert, bevor sie in scheinträchtige Ammentiere implantiert wurden. Jeweils 8-10 Blastozysten wurden in scheinchwangere C57Bl/6-Mäuse transplantiert.

3.8 Testen der chimären Mäuse auf Keimbahntransmission

In den Würfen der Ammenmütter befinden sich nach erfolgreichen Injektionen und Reimplantationen der Blastozysten Chimären. Von den zwei Zellpopulationen stammt eine aus den Blastozysten der weißen CB20 Spendertiere und die andere aus den injizierten ES-Zellen, die ursprünglich aus schwarzfarbenen Wildtyp Mäusen gewonnen wurden. Der Grad des Chimärismus kann aus dem Verhältnis von schwarzem zu weißem Fell abgeschätzt werden, wobei der Anteil schwarzer Fellfarbe den Anteil an ES-Zellen widerspiegelt. Um zu testen, ob die genetisch modifizierten ES-Zellen auch zur Bildung von Keimzellen beitragen, wurden die männliche Chimären mit schwarzen C57BL/6 Weibchen verpaart. Da die Fellfarben schwarz und weiß zur braunen Fellfarbe führen, kann ein Nachkomme mit braunem Fell nicht von ES-Zellen abstammen und somit nicht das modifizierte Gen tragen.

Schwarzfarbene Nachkommen tragen dagegen ein Allel von den injizierten ES-Zellen, wobei sie entweder das modifizierte oder das Wildtyp-Allel tragen können, da die selektierten ES-Zellen heterozygot für diesen Locus sind. Deswegen wurde eine Genotypisierung durchgeführt.

3.9 Genotypisierung der mutanten Mauslinien

Mausschwanzspitzenbiopsien von dem schwarzen Nachwuchs nach der Verpaarung einer Chimäre mit Wildtyp Mäusen wurden mit Proteinase K (1mg/ml) in 500 µl „Tails-Lyse“-Puffer (Stocklösungen für 500 µl: 50ml EDTA pH 8,0 (von 5M); 5ml Tris-HCl pH 7,5 (von 1M); 10ml NaCl (von 5M); 50ml SDS (von 10%)) bei 55 °C 15 min lysiert. Nach Fällung in 500 µl Isopropanol, Mischung, 15-minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm, Waschen in 70 %igem Ethanol und anschließender wiederholter 5-minütiger Zentrifugation wurde die genomische DNA in 30-60 µl sterilem H₂O-Millipore bei 55 °C 30 min gelöst und für die Genotypisierung durch PCR-Analyse eingesetzt.

Ein 50 µl PCR-Ansatz enthielt:

- 37 µl ddH₂O
- 5 µl *Taq*-Puffer (10x)
- 1 µl von jedem Primer
- 3 µl MgCl₂
- 2 µl dNTPs
- 1 µl *Taq*-Polymerase

3.10 Zucht von konditionellen R26⁺/cag-car/Cre *Knock in* Tg Mäusen

Zur Generierung der konditionellen R26⁺/cag-car/cre Tg Mäuse wurden R26⁺/cag-stop-car mit CD4-Cre Mäusen verpaart. Die resultierenden doppeltransgenen Mäuse haben eine aktive Cre-Rekombinase in den T-Zellen.

3.11 Isolierung muriner T-Lymphozyten

Die Tiere wurden mittels CO₂-Inhalation getötet und seziiert. Die Milz wurde in PBS entnommen und durch ein Zellsieb (70 µm Maschenweite) zerrieben. Die Zellen wurden nach ausgiebiger Spülung mit PBS abzentrifugiert (1200 rpm, 10 min, RT) und im Waschmedium resuspendiert. Anschließend wurden CD8⁺ T-Zellen mittels magnetisch aktivierter Zellsortierung (MACS) isoliert. Die MACS-Technologie

beruht auf der Separation magnetisch markierter Zellen von unmarkierten Zellen in einem magnetischen Feld unter Verwendung von MACS-MicroBeads (an mAk gekoppelte supermagnetische Partikel), MACS-Säulen (aus ferromagnetischen Kugeln) und MACS-Separatoren (permanentes Magnetfeld). Bei der Positivselektion wird die gewünschte Zellpopulation magnetisch markiert, und beim Säulenlauf im magnetischen Feld auf der Säule zurückgehalten während unmarkierte Zellen die Säule passieren. Nach Entfernung der Säule aus dem Separator, d.h. nach Entfernung aus dem magnetischen Feld, kann die Positivfraktion von der Säule eluiert werden. Bei der Negativselektion werden die unerwünschten Zellen magnetisch markiert und auf der Säule zurückgehalten, während die gewünschte unmarkierte Zellpopulation die Säule passiert. Für die T-Zellanreicherung wurde die Milz-Lymphozytensuspension gewaschen und der Überstand komplett abgenommen. Die Zellen wurden in 90 µl MACS-Puffer (2 mM EDTA in PBS) und 10 µl anti-CD8-MicroBeads pro 10⁷ Zellen resuspendiert. Nach 15 min Inkubation im Kühlschrank wurde die Suspension zweimal gewaschen und in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die Separation erfolgte über eine MS-Separationssäule. Nach der Trennung wurden isolierte CD8⁺ Maus-Lymphozyten einmal mit PBS gewaschen, im RPMI 1640 (Dutch Modification) Medium entnommen und einen Tag mit 500 U/ml IL-2, 100 ng/ml anti-CD28, 100 ng/ml anti-CD3 aktiviert und anschließend im Medium mit 500 U/ml IL-2 kultiviert.

3.12 Präparation von murinen T-Zellen aus dem Blut für die FACS-Analyse

Das Blut der Maus wurde durch Anritzen der Schwanzvene gewonnen. Da die Schwanzvenen bei der Thermoregulation der Maus eine große Rolle spielen, kann die Blutabnahme durch Hyperthermie wesentlich erleichtert werden. Dazu wurden die Tiere einem Infrarotstrahler ausgesetzt. Es wurden etwa 100 µl Blut von dem Versuchstier in 100 µl PBS-Heparin abgenommen. Die Erythrozyten wurden aus der Blutzellsuspension durch Zugabe von 2 ml Erythrozyten-Lysepuffer (8,29 g NH₄Cl; 1 g KHCO₃; 37,2 mg Na₂EDTA; H₂O ad 1 l; pH 7,2-7,4 mit 1 N HCl einstellen und durch 0,2 µm Filter steril filtrieren) und bei 15-minütiger Inkubation bei 37 °C lysiert. Da Erythrozyten eine Natrium-Kalium-Pumpe fehlt, können diese die einströmenden Ionen nicht mehr aus der Zelle befördern. Um den osmotischen Druck auszugleichen, strömt Wasser in die Zellen und bringt diese dadurch zum Platzen.

Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension mit 8 ml PBS verdünnt und mit 1200 rpm bei 4 °C über eine Dauer von 5 min zentrifugiert. Zu den Zellen wurden entsprechende Antikörper für die FACS-Analyse zugegeben und 30 min im Dunklen auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben zweimal mit PBS gewaschen, bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert und in 500 µl PBS resuspendiert.

3.13 Immunfluoreszenz (FACS)-Analysen

(FACScan™-Durchflußzytometers, Becton Dickinson, Heidelberg)

Etwa 2×10^5 Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen (Renner GmbH) überführt. Die Zellen wurden 5 min bei 400 g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 2 ml PBS resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt dreimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand erneut verworfen und die Zellen in etwa 100 µl PBS resuspendiert. Ein Detektions-Antikörper (Endkonzentration 5 µg/ml) wurde zugegeben und die Probe 30 min auf Eis inkubiert. Ab diesem Schritt wurden die Proben vor direkter Lichteinstrahlung geschützt. Danach wurden die Zellen zweimal mit 2 ml PBS (4 °C) gewaschen und bei 400 g zentrifugiert, wobei der Überstand jeweils verworfen wurde. Anschließend wurde das Zellsediment in 500 µl PBS resuspendiert und 1 µl Propidiumjodid (0,5 mg/ml, Sigma, Deisenhofen) hinzugegeben. Die Auswertung der Immunfluoreszenz-Tests erfolgte mit Hilfe eines FACScan™-Durchflußzytometers unter Verwendung der FACScan-Research Software.

3.14 Kokultivierung mit Antigen-positiven Tumorzellen

CAR exprimierende T-Lymphozyten wurde mit PBS gewaschen. Für die Kultivierung wurde die Zellzahl bestimmt und anhand der durchflußzytometrisch bestimmten Expression vom CAR auf die Effektorzellen normiert. In einer vierstufigen bzw. achstufigen Verdünnungsreihe wurden z.B. 1×10^5 bis $1,25 \times 10^3$ Zellen pro Vertiefung auf 96-Well-Rundbodenplatten (TPP®, Trasadingen, Schweiz) mit konstanter Zahl an Antigen-positiven Tumorzellen (z.B. 2×10^4 Zellen pro Vertiefung) in einem Volumen von je 250 µl pro Vertiefung kokultiviert. Je nach Experiment betrug das maximale Verhältnis zwischen Effektorzellen und Tumorzelle (E:T ratio) 10:1. Nach 48 h wurden zur Analyse der Zellkulturüberstände 150 µl pro Vertiefung abgenommen und für Zytokin-ELISA

weiterverwendet oder bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, während die Zytotoxizität der Effektorzellen anhand eines XTT-basierenden Viabilitätstest der verbleibenden Zellen ermittelt wurde. Aus diesem Grund wurden zum Vergleich stets nicht transgene T-Lymphozyten sowie mit Antigen-defizienten Tumorzellen kokultivierte CAR-exprimierende T-Zellen ausplattiert.

3.15 XTT-basierender Zytotoxizitätstest

(Cell proliferation Kit II (XTT), Roche Diagnostics, Mannheim)

(Jost und Kirkwood, 1992)

Die spezifische Zytolyse wurde in einem XTT-basierenden Zytotoxizitäts-Test bestimmt. Hierbei wurde der Umsatz des durch mitochondriale Dehydrogenasen metabolisierten XTT zu einem wasserlöslichen Formazan-Salz photometrisch bestimmt. Die Höhe des Umsatzes hängt direkt von der Viabilität der kokultivierten Zellen ab. Es wurden jeweils $50\text{ }\mu\text{l}$ pro Vertiefung XTT-Markierungslösung (1 mg/ml XTT; $1,25\text{ mM}$ PMS, Roche Diagnostics, Mannheim) zu $50\text{ }\mu\text{l}$ Medium pro Vertiefung gegeben, der Ansatz bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $5\text{ }\%$ CO_2 inkubiert und die Extinktion alle 30 min photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm mit 650 nm Referenzwellenlänge ($\text{OD}_{450-650}$) bestimmt. Der maximale Umsatz von XTT wurde gemessen in den Vertiefungen, die nur Tumorzellen enthielten. Zudem wurde die OD der Vertiefungen bestimmt, die nur RPMI 1640 Medium, $10\text{ }\%$ (v/v) FCS enthielten. Desweiteren wurde der Anteil am Gesamtumsatz des XTT-Substrates bestimmt, der ausschließlich auf die Effektorzellen zurückzuführen ist. Hierfür wurde die gleiche Anzahl von Lymphozyten wie auch im Versuchsansatz in RPMI-Medium 1640 mit $10\text{ }\%$ (v/v) FCS ausplattiert und die OD dieser Vertiefungen nach Zugabe des XTT-Substrates bestimmt. Die Anzahl der lebenden Tumorzellen [%] wurde wie folgt bestimmt:

$$\text{Viabilität [\%]} = \frac{\text{OD}_{\text{Vertiefung des Versuchsansatzes}} - \text{OD}_{\text{Effektorzellen alleine}}}{\text{OD}_{\text{Tumorzellen alleine}} - \text{OD}_{\text{Medium}}} \times 100$$

3.16 Enzym-gekoppelter Immunsorbanztest (ELISA)

Die Beschichtung der Mikrotiterplatten (PolySorb, Nunc GmbH, Wiesbaden) erfolgte durch Inkubation von 50 µl Fangantikörper pro Vertiefung (RT, 3-4h). Wenn nicht anders angegeben, betrug die Konzentration der verwendeten Antikörper 1 µg/ml im Beschichtungspuffer (34 mM Na₂CO₃; 16mM NaHCO₃, pH 9,6). Zur Absättigung aller freien Bindungsstellen wurde über Nacht mit 3 % (w/v) BSA/PBS bei 4 °C inkubiert und 5 x mit PBS-Tween gewaschen. Die Inkubation mit einem Biotin-gekoppeltem Detektionsantikörper (50 µl/Vertiefung) erfolgte 2 h bei RT, anschließend wurde 5 x mit PBS-Tween gewaschen, 45 min mit einer Streptavidin-gekoppelten Peroxidase (1:10000 Verdünnung in PBS; Roche Diagnostics) inkubiert und erneut gewaschen. Der Test wurde durch Zugabe von 50 µl ABTS-Substratlösung (1 mg/ml ABTS-Puffer, Roche Diagnostics) pro Vertiefung bei RT entwickelt. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm (OD405) wurde photometrisch bestimmt.

3.17 Tumorinduktion durch s.c. Injektion

Zur Tumorerzeugung in transgenen und Wildtyp Mäusen wurden den ca. 1-1,5 Jahre alten Tieren die Tumorzellen durch subcutane (s.c.) Injektionen in eine oder beide Flanken verabreicht. Diese Injektionen bestanden aus 0,1 – 0,15 ml Zellsuspension in PBS mit 2 - 3 x 10⁶ MC38 (CEA-) oder C15A3 (CEA+) Tumorzellen. Das Tumorwachstum wurde anschließend mindestens zwei Mal wöchentlich palpatorisch überprüft. Die Tumorgöße wurde jeden zweiten Tag mit einer Schublehre registriert. Die individuellen Tumorgößen wurden nach folgender Formel berechnet: $V = l \times b \times t$. Dabei bedeutet V das Volumen, l die Länge des Tumors in der Longitudinalachse, b die Breite des Tumors in der Transversalachse, und t die Höhe des Tumors in der Sagittalachse jeweils in mm. Nach 21 Tagen bei einem Tumolvolumen von durchschnittlich etwa 3.000 mm³ in den Kontrolltieren wurden die Tiere euthanasiert. Bei einem Tumordurchmesser von ca. 7 - 15 mm erfolgte die Tumorentnahme zwecks der vergleichenden lichtmikroskopischen Untersuchungen und Analyse.

4 Ergebnisse

Ziel der Arbeit ist es, eine konditionale, transgene *knock in* Mauslinie mit Expression des anti-CEA Chimären Antigen Rezeptors (CAR) in T-Zellen zu generieren und funktionell zu charakterisieren. Der SCA431-Fc-CD28-CD3 ζ CAR ist spezifisch gegen das Tumorantigen CEA gerichtet und verfügt vollständig über die murinen Domänen.

Die Arbeit bestand aus folgenden Schritten: Generierung des Targeting Vektors und einer transgenen ES-Zelllinie durch homologe Rekombination des Targeting Vektors, Injizierung der modifizierten ES-Zellen in Blastozysten und Transplantation in scheinchwangere Weibchen zum Erhalt chimärer Mäuse. Diese Mäuse wurden mit Wildtyp Mäusen gekreuzt und bildeten nach Keimbahngängigkeit des Transgens die heterozygote F1-Generation der CAR-transgenen Mauslinie. Schematisch sind die o.a. Schritte im Abb.6 dargestellt. Nach der Verpaarung der F1-Generation dieser Mäuse mit der Cre-Mauslinie erfolgte die konditionale Expression des CARs exklusiv in T-Zellen.

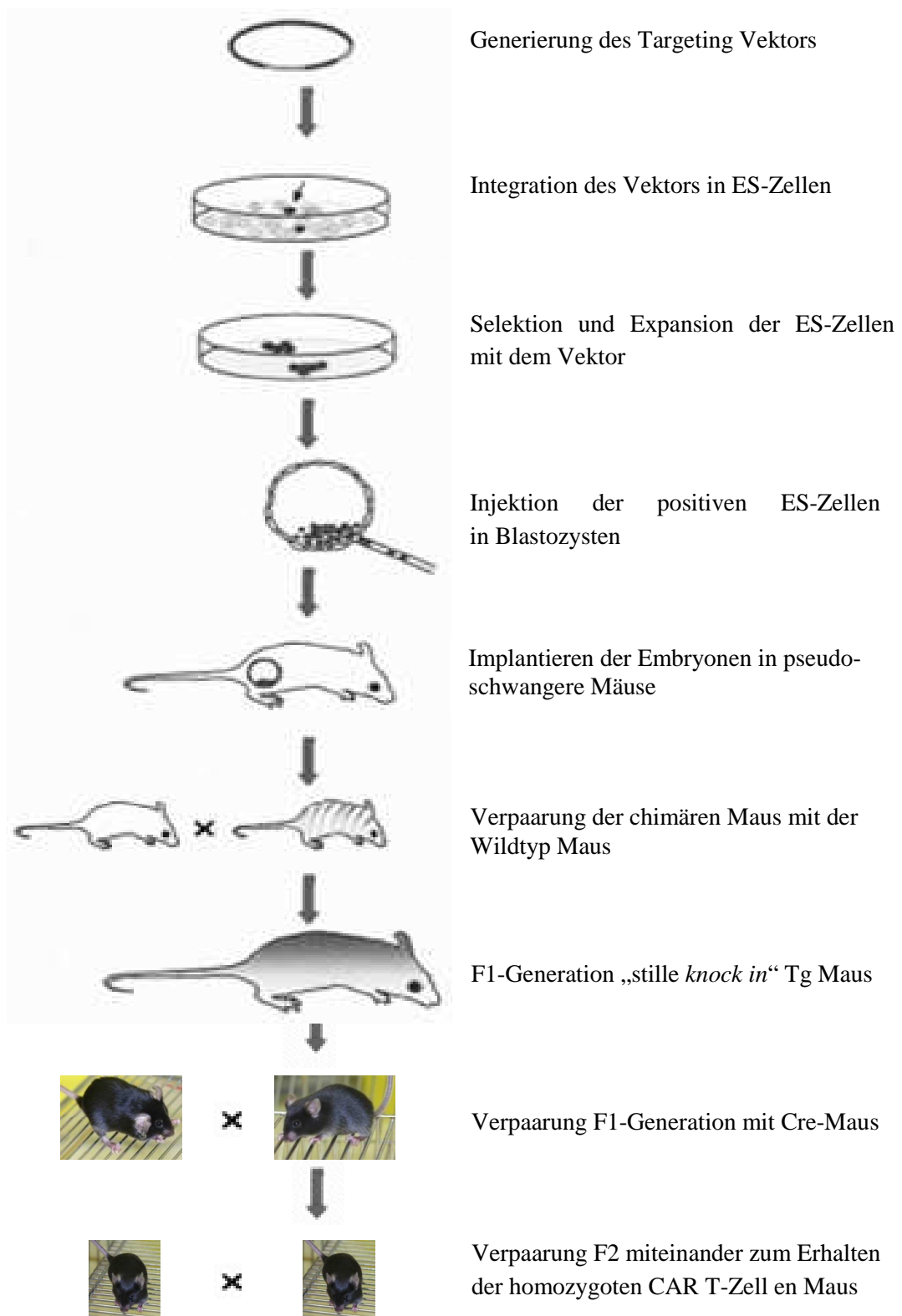


Abbildung 6: Schema zur Generierung knock-in transgene Maus.

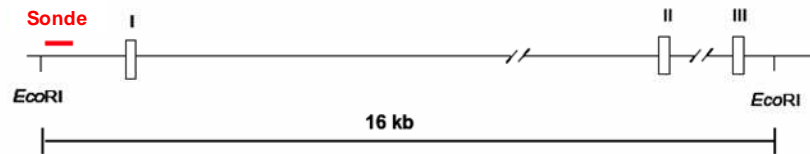
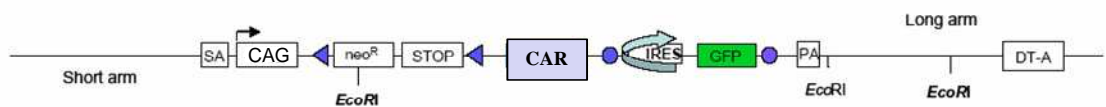
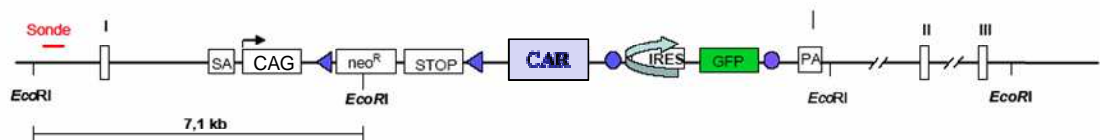
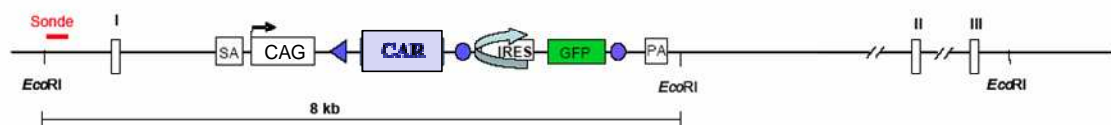
A ROSA26-Lokus (Wildtyp)**B ROSA26-Targeting Vektor****C ROSA26-Lokus nach homologer Rekombination****D ROSA26-Lokus nach CRE-vermittelter Rekombination**

Abbildung 7: Targetingstrategie zur Generierung eines konditionalen CAR exprimierenden Alleles. Schematische Darstellung des ROSA26-Wildtyp-Locus (A), des Targeting Vektors (B), des rekombinierten ROSA26-STOP-CAR Allels (C) und des aktiven ROSA26-CAR Allels (D) mit den relevanten Restriktionsenzymchnittstellen für *EcoRI*. Die Detektion der DNS-Fragmente erfolgt mittels einer externen 5'Sonde oder 3'Sonde. Man erhält ein 16 kb DNS-Fragment bei Vorliegen einer Wildtyp DNS, ein 7,1 kb DNS-Fragment nach der homologen Rekombination und ein 8 kb DNS-Fragment nach Cre-Rekombination.

4.1 Klonierung des Vektors mit dem anti-CEA-CAR #1015

SCA431-Fc-CD28-CD3 ζ

Als erstes haben wir den Vektor, der für SCA431-mFc-CD28-CD3 ζ kodiert ist, optimiert. Der im Labor vorliegende ROSA-CD4-STOP-SCA431-Fc-CD28-CD3 ζ (#1011) Vektor, hergestellt von Nadin Fein, kodiert für den CAR unter Kontrolle des CD4 Promoters, erwies sich als unzureichend in der Expression in T-Zellen. Die kodierte Sequenz des CARs wurde aus dem ROSA-CD4-STOP-SCA431-Fc-CD28-CD3 ζ (#1011) Vektor isoliert und mit dem CAG-Promotor in den ROSA-CAG-STOP-GFP (#1013) Targeting Vektor eingefügt (Abb.8). Der CAG-Promoter fand Anwendung aufgrund seiner Eigenschaft als starker Promoter und seiner Vermittlung einer konstitutiv langfristigen Genexpression in einem breiten Zellspektrum. Dazu erfolgte zuerst die Spaltung des #1011 Vektors mit *AcsI* und die Isolierung des ~2kb SCA431-Fc-CD28-CD3 ζ CAR-DNS-Fragmentes (Abb.9). Der Targeting Vektor #1013 wurde mit *AcsI* linearisiert (Abb.9). Um die Re-Ligation der #1013 Vektorenden der enzymatisch gespaltenen DNS-Moleküle zu verhindern, wurden die 5-Phosphatgruppen mit Hilfe der Shrim Alkaline Phosphatase (SAP) entfernt. Der linearisierte und dephosphorylierte Vektor #1013 wurde mit der ~2kb SCA431-mFc-CD28-CD3 ζ CAR-DNS ligiert. Die korrekte Ligation wurde durch Restriktionsspaltung des #1015 ROSA-CAG-STOP-SCA431-Fc-CD28-CD3 ζ Vektors mit *EcoRI* bestätigt. Erwartungsgemäß wurden die 8400bp, 4300bp, 3500bp und 1900bp DNS-Fragmente erhalten (Abb.10). Die drei Klone des #1015 Targeting Vektors mit dem Insert der gewünschten Anordnung der Domänen wurden durch Sequenzierung verifiziert (Anhang). Die vollständige Plasmid-Karte des klonierten Targeting Vektor #1015 ROSA-CAG-STOP-SCA431-mFc-mCD28-mCD3 ζ ist in der Abb.11 dargestellt.

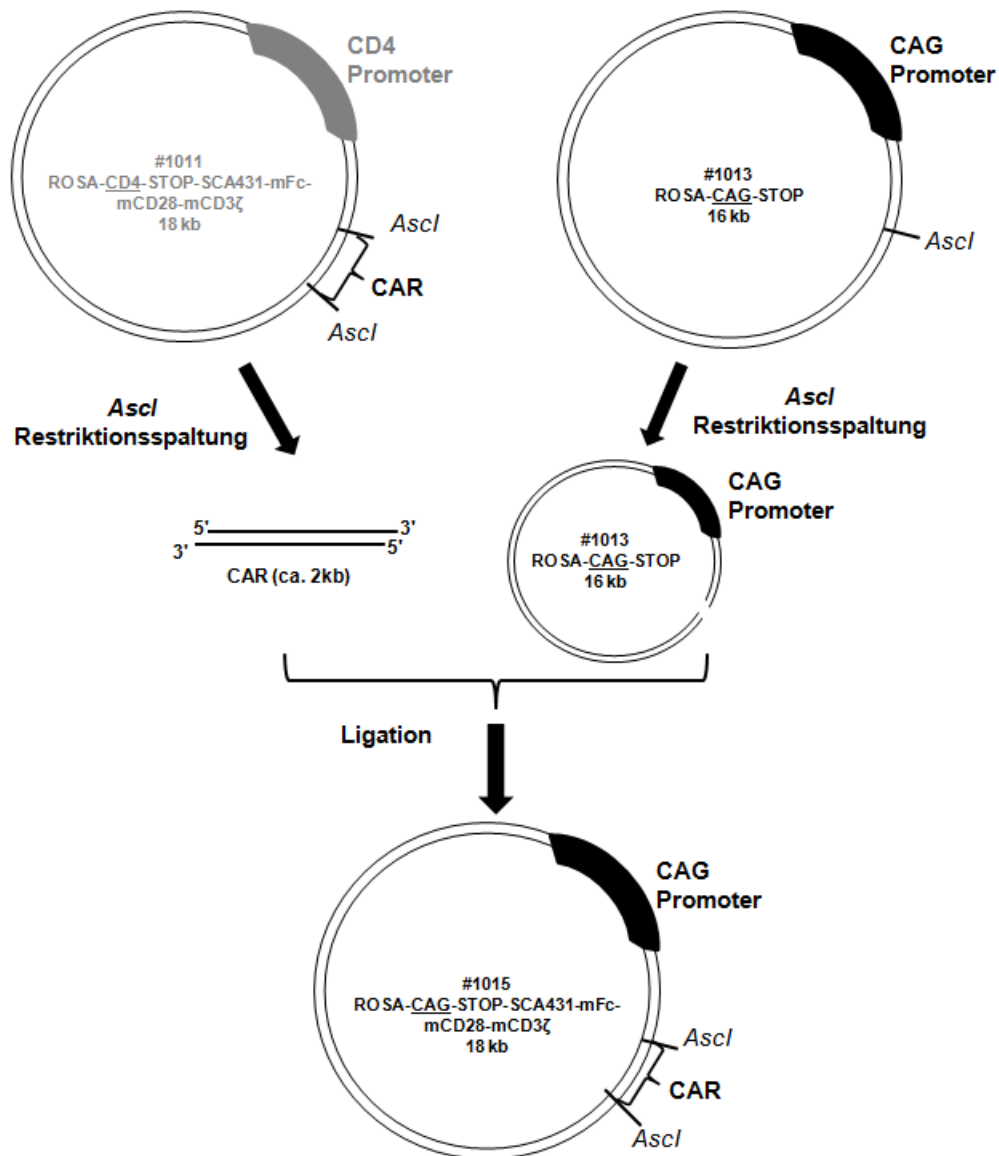


Abbildung 8: Klonierung des Targeting Vektors für ROSA-CAG-STOP-SCA431-Fc-CD28-CD3ζ (#1015) aus dem Targeting Vektor ROSA-CAG-STOP (#1013) durch Insertion des SCA431-Fc-CD28-CD3ζ CAR aus dem Vektor ROSA-CD4-STOP-Fc-CD28-CD3zeta (#1011). Der 16 kb große Targeting Vektor #1013 wurde durch das Restriktionsenzym *AcsI* geöffnet und durch Alkalische Phosphatase (SAP) dephosphoryliert. Das Plasmid #1011 wurde durch *AcsI* gespalten und die CAR kodierte Sequenz SCA431-Fc-CD28-CD3ζ isoliert. Die linearisierte, dephosphorylierte Targeting Vektor DNS und das CAR Fragment wurden zu dem ROSA-CAG-STOP-SCA431-Fc-CD28-CD3ζ (#1015) Vektor 18 kb ligiert.

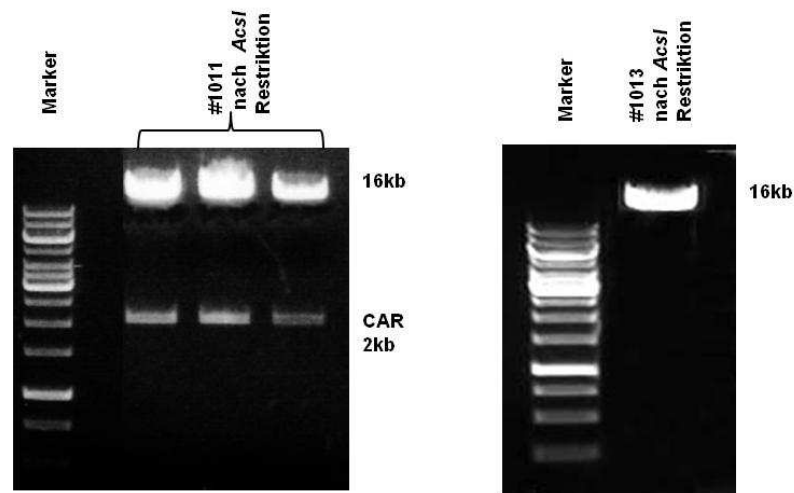


Abbildung 9: Restriktionsspaltung des ROSA-CD4-STOP-SCA431-Fc-CD28-CD3 ζ (#1011) Vektors und Linearisierung der ROSA-CAG-STOP (#1013) Targeting Vektor DNS. Die Plasmid-DNS #1011 und #1013 wurden mit dem Restriktionsenzym *AclI* geschnitten und elektrophoretisch in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Die #1011 DNS wurde in die zwei Fragmente 16 kb und 2 kb geschnitten, das 2 kb CAR DNS-Fragment wurde anschließend ausgeschnitten, aus dem Agarosegel isoliert und mit dem linearisierten und dephosphorilierten 16 kb Targeting Vektor #1013 ligiert.

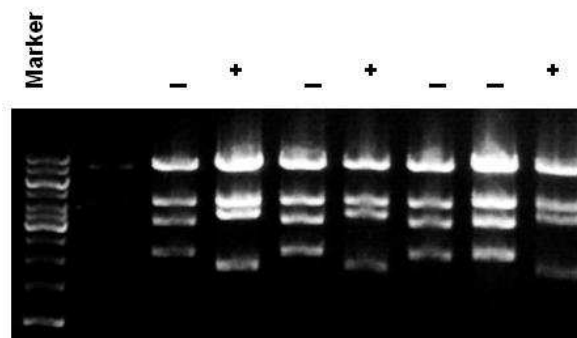


Abbildung 10: Restriktionsanalyse der ROSA-CAG-STOP-SCA431-Fc-CD28-CD3 ζ (#1015) DNS. Die Plasmid-DNS #1015 wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* geschnitten und elektrophoretisch in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Plasmid-DNS #1015 mit dem Insert in der gewünschten Orientierung ergab die vier DNS-Fragmente von 8400 bp, 4300 bp, 3500 bp und 1900 bp (sind als '+', im Bild markiert). Wurde der Insert revers eingebaut, dann wurde die Plasmid-DNS in 8400 bp, 4300 bp, 3300 bp und 2200 bp Fragmente gespalten (sind als '-', im Bild markiert).

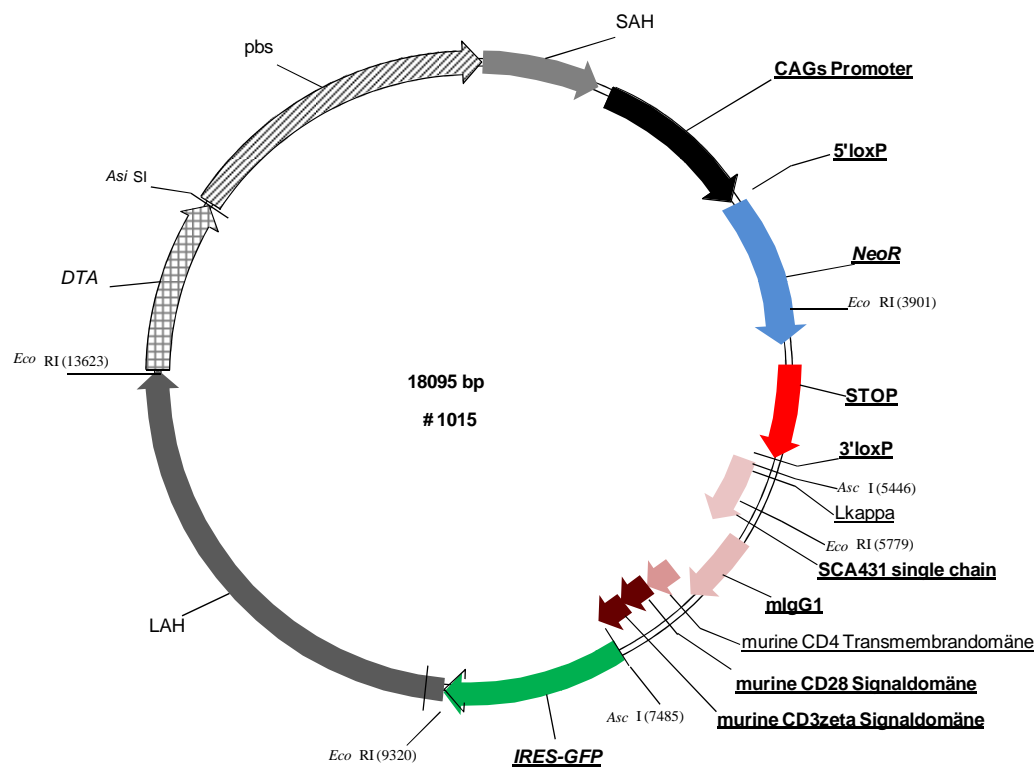


Abbildung 11: Plasmidkarte des Targeting Vektors ROSA-CAG-STOP-SCA431-Fc-CD28-CD3 ζ (#1015) für die murine ES-Transfektion. CAR cDNS befindet sich zwischen zwei *AscI* Schnittstellen.

4.2 Modifikation der ES-Zellen

Als nächstes wurden ES-Zellen mit dem Targeting Vektor #1015 ROSA-CAG-STOP-SCA431-Fc-CD28-CD3 ζ transfiziert und homolog rekombinierte Klone identifiziert. Dazu wurde das Targeting Konstrukt #1015 mit dem Restriktionsenzym *AsiSI* linearisiert (Abb.12) und durch Elektroporation in männliche C57/B16 ES-Zellen transfiziert. Nach Selektion mit Geneticin (G418) wurden resistente ES Zellkolonien isoliert und auf eine 96well Platte in ES Medium expandiert. Zur Bestätigung der homologen Rekombinanten wurde eine Southern Blot-Analyse der genomischen DNS aus 96 ES-Zellklonen durchgeführt. Hierfür wurde die genomische DNS mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* oder *EcorV* geschnitten. Zur Detektion der rekombinierten DNS-Fragmente wurden ein 625 bp DNS-Fragment aus dem Bereich des *neo*-gens (neo-Sonde), sowie ein 80 bp DNS-Fragment aus dem 5'-Bereich des ersten Exons des ROSA26-Gens (ROSA 5'-Sonde) als Sonde

verwendet. Nach homologer Rekombination wurde mit der ROSA 5'-Sonde die Wildtyp-Bande ~16 kb und eine 7 kb Bande für das modifizierte Allel nachgewiesen. Mit der *neo*-Sonde wurde in der Wildtyp-DNS keine und in dem ROSA26+/stop-cag-car CAR Allel eine 11 kb Bande detektiert (Abb.13).

Durch Southern Blot-Analysen wurden homolog rekombinante (hR) ES-Zellen Klone identifiziert werden. Die Genotypisierung mit Hilfe Southern Blot-Hybridisierung der transgenen Kopien gibt im Vergleich zur PCR die zusätzliche Aussage über die Anzahl der integrierten transgenen Kopien. Das Bandenmuster gab Auskunft über Art der Integration und Anzahl der transgenen Kopien. Es wurden etwa acht homolog rekombinante Klone aus 100 analysierten Klonen mittels ROSA 5'-Sonde identifiziert. Davon hatten fünf Klone das erwünschte Bandenmuster nach der *neo*-Sonde Detektion. Die Analysen bestätigen insgesamt, dass die Klone B11, E12, F1, F3, F4 und H6 durch homologe Rekombination des Targeting Vektors in den genomischen Locus ROSA26 wie erwartet integriert wurden, ohne dass unerwünschte Rekombinationsereignisse beobachtet wurden.

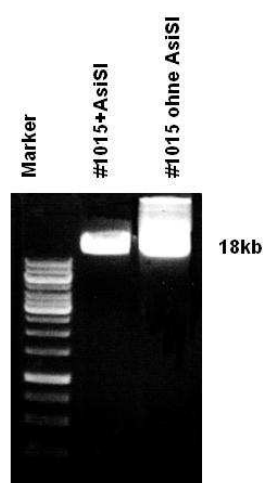


Abbildung 12: Linearisierung der ROSA-CAG-STOP-SCA431-Fc-CD28-CD3 ζ (#1015) Targeting Vektor DNS mit der Hilfe von *AsiSI* für die ES-Zellen Transfektion. Die Plasmid-DNS #1015 wurde mit dem Restriktionsenzym *AsiSI* linearisiert und elektrophoretisch in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Die linearisierte #1015 DNS von 18 kb wurde ausgeschnitten, aus dem Agarosegel isoliert, gereinigt und in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) elektroporetisch transfiziert.

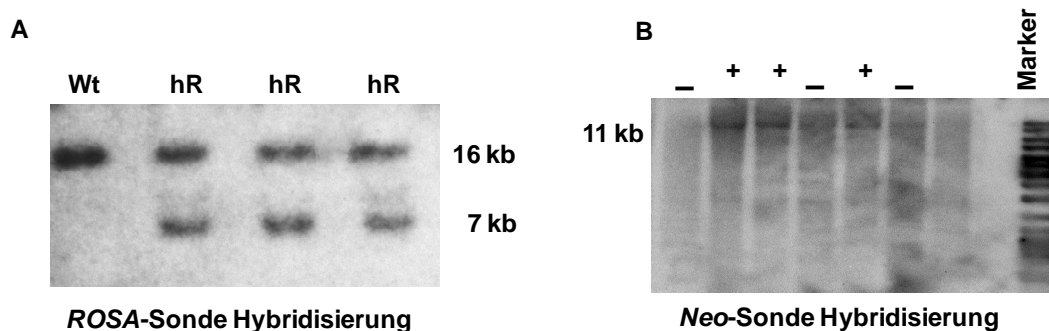


Abbildung 13: Genotypisierung der ROSA-CAG-STOP-SCA431-Fc-CD28-CD3 ζ #1015 tragende ES-Zellen mit Hilfe der Southern Blot-Analyse. A) Für die Southern Blot-Analyse wurde die genomische DNS von 96 mit dem Targeting Vektor transfizierten ES-Klonen nach der *EcoRI* Restriktionsspaltung mit der ROSA 5'-Sonde hybridisiert und die Banden detektiert. Dabei ergaben sich die beiden Banden 16 kb Wildtyp ROSA26 Bande (Wt) und die 7 kb Bande, die eine homologe Rekombination anzeigt (hR). B) Die DNS wurde mit *EcoRV* geschnitten und mit der *neo*-Sonde hybridisiert. Hier zeigte die 11 kb Bande die homologe Rekombination und richtige Integration ins Genom an (+), die Wildtyp-DNS dagegen zeigte keine Neo-Bande (-).

4.3 Etablierung und Genotypisierung der mutanten Mauslinie

4.3.1 Kreuzung der transgenen Tiere

Es wurde überprüft, ob die mittels Southern Blot getesteten, homolog rekombinierten Klone der ES-Zellen mit der richtigen Integration des Transgens, die in Blastozyste injiziert wurden, zu der chimären Maus geführt haben. Zudem wurde die chimäre Maus auf Keimbahntransmission getestet. Wir haben dafür homolog rekombinante ES-Zellen von den Klonen F3 und F4 für die Blastozysten-Injektion ausgewählt. Es wurden jeweils 12 ES-Zellen vom Klon F3 in 16 CB20 Blastozysten transferiert und jeweils 12 ES-Zellen vom Klon F4 in 18 CB20 Blastozysten an zwei aufeinander folgenden Tagen transferiert. Die Blastozysten mit den ES-Zellen vom Klon F3 wurden in eine, die vom Klon F4 in drei pseudoschwangere Mäuse implantiert. Drei Ammen haben insgesamt 13 chimäre Männchen mit schwarz-weiß gemusterter Fellfarbe geworfen. Drei davon zeigten über 70 %igen Chimärismus, was auf eine hohe Wahrscheinlichkeit der erfolgten Keimbahntransmission schließen lassen konnte. Diese drei chimären Männchen wurden mit C57Bl/6 Wildtyp (WT)

Weibchen verpaart, um die Keimbahntransmission zu überprüfen (Abb.14). Wenn die rekombinanten ES-Klone in die Keimbahn eingegangen waren, dann wurden Nachkommen der F1-Generation mit schwarzer Fellfarbe erzeugt. Der Nachwuchs mit brauner Fellfarbe der F1-Generation stammte von CB20 und C57Bl/6 Zellen und wurde nicht weiter benutzt (Abb.14). Die mit dem homolog rekombinanten ES-Zellklon erzeugte Mauslinie wird als ROSA26+/cag-stop-car bezeichnet.

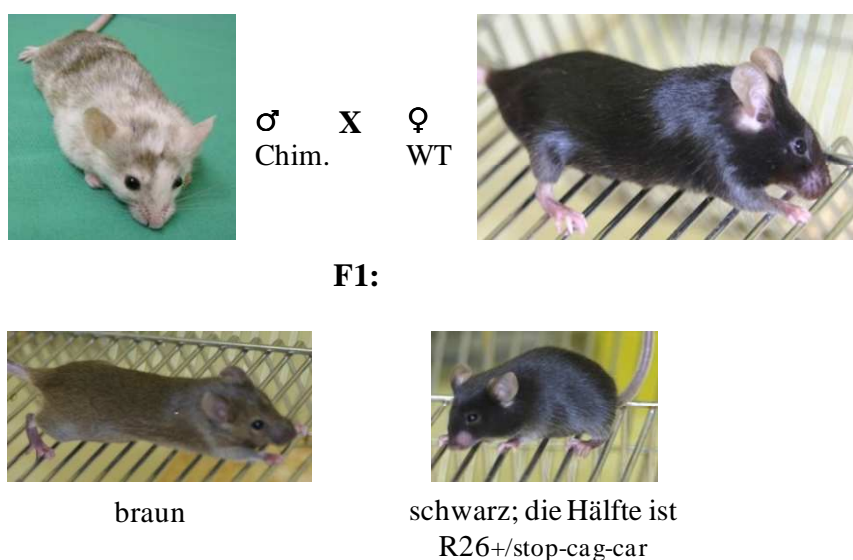


Abbildung 14: Kreuzung chimärer Mäuse zur Feststellung der Keimbahntransmission des Transgens ROSA26+/cag-stop-car Chimäre. Die Kreuzungen von einer 85%igen männlichen Chimäre mit Wildtyp Weibchen (WT) ergaben Nachkommen mit und ohne ROSA26+/cag-stop-car Transgen im Verhältnis von circa 1:3. Der braune Nachwuchs stammte von den Gameten von WT und Zellen von der Blastozyste von Mäusen mit der weißen Fellfarbe. Ungefähr die Hälfte des schwarzen Nachwuchses trug das Transgen.

Aus der Kreuzung der drei männlichen Chimären mit weiblichen Wildtyp Mäusen C57Bl/6 sind nur aus einer von drei Verpaarungen 15 Mäuse F1-Generation von insgesamt 100 Mäusen mit schwarzer Fellfarbe hervorgegangen. Von diesen 15 schwarzen Mäusen haben wir die genomische DNS aus den kupierten Schwanzspitzen isoliert und mit Hilfe der PCR genotypisiert, um das Transgen ROSA26+/cag-stop-car nachzuweisen. Etwa sieben schwarze Mäuse der F1-Generation hatten das ROSA26+/cag-stop-car im Genom (Abb.15 und 16).

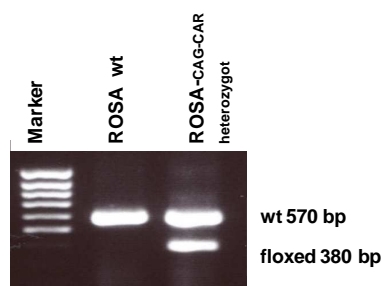


Abbildung 15: Genotypisierung der Nachkommen nach der Kreuzung chimärer und Wildtyp Mäuse mittels RT-PCR. Isolierte DNS aus der kupierten Mausschwanzspitze wurde mit drei Primern Rosa_forw, Rosa_rev_WT und Rosa_rev_CAG for Rosa Locus eingesetzt. Das Produkt wurde in 0,8 %igem Agarose-Gel aufgetrennt. Ein 570 bp-DNS-Fragment repräsentiert ein Rosa Wildtyp-Allel, während ein transgenes ROSA26+/cag-stop-car-Allel durch ein 380 bp- floxed DNS-Fragment angezeigt wird.

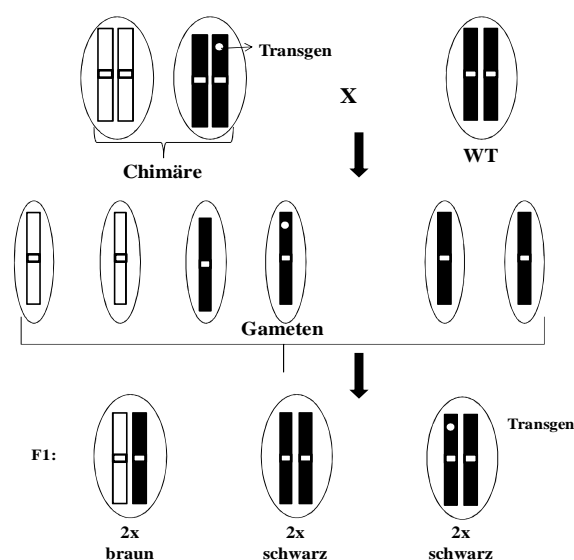


Abbildung 16: Schema zur Gametverteilung und Transgenerbe. Chimäre Mäuse trugen in den Gonaden Zellen der Blastozyste (weiß) und von injizierten ES mit Transgen (schwarz). Allerdings fand die Homologe Rekombination nur in einem von zwei Chromosomen der diploiden ES statt (schwarz mit weißem Punkt), so dass das zweite Chromosom Wildtyp war. Der Nachwuchs erbte weiße oder schwarze Fellfarbe. Wildtyp Mäuse (WT) hatten zwei Chromosomen ohne Transgen (schwarz), der Nachwuchs erbte schwarze Fellfarbe. Wenn in der F1-Generation ‚weiße‘ und ‚schwarze ohne Transgen‘ Gameten zusammenkamen, hatten die Mäuse braune Fellfarbe. Wenn in der F1-Generation zwei ‚schwarze ohne Transgen‘ Gameten zusammenkamen, hatten die Mäuse zwar schwarze Fellfarbe, waren aber nicht transgene Mäuse - dies konnte man nur durch PCR testen. Wenn in der F1-Generation ‚schwarze ohne Transgen‘ und ‚schwarze mit Transgen‘ Gameten zusammenkamen, dann entstand eine R26+/stop-cag-car transgene Maus, was bei circa einem Drittel der gesamten Mäuse der F1-Generation der Fall war.

Als nächstes wollten wir die konditionale Expression von SCA431-Fc-CD28-CD3 ζ in T-Zellen einschalten. Dafür haben wir die transgenen ROSA26⁺/stop-cag-car Mäuse aus der F1-Generation mit CD4-Cre Mäusen verpaart, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des CD4-Promoters exprimiert hatten. Dadurch wurden Nachkommen erzeugt, in denen die *neo/stop*-Selektionskassette (Abb.7) durch Cre-vermittelte Rekombination im frühembryonalen Stadium entfernt wurde. Die so entstandene doppelt transgene Mauslinie ROSA26⁺/cag-car/Cre hatte den CAR auf der Oberfläche der T-Lymphozyten exprimiert (Abb.17).

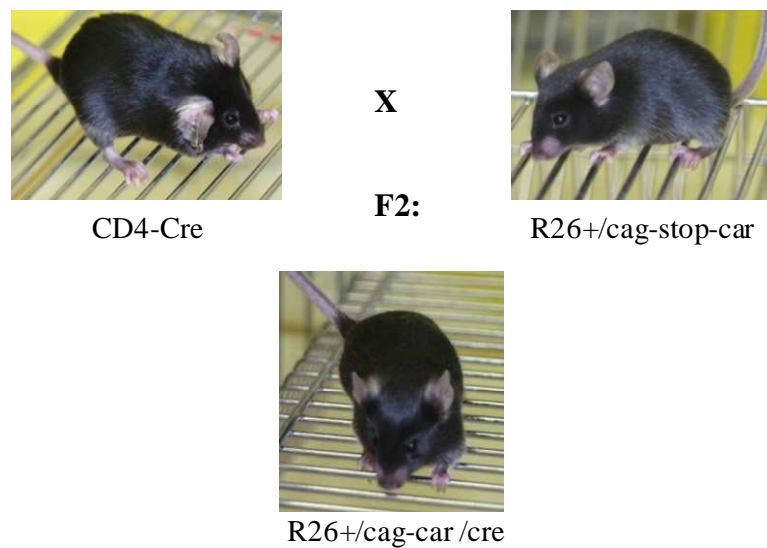


Abbildung 17: Kreuzung ROSA26⁺/cag-stop-car mit CD4-Cre Maus zur Generierung der doppelt transgenen Mäusen ROSA26⁺/cag-car/Cre. Konditioneller gewebespezifischer *knock in*. Die beiden CD4-Cre transgenen weiblichen und die beiden CD4-Cre transgenen männlichen Tiere wurden vom Institut für Genetik, Uni Köln, erzeugt. Die Kreuzungen der CD4-Cre Mäuse mit ROSA26⁺/stop-cag-car Mäusen ergaben doppelt transgene ROSA26⁺/cag-car/Cre Nachkommen. ROSA26⁺/cag-car/Cre hatte CAR auf den T-Lymphozyten exprimiert.

4.3.2 Genotypisierung der ROSA26⁺/cag-car/Cre Maus

Die Genotypisierung der doppelt transgenen Mäuse ROSA26⁺/cag-car/Cre erfolgte mittels PCR von der genomischen DNS aus kuperten Schwanzspitzen. Mit den Oligonukleotiden Rosa_forw, Rosa_rev_WT und Rosa_rev_CAG konnten die ROSA26⁺/cag-car/Cre durch das 380 bp transgene PCR-Produkt vom 570 bp PCR-Produkt des Wildtyp-Allels unterschieden werden. Das *cre*-Allel aus den CD4-Cre Mäusen wurde mit den *cre*-spezifischen Oligonucleotiden CD4Cre1 und CD4Cre2 durch ein 600 bp PCR-Produkt nachgewiesen (Abb.18).

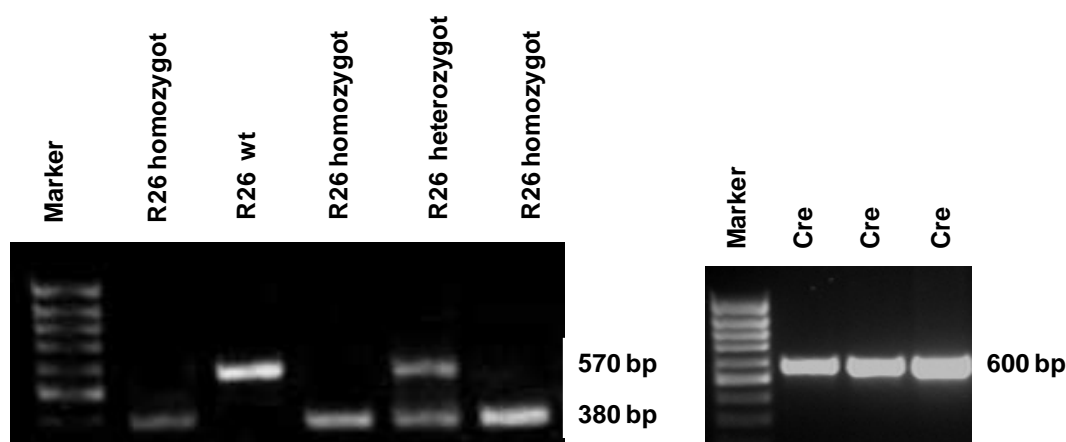


Abbildung 18: Genotypisierung des doppelt transgenen Nachkommens ROSA26⁺/cag-car/Cre aus der Verpaarung der CD4-Cre und ROSA26⁺/cag-stop-car Mäusen mittels RT-PCR. Isolierte DNS aus der kuperten Mausschwanzspitze wurde entweder mit drei Primern Rosa_forw, Rosa_rev_WT und Rosa_rev_CAG für ROSA-Locus oder mit zwei Primern CD4Cre1 und CD4Cre2 für *Cre*-Gen zusammen eingesetzt. Das Produkt wurde in 0,8 %igem Agarose-Gel aufgetrennt. Ein 570 bp DNS-Fragment repräsentiert ein ROSA Wildtyp-Allel, während ein transgenes ROSA26⁺/cag-car/Cre Allel durch ein 380 bp DNS-Fragment ausgezeichnet ist. Das *Cre*-Gen wurde durch ein 600 bp DNS-Fragment nachgewiesen, die Wildtyp Maus hatte kein *Cre*-Gen.

Nach der Verpaarung der ROSA26⁺/cag-stop-car Maus mit der CD4-Cre Maus hatten wir eine heterozygote F2-Generation ROSA26⁺/cag-car/cre Mauslinie generiert, deren Verpaarung miteinander die F3-Generation und weitere Fn-Generationen homozygoter Mauslinien cag-car/cag-car/Cre erzeugte. Genomische DNS der homozygoten cag-car/cag-car/Cre Mauslinie zeigte nach der RT-PCR mit Rosa_forw, Rosa_rev_WT und Rosa_rev_CAG Primer nur die 380 bp Bande (Abb.18).

4.4 Analyse der CAR transgenen Mäuse

4.4.1 Histologische Analyse der ROSA26+/cag-car/Cre Maus

Transgene Tiere der Linie ROSA26+/cag-car/Cre wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung histologisch und morphometrisch analysiert. Die transgenen Mäuse sind fertil und bringen jeweils eine normale Anzahl von Nachkommen hervor (ca. 6-12 Mäuse pro Wurf). Die Tiere haben einen normalen Lebenszyklus und ihre Lebenserwartung entspricht der einer normalen Wildtyp Labormaus, was unter optimalen Bedingungen etwa 2-3 Jahre beträgt. Die Vererbung der Transgene folgte den Mendelschen Regeln. Für den histologischen Vergleich der Organe von transgenen (Tg) und Kontrolltieren (WT) wurden die Mäuse gleichen Geschlechts und Alters genommen. Besonders haben wir geachtet auf das histologische Bild von Milz, Lymphknoten und die Gewebe des Gastrointestinaltrakts, da sich dort die T-Zellen verstärkt ansammeln. Zwischen WT und Tg Mäusen wurde in der histologischen Struktur der Organe kein Unterschied durch Organschnitte und Färbung nachgewiesen. Insgesamt wurden histologisch und morphometrisch keine Abweichungen von transgenen Tieren zu Wildtyp Mäusen festgestellt (Abb.19).

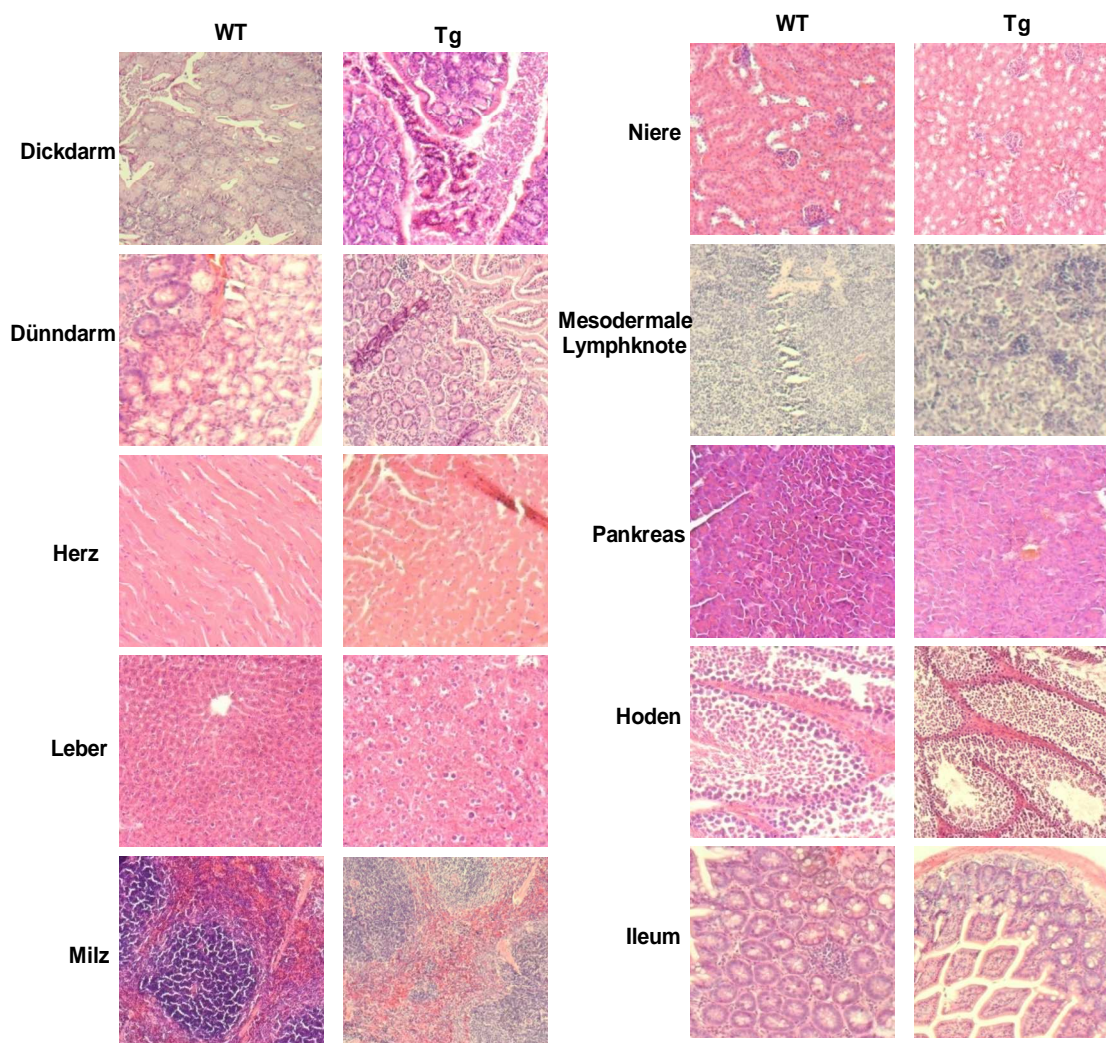


Abbildung 19: Histologische Analyse der CAR transgenen Maus. Dargestellt ist die Hämatoxylin/Eosin (HE) Färbung von Schnitten unterschiedlicher Organe der Kontroll- (WT) und transgenen (Tg) Mäuse im Alter von vier Monaten.

4.4.2 Expression des CARs in T-Zellen transgener Tiere

Es wurde untersucht, ob der chimäre Rezeptor SCA431-Fc-CD28-CD3 ζ (#1015) auf der Oberfläche der T-Zellen exprimiert wurde. Dazu wurden CD3 ζ T-Zellen aus der Milz von transgenen Mäusen (Tg) und Wildtyp Mäusen (WT) isoliert und über die magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS) getrennt. Die CD3 $^{+}$ T-Zellen wurden hierbei mit einem anti-CD3-PE markiert, der CAR durch das anti-IgG $_1$ -PE Antikörper nachgewiesen. Die transgenen CD3 $^{+}$ T-Zellen trugen zusätzlich GFP Marker (Abb.7), der sich im FITC Kanal sichtbar machte. Das anti-IgG $_1$ -PE Antikörper band sich an den extrazellulären Fc-Teil des CARs. Die Lymphozyten

von WT Mäusen dienten als Kontrolle. Die durchflusszytometrische Auswertung zeigte, dass alle CD3⁺ T-Lymphozyten aus Tg Mäusen den CAR auf der Oberfläche trugen. T-Lymphozyten aus WT Mäusen zeigten kein Signal im FITC Kanal und exprimierten keinen CAR auf der Zelloberfläche (Abb.20).

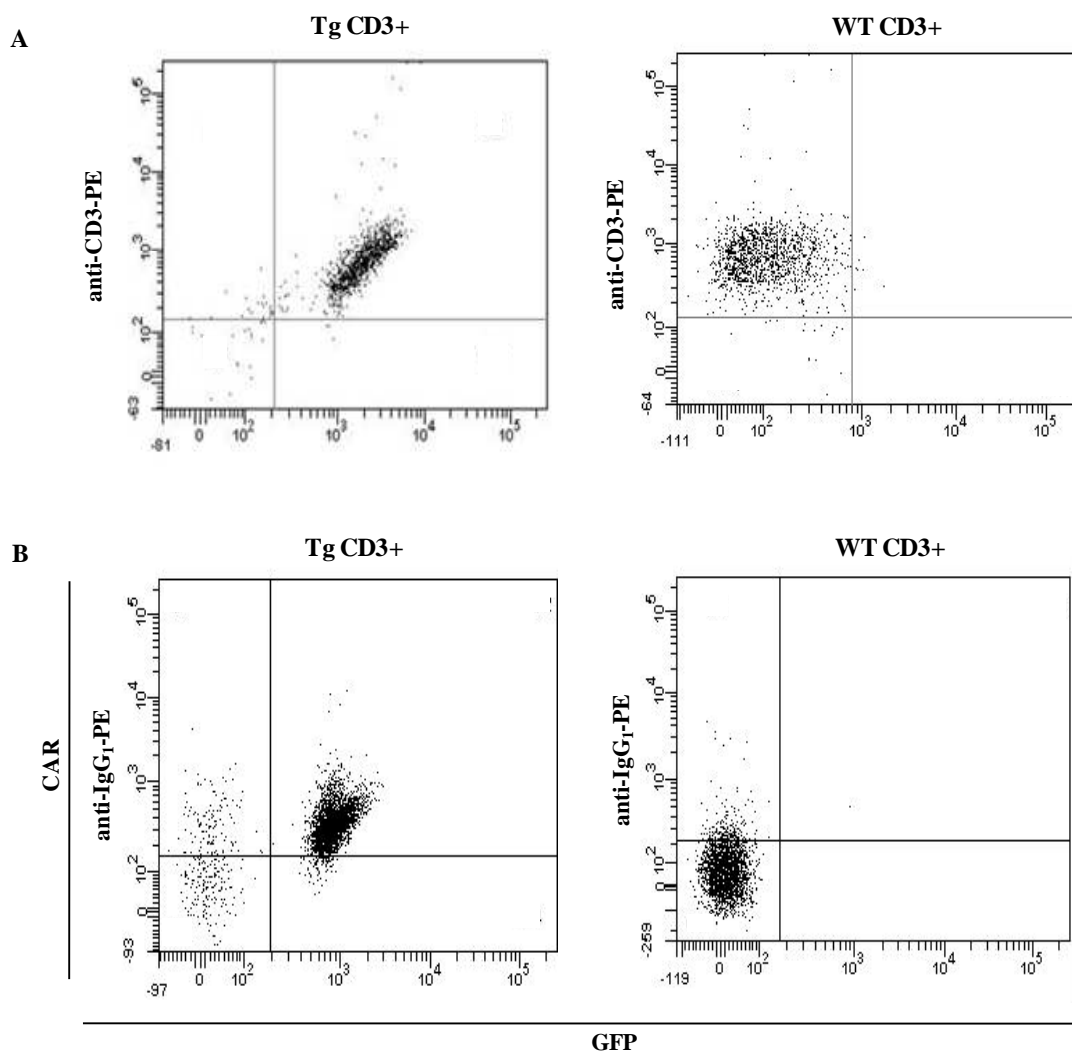


Abbildung 20: Expression des CARs auf der Oberfläche der CD3⁺ T-Lymphozyten aus transgenen (Tg) und Wildtyp (WT) Tieren. Die Lymphozyten wurden aus der Milz isoliert und CD3⁺ T-Zellen wurden mit Hilfe der magnetischen Sortierung getrennt. CD3⁺ T-Lymphozyten wurden mit einem anti-CD3-PE (A) oder mit anti-IgG₁-PE (B) Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Tg CD3⁺ T-Zellen zeigten ein GFP-Signal. Etwa 95 % Tg CD3⁺ T-Zellen exprimierten den CAR, was durch die Fc-Bindung mit anti-IgG₁-PE nachgewiesen wurde. CD3⁺ T-Zellen aus der Wildtyp (WT) Maus dienten als Kontrolle. WT T-Zellen banden sich nicht anti-IgG₁-PE und zeigten kein GFP-Signal.

Sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺ CAR tragenden transgenen T-Zellen exprimieren CAR auf der Oberfläche (Abb.21).

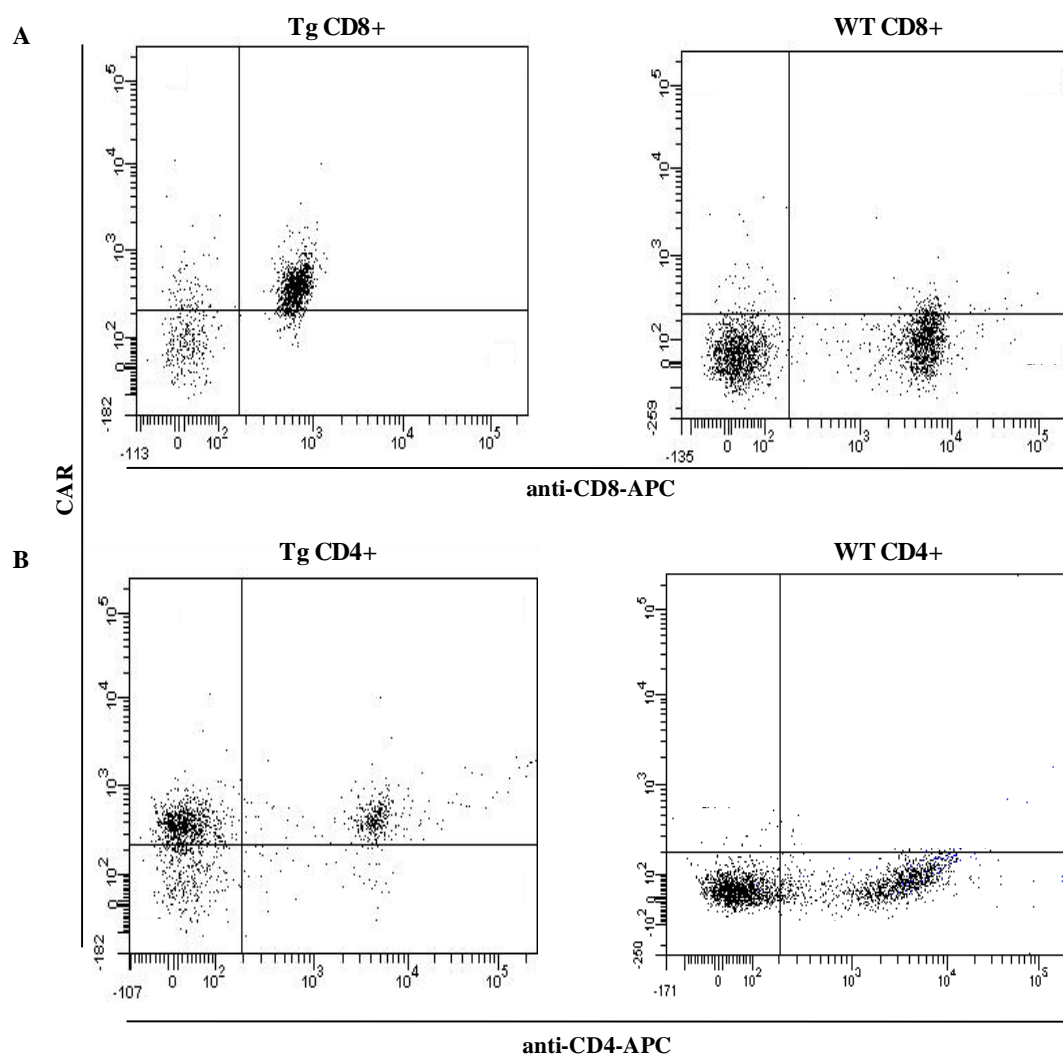


Abbildung 21: Expression des CARs auf der Oberfläche CD8⁺ und CD4⁺ T-Lymphozyten aus transgenen (Tg) und Wildtyp (WT) Tieren. Die Lymphozyten wurden aus der Milz isoliert und CD3⁺ Zellen wurden mit Hilfe magnetischer Sortierung getrennt. CD3⁺ T-Lymphozyten von transgenen und Wildtyp Mäusen wurden entweder mit anti-CD8-APC und anti-IgG-PE (A) oder mit anti-CD4-APC und anti-IgG₁-PE (B) Antikörpern zusammen inkubiert. Der anti-IgG₁-PE Antikörper bindet sich an die Fc-Domäne des CARs. Die T-Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert. 95 % CD8⁺ und CD4⁺ aus transgenen Tieren exprimierten den CAR, Zellen aus Wildtyp Mäusen zeigten keine CAR Expression.

Um festzustellen, dass der CAR exklusiv auf CD3+ T-Lymphozyten exprimiert, wurde Blut von transgenen und Wildtyp Tieren isoliert, die Erythrozyten lysiert und Proben mit anti-CD19-APC und anti-NK.1.1-APC Antikörpern inkubiert. Wie erwartet, exprimieren weder B-Zellen noch Naturkiller-Zellen den CAR (Abb.22).

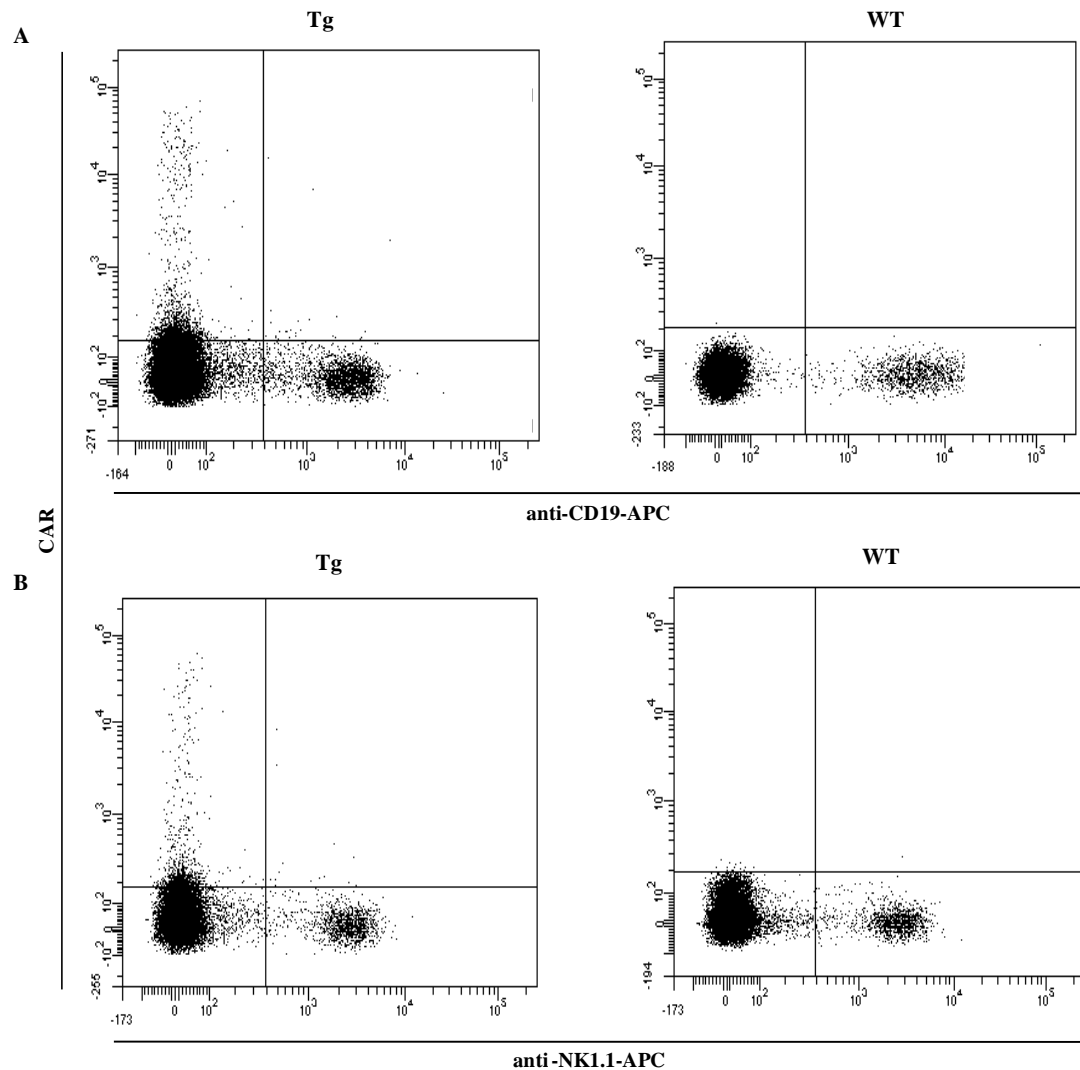


Abbildung 22: Keine Expression des CARs auf der Oberfläche B-Zellen und NK-Zellen aus transgenen (Tg) und Wildtyp (WT) Tieren. Blut von transgenen und Wildtyp Mäusen wurde nach der Erythrolyse entweder mit anti-CD19-APC und anti-IgG₁-PE (A) oder mit anti-NK1.1-APC und anti-IgG₁-PE (B) Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Es wurde keine Expression von CAR auf B-Zellen oder Natur Killer-Zellen bei Tg und WT Tieren nachgewiesen.

4.5 Funktionelle Charakterisierung der transgenen SCA431-Fc-CD28-CD3 ζ exprimierenden T-Zellen

4.5.1 Ko-Inkubation ruhender CAR exprimierenden T-Zellen mit CEA+ C15A3 Tumorzellen

Es wurde geprüft, ob die frisch isolierten CAR tragenden CD3⁺ T-Zellen der transgenen Maus in vitro eine spezifische Zytolyse der CEA⁺ C15A3 Tumorzellen vermitteln. Aus den Milzen isolierte CD3⁺ T-Zellen aus transgenen und Wildtyp Mäusen wurden sofort, ohne Prä-Aktivierung, mit CEA⁺ oder CEA⁻ Tumorzelllinien zusammengesetzt. Die CD3⁺ und Tumorzelllinien wurden 24-48 Stunden ko-kultiviert. Anschließend wurde die Viabilität der Tumorzellen gemessen. Ko-Inkubation von CD3⁺ ohne CAR aus WT Mäusen wurde als Kontrolle benutzt. Überraschenderweise haben aus Tg Tieren isolierte CD3⁺ Zellen die CEA⁺ Tumorzelllinie nicht lysiert, auch nicht bei Verlängerung der Ko-Inkubationszeit oder nach Erhöhung des Verhältnisses von Effektorzellen zu Tumorzellen (Abb.23). Dieselben Ergebnisse ergaben sich, wenn man CD3⁺ Zellen 24-72 Stunden vor der Ko-Inkubation nur mit 400 U/ml IL-2 aktiviert hat. Es wurde auch keine Steigerung der IFN- γ Sekretion nach der Ko-Inkubation mit Tumorzelllinien gemessen. Wir schließen daraus, dass die ruhenden CAR tragenden Zellen aus der transgenen Maus nicht in der Lage sind, die CEA⁺ C15A3 Tumorzellen spezifisch zu lysieren. Im Vergleich dazu lysieren T-Zellen, die retroviral mit den anti-CEA CAR ausgestattet wurden, die CEA⁺ C15A3 Zellen, nicht die CEA⁻ MC38 Zellen. Einziger Unterschied zwischen den CAR tragenden T-Zellen, die retroviral gewonnen wurden, und den CAR tragenden T-Zellen, die aus der transgenen Maus isoliert wurden, ist der präaktivierte Zustand von retroviral gewonnenen T-Zellen.

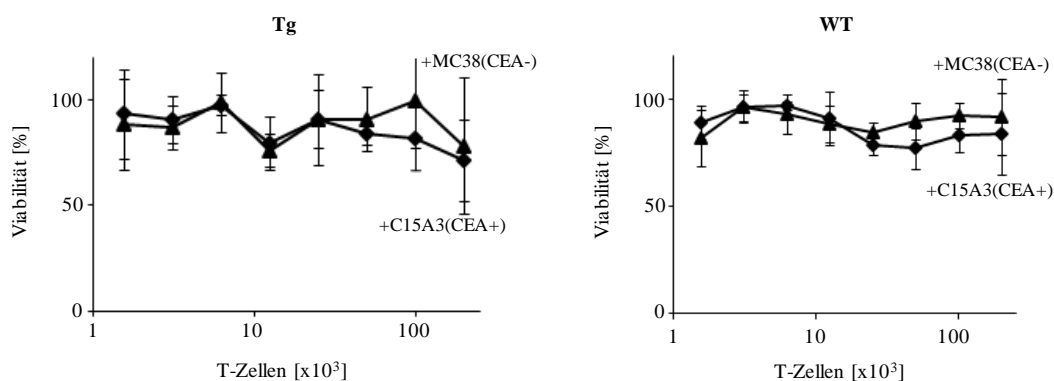


Abbildung 23: Cytotoxizität der CAR transgenen T-Zellen gegen CEA+ C15A3 und CEA- MC38 Tumorzellen mit CD3+ T-Zellen ohne Prä-Aktivierung von CD3+ Zellen. CD3+ T-Lymphozyten aus CAR transgenen Tieren (Tg) oder Wildtyp Tieren (WT) wurden in einer Verdünnungsreihe ($0,25 \times 10^3$ - 2×10^4 T-Zellen pro Vertiefung) ausplattiert und entweder mit den CEA+ C15A3 Zellen (●) oder mit den CEA- MC38 Zellen (▲) (je $2,5 \times 10^4$ Zellen) für 24-48 Stunden ko-inkubiert. CD3+ T-Lymphozyten aus Wildtyp Mäuse (WT) dienten als Kontrolle. Die Bestimmung der Vitalität erfolgte mit Hilfe eines XTT Tests. Der Test wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt und Mittelwert und Standardabweichung aufgetragen.

4.5.2 T-Zellen Aktivierung nach der Ko-Inkubation prä-aktivierten transgenen T-Zellen mit CEA+ C15A3 Tumorzellen

Die CD3+ T-Zellen wurden aus der Milz von CAR transgenen und Wildtyp Tieren isoliert. Die T-Zellen wurden mit dem agonistischen Antikörper anti-CD3 anti-CD28 und IL-2 drei Tage prä-aktiviert, gewaschen und 48 Stunden in einer Verdünnungsreihe auf Mikrotiterplatten mit Zellen der Linie CEA+ C15A3 oder CEA- MC38 ko-kultiviert. Als Kontrolle dienten T-Zellen aus der Wildtyp Maus. Nach 48 h wurde die IFN- γ Konzentration im Kulturüberstand mit Hilfe eines ELISA bestimmt. Die Aktivierung der transgenen T-Zellen wurde anhand der Induktion der IFN- γ Sekretion bestimmt. T-Zellen mit anti-CEA CAR sezernierten nach Ko-Inkubation mit Zellen der Linie C15A3 (CEA+) IFN- γ in Abhängigkeit vom Verhältnis Effektorzellen:Tumorzellen. Als Kontrollen für die Rezeptor-Spezifität wurden die T-Zellen mit Zellen der Linie MC38 (CEA-) ko-inkubiert, wobei keine Induktion der IFN- γ Sekretion registriert wurde. T-Zellen aus der Wildtyp Maus wurden ebenfalls nicht zur IFN- γ Sekretion durch die Ko-Inkubation

mit Zellen der Linie MC38 oder C15A3 aktiviert. Offensichtlich wird die CAR tragende T-Zelle-Aktivierung Antigen-spezifisch durch die anti-CEA CAR vermittelt (Abb.24).

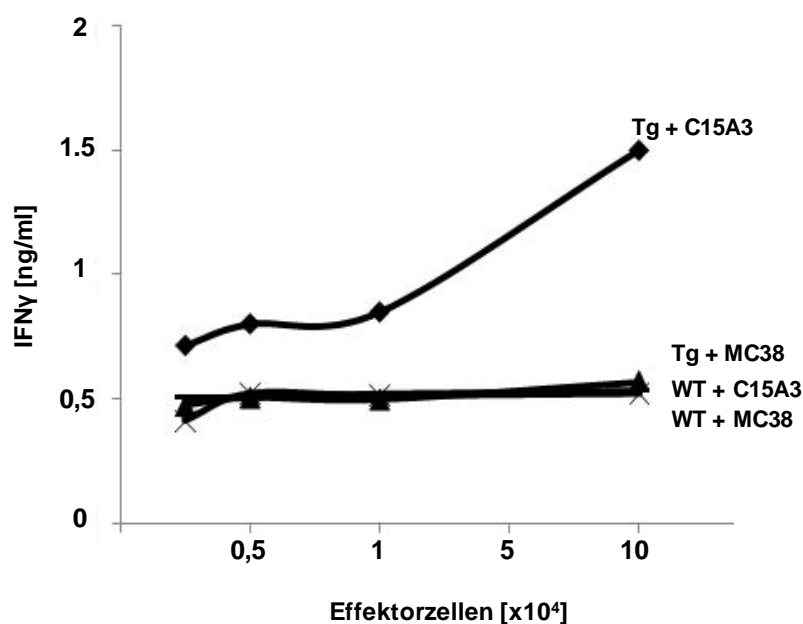


Abbildung 24: Induktion der Rezeptor-vermittelten IFN- γ Sekretion durch T-Zellen.

Die T-Zellen mit CAR mit der CEA Spezifität aus der transgenen oder Wildtyp Maus wurden in einer Verdünnungsreihe ($0,25 \times 10^3$ - 2×10^5 T-Zellen pro Vertiefung) ausplattiert und mit je $2,5 \times 10^4$ Tumorzellen/Vertiefung der Linie C15A3 (CEA+) oder MC38 (CEA-) für 48 h ko-kultiviert. Als Kontrolle wurden T-Zellen der Wildtyp Maus verwendet. Die IFN- γ Konzentration im Zellkulturüberstand wurde mit Hilfe eines ELISAs bestimmt.

4.5.3 Spezifische Zytolyse CEA+ C15A3 Tumorzelllinie nach der Ko-Inkubation mit CAR transgenen T-Zellen nach der Prä-Aktivierung *in vitro*

Wir haben untersucht, ob die CAR tragenden CD3+ T-Zellen aus der transgenen Maus mit dem CAR Rezeptor nach einer dreitägigen *in vitro* Prä-Aktivierung mit anti-CD3, anti-CD28 und IL-2 zur spezifischen Zytolyse der CEA+ Tumorzelllinie induziert werden. Hierfür wurden CD3+ T-Zellen aus CAR tragenden oder Wildtyp Maus isoliert und mit aktivierenden Antikörpern prä-aktiviert. Am vierten Tag wurden die Zellen gewaschen und in einer Verdünnungsreihe zusammen mit Tumorzellen der Linie C15A3 (CEA+) oder der Linie MC38 (CEA-) für 48 h ko-inkubiert. Anschließend wurde die Viabilität der Tumorzellen gemessen. CD3+ T-Zellen mit CAR aus transgenen Mäusen entwickelten eine zytolytische Aktivität

gegenüber CEA+ C15A3 Tumorzellen. Hingegen wurde keine zytolytische Aktivität der CD3+ T-Zellen aus der Wildtyp Maus gegenüber Zellen der Tumorzellen CEA+ C15A3 und CEA- MC38 registriert. Dies zeigt, dass die zytolytische Aktivität Antigen spezifisch durch die anti-CEA CAR nach der Prä-Aktivierung vermittelt wird (Abb.25).

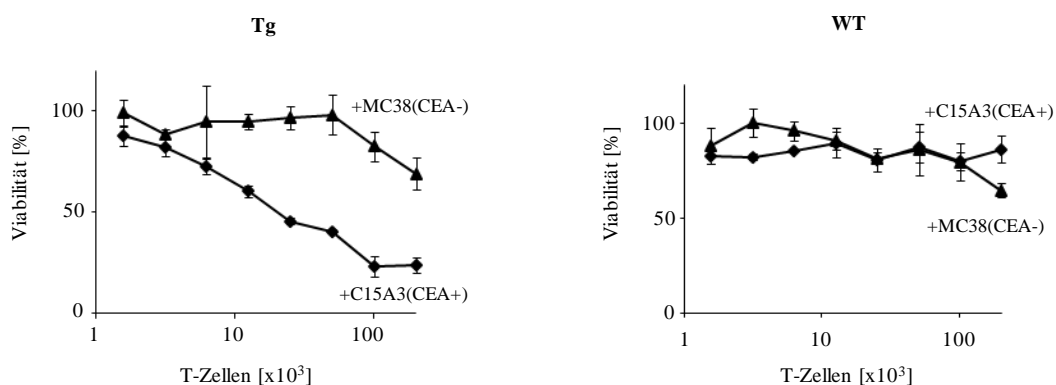


Abbildung 25: Prä-aktivierte CAR tragende T-Zellen aus der transgenen Maus lysieren die CEA+ C15A3 Tumorzellen nach der Ko-Inkubation. CD3+ T-Lymphozyten wurden aus Milzen der transgenen Tieren (Tg) oder Wildtyp Tieren (WT) isoliert und 72 Stunden mit den anti-CD28, anti-CD3 und IL-2 Antikörpern aktiviert. Die T-Zellen wurden in einer Verdünnungsreihe ($0,25 \times 10^3$ - 2×10^5 T-Zellen pro Vertiefung) ausplattiert und entweder mit den CEA+ C15A3 Zellen (●) oder mit den CEA- MC38 Zellen (▲) (je $2,5 \times 10^4$ Zellen) für 24-48 Stunden ko-inkubiert. CD3+ T-Lymphozyten aus Wildtyp Mäuse (WT) dienen als Kontrolle. Die Bestimmung der Vitalität erfolgte mit Hilfe eines XTT Tests. Der Test wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt und Mittelwert und Standardabweichung aufgetragen.

4.5.4 Anti-Tumor Aktivität der CAR transgenen T-Zellen *in vivo*

In immunokompetenten C57/B16 Versuchstieren führt die Injektion von murinen Tumorzelllinien zur Tumorbildung. In diesem Versuch wollten wir der Frage nachgehen, ob die subkutane Injektion von CEA+ Tumorzellen der Linie C15A3 oder CEA- MC38 zur Tumorbildung in anti-CEA CAR tragenden Tieren führt. Dadurch wird untersucht, ob CAR transgene T-Zellen *in vivo* durch CEA Tumorantigen funktional aktiviert werden. Die CEA Expression auf der Oberfläche von Tumorzellen (Abb.26) wurde durchflusszytometrisch gemessen. Die C15A3 (CEA+) Tumorzellen zeigten starke CEA Expression, MC38 (CEA-) Tumorzellen exprimieren kein CEA auf der Oberfläche und wurden als Kontrolle benutzt. Den Tieren wurden 2×10^6 Tumorzellen subkutan in die rechte Flanke injiziert und das

Tumorvolumen zweitäglich gemessen (Abb.27). Keine von fünf CAR transgenen Mäusen entwickelte während des Experiments einen C15A3 (CEA+) Tumor (Abb.27; A). Alle fünf transgenen Tiere entwickelten aber einen MC38-Tumor, was die CEA-Spezifität der anti-Tumor-Antwort zeigt (Abb.27; C). Die Mäuse entwickelten bis zum ein Jahr nach der Injektion keinen Tumor. Alle fünf Wildtyp Mäuse, denen zum Vergleich ebenfalls die beiden Tumorzelllinien injiziert wurden, entwickelten dagegen einen C15A3 (CEA+) und MC38 (CEA-) Tumor (Abb.27; B und D).

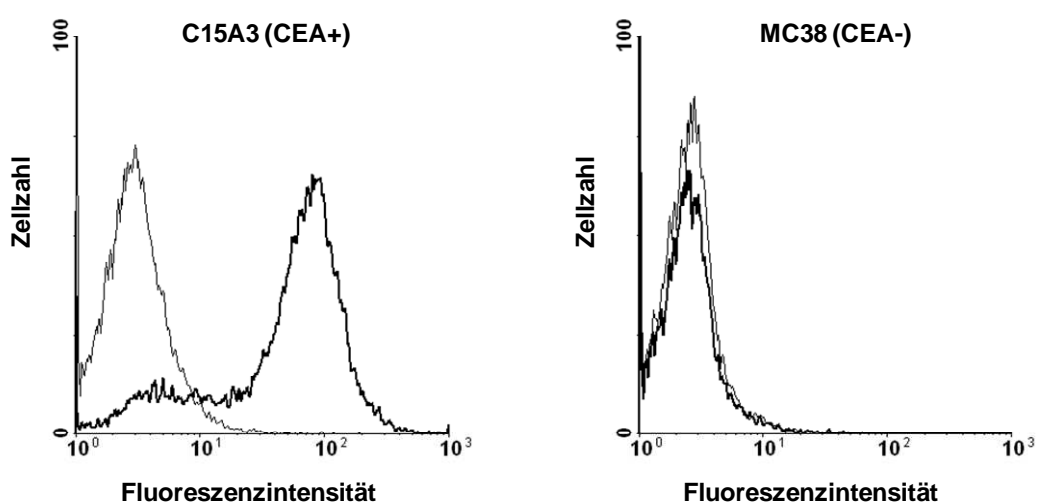


Abbildung 26: Nachweis der CEA Expression in C15A3 Tumorzelllinie. C15A3 Tumorzellen waren aus MC38 Tumorzellen durch stabile Transfektion mit CEA gewonnen. Zellen der Tumorzelllinie MC38 und C15A3 wurden mit einem murinen anti-human-CEA Antikörper oder einem murinen IgG₁ Antikörper (Isotyp-Kontrolle) und dann mit einem FITC gekoppelten anti-Maus-IgG₁ Antikörper inkubiert (dicke Linie). Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden die Fluoreszenzintensitäten ermittelt und als Histogramme übereinander gelegt. Die Fluoreszenzintensität der MC38 Zellen diente als Kontrolle.

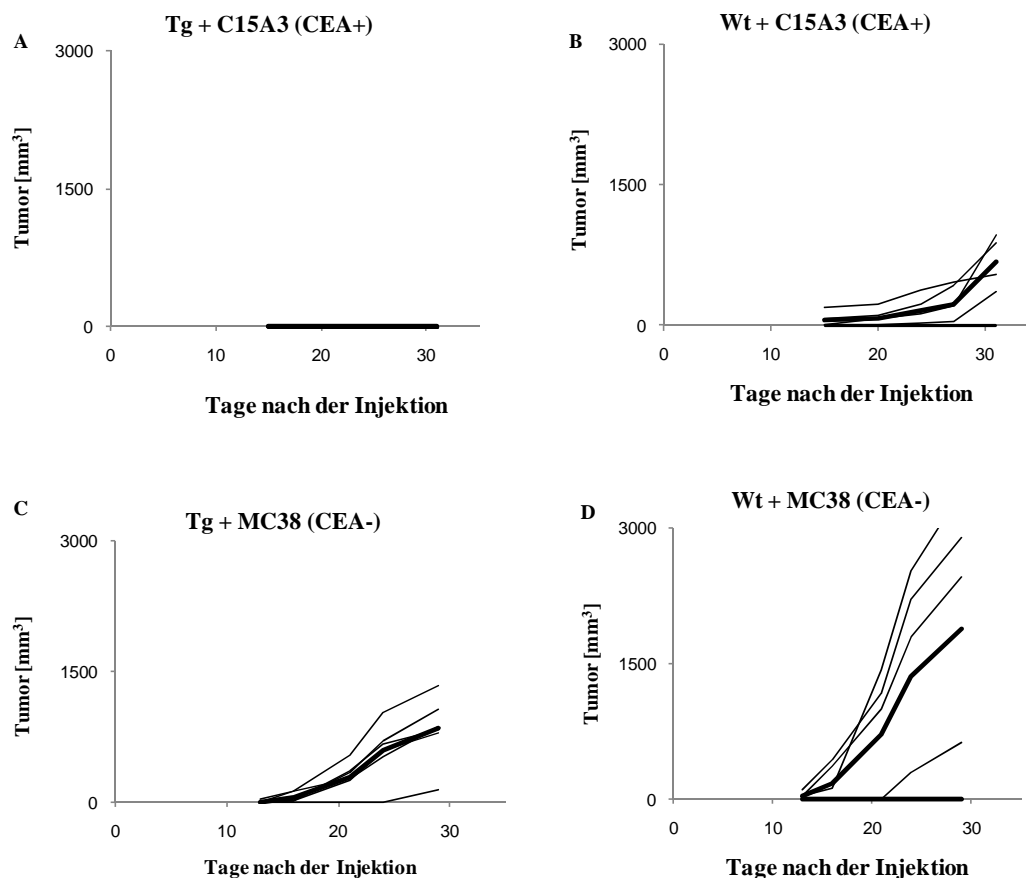


Abbildung 27: Tumorwachstum nach der subkutanen Injektion (I) der CEA+/CEA- Tumorzellen in die CAR transgene Maus. Je $2,5 \times 10^6$ Tumorzellen der MC38 (CEA-) oder C15A3 (CEA+) Tumorzelllinien wurden s.c. in die rechte Flanke der CAR transgenen (A und C) und der Wildtyp Maus (B und D) injiziert und das Tumolvolumen zweitäglich gemessen. Die dünne Linie repräsentiert jedes einzelne Tier, die dicke Linie zeigt den Mittelwert aus fünf Testtieren jeder Gruppe.

In einem weiteren Experiment (II) wurde untersucht, ob transgene Tiere den CEA positiven Tumor mit einer geringerer CEA Expression (z.B. 15 % CEA-Expression=CEA+) (Abb.28) ebenfalls abstoßen. Diesmal wurden nur C15A3 Tumorzelllinien benutzt, die sich aber in der Expressionstärke (MFI) des Antigens unterschieden. Jeder Maus von transgenen (Tg) oder Wildtyp (WT) Tiere wurde rechts C15A3 (CEA+++)-stark exprimierende Tumorzellen und links C15A3 (CEA+)-schwach exprimierende Tumorzellen s.c. injiziert. Die Ergebnisse sind im Abb.29 dargestellt. Von transgenen Tieren, denen C15A3 (CEA+++ und CEA+) injiziert wurde, entwickelten zwei von vier Tieren den schwach Antigen-

exprimierenden Tumor C15A3 (CEA+) und einer von vier den stark Antigen-exprimierenden C15A3 (CEA+++)¹ (Abb.29). Das zeigt, dass der Tumor mit dem schwach exprimierenden CEA+ nicht in allen Fällen den CAR stimuliert und die T-Zellen aktiviert. Vier aus vier Wildtyp Mäuse entwickelten besonders schnell einen C15A3 (CEA+) Tumor, drei von vier Mäusen bekamen auch einen C15A3 (CEA+++)¹ Tumor, der aber langsamer wuchs im Vergleich zum C15A3 (CEA+) Tumor.

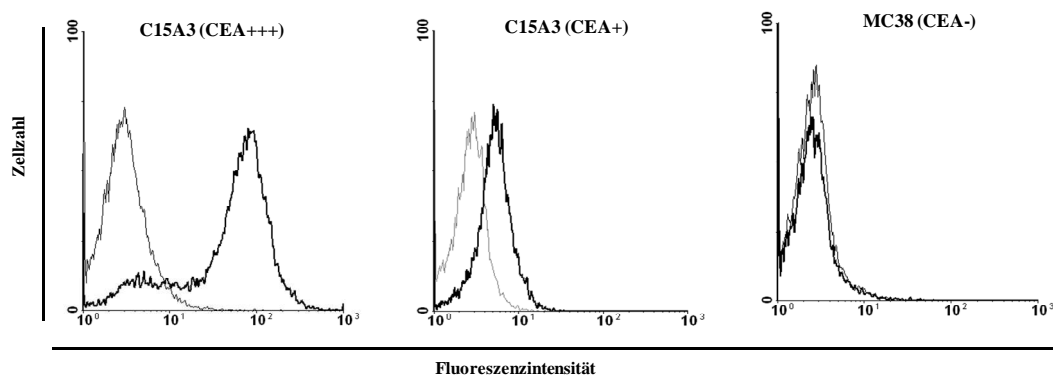


Abbildung 28: Unterschiedliche Stärke der CEA Expression in C15A3 Tumorzelllinie. Zellen der Tumorzelllinie MC38 und C15A3 wurden mit einem murinen anti-human-CEA Antikörper oder einem murinen IgG₁ Antikörper (Isotyp-Kontrolle) und dann mit einem FITC gekoppelten anti-Maus-IgG₁ Antikörper inkubiert (dicke Linie). Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden die Fluoreszenzintensitäten ermittelt und als Histogramme übereinander gelegt. Die Fluoreszenzintensität der MC38 Zellen diente als Kontrolle.

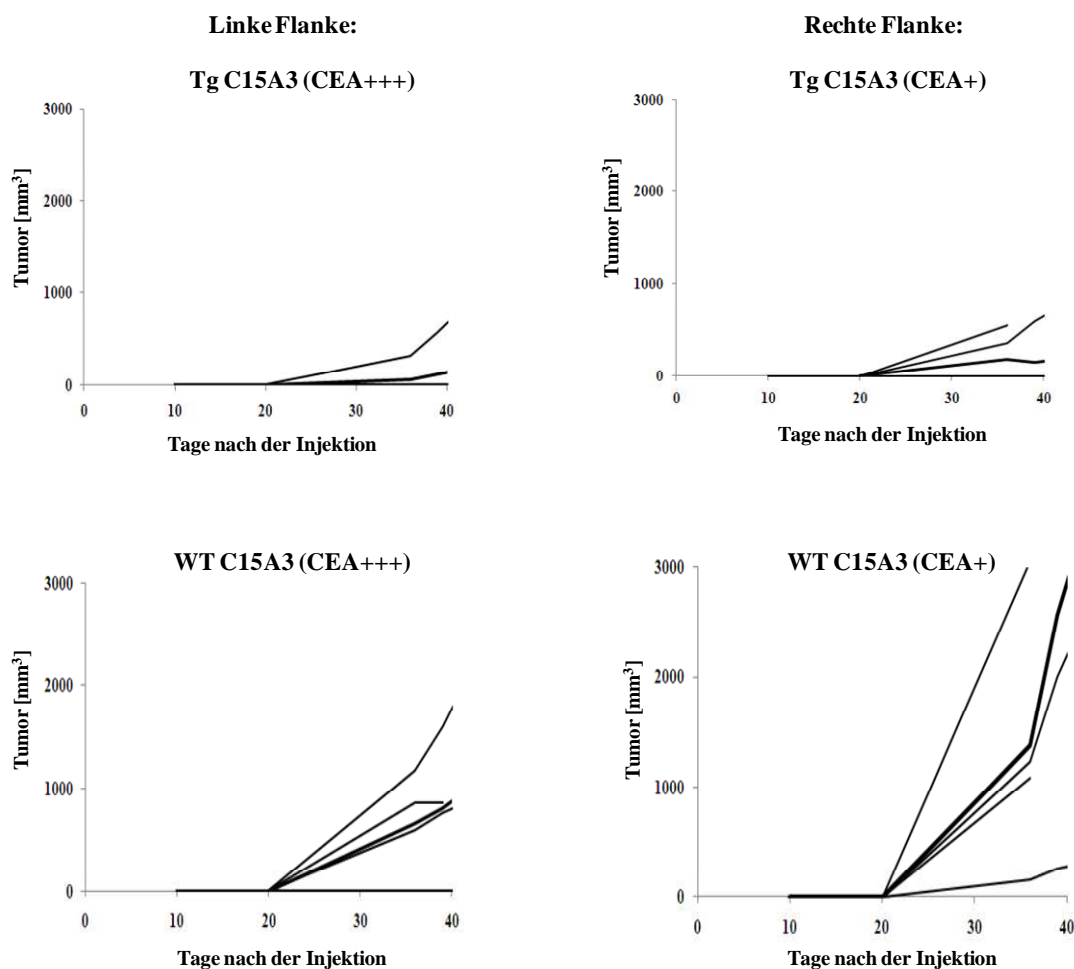


Abbildung 29: Tumorwachstum nach der subkutanen Injektion (II) der CEA+ Tumorzellen mit Unterschiedlicher Antigen Expressionen in die CAR transgene Maus. Je $2,5 \times 10^6$ Tumorzellen der C15A3 (CEA+) rechts oder C15A3 (CEA+++)-links Tumorzelllinien wurden s.c. in jede der transgenen Mäusen (Tg) oder Wildtyp Mäusen (WT) injiziert und das Tumolvolumen zweitäglich gemessen. Die dünne Linie repräsentiert jedes einzelnes Tier, die dicke Linie zeigt den Mittelwert aus vier Testtieren.

Im nächsten Experiment (III) wollten wir sehen, ob die transgene CAR tragende Tiere, die schon einmal den Kontakt mit den stark exprimierenden CEA(+++) Tumorzellen hatten, die Gedächtnis-Zellen gebildet haben und verstärkt gegen den Tumorzellen mit der niedrigeren CEA(+) Expression reagieren. Dafür haben wir jeder transgenen Maus, die zum ersten Mal Tumordinjektion bekommen hat (Tg) und erneut Tumordinjektion bekommen hat (Tg, *challenge*) rechts C15A3 (CEA+++)-stark exprimierende Tumorzellen und links C15A3 (CEA+)-schwach exprimierende Tumorzellen s.c. injiziert. Die Ergebnisse sind im Abb.30 dargestellt. Keine von Tg

challenge Mäusen hat ein Tumor entwickelt. Im Unterschied dazu haben Tg Tiere, die zum ersten Mal mit der CEA C15A3 Tumorzelllinie injiziert wurden, zu 50% (2 von 4) Tumor mit niedrigerer CEA+ Expression bekommen und 25% (1 von 4). Offensichtlich haben die transgene Tiere mit CAR Expression ein immunologisches Gedächtnis gegen CEA gebildet und konnten bei der erneuten Injektion der Tumor mit niedrigeren CEA Expression erfolgreich abstoßen

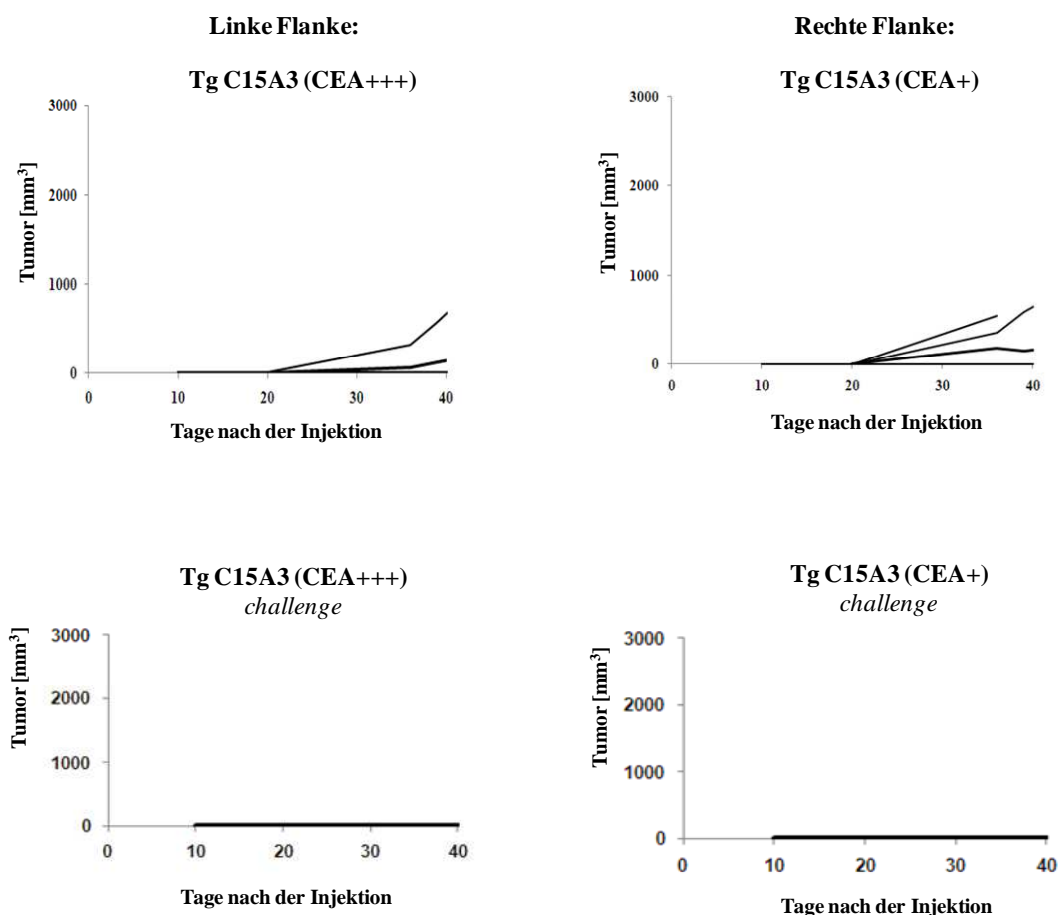


Abbildung 30: Tumorwachstum nach der subkutanen Injektion (III) der CEA+ Tumorzellen mit Unterschiedlicher Antigen Expressionen in die CAR transgene Maus. Je $2,5 \times 10^6$ Tumorzellen der C15A3 (CEA+) rechts oder C15A3 (CEA+++)-links Tumorzelllinien wurden s.c. in jede der transgenen Mäusen (Tg) zum ersten Mal oder der transgenen Mäusen (Tg *challenge*) erneut injiziert und das Tumolvolumen zweitäglich gemessen. Die dünne Linie repräsentiert jedes einzelnes Tier, die dicke Linie zeigt den Mittelwert aus vier Testtieren.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine transgene, den anti CEA-CAR SCA431-mFc-CD28-CD3 ζ konditional exprimierende Maus generiert. Der CAR ist gerichtet gegen das carcinoembryonale Antigen (CEA) und trägt die murine CD3 ζ Signalkette mit der kostimulatorischen murinen Domäne CD28. Der CAR ist ausschließlich in T-Zellen exprimiert und Antigen-spezifisch *in vitro* und *in vivo*.

Während im letzten Jahrzehnt zahlreiche CAR mit humanen Domänen generiert und in humanen T-Zellen exprimiert wurden, ist über die Expression und Funktion muriner CAR wenig bekannt. Die Gentransfermethode ist entscheidend für die Effizienz der T-Zell Transduktion, die Anordnung der Domänen in dem CAR ist wichtig für die Stabilität der Expression des CAR auf der Oberfläche der T-Zelle (Review: Bridgeman, 2010). Für die Verwendung eines CARs „zweiter Generation“ spricht die vollständige Aktivierung naiver T-Zellen durch die CAR CD28-CD3 ζ Signalkette im Mausmodell (Friedmann-Morvinski et al., 2005). Deswegen haben wir den murinen CAR eingesetzt, der die scFv Domäne zur Antigen-Bindung, die IgG₁ CH2-CH3 Domäne als „spacer“ und die intrazelluläre, kombinierte CD28-CD3 ζ Domäne als Signalkette trägt. Die CD28 Kette ist notwendig für eine adäquate Kostimulation und beeinflusst die Eigenschaft, die Effizienz und die Dauer der Tumor-spezifischen T-Zell Aktivierung. Im Vergleich zur Signalleitung durch die CD3 ζ Signalkette führt die Kombination aus der CD3 ζ Signalkette und der kostimulatorischen CD28 Signaldomäne zur gesteigerten IFN- γ Sekretion und zur Induktion von IL-2 (Hombach et al., 2001). IL-2 wiederum unterstützt die Proliferation und die Differenzierung der T-Zellen. Darüber hinaus regt IL-2 die Produktion anderer Zytokine, wie z.B. IFN- γ , an und erhöht die zytotoxische Aktivität von CD8⁺ Zellen. Diese Faktoren zusammen bewirken, dass die Effizienz einer Immunreaktion steigt.

Zur Generierung der anti-CEA SCA431-CD28-CD3 ζ CAR transgenen Maus wurde zunächst der Targeting Vektor #1015 ROSA-CAG-STOP-SCA431-Fc-CD28-CD3 ζ kloniert, mit dessen Hilfe der gewünschte CAR durch homologe Rekombination in den ROSA26-Locus des Genoms von embryonalen Stammzellen eingebracht wurde. Durch Injektion ausgewählter, homolog rekombinierter Stammzellklone in

Blastozysten und anschließende Reimplantation in pseudoschwangere Ammenmäuse wurden chimäre Mäuse erzeugt, die den Targeting Vektor #1015 tragen. Eine Keimbahntransmission der transgenen Zellen erlaubte die Etablierung eines neuen transgenen Mausstammes ROSA26⁺/cag-stop-car, der über einen „stillen“ *knock in* verfügte. Die STOP-Kassette im Targeting Vektor vor der cDNS des CARs verhinderte die ubiquitäre Expression des CARs. Die STOP-Kassette ist mit zwei *loxP*-Stellen flankiert und wurde nach der Kreuzung des transgenen Mausstammes ROSA26⁺/cag-stop-car mit einem Mausstamm, der die *Cre*-Rekombinase unter dem CD4-Promoter in den T-Zellen exprimiert, durch die *Cre*-Rekombinase in den T-Zellen entfernt. Der Vorteil dieses Systems ist, dass eine konditionale Expression des CARs in T-Zellen erreicht wird. Dadurch wurde der doppelt transgene Mausstamm ROSA26⁺/cag-car/*Cre* erzeugt. Der transgene CAR ist in diesem Mausstamm konditional in den T-Zellen unter Kontrolle des „CMV-early enhancer/chicken- β -actin“ (CAG) Promoters exprimiert. Der CAG-Promoter wurde gewählt, da er ein starker Promoter ist und eine konstitutiv langfristige Genexpression in einem breiten Zellspektrum vermitteln kann. Die transgenen T-Zellen erhielten durch den Targeting Vektor zusätzlich ein EGFP Reporterprotein.

Beide Geschlechter der R26⁺/cag-car/*Cre* transgenen Tiere haben die stabile 100% Expression der SCA431-mFc-CD28-CD3 ζ CAR in T-Zellen. Die Expression des CARs in T-Zellen ist unabhängig vom Alter der Tiere. Es wurden keine phänotypischen Veränderungen und kein Unterschied in Lebensdauer, Organbildung oder Gewebekonstruktion im Vergleich zu Wildtyp Mäusen beobachtet. Insbesondere haben wir auf die Entwicklung und Gewebekonstruktion von Milz, Thymus, lymphatischen Knoten und Gastrointestinaltrakt geachtet, da sich dort die T-Zellen verstärkt ansammeln.

Die Expression des CARs in der R26⁺/cag-car/*Cre* transgenen Maus erfolgt exklusiv in CD3⁺ T-Zellen. Insbesondere exprimieren B-Zellen und NK-Zellen keinen CAR. Diese exklusive Expression auf T-Zellen des Transgens basiert auf der Nutzung des *Cre/loxP*-Systems und erlaubt, spezifisch die Wirkung von T-Zellen zu untersuchen. In diesem Zusammenhang ist es wichtig darauf hinzuweisen, dass normalerweise *ex vivo* die Modifizierung von den T-Zellen mit einem CAR durch retrovirale Transduktion erreicht wird. Die retrovirale Gewinnung von CAR exprimierenden Zellen in ausreichender Menge ist jedoch zeitaufwändig und teuer. Um die Zellen empfänglich für das Zuführen von Retroviren zu machen, muss man diese vorerst

aktivieren. Dieses schließt die Möglichkeit aus, mit ruhenden Zellen zu arbeiten, die primär durch ein Tumor Antigen aktiviert werden können. Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugte transgene Maus mit 100% CAR exprimierenden T-Zellen bietet dagegen den Vorteil, ruhende T-Zellen mit CAR für funktionelle Untersuchungen zu nutzen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, *in vivo* die Entstehung des Gedächtnisses der T-Zellen zu untersuchen und die Immunüberwachung des Tumors zu analysieren.

Als erstes haben wir uns mit der Frage beschäftigt, ob T-Zellen mit CEA spezifischem CAR aus der transgenen Maus durch Kontakt mit CEA+ Tumorzellen *in vitro* spezifisch aktiviert werden. Überraschenderweise erfolgte keine Lyse von Tumorzellen nach der Ko-Inkubation mit CAR transgenen T-Zellen. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen mit T-Zellen, die durch retroviralen Gentransfer mit demselben CAR erzeugt wurden. Der Unterschied zwischen CAR transgenen und retroviral gewonnenen T-Zellen ist in der Prä-Aktivierung von transduzierten CAR T-Zellen zu finden. Die Unfähigkeit des CARs, nur durch ein Antigen die T-Zellen zu aktivieren, hat auch die Gruppe von Brocker beobachtet (Brocker et al. 2005). Grundlage von deren Beobachtungen ist eine transgene Maus mit FvCD3 ζ CAR und ohne CD28 stimulatorische Domäne in der intrazellulären Signalkette. FvCD3 ζ ist gegen das humane CD3 ϵ gerichtet. Ohne CD28 Prä-Aktivierung der CAR T-Zellen haben die FvCD3 ζ CAR tragenden Zellen keine Lyse von Antigen positiven Tumorzellen (EL4-hCD3 ϵ) *in vitro* gezeigt. Erst nach Prä-Aktivierung von CAR tragenden T-Zellen mit IL-2 und anti-CD28 haben die T-Zellen spezifisch den Tumor lysiert. Da unser CAR durch CD28 und CD3 ζ stimuliert wird, haben wir mit unserem anti-CEA CAR die Lyse von Antigen positiven Tumorzellen C15A3 (CEA+) ohne Prä-Aktivierung von T-Zellen erwartet. In unserem chimären Rezeptor ist die CD28 kostimulatorische Domäne zusammen mit CD3 ζ in der Signalkette enthalten und somit unabhängig von extrazellulärer Kostimulation. Trotzdem hat die Ko-Inkubation von Antigen positiven Tumorzellen und CAR tragenden ruhenden T-Zellen aus der transgenen Maus nicht zur Lyse von Antigen positiven Tumorzellen geführt und zu keiner Zytokinen (IFN- γ) Sekretion. Die Aktivierung in Gegenwart von IL-2 führte auch zu keiner Lyse von Tumorzellen. Es wurde dabei keine IFN- γ Produktion registriert. Offensichtlich reicht entgegen unserer Erwartung die simultane CD3 ζ und CD28 Stimulation durch den CAR nicht aus, eine vollständige T-Zell Aktivierung *in vitro* zu erzielen. Im Gegensatz dazu führte die dreitägige Prä-

Aktivierung mit anti-CD28, anti-CD3 Antikörper und IL-2 zur spezifischen Lyse von Antigen positiven Tumorzelllinie C15A3 (CEA+) durch CAR tragende T-Zellen und zur Sekretion von IFN- γ . Dieses zeigt, dass die CAR T-Zellen nicht in der Aktivierung blockiert und prinzipiell zu einer spezifischen T-Zell Antwort in der Lage sind.

Im Gegensatz hierzu wurde *in vivo* eine effektive Anti-Tumor Antwort beobachtet in zwei Modellen: 1) Transplantation des Tumors in die CAR transgene Maus; 2) Transplantation der CAR transgenen T-Zellen in die Tumor tragende Maus.

Im ersten Modell haben wir den transgenen Tieren die Tumorzelllinie C15A3 mit hoher CEA-Antigen-Expression subkutan injiziert und eine Tumorprotektion beobachtet. Während *in vitro* in unserem Mausmodell die zur CD3 ζ Signalkette zusätzliche CD28 kostimulatorische Domäne nicht ausreichte, um T-Zellen nur durch CEA zu aktivieren, haben wir *in vivo* in den transgenen Tieren den anti-CEA Effekt gegenüber CEA+ Tumorzellen durch T-Zellen mit dem anti-CEA-CD28-CD3 ζ CAR beobachtet. Das zeigt, dass *in vivo* die CAR transgenen T-Zellen keine zusätzliche Prä-Aktivierung für die Tumoreliminierung brauchen und ausschließlich durch CEA spezifisch aktiviert werden.

Im zweiten Modell haben wir die orthotopisch in den Pankreas transplantierten CEA+ Pankreastumorzellen in der immunokompetenten Maus C57/Bl6 mit den CAR transgenen T-Zellen behandelt. Wir konnten sehen, dass die CEA+ Pankreastumorzellen eliminiert wurden, nicht jedoch der CEA- Pankreastumor (Chmielewski, nicht publiziert). Das zeigte, dass die transferierten CAR tragenden T-Zellen in der Wildtyp Maus spezifisch aktiviert werden.

Im Gegensatz hierzu hat Brocker et al. in 2005 in eine immunkompetente Maus die T-Zellen mit CAR aus einer transgenen Maus und eine Antigen exprimierende Tumorzelllinie zusammen transferiert und keine Lyse von Tumorzellen ohne externe Aktivierung der T-Zellen beobachtet. Er hat in die Maus C57/Bl6 die Antigen positive Maus-EL4-Lymphoma mit der Expression von hCD3 ϵ injiziert und CAR FvCD3 ζ T-Zellen aus der transgenen Maus, die gegen hCD3 ϵ spezifisch sind, transferiert. Durch zusätzliche IL-2 Injektion waren die FvCD3 ζ CAR transgenen T-Zellen jedoch funktionell in der Lage, das Wachstum des Tumors zu verlangsamen, aber nicht zu verhindern. Dies zeigt, dass eine ausschließlich aus

CD3 ζ bestehende Signalkette in CAR nicht ausreicht, um den CAR vollständig *in vivo* durch Antigen zu aktivieren.

Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob die Tumorabstoßung abhängig von der Höhe der Antigenexpression ist. Dazu wurde CAR transgenen Tieren die murine CEA+ C15A3 Tumorlinie s.c. in beide Seiten injiziert, wobei in die linke Seite C15A3 mit hoher CEA Expression, in die rechte Seite C15A3 mit niedriger CEA Expression injiziert wurde. Die Hälfte der transgenen Tiere entwickelte den Tumor mit der niedrigeren CEA Expression und ein Viertel der Tiere den Tumor mit der höheren CEA Expression. Offenbar reicht es bei der Gabe des Tumors mit niedriger CEA Expression nicht aus, die T-Zellen durch den CAR zu aktivieren.

Wir haben in einem weiteren Versuch die transgenen Tiere, denen schon einmal die hochexprimierenden CEA-Antigen Tumorzellen injiziert wurden und die keinen Tumor entwickelt haben, erneut mit CEA+ Tumorzellen, diesmal aber mit der niedrigeren Antigen Expression, injiziert. Hierbei konnten wir beobachten, dass die transgenen Tiere keinen Tumor entwickelt hatten. Hieraus schließen wir, dass bei einem „Challenge“ mit CEA+ Tumorzellen mit niedriger Antigen-Dichte eine signifikant erhöhte Wahrscheinlichkeit auf ein tumorfreies Überleben besteht. Wir nehmen an, dass die CAR transgenen T-Zellen persistieren und das immunologische Gedächtnis ausbilden.

Eine weitere Frage ist, ob CAR in der transgenen Maus zwischen der Expression von Antigen auf den gesunden Zellen und Tumorzellen unterscheiden können. Diese Frage berührt die Balance zwischen Autoimmunität und Tumortoleranz. Um diese Fragen zu beantworten, haben wir die R26⁺/cag-car/Cre transgene Maus mit einer CEA-tragenden transgenen Maus gekreuzt. In der CEA transgenen Maus wird das humane CEA überwiegend im Gastrointestinaltrakt und in der Lunge exprimiert. Die eingekreuzte CAR-tg x CEA-tg Maus zeigt offensichtlichen keinen phänotypischen Unterschied zur Wildtyp Maus. In Gewebeschnitten konnte man jedoch die Infiltration von T-Zellen im Gastrointestinaltrakt feststellen, in denen CEA auf dem gesunden Gewebe exprimiert wird. Die Verpaarung der R26⁺/cag-car/Cre transgenen Maus mit der CEA-exprimierenden transgenen Maus bietet die Möglichkeit, die Entwicklung von Autoimmunität vs. Tumorantwort *in vivo* über einen längeren Zeitraum zu untersuchen.

Eine andere Möglichkeit für die Nutzung der Maus besteht in der Kreuzung der R26⁺/cag-car/Cre Maus mit anderen Cre-Mäusen, um die Expression von CAR auf der Oberfläche, zum Beispiel von NK-Zellen oder anderen Zellen zu erreichen. Dadurch könnten die CAR Modifikationen in anderen Effektorzellen als T-Zellen studiert werden.

Zwei andere Mausmodelle mit chimären Rezeptoren wurden in der Literatur beschrieben. Die Gruppe von Eshhar, Weizmann Institut, Israel, hat zwei transgene Mäuse generiert. Eine davon trägt einen chimären Rezeptor spezifisch gegen 2,4,6-Trinitrophenyl (TNP) mit humanen CD28 und CD3 γ intrazellulären Signaldomänen (TPCR). Die andere trägt einen chimären Rezeptor spezifisch gegen 2,4,6-trinitrophenyl (TNP) ohne CD28 und mit nur CD3 γ intrazellulären Signaldomänen (TPCR Δ CD28). Die mit dem TPCR ausgestatteten T-Zellen waren in der Lage, *in vitro* allein durch Antigen, angezeigt durch IL-2 Sekretion, aktiviert zu werden. Bei den mit TPCR Δ CD28 ausgestatteten T-Zellen stieg die IL-2 Sekretion nach der zusätzlichen B7(CD28) Kostimulation. Allerdings war der CAR durch das lösliche Antigen blockiert. Obwohl bekannt ist, dass lösliches CEA im Blut von Tumorpatienten nachweisbar ist, haben wir *in vivo* im Mausmodell keine Blockade des CARs beobachtet.

In Fortsetzung dieses Projektes sind zwei weitere Mausmodelle mit chimären Antigen Rezeptoren für die Generierung und den Vergleich zur anti-CEA-CD28-CD3 ζ CAR tragenden transgenen Maus geplant. Dies werden anti-CEA mit ausschließlich CD3 ζ Signaldomäne und „dritter Generation“ anti-CEA-CD28-CD3 ζ -OX40 CAR mit zwei kostimulatorischen Domänen in T-Zellen CAR tragende Mäuse. Nach jüngeren Erkenntnissen sind durch CD28-CD3 ζ -OX40 stimulierte T-Zellen hochpotente Effektorzellen zur Tumoreliminierung *in vivo*. Diese T-Zellen differenzieren in spätere Stufen, in denen sie eine andere Stimulation als durch CD28 benötigen. Deswegen zeigt sich die OX40 Kostimulation zusammen mit CD28 als Vorteil. Da eine T-Zelle mit dem CD28-CD3 ζ -OX40 CAR zwangsläufig in die späte Differenzierung läuft, wäre eine CD28-CD3 ζ -OX40 CAR transgene Maus in Bezug auf eine anhaltende T-Zell Antwort interessant. Hierbei ist zu erwarten, dass T-Zellen mit dem CD28-CD3 ζ -OX40 CAR am Tumorort persistieren und Rezeptorvermittelte Kostimulation die Apoptose von Effektor T-Zellen durch erhöhte

Expression von Bcl-2 verhindert. Infolgedessen lysierten CD28-OX40 kostimierte T-Zellen etablierte Tumore *in vivo* effektiver (Ederer, nicht publiziert).

Zusammenfassung

Die adoptive T-Zell-Therapie mit Hilfe von durch einen Chimären Antigen Rezeptor (CAR) modifizierten T-Zellen vereint die Spezifität von Antikörpern mit den anti-tumoralen Eigenschaften von T-Zellen. Durch dieses Verfahren werden CAR modifizierte Effektorzellen spezifisch aktiviert und entfalten ihre zytolytische Wirkung lokalisiert am Tumor. Im Gegensatz zu Zellkultur-Modellen kann im Mausmodell der Prozess der Tumoreliminierung im Kontext des etablierten Tumors und des Immunsystems sowie derer Wechselwirkungen analysiert werden.

Zielsetzung dieser Arbeit war es, eine transgene Mauslinie mit konditionaler Expression eines CAR mit Spezifität für das Carcinoembryonale Antigen (CEA) auf T-Zellen zu generieren. Die transgene Maus wurde durch die Transfektion des CAR Expressionskonstrukts in embryonalen Stammzellen mit Hilfe des *Cre/loxP* Systems zur konditionalen Expression in T-Zellen generiert. Hierdurch exprimieren sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Lymphozyten den CAR. Transgene Tiere zeigen darüber hinaus keine phänotypischen oder gewebespezifischen Unterschiede zu Wildtyp Mäusen und keine Einschränkung der Lebenszeit.

Die Mäuse sind immunkompetent in Gegenwart der CAR T-Zellen. Nach Prä-Aktivierung der isolierten, CAR tragenden T-Lymphozyten sind diese in der Lage, nach Antigen-spezifischer Aktivierung durch CEA exprimierende Tumorzellen, IFN- γ zu sezernieren und Tumorzellen zu lysieren. Ruhende T-Zellen können dagegen nicht *in vitro* CEA⁺ Tumorzellen lysieren. Transplantierte CEA⁺ Tumorzelllinien werden jedoch von anti-CEA-CAR transgenen Tieren abgestoßen. Wildtyp Mäuse mit adoptivem Transfer der CAR transgenen T-Zellen entwickeln ebenfalls keinen Tumor. Die CAR transgenen Tiere, die erneut mit dem CEA⁺ Tumorzellen konfrontiert wurden, entwickeln kein Tumor, auch wenn die Antigen Expression viel niedriger ist.

Dieses Mausmodell bietet die Möglichkeit, Fragen der Antigen-spezifischen Aktivierung, Toleranz und Auto-Immunität von T-Zellen mit Spezifität für ein Auto- und Tumorantigen zu studieren.

Anhang

DNS-Sequenz der CAG-Neo-STOP-SCA431-Fc-CD28-CD3 ζ -EGFP Intergrations-Kassette in ROSA 26 Locus. Die cDNS für den CAR SCA431-Fc-CD28-CD3 ζ im ROSA-CAG-STOP-SCA431-Fc-CD28-CD3 ζ Vektor (#1015) umfasst 2039 bp und befindet sich zwischen zwei Restriktionsschnittstellen *AscI*, die der Klonierung dienen. Diese Schnittstellen sind mit Fettdruck gekennzeichnet. Die abgeleitete Aminosäuresequenz wird im Ein-Buchstaben-Code über der Nukleotidsequenz aufgeführt und ist annotiert. Das Stopp-Codon ist mit einem Stern (*) markiert.

```

                                CAGs Promoter
~~~~~
S L F F P Q L A V E D K L F A V F P V V
1141 TCCCTTTTT TTCCACAGCT CGCGGTTGAG GACAAACTCT TCGCGGTCTT TCCAGTGGTT
    AGGGAAAAAA AAGGTGTCGA GCGCCAACTC CTGTTTGAGA AGCGCCAGAA AGGTACACAA
                                CAGs Promoter
~~~~~
N * S Y N R * G N I * N H F Q M I H S *
1201 AATTAAGTT ATAATCGCTG AGGTAATATT TAAAATCATT TTCAAATGAT TCACAGTTAA
    TTAATTTCAA TATTAGCGAC TCCATTATAA ATTTTAGTAA AAGTTTACTA AGTGTCAATT
                                CAGs Promoter
~~~~~
F A T I * F Y F H I N * T P C R L L L R
1261 TTTGCGACAA TATAATTTTA TTTTCACATA AACTAGACGC CTTGTCTCTC TCTTCTTCGT
    AAACGCTGTT ATATTTAAAT AAAAGTGTAT TTGATCTGCG GAACAGCAGA AGAAGAAGCA
                                CAGs Promoter
~~~~~
I P S L F H F S L H K N * H S Y Y R I H
1321 ATTCCTTCTC TTTTTCATTT TTCTCTTCAT AAAAATTAAC ATAGTTATTA TCGTATCCAT
    TAAGGAAGAG AAAAAGTAAA AAGAGAAGTA TTTTAAATTG TATCAATAAT AGCATAGGTA
                                CAGs Promoter
~~~~~
I C I Y R I E * I F C C H K Y I C L F *
1381 ATATGTATCT ATCGTATAGA GTAAATTTTT TGTTGCATA AATATATATG TCTTTTTTAA
    TATACATAGA TAGCATATCT CATTTAAAAA ACAACAGTAT TTATATATAC AGAAAAAATT
                                CAGs Promoter
~~~~~
W G V * Y R C A * F F C N L Q Q C Y F L
1441 TGGGGTGTAT AGTACCGCTG CGCATAGTTT TTCTGTAATT TACAACAGTG CTATTTTCTG
    ACCCCACATA TCATGGCGAC GCGTATCAAA AAGACATTA AAGTGTGCAC GATAAAAGAC
                                CAGs Promoter
~~~~~
V V L R S V L L * L L N L Y N Q * I W D
1501 GTAGTTCTTC GGAGTGTGTT GCTTTAATTA TTAAATTTAT ATAATCAATG AATTTGGGAT
    CATCAAGAAG CCTCACACAA CGAAATTAAT AATTTAAATA TATTAGTTAC TTAAACCCTA
                                CAGs Promoter
~~~~~
R R F C T I C C R H S T Q L L L V Q L H
1561 CGTCGGTTTT GTACAATATG TTGCCGGCAT AGTACGCAGC TTCTTCTAGT TCAATTACAC
    GCAGCCAAA CATGTTATAC AACGGCCGTA TCATGCGTCG AAGAAGATCA AGTTAATGTG
                                CAGs Promoter
~~~~~
H F L A A P D * H N F P K C C T N R * T
1621 CATTTTTTAG CAGCACC GGA TTAACATAAC TTTCCAAAAT GTTGTACGAA CCGTTAAAACA
    GTAAAAATC GTCGTGGCCT AATTGTATTG AAAGGTTTTA CAACATGCTT GGCAATTTGT

```


CAGs Promoter

~~~~~  
**K T V H L P F L Y Y C L R A V V C C \* K**  
 1681 AAAACAGTTC ACCTCCCTTT TCTATACTAT TGTCTGCGAG CAGTTGTTTG TTGTTAAAAA  
 TTTTGTCAAG TGGAGGGAAA AGATATGATA ACAGACGCTC GTCAACAAAC AACAATTTTT

## CAGs Promoter

~~~~~  
*** Q P L * * D A Q T N I T N W K C L S I**
 1741 TAACAGCCAT TGTAATGAGA CGCACAAACT AATATCACAA ACTGGAAATG TCTATCAATA
 ATTGTCCGTA ACATTACTCT GCGTGTGTA TTATAGTGTG TGACCTTAC AGATAGTTAT

CAGs Promoter

~~~~~  
**Y S C S S Y \* \* \* S I T G S L V H S P Y**  
 1801 TATAGTTGCT CTAGTTATTA ATAGTAATCA ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT  
 ATATCAACGA GATCAATAAT TATCATTAGT TAATGCCCA GTAATCAAGT ATCGGGTATA

## CAGs Promoter

~~~~~  
M E F R V T * L T V N G P P G * P P N D
 1861 ATGGAGTTCC GCGTTACATA ACTTACGGTA AATGGCCCGC CTGGCTGACC GCCCAACGAC
 TACCTCAAGG CGCAATGTAT TGAATGCCAT TTACCGGGCG GACCGACTGG CGGGTTGCTG

CAGs Promoter

~~~~~  
**P R P L T S I M T Y V P I V T P I G T F**  
 1921 CCCCGCCCAT TGACGTCAAT AATGACGTAT GTTCCCATAG TAACGCCAAT AGGGACTTTC  
 GGGCGGGTA ACTGCAGTTA TTACTGCATA CAAGGTATC ATTGCGGTTA TCCCTGAAAG

## CAGs Promoter

~~~~~  
H * R Q W V D Y L R * T A H L A V H Q V
 1981 CATTGACGTC AATGGGTGGA CTATTTACGG TAAACTGCC ACTTGGCAGT ACATCAAGTG
 GTAACGTCAG TTACCCACCT GATAAATGCC ATTTGACGGG TGAACCGTCA TGTAGTTCAC

CAGs Promoter

~~~~~  
**Y H M P S T P P I D V N D G K W P A W H**  
 2041 TATCATATGC CAAGTACGCC CCCTATTGAC GTCAATGACG GTAAATGGCC CGCCTGGCAT  
 ATAGTATACG GTTCATGCGG GGGATAACTG CAGTTACTGC CATTTACCGG GCGGACCGTA

## CAGs Promoter

~~~~~  
Y A Q Y M T L W D F P T W Q Y I Y V L V
 2101 TATGCCAGT ACATGACCTT ATGGGACTTT CCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC
 ATACGGGTCA TGTACTGGAA TACCCTGAAA GGATGAACCG TCATGTAGAT GCATAATCAG

CAGs Promoter

~~~~~  
**I A I T M H G R G E P H V L L H S P H L**  
 2161 ATCGCTATTA CCATGCATGG TCGAGGTGAG CCCCACGTTG TGCTTCACTC TCCCCATCTC  
 TAGCGATAAT GGTACGTACC AGCTCCACTC GGGGTGCAAG ACGAAGTGAG AGGGGTAGAG

## CAGs Promoter

~~~~~  
P P L P T P N F V F I Y F L I I L C S D
 2221 CCCCCCTCC CCACCCCAA TTTTGTATTT ATTTATTTTT TAATTATTTT GTGCAGCGAT
 GGGGGGAGG GGTGGGGTT AAAACATAAA TAAATAAAA ATTAATAAAA CACGTGCGTA

CAGs Promoter

~~~~~  
**G G G G G G G A R A R R G G A G R G A G**  
 2281 GGGGGCGGG GGGGGGGGG GCGCGCGCC AGGCGGGCG GGGCGGGCG AGGGCGGGG  
 CCCCCGCCC CCCCCCCCC CCGCGCGCG TCCGCCCCG CCGCCCCCG TCCCCGCCC

## CAGs Promoter

~~~~~  
R G E A E R C G G S Q S E R R A P K V S
 2341 CGGGGCGAGG CGGAGAGGTG CGGCGGCAGC CAATCAGAGC GGCGGCTCC GAAAGTTTCC
 GCCCCGCTCC GCCTCTCCAC GCCCGCTCG GTTAGTCTCG CCGCGGAGG CTTTCAAAGG

CAGs Promoter

~~~~~  
**F Y G E A A A A A A L \* K A K R A A G G**  
 2401 TTTTATGGCG AGGCGGCGG GCGGCGGCC CTATAAAAAG CGAAGCGCG GCGGGCGGG  
 AAAATACCGC TCCGCCCGG CCGCCGCGG GATATTTTTT GCTTCGCGG CCGCCCCCC

CAGs Promoter

~~~~~

S R C D A A F A P C P A P P P P R A A R
2461 AGTCGCTGCG ACGCTGCCTT CGCCCCGTGC CCCGCTCCGC CGCCGCTCG CGCCGCCCGC
 TCAGCGACGC TCGACGGAA GCGGGGCACG GGGCGAGGCG GCGGCGGAGC GCGGCGGGCG

CAGs Promoter

~~~~~

**P G S D \* P R Y S H R \* A G G T A L L L**  
**2521** CCCGGCTCTG ACTGACCGCG TTACTCCCAC AGGTGAGCGG GCGGGACGGC CCTTCTCCTT  
 GGGCCGAGAC TGA CTGGCGC AATGAGGGT TCCACTCGCC CGCCCTGCCG GGAAGAGGAA

CAGs Promoter

~~~~~

R A V I S A W F N D G L F L F C G C V K
2581 CGGGCTGTAA TTAGCGCTTG GTTTAATGAC GGCTTGTTTC TTTTCTGTGG CTGCGTGAAA
 GCCCGACATT AATCGCGAAC CAAATTACTG CCGAACAAAG AAAAGACACC GACGCACTTT

CAGs Promoter

~~~~~

**A L R G S G R A L C A G G A A R G C P R**  
**2641** GCCTTGAGGG GCTCCGGGAG GGCCCTTTGT GCGGGGGGAG CGGCTCGGGG CTGTCCCGGG  
 CGGAACTCCC CGAGGCCCTC CCGGAAACA CGCCCCCTC GCCGAGCCCC GACAGGCGCC

CAGs Promoter

~~~~~

G D G C L R G G R G R A G F G F W R V T
2701 GGGGACGGCT GCCTTCGGGG GGGACGGGC AGGGCGGGGT TCGGCTTCTG GCGTGTGACC
 CCCCTGCCGA CGGAAGCCCC CCCTGCCCCG TCCCGCCCCA AGCCGAAGAC CGCACACTGG

CAGs Promoter

~~~~~

**G G S R A S L A S V G R S S P G F P \* \***  
**2761** GGCGGCTCTA GAGCCTCGCT AGCATCTGTA GGGCGCAGTA GTCCAGGGTT TCCTTGATGA  
 CCGCCGAGAT CTCGGAGCGA TCGTAGACAT CCCGCGTCAT CAGGTCCCAA AGGAACTACT

CAGs Promoter

~~~~~

C H T Y P V P F F S T A R G * G Q T L R
2821 TGTCATACTT ATCCTGTCCC TTTTTTTTCC ACAGCTCGCG GTTGAGGACA AACTCTTCGC
 ACAGTATGAA TAGGACAGGG AAAAAAAGG TGTCGAGCGC CAACTCCTGT TTGAGAAGCG

CAGs Promoter NeoR

~~~~~

5'loxP

~~~~~

G L S S G * L N N F V * H T L Y E V M D
2881 GGTCTTTCCA GTGGTTAATT AAATAACTTC GTATAGCATA CATTATACGA AGTTATGGAT
 CCAGAAAGGT CACCAATTAA TTTATTGAAG CATATCGTAT GTAATATGCT TCAATACCTA

NeoR

~~~~~

**P N K R P N T R A F Y S V F L L P I P S**  
**2941** CCGAACAAAC GACCCAACAC CCGTGCCTTT TATTCTGTCT TTTTATTGCC GATCCCCTCA  
 GGCTTGTTG CTGGTTGTG GGCACGAAA ATAAGACAGA AAAATAACGG CTAGGGGAGT

NeoR

~~~~~

E E L V K K A I E G D A L R I G S G D T
3001 GAAGAACTCG TCAAGAAGGC GATAGAAGGC GATGCGCTGC GAATCGGGAG CGGCGATACC
 CTTCTTGAGC AGTTCTTCCG CTATCTTCCG CTACGCGAGC CTTAGCCCTC GCCGCTATGG

NeoR

~~~~~

**V K H E E A V S P F A A K L F S N I T G**  
**3061** GTAAAGCAG AGGAAGCGGT CAGCCCATTC GCCGCCAAGC TCTTCAGCAA TATCACGGGT  
 CATTTCTGTC TCCTTCGCCA GTCGGGTAAG CGGCGGTTTC AGAAGTCGTT ATAGTGCCCA

NeoR

~~~~~

S Q R Y V L I A V R H T Q P A T V D E S
3121 AGCCAACGCT ATGTCTGAT AGCGGTCCGC CACACCAGC CGGCCACAGT CGATGAATCC
 TCGGTTGCCA TACAGGACTA TCGCCAGGCG GTGTGGGTTC GCCGGTGTCA GCTACTTAGG

NeoR

~~~~~

**R K A A I F H H D I R Q A G I A M G H D**  
**3181** AGAAAAGCGG CCATTTTCCA CCATGATATT CGGCAAGCAG GCATCGCCAT GGGTACAGAC  
 TCTTTTCGCC GGTAAGAGGT GGTACTATAA GCCGTTTCGTC CGTAGCGGTA CCCAGTCTG

## NeoR

~~~~~  
E I L A V G H A R L E P G E Q F G W R E
 3241 GAGATCCTCG CCGTCGGGCA TGC GCGCTT GAGCCTGGCG AACAGTTCGG CTGGCGCGAG
 CTCTAGGAGC GGCAGCCCGT ACGCGCGGAA CTCGGACCGC TTGTCAAGCC GACCGCGCTC

NeoR

~~~~~  
**P L M L F V Q I I L I D K T G F H P S T**  
 3301 CCCCTGATGC TCTTCGTCCA GATCATCCTG ATCGACAAGA CCGGCTTCCA TCCGAGTACG  
 GGGGACTACG AGAAGCAGGT CTAGTAGGAC TAGCTGTTCT GGCCGAAGGT AGGCTCATGC

## NeoR

~~~~~  
C S L D A M F R L V V E W A G S R I K R
 3361 TGCTCGCTCG ATGCGATGTT TCGCTTGGTG GTCGAATGGG CAGGTAGCCG GATCAAGCGT
 ACGAGCGAGC TACGCTACAA AGCGAACAC CAGCTTACCC GTCCATCGGC CTAGTTCGCA

NeoR

~~~~~  
**M Q P P H C I S H D G Y F L G R S K V R**  
 3421 ATGCAGCCGC CGCATTGCAT CAGCCATGAT GGATACTTTC TCGGCAGGAG CAAGGTGAGA  
 TACGTCGGCG GCGTAACGTA GTCGGTACTA CCTATGAAAG AGCCGTCTC GTTCCACTCT

## NeoR

~~~~~  
*** Q E I L P R H F A Q * Q P V P S R F S**
 3481 TGACAGGAGA TCCTGCCCCG GCACTTCGCC CAATAGCAGC CAGTCCCTTC CCGCTTCAGT
 ACTGTCCTCT AGGACGGGGC CGTGAAGCGG GTTATCGTCG GTCAGGGAAG GGCGAAGTCA

NeoR

~~~~~  
**D N V E H S C A R N A R R G Q P R \* P R**  
 3541 GACAACGTCG AGCACAGCTG CGCAAGGAAC GCCCGTCGTG GCCAGCCACG ATAGCCCGCG  
 CTGTTGCAGC TCGTGTGAC GCGTTCCTTG CGGGCAGCAC CCGTCCGTGC TATCGGCGCG

## NeoR

~~~~~  
C L V L Q F I Q G T G Q V G L D K K N R
 3601 TGCCTCGTCC TGCAGTTCAT TCAGGGCACC GGACAGGTCG GTCTTGACAA AAAGAACC GG
 ACGGAGCAGG ACGTCAAGTA AGTCCCCTGG CCTGTCCAGC CAGAAGTGT TTTCTTGGCC

NeoR

~~~~~  
**A P L R \* Q P E H G G I R A A D C L L C**  
 3661 GCGCCCTGC GCTGACAGCC GGAACACGGC GGCATCAGAG CAGCCGATTG TCTGTTGTGC  
 CGCGGGGACG CGACTGTCCG CTTTGTGCCG CCGTAGTCTC GTCGGTAAAC AGACAACACG

## NeoR

~~~~~  
P V I A E * P L H P S G R R T C V Q S I
 3721 CCAGTCATAG CCGAATAGCC TCTCCACCCA AGCGGCCGGA GAACCTGCGT GCAATCCATC
 GGTCAGTATC GGCTTATCGG AGAGGTGGGT TCGCCGGCCT CTTGGACGCA CGTTAGGTAG

NeoR

~~~~~  
**L F N G R S H I G C R V A R C S R P H A**  
 3781 TTGTTCAATG GCCGATCCCA TATTGGCTGC AGGGTCGCTC GGTGTTGAG GCCACACGCG  
 AACAAGTTAC CGGCTAGGGT ATAACCAGC TCCAGCGAG CCACAAGCTC CGGTGTGCGC

## NeoR

~~~~~  
S P * Y A K W T W D R A A P T A S A C S
 3841 TCACCTTAAT ATGCGAAGTG GACCTGGGAC CGCGCCGCC CACTGCATC TCGGTGTTCG
 AGTGAATTA TACGCTTAC CTGGACCCTG GCGCGCGGG GCTGACGTAG ACGCACAAGC

NeoR

~~~~~  
**N S P M T R R W A G F A R H W V E T F Q**  
 3901 AATTTCGCAA TGACAAGACG CTGGGCGGGG TTTGCTCGAC ATTGGGTGGA AACATTCCAG  
 TTAAGCGGTT ACTGTTCTGC GACCCGCCCC AAACGAGCTG TAACCCACCT TTGTAAGGTC

## NeoR

~~~~~  
A W V E R L F A S S C K T T L L D I G W
 3961 GCCTGGGTGG AGAGGCTTTT TGCTTCTCT TGCAAAACCA CACTGCTCGA CATTGGGTGG
 CGGACCACC TCTCCGAAAA ACGAAGGAGA ACGTTTTGGT GTGACGAGCT GTAACCCACC

NeoR

~~~~~  
**K H S R P G W R G F L L P L A K P H C S**

4021 AAACATCCA GGCCTGGGTG GAGAGGCTTT TTGCTTCTC TTGCAAACC AACTGCTCG  
 TTTGTAAGGT CCGGACCCAC CTCTCCGAAA AACGAAGGAG AACGTTTTGG TGTGACGAGC  
 NeoR  
 ~~~~~  
 T S D * S R L G D T K Y G D L G L F V S
 4081 ACTAGTGATT AAAGTCGACT CGGGGACACC AAATATGGCG ATCTCGGCTT TTTCGTTTCT
 TGATCACTAA TTTCAGCTGA GCCCCTGTGG TTTATACCGC TAGAGCCGGA AAAGCAAAGA
 NeoR
 ~~~~~  
 W S W D M F A I D P S T T R T A V R S A  
 4141 TGGAGCTGGG ACATGTTTGC CATCGATCCA TCTACCACCA GAACGGCCGT TAGATCTGCT  
 ACCTCGACCC TGTACAAACG GTAGCTAGGT AGATGGTGGT CTTGCCGGA ATCTAGACGA  
 NeoR  
 ~~~~~  
 A T V V S T E E T T V A V T T T T V V A
 4201 GCCACCGTTG TTTCACCGA AGAAACCACC GTTGCCGTAA CCACCACGAC GGTGTTGCT
 CGGTGGCAAC AAAGGTGGCT TCTTTGGTGG CAACGGCATT GGTGGTGTCTG CCAACAACGA
 NeoR
 ~~~~~  
 K E A A T A T A T V V A A V V V I V V A  
 4261 AAAGAAGCTG CCACCGCAC GGCCACCGTT GTAGCCGCGG TTGTTGTTAT TGATGTTGCT  
 TTTCTTCGAC GGTGGCGGTG CCGTGGCAA CATCGGCGGC AACACAATA ACATCAACGA  
 NeoR  
 ~~~~~  
 H V I S G T S W F S S * V R R N I T I L
 4321 CATGTTATTT CTGGCACTTC TTGGTTTTCC TCTTAAGTGA GGAGGAACAT AACCATTCTC
 GTACAATAAA GACCGTGAAG AACCAAAGG AGAATTCCT CCTCCTTGTG TTGGTAAGAG
 NeoR
 ~~~~~  
 V V V V D A \* I L H L F A Q F S H N M K  
 4381 GTTGTGTCG TTGATGCTTA AATTTTGAC TGTTCGCTC AGTTCAGCCA TAATATGAAA  
 CAACAACAGC AACTACGAAT TTAAAACGTG AACAAAGCGAG TCAAGTCGGT ATTATACTTT  
 NeoR  
 ~~~~~  
 C F S C C S Y G I P L A T Y H H N * L F
 4441 TGCTTTTCTT GTTGTCTTA CGGAATACCA CTTGCCACCT ATCACCACAA CTACTTTT
 ACGAAAAGAA CAACAAGAAAT GCCTTATGGT GAACGGTGA TAGTGGTGTG GATTGAAAAA
 NeoR
 ~~~~~  
 STOP  
 ~~~~~  
 P V P P S L L Y F F S R G I F V K E P Y
 4501 CCCGTTCCCT CATCTTTTT ATATTTTTTT TCTCGAGGGA TCTTTGTGAA GGAACCTTAC
 GGGCAAGGAG GTAGAGAAA TATAAAAAAA AGAGCTCCCT AGAAACACTT CCTTGGAATG
 STOP
 ~~~~~  
 F C G V T \* L D K L P T E I \* S S K V N  
 4561 TTCTGTGGTG TGACATAATT GGACAACTA CCTACAGAGA TTAAAGCTC TAAGGTAAAT  
 AAGACACCAC ACTGTATTAA CCTGTTTGAT GGATGTCTCT AAATTCGAG ATTCCATTTA  
 STOP  
 ~~~~~  
 I K F L S V * C V K L L I L I V C V F *
 4621 ATAAAAATTT TAAGTGATA ATGTGTTAAA CTACTGATTC TAATGTTTG TGTATTTTAG
 TATTTTAAAA ATTCACATAT TACACAATTT GATGACTAAG ATTAACAAAC ACATAAAATC
 STOP
 ~~~~~  
 I P T Y G T D E W E Q W W N A F N E E N  
 4681 ATTCCAACCT ATGGAAGTGA TGAATGGGAG CAGTGGTGGG ATGCCTTTAA TGAGGAAAAC  
 TAAGGTGGG TACCTTGACT ACTTACCCTC GTCACCACCT TACGGAAATT ACTCCTTTTG  
 STOP  
 ~~~~~  
 L F C S E E M P S S D D E A T A D S Q H
 4741 CTGTTTTGCT CAGAAGAAAT GCCATCTAGT GATGATGAGG CTACTGCTGA CTCTCAACAT
 GACAAAACGA GTCTTCTTTA CGGTAGATCA CTACTACTCC GATGACGACT GAGAGTTGTA
 STOP
 ~~~~~  
 S T P P K K K R K V E D P K D F P S E L  
 4801 TCTACTCTC CAAAAAGAA GAGAAAGGTA GAAGACCCCA AGGACTTTC TTCAGAATTG  
 AGATGAGGAG GTTTTTCTT CTCTTCCAT CTTCTGGGGT TCCTGAAAGG AAGTCTAAC

STOP

```

~~~~~
L S F L S H A V F S N R T L A C F A I Y
4861 CTAAGTTTTT TGAGTCATGC TGTGTTTGT AATAGAACTC TTGCTTGCTT TGCTATTTAC
GATTCAAAAA ACTCAGTACG ACACAAATCA TTATCTTGAG AACGAACGAA ACGATAAATG

```

STOP

```

~~~~~
T T K E K A A L L Y K K I M E K Y S V T
4921 ACCACAAAGG AAAAAGCTGC ACTGCTATAC AAGAAAATTA TGGAAAATA TTCTGTAACC
TGGTGTTC TTTTTCGACG TGACGATATG TTCTTTAAT ACCTTTTAT AAGACATTGG

```

STOP

```

~~~~~
F I S R H N S Y N H N I L F F L T P H R
4981 TTTATAAGTA GGCATAACAG TTATAATCAT AACATACTGT TTTTCTTAC TCCACACAGG
AAATATTCAT CCGTATTGTC AATATTAGTA TTGTATGACA AAAAAGAATG AGGTGTGTCC

```

STOP

```

~~~~~
H R V S A I N N Y A Q K L C T F S F L I
5041 CATAGAGTGT CTGCTATTA TAACATGCT CAAAAATTGT GTACCTTGTAG CTTTTTAATT
GTATCTCACA GACGATAATT ATTGATACGA GTTTTAAACA CATGGAATC GAAAAATTA

```

STOP

```

~~~~~
C K G V N K E Y L M Y S A L T R D H N Q
5101 TGTAAGGGG TTAATAAGGA ATATTTGATG TATAGTGCTT TGACTAGAGA TCATAATCAG
ACATTTCCC AATTATTCCT TATAACTAC ATATCACGGA ACTGATCTCT AGTATTAGTC

```

STOP

```

~~~~~
P Y H I C R G F T C F K K P P T P P P E
5161 CCATACCACA TTTGTAGAGG TTTTACTTGC TTTAAAAAAC CTCCACACC TCCCCTGAA
GGTATGGTGT AAACATCTCC AAAATGAACG AAATTTTTTG GAGGTGTGG AGGGGGACTT

```

STOP

```

~~~~~
P E T * N E C N C C C * L V Y C S L * W
5221 CCTGAAACAT AAAATGAATG CAATTGTTGT TGTTAACTTG TTTATTGCAG CTTATAATGG
GGACTTTGTA TTTTACTTAC GTTAACAACA ACAATTGAAC AAATAACGTC GAATATTACC

```

STOP

```

~~~~~
L Q I K Q * H H K F H K * S I F F T A F
5281 TTACAAATAA AGCAATAGCA TCACAAATTT CACAAATAAA GCATTTTTTT CACTGCATTC
AATGTTTATT TCGTTATCGT AGTGTTTAAA GTGTTTATTT CGTAAAAAAA GTGACGTAAG

```

STOP

```

~~~~~
* L W F V Q T H Q C I L S C L D L T W *
5341 TAGTTGTGGT TTGTCCAAAC TCATCAATGT ATCTTATCAT GTCTGGATCT GACATGGTAA
ATCAACACCA AACAGGTTG AGTAGTTACA TAGAATAGTA CAGACCTAGA CTGTACCATT
3'loxP

```

STOP

Lkappa

~~~~~

~~~~~

AscI

```

~~~~~
V S L * L R I A Y I I R S Y G R A T M D
5401 GTAAGCTTAT AACTTCGTAT AGCATAACATT ATACGAAGTT ATGGGCGCGC CACCATGGAT
CATTCGAATA TTGAAGCATA TCGTATGTAA TATGCTTCAA TACCCGCGCG GTGGTACCTA

```

SCA431

single chain

Lkappa

```

~~~~~
F Q V Q I F S F L L I S A S V I M S R G
5461 TTTCCAGTGC AGATTTTCAG CTTCCTGCTA ATCAGTGCCT CAGTCATAAT GTCTAGAGGT
AAAGTCCACG TCTAAAAGTC GAAGGACGAT TAGTCACGGA GTCAGTATTA CAGATCTCCA

```

SCA431 single chain

```

~~~~~
V H S Q V Q L Q E S G P D L V K P S Q S
5521 GTCCACTCCC AGGTCCAAC GCAGGAGTCA GGACCTGACC TGGTGAACC TTCTCAGTCA
CAGGTGAGGG TCCAGGTTGA CGTCTCAGT CCTGGACTGG ACCACTTTGG AAGAGTCAGT

```

## SCA431 single chain

~~~~~  
 L S L T C T V T G Y S I T S G Y S W H W
 5581 CTTTCACTCA CCTGCACTGT CACTGGCTAC TCCATACCA GTGGTTATAG CTGGCACTGG
 GAAAGTGAGT GGACGTGACA GTGACCGATG AGGTAGTGGT CACCAATATC GACCGTGACC

SCA431 single chain

~~~~~  
 I R Q F P G N K L E W M G Y I Q Y S G I  
 5641 ATCCGGCAGT TTCCAGGAAA CAAACTGGAA TGGATGGGCT ACATACAATA CAGTGGTATC  
 TAGGCCGTCA AAGGTCCTTT GTTTGACCTT ACCTACCCGA TGTATGTTAT GTCACCATAG

## SCA431 single chain

~~~~~  
 T N Y N P S L K S R I S I T R D T S K N
 5701 ACTAACTACA ACCCCTCTCT CAAAAGTCGA ATCTCTATCA CTCGAGACAC ATCCAAGAAC
 TGATTGATGT TGGGGAGAGA GTTTTCAGCT TAGAGATAGT GAGCTCTGTG TAGGTTCTTG

SCA431 single chain

~~~~~  
 Q F F L Q L N S V T T E D T A T Y Y C A  
 5761 CAGTTCCTCC TGCAGTTGAA TTCTGTGACT ACTGAGGACA CAGCCACATA TTACTGTGCA  
 GTCAAGAAGG ACGTCAACTT AAGACACTGA TGACTCCTGT GTCGGTGTAT AATGACACGT

## SCA431 single chain

~~~~~  
 R E D Y D Y H W Y F D V W G Q G T T V T
 5821 AGAGAAGACT ATGATTACCA CTGGTACTTC GATGTCTGGG GCCAAGGGAC CACGGTCACC
 TCTCTTCTGA TACTAATGGT GACCATGAAG CTACAGACCC CGGTCCCTG GTGCCAGTGG

SCA431 single chain

~~~~~  
 V S S G G G G S G G G G S G G S D I  
 5881 GTCTCCTCAG GAGGTGGTGG ATCGGGCGGT GGCGGGTCCG GTGGCGCGG ATCTGACATC  
 CAGAGGAGTC CTCCACCACC TAGCCCGCCA CCGCCAGCC CACCGCCGC TAGACTGTAG

## SCA431 single chain

~~~~~  
 Q L T Q S P A I M S A S L G E E I T L T
 5941 CAGCTGACCC AGTCTCCAGC AATCATGTCT GCATCTCTAG GGGAGGAGAT CACCCTAACC
 GTCGACTGGG TCAGAGGTCG TTAGTACAGA CGTAGAGATC CCCTCTCTA GTGGGATTGG

SCA431 single chain

~~~~~  
 C S A S S S V S Y M H W Y Q Q K S G T S  
 6001 TGCAGTGCCA GCTCGAGTGT AAGTTACATG CACTGGTACC AGCAGAAGTC AGGCACTTCT  
 ACGTACCGGT CGAGCTCACA TTCAATGTAC GTGACCATGG TCGTCTCAG TCCGTGAAGA

## SCA431 single chain

~~~~~  
 P K L L I Y S T S N L A S G V P S R F S
 6061 CCCAACTCT TGATTTATAG CACATCCAAC CTGGCTTCTG GAGTCCCTTC TCGCTTCAGT
 GGGTTTGAGA ACTAAATATC GTGTAGGTG GACCGAAGAC CTCAGGAAG AGCGAAGTCA

SCA431 single chain

~~~~~  
 G S G S G T F Y S L T I S S V E A E D A  
 6121 GGCAGTGGGT CTGGGACCTT TTATTCTCTC ACAATCAGCA GTGTGGAGGC TGAAGATGCT  
 CCGTCACCCA GACCCTGGAA AATAAGAGAG TGTTAGTTCGT CACACCTCCG ACTTCTACGA

## SCA431 single chain

~~~~~  
 A D Y Y C H Q W S S Y P T F G G G T K L
 6181 GCCGATTATT ACTGCCATCA GTGGAGTAGT TATCCCACGT TCGGAGGGGG GACCAAGCTG
 CGGCTAATAA TGACGGTAGT CACCTCATCA ATAGGGTGCA AGCCTCCCC CTGGTTCGAC

mIgG1

SCA431 single chain

~~~~~  
 E I K V D P V P R D G G C K P C I C T V  
 6241 GAGATCAAAG TAGATCCTGT GCCCAGGAT GGTGGTTGTA AGCCTTCAT ATGTACAGTC  
 CTCTAGTTTC ATCTAGGACA CGGGTCCCTA CCACCAACAT TCGGAACGTA TACATGTCAG

mIgG1

~~~~~  
 P E V S S V F I F P P K P K D V L T I T
 6301 CCAGAAGTAT CATCTGTCTT CATCTTCCCC CCAAAGCCCA AGGATGTGCT CACCATTACT
 GGTCTTCATA GTAGACAGAA GTAGAAGGGG GTTTTCGGT TCCTACACGA GTGGTAATGA

mIgG1

~~~~~  
 L T P K V T C V V V D I S K D D P E V Q  
 6361 CTGACTCCTA AGGTCACGTG TGTGTGGTA GACATCAGCA AGGATGATCC CGAGGTCCAG  
 GACTGAGGAT TCCAGTGCAC ACAACACCAT CTGTAGTCGT TCCTACTAGG GCTCCAGGTC

## mIgG1

~~~~~  
 F S W F V D D V E V H T A Q T Q P R E E
 6421 TTCAGCTGGT TTGTAGATGA TGTGGAGGTG CACACAGCTC AGACGCAACC CCGGGAGGAG
 AAGTCGACCA AACATCTACT ACACCTCCAC GTGTGTCGAG TCTGCGTTGG GGCCCTCCTC

mIgG1

~~~~~  
 Q F N S T F R S V S E L P I M H Q D W L  
 6481 CAGTTCAACA GCACTTTCG CTCAGTCAGT GAACTTCCCA TCATGCACCA GGACTGGCTC  
 GTCAAGTTGT CGTGAAAGGC GAGTCAGTCA CTTGAAGGGT AGTACGTGGT CCTGACCGAG

## mIgG1

~~~~~  
 N G K E F K C R V N S A A F P A P I E K
 6541 AATGGCAAGG AGTTCAAATG CAGGGTCAAC AGTGCAGCTT TCCCTGCCCC CATCGAGAAA
 TTACCGTTCC TCAAGTTTAC GTCCCAGTTG TCACGTCGAA AGGGACGGGG GTAGCTCTTT

mIgG1

~~~~~  
 T I S K T K G R P K A P Q V C T I P P P  
 6601 ACCATCTCCA AAACCAAAGG CAGACCGAAG GCTCCACAGG TGTGCACCAT TCCACCTCCC  
 TGGTAGAGGT TTTGGTTTCC GTCTGGCTTC CGAGGTGTCC ACACGTGGTA AGGTGGAGGG

## mIgG1

~~~~~  
 K E Q M A K D K V S L T C M I T D F F P
 6661 AAGGAGCAGA TGGCCAAGGA TAAAGTCAGT CTGACCTGCA TGATAACAGA CTTCTTCCT
 TTCTCTGCTT ACCGGTTCCT ATTTTCAGTCA GACTGGACGT ACTATTGTCT GAAGAAGGGA

mIgG1

~~~~~  
 E D I T V E W Q W N G Q P A E N Y K N T  
 6721 GAAGACATTA CTGTGGAGTG GCAGTGAAT GGGCAGCCAG CGGAGAACTA CAAGAACACT  
 CTTCTGTAAT GACACCTCAC CGTCACCTTA CCCGTCGGTC GCCTCTTGAT GTTCTTGTA

## mIgG1

~~~~~  
 Q P I M D T D G S Y F V Y S K L N V Q K
 6781 CAGCCCATCA TGGACACAGA TGGCTCTTAC TTCGTCTACA GCAAGTCAA TGTGCAGAAG
 GTCGGGTAGT ACCTGTGTCT ACCGAGAATG AAGCAGATGT CGTTCGAGTT ACACGTCTTC

mIgG1

~~~~~  
 S N W E A G N T F T C S V L H E G L H N  
 6841 AGCAACTGGG AGGCAGGAAA TACTTTCACC TGCTCTGTGT TACATGAGGG CCTGCACAAC  
 TCGTTGACCC TCCGTCCTTT ATGAAAGTGG ACGAGACACA ATGTACTCCC GGACGTGTTG

murine

CD4

Transmembrandomäne

## mIgG1

~~~~~  
 H H T E K S L S H S P G I V F L A C V L
 6901 CACCATACTG AGAAGAGCCT CTCCCCTCT CTTGGTATTG TGTTCTTGGC TTGCGTGCTG
 GTGGTATGAC TCTTCTCGGA GAGGGTGAGA GGACCATAAC ACAAGGACCG AACGCACGAC

murine

CD28 Signaldomäne

murine CD4 Transmembrandomäne

~~~~~  
 G G S F G F L G F L G L C I L C C V N S  
 6961 GGTGGCTCCT TCGGCTTCT GGGTTTCTT GGGCTCTGCA TCCTCTGCTG TGTCAATAGT  
 CCACCGAGGA AGCCGAAAGA CCCAAAGGAA CCCGAGACGT AGGAGACGAC ACAGTTATCA

murine CD28 Signaldomäne

~~~~~  
 R R N R L L Q S D Y M N M T P R R P G L
 7021 AGAAGGAACA GACTCCTTCA AAGTGACTAC ATGAACATGA CTCCCCGAG GCCTGGGCTC
 TCTTCTTGT CTGAGGAAGT TTCCTGATG TACTTGTACT GAGGGGCTC CGGACCCGAG

murine CD28 Signaldomäne

~~~~~

## murine CD3zeta Signaldomäne

~~~~~

7081 T R K P Y Q P Y A P A R D F A A Y R P L
 ACTCGAAAGC CTTACCAGCC CTACGCCCT GCCAGAGACT TTGCAGCGTA CCGCCCCCTG
 TGAGCTTTCG GAATGGTCGG GATGCGGGGA CCGTCTCTGA AACGTCGCAT GGCGGGGGAC
 murine CD3zeta Signaldomäne

~~~~~

7141 R A K F S R S A E T A A N L Q D P N Q L  
 AGAGCAAAAT TCAGCAGGAG TGCAGAGACT GCTGCCAACC TGCAGGACCC CAACCAGCTC  
 TCTCGTTTTA AGTCGTCCTC ACGTCTCTGA CGACGGTTGG ACGTCTCTGG GTTGGTCGAG  
 murine CD3zeta Signaldomäne

~~~~~

7201 Y N E L N L G R R E E Y D V L E K K R A
 TACAATGAGC TCAATCTAGG GCGAAGAGAG GAATATGACG TCTTGGAGAA GAAGCGGGCT
 ATGTTACTCG AGTTAGATCC CGCTTCTCTC CTTATACTGC AGAACCTCTT CTTCGCCCGA
 murine CD3zeta Signaldomäne

~~~~~

7261 R D P E M G G K Q Q R R R N P Q E G V Y  
 CGGGATCCAG AGATGGGAGG CAAACAGCAG AGGAGGAGGA ACCCCAGGA AGGCGTATAC  
 GCCCTAGGTC TCTACCCTCC GTTTGTCGTC TCCTCTCTCT TGGGGGTCTT TCCGCATATG  
 murine CD3zeta Signaldomäne

~~~~~

7321 N A L Q K D K M A E A Y S E I G T K G E
 AATGCACTGC AGAAAGACAA GATGGCAGAA GCCTACAGTG AGATCGGCAC AAAAGCGGAG
 TTACGTGACG TCTTTCTGTT CTACCGTCTT CGGATGTCAC TCTAGCCGTG TTTTCCGCTC
 murine CD3zeta Signaldomäne

~~~~~

7381 R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D  
 AGGCGGAGAG GCAAGGGGCA CGATGGCCTT TACCAGGGTC TCAGCACTGC CACCAAGGAC  
 TCCGCCTCTC CGTTCCCCGT GCTACCGGAA ATGGTCCCAG AGTCGTGACG GTGGTCTCTG  
 murine CD3zeta Signaldomäne IRES-GFP

~~~~~

AscI

~~~~~

7441 T Y D A L H M Q T L A P R G A P R P R S  
 ACCTATGATG CCCTGCATAT GCAGACCCTG GCCCCTCGCG GCGCGCCGCG GCCGCGATCA  
 TGGATACTAC GGGACGTATA CGTCTGGGAC CGGGGAGCGC CGCGCGCGCG CGGCCTAGT  
 IRES-GFP

~~~~~

7501 I R Y R S S Y S E V P I L * K V * E L P
 ATTCGGTACC GAAGTTCTTA TTCCGAAGTT CCTATTCTCT AGAAAGTATA GGAACCTCCT
 TAAGCCATGG CTTCAGGAT AAGGCTTCAA GGATAAGAGA TCTTTCATAT CCTTGAAGGA
 IRES-GFP

~~~~~

7561 R G Y P N S A P P P P L T L L A E A A W  
 CGAGGGTACC CCAATCCGC CCCCCCCCC CCCCTAACGT TACTGGCCGA AGCCGCTTGG  
 GCTCCCATGG GGTAAAGCG GGGGGGGGG GGGGATTGCA ATGACCGGCT TCGGCAACC  
 IRES-GFP

~~~~~

7621 N K A G V R L S I C Y F P P Y C R L L A
 AATAAGCCG GTGTGCGTTT GTCTATATGT TATTTCCAC CATATTGCCG TCTTTTGGCA
 TTATTCGGC CACACGCAA CAGATATACA ATAAAAGGTG GTATAACGGC AGAAAACCGT
 IRES-GFP

~~~~~

7681 M \* G P G N L A L S S \* R A F L G V F P  
 ATGTGAGGGC CCGGAAACCT GGCCCTGTCT TCTTGACGAG CATTCTAGG GGTCTTTCCC  
 TACTCTCCG GGCCTTTGGA CCGGACAGA AGAACTGCTC GTAAGGATCC CCAGAAAGGG  
 IRES-GFP

~~~~~

7741 L S P K E C K V C * M S * R K Q F L W K
 CTCTCGCAA AGGAATGCAA GGTCTGTTGA ATGTCGTGAA GGAAGCAGTT CCTCTGGAAG
 GAGAGCGGTT TCCTTACGTT CCAGACAACT TACAGCACTT CCTTCGTCAA GGAGACCTTC

IRES-GFP

~~~~~

7801 L L E D K Q R L \* R P F A G S G T P H L  
 CTTCTTGAAG ACAAACAACG TCTGTAGCGA CCCTTTGCAG GCAGCGGAAC CCCCCACCTG  
 GAAGAACTTC TGTTTTGTTG AGACATCGCT GGGAAACGTC CGTCGCCTTG GGGGTGGAC

IRES-GFP

~~~~~

7861 A T G A S A A K S H V Y K I H L Q R R H
 GCGACAGGTG CCTCTGCGGC CAAAAGCCAC GTGTATAAGA TACACCTGCA AAGGCGGCAC
 CGCTGTCCAC GGAGACGCCG GTTTTCGGTG CACATATCT ATGTGGACGT TTCCGCCGTG

IRES-GFP

~~~~~

7921 N P S A T L \* V G \* L W K E S N G S P Q  
 AACCCAGTG CCACGTTGTG AGTTGGATAG TTGTGGAAAG AGTCAAATGG CTCTCCTCAA  
 TTGGGGTCAC GGTGCAACAC TCAACCTATC AACACCTTTC TCAGTTTACC GAGAGGAGTT

IRES-GFP

~~~~~

7981 A Y S T R G * R M P R R Y P I V W D L I
 GCGTATTCAA CAAGGGGCTG AAGGATGCC AGAAGGTACC CCATTGTATG GGATCTGATC
 CGCATAAGTT GTTCCCGAC TTCCTACGGG TCTTCCATGG GGTAACATAC CCTAGACTAG

IRES-GFP

~~~~~

8041 W G L G A H A L H V F S R G \* K T S R P  
 TGGGGCCTCG GTGCACATGC TTTACATGTG TTTAGTCGAG GTTAAAAAAC GTCTAGGCCC  
 ACCCCGGAGC CACGTGTACG AAATGTACAC AAATCAGCTC CAATTTTTTG CAGATCCGGG

IRES-GFP

~~~~~

8101 P E P R G R G F P L K N T M I I W P Q P
 CCCGAACCAC GGGGACGTGG TTTTCCTTTG AAAAACACGA TGATAATATG GCCACAACCA
 GGGCTTGGTG CCCCTGCACC AAAAGGAAAC TTTTGTGCT ACTATTATAC CGGTGTGGT

IRES-GFP

~~~~~

8161 W \* A R A R S C S P G W C P S W S S W T  
 TGGTGAGCAA GGGCGAGGAG CTGTTACCG GGGTGGTGCC CATCCTGGTC GAGCTGGACG  
 ACCACTCGTT CCCGCTCCTC GACAAGTGGC CCCACCACGG GTAGGACCAG CTCGACCTGC

IRES-GFP

~~~~~

8221 A T * T A T S S A C P A R A R A M P P T
 GCGACGTAAA CGGCCACAAG TTCAGCGTGT CCGGCGAGGG CGAGGGCGAT GCCACCTACG
 CGCTGCATTT GCCGGTGTTC AAGTCGCACA GGCCGCTCCC GCTCCCGTA CGGTGGATGC

IRES-GFP

~~~~~

8281 A S \* P \* S S S A P P A S C P C P G P P  
 GCAAGCTGAC CCTGAAGTTC ATCTGCACCA CCGGCAAGCT GCCCGTCCC TGGCCACCC  
 CGTTGACTG GGACTTCAAG TAGACGTGGT GGCCGTTCGA CGGGCACGGG ACCGGGTGGG

IRES-GFP

~~~~~

8341 S * P P * P T A C S A S A A T P T T * S
 TCGTGACCAC CCTGACCTAC GCGGTGCGT GCTTCAGCCG CTACCCCGAC CACATGAAGC
 AGCACTGGTG GGACTGGATG CCGCACGTCA CGAAGTCGGC GATGGGGCTG GTGTACTTCG

IRES-GFP

~~~~~

8401 S T T S S S P P C P K A T S R S A P S S  
 AGCAGACTT CTCAAGTCC GCCATGCCG AAGGCTACGT CCAGGAGCGC ACCATCTTCT  
 TCGTGCTGAA GAAGTTCAGG CGGTACGGGC TTCCGATGCA GGTCTCGCG TGGTAGAAGA

IRES-GFP

~~~~~

8461 S R T T A T T R P A P R * S S R A T P W
 TCAAGGACGA CGGCAACTAC AAGACCCGCG CCGAGGTGAA GTTCGAGGGC GACACCCTGG
 AGTTCCTGCT GCCGTTGATG TTCTGGGCGC GGCTCCACTT CAAGTCCC GCTGTGGGACC

IRES-GFP

~~~~~

8521 \* T A S S \* R A S T S R R T A T S W G T  
 TGAACCCAT CGAGCTGAAG GGCATCGACT TCAAGGAGGA CGGCAACATC CTGGGGCACA  
 ACTTGGCGTA GCTCGACTTC CCGTAGCTGA AGTTCCTCCT GCCGTTGTAG GACCCCGTGT

IRES-GFP

~~~~~

S W S T T T T A T T S I S W P T S R R T

8581 AGCTGGAGTA CAACTACAAC AGCCACAACG TCTATATCAT GGCCGACAAG CAGAAGAACG
TCGACCTCAT GTTGATGTTG TCGGTGTTGC AGATATAGTA CCGGCTGTTC GTCTTCTTGC

IRES-GFP

~~~~~

A S R \* T S R S A T T S R T A A C S S P

8641 GCATCAAGGT GAACTTCAAG ATCCGCCACA ACATCGAGGA CGGCAGCGTG CAGCTCGCCG  
CGTAGTTCCA CTTGAAGTTC TAGGCGGTGT TGTAGTCCT GCCGTGCGAC GTCGAGCGGC

IRES-GFP

~~~~~

T T T S R T P P S A T A P C C C P T T T

8701 ACCACTACCA GCAGAACACC CCCATCGCGC ACGGCCCGT GCTGCTGCC GACAACCACT
TGGTGATGGT CGTCTTGTGG GGGTAGCCGC TGCCGGGGCA CGACGACGGG CTGTTGGTGA

IRES-GFP

~~~~~

T \* A P S P P \* A K T P T R S A I T W S

8761 ACCTGAGCAC CCAGTCCGCC CTGAGCAAAG ACCCCAACGA GAAGCGGAT CACATGGTCC  
TGGACTCGTG GGTCAGGCGG GACTCGTTTC TGGGGTTGCT CTTCGCGCTA GTGTACCAGG

IRES-GFP

~~~~~

C W S S * P P P G S L S A W T S C T S N

8821 TGCTGGAGTT CGTGACCGCC GCCGGGATCA CTCTCGGCAT GGACGAGCTG TACAAGTAAT
ACGACCTCAA GCACTGGCGG CGGCCCTAGT GAGAGCCGTA CCTGCTCGAC ATGTTCATTA

IRES-GFP

~~~~~

P G S G E L P T K F L F R S S Y S L E S

8881 CCGGGATCCG GAGAGCTCCC AACGAAGTTC CTATTCCGAA GTTCCTATTC TCTAGAAAGT  
GGCCCTAGGC CTCTCGAGGG TTGCTTCAAG GATAAGGCTT CAAGGATAAG AGATCTTCA

IRES-GFP

~~~~~

I G T S S R L D A A R G I H * F * S G R

8941 ATAGGAACTT CCTCGAGGTT GGATGCAGCC CGGGGGATCC ACTAGTTCTA GAGCGGCCGA
TATCCTTGAA GGAGCTCAA CCTACGTCCG GCCCCCTAGG TGATCAAGAT CTCGCCGGCT

IRES-GFP

~~~~~

S A S T V P S S C Q P S V V C P S P V P

9001 TCAGCCTCGA CTGTGCCTTC TAGTTGCCAG CCATCTGTTG TTTGCCCTC CCCCCTGCTC  
AGTCGGAGCT GACACGGAAG ATCAACGTC GGTAGACAAC AAACGGGGAG GGGGCACGGA

IRES-GFP

~~~~~

S L T L E G A T P T V L S * * N E E I A

9061 TCCTTGACCC TGGAAGGTGC CACTCCCACT GTCCTTTCCT AATAAAATGA GGAAATGCA
AGGAACTGGG ACCTTCCACG GTGAGGTGA CAGGAAAGGA TTATTTTACT CCTTTAACGT

IRES-GFP

~~~~~

S H C L S R C H S I L G G G V G Q D S K

9121 TCGCATTGTC TGAGTAGGTG TCATTCTATT CTGGGGGGTG GGGTGGGGCA GGACAGCAAG  
AGCGTAACAG ACTCATCCAC AGTAAGATAA GACCCCCAC CCCACCCGT CCTGTCTGTT

IRES-GFP

~~~~~

G E D W E D N S R H A G D A V G S M A S

9181 GGGGAGGATT GGGAAGACAA TAGCAGGCAT GCTGGGGATG CCGTGGGCTC TATGGCTTCT
CCCCCTCTAA CCCTTCTGTT ATCGTCCGTA CGACCCCTAC GCCACCCGAG ATACCGAAGA

IRES-GFP

~~~~~

E A E R T S W G S R S T S S S L E A R

9241 GAGCGGAAA GAACCAGCTG GGGCTCGAGA TCCACTAGTT CTAGCCTCGA GGCTAGAGC  
CTCCGCCTTT CTTGGTCGAC CCCGAGCTCT AGGTGATCAA GATCGAGCT CCGATCTCG

## Literaturverzeichnis

**Abken H, Hombach A, Heuser C, Kronfeld K, Seliger B (2002):** Tuning tumor-specific T-cell activation: a matter of costimulation? *Trends Immunol*; 23(5):240–5

**Abken H, Hombach A and Heuser C (2003):** Immune response manipulation: recombinant immunoreceptors endow T-cells with predefined specificity ; *Current Pharma Design*: 9, 639 – 652

**Alexopoulou AN, Couchman JR, Whiteford JR (2008):** The CMV early enhancer/chicken beta-actin (CAG) promoter can be used to drive transgene expression during the differentiation of murine embryonic stem cells into vascular progenitors; *BMC Cell Biol*. Jan 11; 9:2

**Baum PR, Gayle RB, Ramsdell F, Srinivasan S, Sorensen RA, Watson ML, Seldin MF, Baker E, Sutherland GR, Clifford KN (1994):** Molecular characterization of murine and human OX40/OX40 ligand systems: identification of a human OX40 ligand as the HTLV-1-regulated protein gp34; *EMBO J*, 13(17):3992–4001

**Beecham E J, Ma Q, Ripley R, and Junghans RP (2000):** Coupling CD28 costimulation to immunoglobulin T-cell receptor molecules: the dynamics of T-cell proliferation and death. *Journal of Immunotherapy* (Hagerstown, Md.: 1997) 23, no. 6 (December): 631-642

**Berry LJ, Moeller M, Darcy PK (2009):** Adoptive immunotherapy for cancer: the next generation of gene-engineered immune cells; *Tissue Antigens*. Oct; 74(4):277-89

**Brocker T, Peter A, Traunecker A, Karjalainen K (1993):** New simplified molecular design for functional T cell receptor; *Eur J Immunol*. Jul; 23(7):1435-9

**Brocker T, Karjalainen K (1995):** Signals through T cell receptor-zeta chain alone are insufficient to prime resting T lymphocytes; *J Exp Med*. May 1;181(5):1653-9

**Brocker T (2000):** Chimeric Fv-zeta or Fv-epsilon receptors are not sufficient to induce activation or cytokine production in peripheral T cells; *Blood*; Sep 1;96(5):1999-2001

**Carpenito C, Milone MC, Hassan R, Simonet JC, Lakhai M, Suhoski MM, Varela-Rohena A, Haines KM, Heitjan DF, Albelda SM, Carroll RG, Riley J, Pastan I, June CH (2009):** Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains; *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(9):3360–3365

---

**Cartellieri M, Bachmann M, Feldmann A, Bippes C, Stamova S, Wehner R, Temme A, Schmitz M (2010):** Chimeric antigen receptor-engineered T cells for immunotherapy of cancer; *J Biomed Biotechnol.*;2010:95630

**Chames P, Willemsen RA, Rojas G, Dieckmann D, Rem L, Schuler G, Bolhuis RL and Hoogenboom HR (2002):** TCR-like human antibodies expressed on human CTLs mediate antibody affinity-dependent cytolytic activity. *J Immunol.*: 169, 1110 – 1118

**Chmielewski M, Hombach A, Heuser C, Adams GP, Abken H (2004):** T cell activation by antibody-like immunoreceptors: increase in affinity of the single-chain fragment domain above threshold does not increase T cell activation against antigen-positive target cells but decreases selectivity; *J Immunol.*;173(12):7647-53

**Dudley ME, James CY, Richard S, Marybeth SH, Richard R, Kammula U, Robbins PF, et al. (2008):** Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26, no. 32: 5233-5239

**Eades-Perner AM, van der Putten H, Hirth A, Thompson J, Neumaier M, von Kleist S, Zimmermann W (1994):** Mice transgenic for the human carcinoembryonic antigen gene maintain its spatiotemporal expression pattern; *Cancer Res.* ;54(15):4169-76

**Emtage PCR., Lo ASY., Gomes EM, Liu DL, Gonzalo-Daganzo RM, Junghans RP (2008):** Second-generation anti-carcinoembryonic antigen designer T cells resist activation-induced cell death, proliferate on tumor contact, secrete cytokines, and exhibit superior antitumor activity in vivo: a preclinical evaluation; *Clin Cancer Res*, 14(24):8112–8122

**Elinav E, Waks T, Eshhar Z (2008):** Redirection of regulatory T cells with predetermined specificity for the treatment of experimental colitis in mice; *Gastroenterology: Jun*;134(7):2014-24

**Elinav E, Adam N, Waks T, Eshhar Z (2009):** Amelioration of colitis by genetically engineered murine regulatory T cells redirected by antigen-specific chimeric receptor; *Gastroenterology: May*;136(5):1721-3

**Eshhar Z, Waks T, Gross G, Schindler DG (1993):** Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the  $\gamma$  or  $\zeta$  subunits of the immunoglobulin and T cell receptors; *Proc Natl Acad Sci*: 720 – 725

- Eshhar Z, Waks T, Bendavid A, Schindler DG (2001):** Functional expression of chimeric receptor genes in human T cells; *J Immunological Methods*: 248, 67 – 76
- Eshhar Z (2008):** The T-body approach: redirecting T cells with antibody specificity; *Handb Exp Pharmacol*, (181):329–42,
- Eshhar Z (2010):** Adoptive cancer immunotherapy using genetically engineered designer T-cells: First steps into the clinic; *Curr Opin Mol Ther*. Feb;12(1):55-63
- Friedmann-Morvinski D, Bendavid A, Waks T, Schindler D, Eshhar Z (2005):** Redirected primary T cells harboring a chimeric receptor require costimulation for their antigen-specific activation; *Blood* Apr 15;105(8):3087-93
- Gattinoni L, Powell DJ Jr, Rosenberg SA, Restifo NP (2006):** Adoptive immunotherapy for cancer: building on success; *Nat Rev Immunol*. May; 6(5):383-93. Review
- Gramaglia I, Weinberg AD, Lemon M, Croft M (1998):** Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. *J Immunol*, 161(12):6510–6517,.
- Greenfield EA, Nguyen KA, Kuchroo VK (1998):** CD28/B7 costimulation: a review; *Crit Rev Immunol*:18, 389 – 318
- Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2005):** The B7 family revisited; *Annu Rev Immunol*, 23:515–548
- Haynes NM, Trapani JA, Teng MWL, Jackson JT, Cerruti L, Jane SM, Kershaw MH, Smyth MJ and Darcy PK (2002):** Single chain antigen recognition receptors that costimulate potent rejection of established experimental tumors; *Gene Therapy*: 100, 3155 – 3163
- Heuser C, Hombach A, Lösch C, Manista K, and Abken H (2003):** T-cell activation by recombinant immunoreceptors: impact of the intracellular signalling domain on the stability of receptor expression and antigenspecific activation of grafted T cells; *Gene Therapy* 10, no. 17 (August): 1408-1419
- Hombach A, Sircar R, Heuser C, Tillmann T, Diehl V, Kruis W, Pohl C and Abken H (1998):** Chimeric anti-TAG72 receptors with immunoglobulin constant Fc domain and  $\gamma$  or  $\zeta$  signalling chains; *Int J Mol Med*: 2, 99 – 103

**Hombach A, Schneider C, Sent, D, Koch D, Willemsen RA, Diehl V, Kruis W, Bolhuis RL, Pohl C and Abken H (2000):** An entirely humanized CD3  $\zeta$ -chain signalling receptor that directs peripheral blood T cells to specific lysis of carcinoembryonic Antigen-positiv tumor cells; *Int J Cancer*: 88, 115 – 120 (2000)

**Hombach A, Heuser C, Marquardt T, Groneck V Pohl C and Abken H (2001a):** CD4+ T cells engrafted with a recombinant immunoreceptor efficiently lyse target cells in a MHC- and Fas-independent fashion; *J Immunol*: 167, 1090 – 1096

**Hombach A, Sent D, Schneider C, Heuser C, Koch D, Pohl C, Seliger B and Abken H (2001b):** T cell activation by recombinant receptors. CD28 costimulation is required for Interleukin 2 secretion and receptor-mediated T cell proliferation but does not affect receptor mediated target cell lysis; *Cancer Res*: 61, 1976 – 1982

**Hombach A, Wiczarkowicz A, Marquardt T, Heuser C, Usai L, Pohl C, B. Seliger and H. Abken (2001c):** 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 $\zeta$  signalling receptor molecule; *Journal of Immunology*: 167, 6123 – 6131

**Irion S, Luche H, Gadue P, Fehling HJ, Kennedy M, Keller G (2007):** Identification and targeting of the ROSA26 locus in human embryonic stem cells; *Nat Biotechnol*. Dec;25(12):1477-82

**Kershaw, Michael H, Jennifer A Westwood, Linda L Parker, Gang Wang, Zelig Eshhar, Sharon A Mavroukakis, Donald E White, et al. (2006):** A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clinical Cancer Research; An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 12, no. 20 (October 15): 6106-6115

**Kim JE, White FM (2006):** Quantitative analysis of phosphotyrosine signaling networks triggered by CD3 and CD28 costimulation in Jurkat cells; *J Immunol*. 2006 Mar 1;176(5):2833-43

**Koehler H, Kofler D, Hombach A, Abken H (2007):** CD28 costimulation overcomes transforming growth factor-beta-mediated repression of proliferation of redirected human CD4+ and CD8+ T cells in an antitumor cell attack; *Cancer Research* 67, no. 5 (March 1): 2265-2273

- Kruschinski A, Moosmann A, Poschke I, Norell H, Chmielewski M, Seliger B, Kiessling R, Blankenstein T, Abken H, Charo J (2008):** Engineering antigen-specific primary human NK cells against HER-2 positive carcinomas; *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 11;105(45):17481-6
- Lee PP, Fitzpatrick DR, Beard C, Jessup HK, Lehar S, Makar KW, Pérez-Melgosa M, Sweetser MT, Schlissel MS, Nguyen S, Cherry SR, Tsai JH, Tucker SM, Weaver WM, Kelso A, Jaenisch R, Wilson CB (2001):** A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival; *Immunity*. Nov;15(5):763-74
- Maxwell JR, Weinberg A, Prell RA, Vella AT (2000):** Danger and OX40 receptor signaling synergize to enhance memory T cell survival by inhibiting peripheral deletion; *J Immunol*, 164(1):107–112
- Moeller M, Haynes NM, Trapani JA, Teng MW, Jackson JT, Tanner JE, Cerutti L, Jane SM, Kershaw MH, Smyth MJ, Darcy PK (2004):** A functional role for CD28 costimulation in tumor recognition by single-chain receptor-modified T cells; *Cancer Gene Ther*. May;11(5):371-9
- Moritz D and Groner B (1995):** A spacer region between the single chain antibody- and the CD3 zeta-chain domain of chimeric T cell receptor components is required for efficient Ligand binding and signalling activity; *Gene Therapy*: 2, 539 – 546
- Nagy A (2000):** Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring; *Genesis*, 26,99-109
- Nagy A (2001):** Published Cre-transgenic-lines. <http://www.mshri.on.ca/nagy/Cre-pub.html>
- Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J (1991):** Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector; *Gene*. Dec 15;108(2):193-9
- Nyabi O, Naessens M, Haigh K, Gembarska A, Goossens S, Maetens M, De Clercq S, Drogat B, Haenebalcke L, Bartunkova S, De Vos I, De Craene B, Karimi M, Berx G, Nagy A, Hilson P, Marine JC, Haigh JJ (2009):** Efficient mouse transgenesis using Gateway-compatible ROSA26 locus targeting vectors and F1 hybrid ES cells. *Nucleic Acids Res*. Apr;37(7):e55

**Park, JR, Digiusto, DL, Slovak M, Wright C, Naranjo A, Wagner J, Meechoovet HB, Bautista C, Chang WC, Ostberg JR., Jensen MC (2007):** Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. *Mol Ther*, 15(4):825–833

**Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S and Ullrich A (2001):** The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification; *Endocr. Relat. Cancer*: 8, 11 –31

**Pule M, Finney H, Lawson A (2003):** Artificial T-cell receptors. *Cytotherapy*. ;5(3):211-26. Review

**Raab M, Cai YC, Bunnell SC, Heyeck SD, Berg LJ, Rudd CE (1995):** p56Lck and p59Fyn regulate CD28 binding to phosphatidylinositol 3-kinase, growth factor receptor-bound protein GRB-2, and T cell-specific protein-tyrosine kinase ITK: implications for T-cell costimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Sep 12;92(19):8891-5

**Radvanyi LG, Shi Y, Vaziri H, Sharma A, Dhala R, Mills GB and Miller RG (1996):** CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response; *J. Immunol*: 156, 1788

**Rogers PR, Song J, Gramaglia I, Killeen N, Croft M (2001):** OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells; *Immunity*, 15(3):445–455

**Sadelain M, Rivière I and Brentjens R (1999):** Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes; *Nature Review*: 20, 170 – 175

**Sadelain M, Rivière I, Brentjens R (2003):** Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes; *Nat Rev Cancer*. Jan;3(1):35-45

**Sadelain M, Brentjens R, Rivière I (2009):** The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr Opin Immunol*. Apr;21(2):215-23

**Saha A, Chatterjee SK, Foon KA, Bhattacharya-Chatterjee M (2006):** Anti-idiotypic antibody induced cellular immunity in mice transgenic for human carcinoembryonic antigen. *Immunology*. Aug;118(4):483-96

**Sanger F, Coulson. AR (1975):** A rapid method for determining sequences in DNS by primed synthesis with DNS polymerises; *J Mol Biol*: 94, 441 – 448



---

**Sambrook J., Russel K and Maniatis T (2001):** „Molecular Cloning“, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3. Aufl., 2001, New York

**Seliger B, Maeurer MJ and Ferrone S (2000):** Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth; *Immunol Today*: 21, 455 – 464

**Soriano P (1999):** Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain; *Nat Genet*, 21, 70-71

**Tai X, Cowan M, Feigenbaum L, Singer A. (2005):** CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2; *Nat Immunol.* Feb;6(2):152-62

**Takeda I, Ine S, Killeen N, Ndhlovu LC, Murata K, Satomi S, Sugamura K and Ishii N (2004):** Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells; *J.Immunol.* 172:3580-3589

**Till BG, Jensen MC, Wang J, Chen EY, Wood BL, Greisman HA, Qian X, James SE, Raubitschek A, Forman SJ, Gopal AK, Pagel JM, Lindgren CG, Greenberg PD, Riddell SR, Press OW (2008):** Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells; *Blood*, 112(6):2261–2271

**Thomas K R. and MR Capecchi (1987):** Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells; *Cell* 51:503-512

**Tsang KY, Zaremba S, Nieroda CA, Zhu MZ, Hamilton JM and Schlom J (1995):** Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine; *J Natl Cancer Inst*: 87, 982 – 990

**Wang J, Jensen M, Lin Y, Sui X, Chen E, Lindgren CG, Till B, Raubitschek A, Forman SJ, Qian X, James S, Greenberg P, Riddell S, Press OW (2007):** Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains; *Hum Gene Ther*, 18(8):712–725

**Weijtens MEM, Willemsen RA, Hart EH and Bolhuis RLH (1998a):** A retroviral vector system 'STITCH' in combination with an optimised single chain antibody chimeric receptor gene structure allows efficient gene transduction and expression in human T lymphocytes; *Gene Therapy*: 5, 1195 – 1203

**Weijtens MEM, Willemsen RA, van Krimpenand BA, Bolhuis RLH (1998b):** Chimeric scFv/ $\gamma$  receptor-mediated T-cell lysis of tumor cells is coregulated by adhesion and accessory molecules; *Int J Cancer*: 77, 181 – 187

**Wilmans W, Huhn D and Wilms K (2000):** *Internistische Onkologie*, Thieme Verlag, Stuttgart: 71 – 93

**Zambrowicz BP, Imamoto A, Fiering S, Herzenberg LA, Kerr WG and Soriano P. (1997):** Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells; *Proc Nat Acad Sci USA*, 94, 3789-3794

## Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Professor Dr. Hinrich Abken herzlich bedanken, der mich mit dem Projekt dieser Dissertation betraut hat und die Arbeit durch Anregungen und Diskussionen förderte. Er hatte immer ein offenes Ohr und stand mir mit großer Hilfsbereitschaft zur Seite. Zudem möchte ich mich bei ihm für die kritische Durchsicht des Manuskripts und die Erstellung des Gutachtens bedanken.

Herrn Professor Dr. Jens Brüning gilt mein Dank für seine unkomplizierte Unterstützung meines Promotionsverfahrens in der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Uni Köln. Auch ihm möchte ich für die Begutachtung der Arbeit danken.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Günter Plickert dafür bedanken, dass er bereitwillig den Vorsitz meiner Disputation übernommen hat.

Bei den Mitgliedern der AG Tumorgenetik möchte ich mich für das freundschaftliche Arbeitsklima, die große Hilfsbereitschaft und das Vertrauen, das in mich gesetzt wurde, bedanken. Ich werde euch vermissen! Insbesondere erwähnen möchte ich Nicole Hoffmann, vielen Dank für alle Maus-Versuche, Dr. Markus Chmielewski, Dr. Patrick Schmidt, für ihre hilfreichen Ratschläge und die kritischen Auseinandersetzungen.

Ein großer Dank gilt meinem Mann, der mich sehr unterstützt hat. Meinem Sohn danke ich für die Beschleunigung und die Motivation beim Zusammenschreiben.

# Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat, dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Jens Brüning und Prof. Dr. Hinrich Abken betreut worden.

Köln, den 09. Februar 2011

---

Olga Hahn

# Lebenslauf

|                     |                                      |
|---------------------|--------------------------------------|
| Name                | Olga (Volha) Hahn (geb. Makhnatkina) |
| Geburtsdatum/ -ort  | 08.04.1978 in Minsk, Weissrussland   |
| Staatsangehörigkeit | weissrussisch                        |
| Familienstand       | verheiratet                          |
| Adresse             | Bachemer Str. 82, 50931 Köln         |
| e-mail              | volhamara@web.de                     |
| Telefon             | (0221) 2933269                       |

## Schulbildung und Hochschulbildung

|            |                                                                                                                                                             |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1985-1995  | Mittelschulen № 156 und 51, Minsk , Weissrussland                                                                                                           |
| 1995- 2000 | Biologiestudium an der Weissrussischen Staatsuniversität, Minsk, Weissrussland. Abschluss: Diplom Biologie, Biologie- und Chemie-Lehrerin. Gesamtnote -gut- |

## Berufliche Tätigkeiten

|           |                                                            |
|-----------|------------------------------------------------------------|
| 2000-2001 | Chemielehrerin in Mittelschule № 180, Minsk, Weissrussland |
| 2001-2002 | Au-pair, Friesland und Köln, Deutschland                   |

## Akademische Ausbildung

|            |                                                                                                                                                                                                 |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2002- 2003 | Deutschkurs an der Universität zu Köln<br>Abschluss: DSH-Prüfung. Gesamtnote -sehr gut-                                                                                                         |
| 2003-2007  | Biologiestudium an der Universität zu Köln<br>Hauptfach: Genetik; Nebenfächer: Biochemie, Organische Chemie. Abschluss: Diplom Biologie. Gesamtnote -gut-                                       |
| 2007-2011  | Promotion an der Universität zu Köln, Institut für Genetik, externe Doktorarbeit im Labor für Tumorgenetik und Zellbiologie bei Prof. Dr. H. Abken, Klinik I für Innere Medizin, Uniklinik Köln |

Köln, 10. Februar 2011

---

Olga Hahn

