

**Rekombinante Immunrezeptoren
als Biosensoren und signalabhängige Produzenten
heterologer Produkte**

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

vorgelegt von
Caroline Kopecky aus Köln
Köln, April 2008

Berichterstatter: Prof. Dr. Jens Brüning
Prof. Dr. Hinrich Abken
Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Günter Schwarz

Tag der Disputation 25. Juni 2008

Abstract

The majority of cancer deaths is due to the dissemination of tumor cells and subsequent formation of metastatic lesions. The detection of circulating tumor cells is therefore expected to be a powerful tool in the evaluation of cancer prognosis. Current strategies for detecting and isolating disseminated tumor cells are technically limited and still suffer from very low sensitivity and specificity, which is in part due to high serum concentrations of tumor-associated antigens (TAAs). Here, we developed a cellular biosensor that selectively targets membrane-bound carcinoembryonic antigen (CEA) of colorectal cancer in the presence of the soluble CEA. The signaling device of the sensor is a recombinant immunoreceptor, which is modularly composed of an extracellular single chain antibody fragment (scFv) for binding and an intracellular CD3 ζ signaling domain. The receptor is expressed in genetically modified Jurkat T-cells, equipped with an intracellular NFAT-luciferase indicator, which enables the biosensor to generate a light signal after antigen-specific crosslinking of the immunoreceptor on the cell surface. The biosensor with specificity for CEA was activated upon binding of CEA coated on sepharose beads while ignoring high levels of soluble antigen. This demonstrates the feasibility of the biosensor for specific detection of membrane-bound CEA in the presence of high serum concentrations of CEA as found in cancer patients during progression of the disease. By using the fluorescent Ca²⁺-sensitive Cameleon protein as reporter, the biosensor acts in nearly real time. While these biosensors detect corpuscular CEA, soluble CEA is detected by a combined costimulatory CD28-CD3 ζ signalling domain. Taken together the biosensor provides a versatile system to detect circulating tumor cells in a fast, highly specific and sensitive fashion by clearly discriminating corpuscular versus soluble antigen.

We moreover adopted the biosensor concept to an immunotherapeutic approach to induce the production of the immune stimulatory cytokine IL-12 in human T-lymphocytes upon specific binding to CEA⁺ tumor cells. NFAT-triggered IL-12 and the CEA-specific immunoreceptor were coexpressed in T-cells which secrete IL-12 upon receptor binding to CEA. Moreover, the secretion of IFN- γ and cytotoxicity of CEA⁺ tumor cells is increased compared to T cells with anti-CEA receptors only. Recombinant immunoreceptor triggered secretion of a heterologous protein thereby provides a strategy for the concentration of an immunotherapeutic adjuvans specifically at the tumor site, while preventing systemic toxicity.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	I
1 Einleitung	1
1.1 Tumorzellen metastasieren frühzeitig über die Blutbahn	1
1.2 Tumorassoziierte Antigene (TAA) und Tumor <i>escape</i>	3
1.2.1 Tumorassoziierte Antigene gastrointestilaler Tumore: CEA und TAG72	4
1.2.2 Tumorassoziierte Antigene bei Morbus Hodgkin: CD30 Antigen	5
1.3 Behandlung von malignen Tumoren mit Hilfe der adoptiven Immuntherapie . .	6
1.3.1 Rekombinante Immunrezeptoren	7
1.4 Molekulare Mechanismen der T-Zellaktivierung	9
1.4.1 T-Zellaktivierung durch rekombinante Immunrezeptoren	12
1.4.2 Steigerung der rezeptorvermittelten T-Zellaktivierung durch IL-12 . . .	13
1.5 Zielsetzung	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	16
2.1.2 Geräte, Apparaturen und Zubehör	16
2.1.3 Enzyme und Reaktionskits	17
2.1.4 Lösungen, Medien und Puffer	18
2.1.5 Bakterienstämme	18
2.1.6 Zelllinien und primäre Zellen	19
2.1.7 Plasmide	20
2.1.8 Synthetische Oligonukleotide	21
2.1.9 Antikörper und Antikörpercocktails	23
2.1.10 Sonstige Proteine	25
2.2 Bakterienkultur	26
2.2.1 Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> DH5 α Bakterien	26
2.2.2 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> DH5 α Bakterien	26
2.2.3 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> DH5 α Bakterien	27
2.3 Isolierung von Plasmid DNA aus <i>Escherichia coli</i>	27
2.3.1 Schnellpräparation von Plasmid DNA nach der Koch-(boiling) Methode	27
2.3.2 Midi-Präparation von Plasmid DNA durch Bindung an eine Anionen-	
austauscher-Säule	28
2.4 Agarosegelelektrophorese von DNA	28
2.5 Präzipitation, Reinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA	29
2.5.1 DNA-Präzipitation mit Ethanol	29
2.5.2 Reinigung von DNA-Fragmenten mittels präparativer Agarosegelelek-	
trophorese	29
2.5.3 DNA-Konzentrationsbestimmung	29
2.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	30

2.6.1	PCR Amplifikation von DNA Fragmenten	30
2.6.2	SOE-PCR	30
2.6.3	„Site-directed“ Mutagenese-PCR	31
2.6.4	Identifikation rekombinanter Bakterienklone mittels Kolonie-PCR . . .	31
2.6.5	DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode	32
2.7	Enzymkatalysierte Modifikation von DNA	32
2.7.1	DNA-Restriktion	32
2.7.2	Ligation restringierter DNA	33
2.7.3	5'-Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	33
2.8	Zellkultur	33
2.8.1	Allgemeine Kulturbedingungen	33
2.8.2	Kryokonservierung von Zellen	34
2.8.3	Passage adhärenter Zellen durch Trypsinierung	34
2.8.4	Transfektion von 293T-Zellen mittels Lipofektion	34
2.8.5	Elektrotransfektion von Jurkat-Zellen	35
2.8.6	Selektion stabil transfizierter Zellen durch limitierende Verdünnungsreihen	35
2.8.7	Lymphozytenseparation mittels Dichtezentrifugation	36
2.8.8	Magnetische Zellsortierung (MACS) humaner CD3 ⁺ T-Lymphozyten .	37
2.8.9	Retrovirale Transduktion von humanen T-Lymphozyten und Jurkat Zellen	37
2.8.10	Stimulation humaner T-Lymphozyten und Jurkat Zellen durch oberflächengebundene Antikörper	38
2.8.11	BrdU-Proliferationstest	38
2.8.12	Stimulation humaner T-Lymphozyten und Jurkat Zellen durch Kokultivierung mit Antigen-positiven Tumorzellen	39
2.8.13	XTT basierter Viabilitätstest	39
2.9	Luciferase-Messung transfizierter Jurkat-Zellen	40
2.10	Immunfluoreszenz (FACS)-Analysen	40
2.11	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie	41
2.12	Ca ²⁺ -Messung von Jurkat-Cameleon Zellen	42
2.13	Proteinchemische Methoden	43
2.13.1	Beschichtung von Deckgläschen mit Poly-D-Lysin	43
2.13.2	Kopplung von Antikörpern an NHS-aktivierte Sepharose	43
2.13.3	Reinigung und Konzentration von Antikörpern und Proteinen aus Zellkulturüberständen	43
2.13.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen	44
2.13.5	„Enzyme-Linked-Immuno s orbend- A ssay“ (ELISA)	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Insertion von Green Fluorescent Protein (GFP) in rekombinante Immunrezeptoren	46
3.1.1	Generierung von anti-TAG72 Rezeptoren mit eGFP	46
3.1.2	Expression von anti-TAG72-eGFP Immunrezeptoren in 293T-Zellen . .	49
3.1.3	Generierung von anti-CEA Rezeptoren mit terminalem eGFP	50
3.1.4	Expression von anti-CEA-eGFP Immunrezeptoren in 293T-Zellen . . .	53
3.2	Funktionalitätsanalyse der rekombinanten Immunrezeptoren mit fusioniertem GFP	54

3.2.1	Expression von anti-TAG72-eGFP und anti-CEA-eGFP Immunrezeptoren in humanen T-Lymphozyten	54
3.2.2	Analyse der Funktion von CD3 ⁺ T-Zellen mit GFP-Fusionsrezeptor nach Antigenbindung	55
3.3	Visualisierung der Interaktion membrangebundener GFP-Fusionsrezeptoren auf der Oberfläche von CD3 ⁺ T-Zellen nach Antigenbindung	60
3.3.1	Clusterbildung von anti-CEA-eGFP Rezeptoren auf der Oberfläche von CD3 ⁺ T-Zellen durch Antigenbindung	60
3.3.2	Aggregation von anti-CEA-eGFP Rezeptoren auf der Oberfläche von CD3 ⁺ T-Zellen nach Koinkubation mit Tumorzellen	62
3.4	Charakterisierung der humanen T-Zelllinie Jurkat und von Reportergenen für den Einsatz in einem T-Zell-basierten Biosensor	65
3.4.1	Charakterisierung der humanen T-Zelllinie Jurkat als Indikatorzelle	65
3.4.2	Generierung von Jurkat-Indikatorzellen mit Reportergenen	66
3.4.3	Generierung eines stabilen Jurkat Zellklons mit NFAT-Luciferase Reporter gen	69
3.5	Funktionelle Charakterisierung des zellulären Biosensors zur Indikation von Carcinoembryonalem Antigen (CEA)	71
3.5.1	Generierung des zellulären CEA-Biosensors durch Expression des rekombinanten anti-CEA Immunrezeptors in Jurkat879 Zellen	71
3.5.2	Aktivierung des CEA-Biosensors Jurkat879 durch immobilisiertes Antigen	73
3.5.3	Aktivierung des CEA-Biosensors Jurkat879 durch quervernetztes, lösliches Antigen	73
3.5.4	Aktivierung des CEA-Biosensors Jurkat879 durch Antigen-positive Tumorzellen	75
3.5.5	Aktivierung des Biosensors Jurkat879 durch lösliches Antigen mit CD28-CD3zeta Immunrezeptoren	77
3.6	Aktivierung des Biosensors durch Quervernetzung des CD3zeta Immunrezeptors in Gegenwart von löslichem Antigen	80
3.6.1	Funktionsanalyse von anti-idiotyp Antikörper gekoppelter Sepharose	80
3.6.2	Generierung von Jurkat879 Biosensorzellen mit stabiler Expression von Immunrezeptoren	82
3.6.3	Aktivierung des Biosensors Jurkat879 durch korpuskuläres Antigen in Gegenwart von löslichem Antigen.	83
3.7	Modifikation des zellulären Biosensors für ein zeitnahes Signal mit Hilfe des Ca ²⁺ -sensitiven Cameleon-Proteins YC3.60	86
3.7.1	Generierung eines stabilen Jurkat Zellklons mit Cameleon-Protein YC-3.60	87
3.7.2	Generierung von Jurkat-Cameleon Zellen mit stabiler Expression von Immunrezeptoren	87
3.7.3	Aktivierung des Ca ²⁺ -basierten Biosensors durch immobilisiertes Antigen	89
3.7.4	Aktivierung des Ca ²⁺ -basierten CEA-Biosensors durch quervernetztes, lösliches Antigen	91
3.7.5	Zeitabhängiges Sensorsignal der Ca ²⁺ -sensitiven CEA-Biosensorzellen	93

3.8	Generierung von <u>selbst-inaktivierenden</u> retroviralen Vektoren (SIN) mit NFAT-Minimalpromotor	96
3.8.1	Generierung von konstitutiven SIN-Vektoren mit GFP und murinem IL-12	96
3.8.2	Generierung von NFAT-induzierbaren SIN-Vektoren mit murinem IL-12	97
3.8.3	Expression der konstitutiven und induzierbaren SIN-Vektorkonstrukte in 293T Zellen	98
3.8.4	Funktionsanalyse der bicistronischen Expressionscassette GFP-IRES-Neo des Plasmids pQCXIN-eGFP in CD3 ⁺ T-Zellen	99
3.9	Rezeptorinduzierte Sekretion von IL-12 in T-Lymphozyten mit Koexpression von anti-CEA Immunrezeptor und NFAT-mIL-12	101
3.9.1	Induktion der IL-12 Sekretion durch Stimulation mit immobilisierten Antikörpern	101
3.9.2	Steigerung der T-Zellantwort bei Kokultivierung mit Antigen-positiven Tumorzellen	103
4	Diskussion	107
	Zusammenfassung	117
5	Anhang	118
5.1	DNA- und Aminosäuresequenz der rekombinanten GFP-Fusionsrezeptoren mit Spezifität für TAG72	118
5.1.1	#849: pBullet-L κ -CC49scFv-Fc-zeta-eGFP	118
5.1.2	#850: pBullet-L κ -CC49scFv-Fc-CD4TM/zetaIZ-eGFP	121
5.1.3	#851: pBullet-L κ -CC49scFv-Fc-CD4TM/eGFP-zetaIZ	125
5.2	DNA- und Aminosäuresequenz der rekombinanten GFP-Fusionsrezeptoren mit Spezifität für CEA	128
5.2.1	#915: pButtet-L κ -BW431/26scFv-Fc-zeta-eGFP	128
5.2.2	#916: pBullet-L κ -BW431/26scFv-Fc-CD4TM/zetaIZ-eGFP	131
5.3	DNA- und Aminosäuresequenz der bicistronischen SIN-Vektoren für GFP-IRES-Neo (#991) und mIL-12-IRES-Neo (#1018)	134
5.3.1	#991: pQCXIN-eGFP	135
5.3.2	#1018: pQCXIN-mIL-12	137
5.4	DNA-Sequenz der NFAT-Minimalpromotorregion NFAT6 und NFAT4 der bicistronischen mIL-12-IRES-Neo Vektoren #1027 und #1028	140
5.4.1	#1027: pSIN-NFAT6-mIL-12	141
5.4.2	#1028: pSIN-NFAT4-mIL-12	141
6	Abkürzungsverzeichnis	142
	Literaturverzeichnis	156
	Danksagung	157
	Erklärung	158
	Lebenslauf	159

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schritte der Metastasierung	2
1.2	Konstruktion eines rekombinanten Immunrezeptors	8
1.3	Signaltransduktion in T-Zellen	11
3.1	Expressions-cassetten der anti-TAG72 und anti-CEA Rezeptoren und den generierten Derivaten mit intrazellulär fusioniertem GFP	46
3.2	Klonierungsschema der anti-TAG72 Rezeptoren #849, #850 mit terminalem eGFP	48
3.3	Klonierungsschema des anti-TAG72 Rezeptors #851 mit intramolekularem eGFP	49
3.4	FACS-Analysen und LSM-Aufnahmen zum Nachweis der Expression der anti-TAG72-GFP Rezeptoren #849, #850 und #851 in transfizierten 293T Zellen	51
3.5	Klonierungsschema der anti-CEA Rezeptoren #915, #916 mit terminalem eGFP	52
3.6	FACS-Analysen zum Nachweis der Expression der anti-CEA Rezeptoren #915 und #916 mit GFP auf der Oberfläche transfizierter 293T Zellen	53
3.7	FACS-Analysen zum Nachweis der Expression der anti-TAG72 und anti-CEA Rezeptoren mit GFP auf der Oberfläche von T-Lymphozyten	55
3.8	Proliferation und IFN- γ Sekretion von CD3 ⁺ T-Zellen mit rekombinanten anti-TAG72 Immunrezeptoren nach Antigenbindung	56
3.9	Aktivierung von CD3 ⁺ T-Zellen mit anti-TAG72-eGFP Rezeptoren bei Kokultivierung mit Antigen-positiven Tumorzellen	57
3.10	Aktivierung von CD3 ⁺ T-Zellen mit anti-CEA-eGFP Rezeptoren bei Kokultivierung mit Antigen-positiven Tumorzellen	58
3.11	Analyse der Clusterbildung von anti-CEA-eGFP Rezeptoren auf der Oberfläche von CD3 ⁺ T-Zellen	61
3.12	FACS-Analyse zum Nachweis der stabilen Expression von DsRed in CEA ⁺ LS174T und CEA ⁻ Colo320 Tumorzellen	63
3.13	Analyse der Rezeptoraggregation von anti-CEA-eGFP Rezeptoren auf der Oberfläche von CD3 ⁺ T-Zellen nach Kontakt mit rot fluoreszierenden CEA ⁺ LS174T Tumorzellen	64
3.14	FACS-Analyse der Expression der T-Zellrezeptormoleküle CD3 und CD28 auf der Oberfläche von Jurkat Zellen und Induktion der IL-2 Sekretion nach Stimulation durch agonistische Antikörper	66
3.15	Jurkat Zellen werden durch Quervernetzung von Immunrezeptoren aktiviert und zur Sekretion von IL-2 angeregt.	67
3.16	FACS-Analyse zum Nachweis der GFP-Expression in transfizierten Jurkat Zellen.	68
3.17	Induktion von NFAT- oder NF κ B-kontrollierten Luciferase-Reportergenen in transfizierten Jurkat Zellen nach Stimulation.	69
3.18	Generierung von Jurkat Zellen mit stabiler NFAT-Luciferase Expression	70
3.19	Schematische Darstellung des zellulären Biosensors.	71
3.20	Nachweis der Expression der anti-CEA Immunrezeptoren auf der Oberfläche von Jurkat879 Indikatorzellen und Aktivierung des Reportergens nach Kreuzvernetzung der Rezeptoren.	72

3.21	Aktivierung von Jurkat879 Zellen mit anti-CEA Immunrezeptoren als CEA-spezifischer Biosensor durch Bindung an immobilisiertes Antigen	74
3.22	Aktivierung von Jurkat879 Zellen mit anti-CEA Immunrezeptoren als CEA-spezifischer Biosensor durch quervernetztes, lösliches Antigen	75
3.23	Aktivierung von Jurkat879 Zellen mit anti-CEA Immunrezeptoren als CEA-spezifischer Biosensor durch Kokultivierung mit Antigen-positiven Tumorzellen	76
3.24	Jurkat879 Zellen mit CD28-CD3zeta Immunrezeptoren werden durch lösliches Antigen konzentrationsabhängig zur Expression von Luciferase und Sekretion von IL-2 stimuliert.	78
3.25	Reziproke Aktivierung von T-Lymphozyten mit anti-CEA und anti-CD30 CD3zeta Immunrezeptoren durch spezifische, anti-idiotyp Antikörper gekoppelte Sepharosekügelchen	81
3.26	Reziproke Aktivierung von Jurkat879 Zellen mit anti-CEA und anti-CD30 CD3zeta Immunrezeptoren durch spezifische, anti-idiotyp Antikörper gekoppelte Sepharosekügelchen	82
3.27	FACS-Analyse zum Nachweis der stabilen Expression von CD3zeta Immunrezeptoren der Spezifität CEA und CD30 auf der Oberfläche von Jurkat879 Zellen	83
3.28	Aktivierung von anti-CEA und anti-CD30 Jurkat879 Zellen auf anti-idiotypischen Sepharosekügelchen in Gegenwart von löslichem Antigen	84
3.29	Schematische Darstellung des Ca^{2+} bindenden gelb fluoreszierenden „Yellow Cameleon“ Proteins mit Emissionsspektren der Ca^{2+} -freien ($-Ca^{2+}$) und gebundenen ($+Ca^{2+}$) Form	86
3.30	FACS-Analyse von Jurkat Zellen mit stabiler Expression von YC3.60 Cameleon-Protein und Aktivierung durch PMA und Ionomycin	88
3.31	FACS-Analyse zum Nachweis der stabilen Expression der Immunrezeptoren mit Spezifität für CEA und CD30 auf der Oberfläche von Jurkat-Cameleon Zellen	89
3.32	Reziproke Aktivierung von Jurkat-Cameleon Zellen mit anti-CEA und anti-CD30 Immunrezeptoren nach Bindung an das immobilisierte Antigen	90
3.33	FACS-Analyse der Aktivierung von Jurkat-Cameleon Zellen mit anti-CEA Immunrezeptor durch quervernetztes, lösliches Antigen	92
3.34	Zeitabhängiges, oszillierendes Fluoreszenzsignal von Jurkat-Cameleon Zellen mit anti-CEA Immunrezeptor nach Aktivierung durch lösliches, quervernetztes Antigen	94
3.35	Klonierungsschema der konstitutiven, bicistronischen SIN-Vektoren #991 pQCXIN-eGFP und #1018 pQCXIN-mIL-12	97
3.36	Klonierungsschema der NFAT-induzierbaren, bicistronischen Vektoren #1027 pSIN-NFAT ₆ -mIL-12 und #1028 pSIN-NFAT ₄ -mIL-12	98
3.37	Nachweis der Expression der SIN-Vektorkonstrukte in 293T Zellen	99
3.38	FACS-Analyse zum Nachweis der Funktion der bicistronischen Expressions-cassette von pQCXIN-eGFP (#991) in CD3 ⁺ T-Zellen	100
3.39	Induktion von IL-12 in T-Lymphozyten mit NFAT-mIL-12 und koexprimiertem anti-CEA Immunrezeptor nach Stimulation mit immobilisierten Antikörpern . .	102
3.40	Einfluss der IL-12 Koexpression von anti-CEA rezeptortragenden T-Lymphozyten auf die rezeptorvermittelte IFN- γ Sekretion und spezifische Zytolyse von CEA ⁺ LS174T Tumorzellen	105

Einleitung

Die Eigenschaften eines malignen Tumors sind unbegrenzte Zellteilung (Immortalität), invasives destruktives Wachstum und die Fähigkeit, Sekundärtumore in anderen Organen zu bilden (Metastasierung). Derzeitige therapeutische Maßnahmen zur Behandlung maligner Erkrankungen beinhalten die chirurgische Entfernung des Tumors, Bestrahlung, oder zytostatische Chemotherapie. Während Primärtumore inzwischen häufig therapeutisch eliminiert werden können, bedingt bei mehr als 90 % der Tumorerkrankungen die Bildung von Sekundärtumoren den Tod des Patienten (Wittekind und Neid, 2005). Ursprung der Metastasen sind zirkulierende Tumorzellen oder Tumorzellverbände in der Blutbahn, die sich vom Primärtumor ablösen. Die Anzahl dieser disseminierten Tumorzellen korreliert mit einer schlechten Prognose (Cristofanilli *et al.*, 2004). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass sich metastasierende Tumorzellen entgegen bisheriger Annahmen bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Tumorgenese absiedeln können und eine zum Primärtumor parallele Entwicklung durchlaufen (Schmidt-Kittler *et al.*, 2003). Dabei können zirkulierende Tumorzellen der Blutbahn einer klinischen Evidenz des Primärtumors um viele Jahre vorausgehen (Kohn und Liotta, 1995). Aus diesem Grund werden zunehmend neue immuntherapeutische Konzepte verfolgt, die sich auf die Induktion einer spezifischen Immunantwort des körpereigenen Immunsystems konzentrieren, ohne gesundes Gewebe anzugreifen. Die sensitive und spezifische Identifikation hämatogen zirkulierender Tumorzellen ist dabei eine wesentliche Voraussetzung und könnte die Möglichkeiten zur Prognose, Frühdiagnose eines rezidiven Krankheitsverlaufs oder die Verlaufskontrolle nach medikamentöser Behandlung bei Krebspatienten nachhaltig verbessern.

1.1 Tumorzellen metastasieren frühzeitig über die Blutbahn

Die Entwicklung von Metastasen eines malignen Tumors basiert auf der Fähigkeit weniger Zellen, nach der Ablösung vom Primärtumor zu überleben und an einem neuen Ort weiterzuwachsen (Fidler, 1990). Die Absiedlung der Zellen kann dabei über die Lymphbahnen (lymphogen) in die Blutgefäße oder über neugebildete Kapillaren während der Angiogenese direkt in die Blutbahn (hämatogen) erfolgen (Kohn und Liotta, 1995). Die hämatogene Metastasierung ist ein sehr komplexer Prozess, der durch die Tumorzellen selbst, aber auch durch das Immunsystem und das umgebende Gewebe beeinflusst wird (Schirmacher, 2001). Dabei sind die genauen Mechanismen der Metastasierung noch nicht vollständig geklärt (Kopfstein und Christofori,

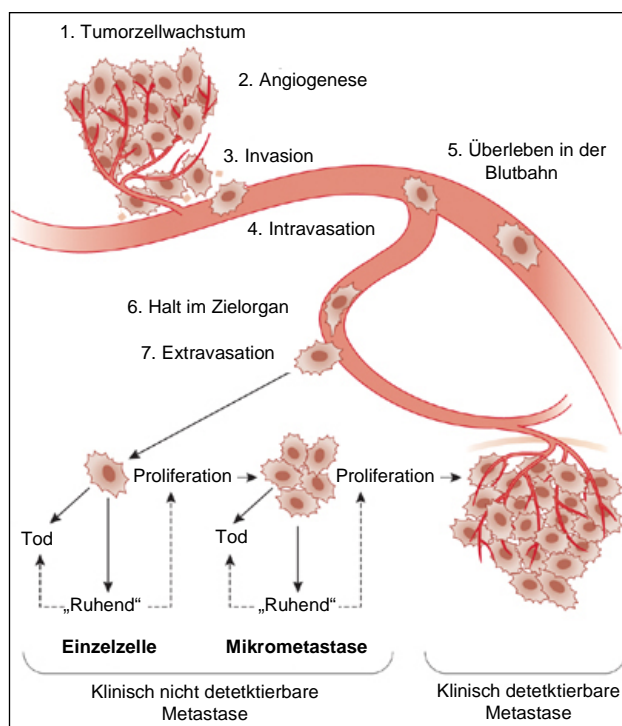


Abbildung 1.1: Schritte der Metastasierung. Abgewandelt nach Chambers *et al.*, 2002.

2006). Es lassen sich ausgehend vom Primärtumor folgende Einzelschritte unterscheiden: Zu Beginn steht die Proliferation eines oder mehrerer Zellklone am Ort der Entstehung des malignen Tumors und die Vaskularisierung des Primärtumors. Es kommt zur Invasion des umgebenden Gewebes mittels Proteolyse-, Adhäsions- und Migrationsmechanismen, so dass einzelne Tumorzellen oder Tumorzellaggregate vom Blut- oder Lymphstrom erfasst werden können und in das Gefäßsystem eintreten. Die Tumorzellen adhären über Kollagenasen und Membranrezeptoren in der Zellmembran an das Gefäßendothel des Zielorts, und integrieren nach Extravasation der Basalmembran in die Gewebematrix des neuen Wirtsgewebes. Unter den vorherrschenden Wachstumsbedingungen des Zielorgans kommt es zum Wachstum der Tumorzellen und Vaskularisierung der Metastase (Chambers *et al.*, 2002) (Abbildung 1.1).

Mit Hilfe von Modellsystemen in der Maus wurde festgestellt, dass täglich etwa 1×10^6 Tumorzellen pro Gramm eines soliden Tumors in die Blutbahn gelangen (Chang *et al.*, 2000). Die Ablösung vom epithelialen Primärtumor führt durch den Verlust des Zellkontakts in den meisten Fällen jedoch zu induzierter Apoptose der Einzelzellen. Etwa 85 % der zirkulierenden Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTC) sind innerhalb weniger Minuten intravaskulär nicht mehr nachweisbar und nur etwa 0,01 % aller im Blut zirkulierenden Krebszellen führen zu einer makrometastatischen Kolonie (Luzzi *et al.*, 1998). Die Ineffizienz der Metastasierung basiert zudem auf der Unfähigkeit der Zellen, nach Extravasation die Proliferation aufrecht zu erhalten, oder nach der Bildung früher Mikrometastasen die Angiogenese zu stimulieren (Holmgren *et al.*, 1995). Mehrzellige Tumorzellaggregate (*circulating tumor microemboli*, CTM) zeigen

nach Ablösung vom Primärtumor dagegen ein besseres Überleben, Proliferation und häufige Etablierung von Mikrometastasen in entfernten Zielorganen (Christiansen und Rajasekaran, 2006). Dabei wurde gezeigt, dass CTM auch ohne Extravasation Metastasen bilden können, indem sie an die Gefäßwände kleiner Kapillaren adhären und dort durch Proliferation die Gefäßmembranen rupturieren (Al-Mehdi *et al.*, 2000). Die bevorzugte Ansiedelung zirkulierender Tumorzellen einer bestimmten Tumorerkrankung in spezifischen Zielorganen wird wesentlich durch die Mikroumgebung beeinflusst. Dabei spielen vor allem Organ-spezifische Chemokine, Adhäsionsmoleküle und lokale Wachstumsfaktoren eine Rolle (Fidler, 2003).

Da zirkulierende Tumorzellen in der Blutbahn mit etwa einer Zelle pro 10^9 hämatologischer Zellen sehr selten sind, ist ihre Detektion eine große technische Herausforderung, die hohe Sensitivität in Kombination mit hoher Spezifität erfordert. Derzeitige Verfahren zur Detektion und Isolation zirkulierender Tumorzellen sind die Durchflusszytometrie (Terstappen *et al.*, 1998), Immunomagnetische Beads (Zieglschmid *et al.*, 2005), optische Hochdurchsatzsysteme (Kraeft *et al.*, 2004) oder mikrofluidische „Antikörper-chips“ (Nagrath *et al.*, 2007). Die z. Z. führende Methode zur Aufreinigung zirkulierender Tumorzellen ist die immunomagnetische Aufreinigung, die bereits kommerziell Anwendung findet (AdnaGen, Hannover). Ausbeute und Fehlerraten sind dabei jedoch noch sehr hoch (Smirnov *et al.*, 2005).

1.2 Tumorassoziierte Antigene (TAA) und Tumor escape

Im Laufe der Tumorgenese durchlaufen normale Körperzellen entscheidende Veränderungen, die zur Expression tumorassoziiierter Antigene (TAA) auf der Zelloberfläche führen. Dabei handelt es sich um eine Reihe von Antigenen, die überexprimiert oder modifiziert sind. Tumorassoziierte Antigene lassen sich nach Boon *et al.*, 1994 in sechs Hauptkategorien einteilen:

1. Virale Antigene bei virusassoziierten Tumoren (z. B. HPV, E6, E7, EBV, LMP1, LMP2)
2. Produkte mutierter oder rearrangierter Selbstantigene, als Resultat der genetischen Instabilität von Tumorzellen (z. B. Caspase8, CDK4, MUM)
3. Produkte mutierter Onkogen-/Tumorsuppressorgene oder deren gesteigerte Expression (z. B. Her-2/neu, p53)
4. Selbstantigene, z. B. embryonale Gene (z. B. CEA, AFP) oder gewebsspezifische Differenzierungsantigene (z. B. Tyrosinase, gp100, MART/Melan, PSA)
5. Durch die Einwirkung von Karzinogenen chemisch modifizierte Selbstantigene
6. Genprodukte von Genen, die nur in Tumorzellen transkriptionell aktiv sind

Diese tumorassoziierten Antigene ermöglichen die Identifikation der malignen Zelle durch das körpereigene Immunsystem und können zur Aktivierung einer gezielten Immunantwort mit anschließender Eliminierung der Tumorzelle führen. Oftmals unterbleibt jedoch eine ausreichende antitumorale Immunreaktion, da verschiedene Mechanismen die Aktivierung zytotoxi-

scher T-Zellen verhindern und zu Immuntoleranz führen (*tumor escape*) (Bruyns *et al.*, 1994). Dazu gehört die unzureichende Präsentation von TAAs durch antigenpräsentierende Zellen (APC), die zu Unterdrückung der Proliferation und Persistenz von T-Zellen in der unmittelbaren Umgebung des Tumors führt und pro-inflammatorische Mechanismen verhindert (Speiser *et al.*, 1997). Dies liegt zumeist an den Kohlenhydrat- und Glycolipidstrukturen zahlreicher tumorassoziierter Antigene, die im MHC-Komplex nicht präsentiert werden können. Überdies kann die zentrale und periphere Toleranz von TAAs, die auch auf normalen Körperzellen exprimiert werden, zur vollständigen Eliminierung von tumorspezifischen T-Lymphozyten führen. Zusätzlich dazu supprimiert eine kleine Population regulatorischer CD4⁺CD25⁺ T-Zellen (T_{reg}) die Aktivität von tumorspezifischen T-Lymphozyten am Tumor (Nomura, 2005). Weitere potentielle Ursachen für die Unterdrückung des Immunsystems werden durch die Tumorzellen selbst ausgelöst, wie z. B. die Freisetzung immunsupprimierender Faktoren TGF- β , IL-10 oder VEGF, die Dysregulation der MHC-Präsentation von Peptidantigenen (Henseling *et al.*, 1990), oder unzureichende Expression der Rezeptoren CD95 oder TRAIL, die ein Apoptose-signal zytotoxischer T-Zellen weiterleiten (Kershaw *et al.*, 2005). Hinzu kommt die antigenmodulierende Immunselektion von Tumorzellen mit keiner oder geringer Expressionsdichte des Tumorantigens (Khong und Restifo, 2002) und die Konzentration abgelöster Tumorantigene oder Antigen-Antikörper Komplexe im Serum, die immunologische Effektorfunktionen spezifisch und unspezifisch blockieren können (Takahashi *et al.*, 1988).

1.2.1 Tumorassozierte Antigene gastrointestilaler Tumore: CEA und TAG72

Bei den meisten malignen Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts, wie Kolon- und Magenkarzinom, werden tumorassozierte Antigene heterogen auf der Zelloberfläche exprimiert. Als wichtigste Tumormarker gastrointestinaler Karzinome gelten u. a. das carcinoembryonale Antigen (CEA), das tumorassozierte Glykoprotein-72 (TAG72) und das Kohlenhydratantigen CA19-9.

Das carcinoembryonale Antigen CEA (CD66e) ist ein embryonales Antigen, das in fetalem Darmgewebe hoch exprimiert wird. Es wird angenommen, dass das fetale Expressionsmuster von CEA die räumliche Orientierung der Darmepithelzellen zueinander und zur umgebenden Matrix während der Embryonalentwicklung fördert (Hostetter *et al.*, 1990). Physiologisch wird es in geringen Mengen in gesundem adulten Kolonepithel exprimiert (Egan *et al.*, 1977). CEA ist ein Immunglobulin-ähnliches Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 180 kDa und ist C-terminal in der Plasmamembran durch einen Glycosylphosphatidylinositol-Rest verankert (Hammarström *et al.*, 1975). Es gehört zu der Familie der interzellulären Adhäsionsproteine und wird bei Erwachsenen als Bestandteil der Glykokalyx auf der luminalen Oberfläche reifender und enddifferenzierter Enterozyten und Darmzotten exprimiert (Frängsmyr *et al.*, 1999). Physiologisch bilden CEA Moleküle im Darmepithel ein Netzwerk, welches den Epithel-

zellen Schutz vor pathogenen Bakterien bietet, indem die variablen Kohlenhydratseitenketten der CEA-Moleküle mit Fimbrien der Bakterien interagieren (Sauter *et al.*, 1993). Seine Bedeutung als Tumormarker basiert auf der Überexpression in vielen epithelialen Tumoren des Kolons, Rektums, Pankreas, Magens und der Brust. Über 90 % der primären Kolorektalkarzinome exprimieren CEA (Goldstein und Mitchell, 2005). Zudem steigt die Serumkonzentration von CEA bei Tumorerkrankungen signifikant an und kann im fortgeschrittenen Krankheitsstadium bis zu 5000 ng/ml gegenüber 2 ng/ml in gesunden Patienten betragen (Moertel *et al.*, 1986). Die Messung des CEA-Serumlevels findet seit einiger Zeit diagnostische Anwendung zur postoperativen Verlaufskontrolle und als Nachweis von Tumorrezidiven nach Entfernung des Primärtumors (Bold *et al.*, 1999). Erhöhte CEA Serumspiegel allein sind jedoch nicht indikativ zur Diagnose neuer Tumorerkrankungen, da CEA auch in pathologisch veränderten, aber tumorfreien Geweben, wie beispielsweise Divertikulitis oder Pankreatitis (Fletcher, 1986), hoch exprimiert wird. Im Gegensatz zur niedrigen Expression in gesundem Gewebe ist die Überexpression von CEA nicht luminal polarisiert, sondern wird auch in intraglandulären und intrazellulären Lumina präsentiert. Etwa 50 % der Patienten mit kolorektalem Karzinom entwickeln Metastasen oder ein postoperatives Lokalrezidiv. Es wird angenommen, dass die adhäsiven Eigenschaften von CEA es den Tumorzellen erleichtern, sich nach Ablösung von Tumorzellaggregaten in anderen Geweben zu etablieren und Metastasen zu bilden (Levin und Griffin, 1991).

Das TAG72 Antigen ist ein hochmolekulares Glycoprotein des Mucin-Typs, welches in prä-malignen Läsionen (Adenome, chronisch ulcerative Colitis) und auf Geweben des Kolonkarzinoms hoch exprimiert wird, dagegen nur schwach in normalem Mucosagewebe. Die Expressionsstärke von TAG72 korreliert mit der neoplastischen Transformation von gesundem Gewebe und stellt somit einen frühen Tumormarker dar. Eine Überexpression von TAG72 in nicht-malignem Gewebe ist auf die sekretorische Phase des Endometriums, auf prä-malignes und transitionales Gewebe (transitionale Mucosa des Kolon) beschränkt (Guadagni *et al.*, 1996).

1.2.2 Tumorassoziierte Antigene bei Morbus Hodgkin: CD30 Antigen

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit findet ein weiteres tumorassoziiertes Antigen als Zielstruktur eines T-Zell basierten Biosensors Anwendung. Das CD30 Antigen ist ein 120 kDa großes transmembranes Glycoprotein der TNF/NGF-Rezeptor-Familie, das in normalem lymphatischem Gewebe durch aktivierte T-, B- und NK-Zellen exprimiert wird. Es bindet den CD30L und verstärkt dadurch die Proliferation von T- und B-Zellen. CD30 stellt ein tumorassoziiertes Antigen dar, das spezifisch auf Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS) Zellen des Hodgkin Lymphoms hochexprimiert wird (Schwab *et al.*, 1982). Überdies findet sich eine Überexpression von CD30 in Tumorzellen des anaplastischen großzelligen Lymphoms (ALCL), Zellen des diffusen B-Zell Non-Hodgkin Lymphoms der anaplastischen Variante und Zellen des embryonalen Hodenkarzinoms. Auch eine virale Infektion, wie durch das Epstein-Barr-Virus (EBV),

HI-Virus (Pizzolo *et al.*, 1994) oder das humane T-Zell Leukämie Virus-1 und Virus-2 (HTLV-1, HTLV-2) erhöht die Expression des CD30 Antigens (Stein *et al.*, 1985).

1.3 Behandlung von malignen Tumoren mit Hilfe der adoptiven Immuntherapie

Das zunehmend bessere molekulare Verständnis des immunologischen Zusammenspiels während der Tumorentstehung führte in den letzten Jahrzehnten zu neuen therapeutischen Konzepten, die die Induktion einer spezifischen anti-Tumor-Reaktion zum Ziel haben. Grundsätzlich unterscheidet man Antikörper-vermittelte Ansätze von immuntherapeutischen Ansätzen, die auf der Rekrutierung von antigenspezifischen, zytotoxischen T-Lymphozyten basieren.

Die Entwicklung der Hybridomtechnik zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern (mAK) ermöglichte die Produktion von tumorspezifischen Antikörpern im großen Maßstab, welche im Unterschied zu Chemotherapeutika und Strahlenbehandlung die Tumorzellen selektiv avisieren und zur Zerstörung maligner Tumoren durch das Immunsystem beitragen können. In der Antikörper-vermittelten Immuntherapie sind entweder die Antikörper selbst wirksam, oder werden als Trägermoleküle verwendet, um zytotoxisch wirksame Substanzen gezielt zu malignen Zellen zu dirigieren. Jedoch ist die therapeutische Anwendbarkeit monoklonaler Antikörper *in vivo* bis heute durch die niedrige Halbwertszeit, unzureichende Gewebspenetration und ungenügende Immunstimulation und Reaktivität mit Normalgewebe limitiert (Pavoni *et al.*, 2006).

Im Gegensatz zu Antikörpern zeichnen sich T-Lymphozyten durch ihre Fähigkeit zu aktiver Gewebepenetration aus (Yazdi *et al.*, 2006). Tumorspezifische T-Lymphozyten können daher eine therapeutisch wirksame anti-Tumor-Reaktion unterhalten, die sich in langandauernder Induktion und Vermittlung einer komplexen Immunreaktion mit hoher zytolytischer Aktivität gegenüber Tumorzellen äußert (Rosenberg, 1996). In vielen soliden Tumoren und tumornahen Lymphknoten werden tumorinfiltrierende T-Lymphozyten (TILs) nachgewiesen. Die TILs enthalten häufig tumorspezifische T-Zellen mit eingeschränkten Effektorfunktionen aufgrund einer supprimierten Expression der CD3 ζ -Kette (Tartour *et al.*, 1995), die sich jedoch *ex vivo* durch Stimulation mit IL-2 wiederherstellen lässt. Die Präparation von TILs ist aufwändig und scheitert oft an der mangelnden Anzahl in Tumorbiopsien (Topalian *et al.*, 1989) oder der kritischen Aufbereitung des Patientenmaterials (Lewko *et al.*, 2000). Verbesserte *in vitro* Kultivierungs- und Stimulationsprotokolle ermöglichten eine gesteigerte Proliferation autologer tumorspezifischer T-Zellen aus Melanomen, Brust-, Kolon- und Renalzell-Karzinomen (Yannelli *et al.*, 1996). In Kombination mit IL-2 konnte eine therapeutische Wirkung von TILs bei metastatischen Melanomen (Rosenberg *et al.*, 1994; Dudley *et al.*, 2005) und Nierenzellkarzinomen

(Bordignon *et al.*, 1999) gezeigt werden. Der Einsatz von TILs zur spezifischen adoptiven Immuntherapie ist jedoch durch das Vorhandensein und die individuelle Präparation begrenzt und lässt viele wichtige Fragen zu Migrationsverhalten, Lebensdauer und spezifischer *in vivo* Aktivität bislang offen.

Eine weitere Strategie, die Vorteile gewebspentrierender zytotoxischer T-Lymphozyten für die adoptive Immuntherapie zu nutzen, liegt in der genetischen Modifikation von T-Zellen mit dem Ziel, diese mit tumorspezifischen T-Zellrezeptoren auszustatten. So wurde die DNA der α - und β -Kette tumorreaktiver TILs aus Patienten mit NY-ESO-1-positiven Tumoren isoliert und zur Transduktion von naiven und reifen T-Zellen verwendet. Humane T-Lymphozyten mit dem rekombinanten TCR sind *in vitro* gegenüber Tumorzellen mit MHC-präsentiertem NY-ESO-1 zytolytisch aktiv (Zhao *et al.*, 2005). Dabei muss der rekombinante TCR so konstruiert werden, dass keine Interaktion mit den endogenen Rezeptorketten möglich ist, um unvorhersehbare Spezifitäten der genetisch modifizierten T-Zellen und eine mögliche Autoaggression zu verhindern (Willemsen *et al.*, 2000). Ein Nachteil dieser Methode ist, dass das Auffinden von T-Zellrezeptoren aus TILs mit Spezifität für ein definiertes tumorassoziertes Antigen äußerst zeitintensiv ist und nicht immer gelingt (Yazdi *et al.*, 2006). Zudem ist in neoplastisch transformierten Zellen die MHC-Präsentation oft dysreguliert, so dass ihre Erkennung durch TCR-modifizierte T-Zellen oftmals unterbleibt (Henseling *et al.*, 1990). Um diese Defizite auszugleichen, wurden MHC-unabhängige rekombinante Immunrezeptoren mit Spezifität für ein tumorassoziertes Antigen entwickelt (Alvarez-Vallina, 2001).

1.3.1 Rekombinante Immunrezeptoren

Die Generierung rekombinanter Immunrezeptoren zielt darauf, die umfangreichen Eigenschaften von T-Lymphozyten zur Induktion und Modulation einer komplexen Immunantwort mit den spezifischen Bindungseigenschaften von monoklonalen Antikörpern zu verknüpfen. Derartige rekombinante Rezeptoren bestehen aus einer antigenbindenden Domäne, die aus einem Einzelkettenfragment (scFv) eines monoklonalen Antikörpers besteht. Diese ist mit Hilfe eines extrazellulären Gelenks mit einer intrazellulären Signaldomäne verbunden (Abbildung 1.2). T-Zellen mit TAA-spezifischen Rezeptoren induzieren nach Bindung an das Zielantigen eine spezifische Immunantwort gegen die TAA-positive Zielzelle, die abhängig von der ausgewählten (ko)stimulatorischen Signalkette(n) zu einer komplexen T-Zellantwort führt. Bevorzugt wird die CD3 ζ Signalkette eingesetzt, die mit einer kostimulatorischen Domäne, wie beispielsweise CD28, OX40 oder 4-1BB, verknüpft wird. Nach diesem Konstruktionsschema wurde eine Reihe von rekombinanten Immunrezeptoren konstruiert und *in vitro* untersucht (Tabelle 1.1).

Die Grundlage der rekombinanten Immunrezeptoren mit MHC-unabhängiger Antigenerkennung sind TAA-spezifische Einzelkettenfragmente (scFv) aus variablen Regionen der schweren (VH) und leichten (VL) Kette eines monoklonalen Antikörpers, die durch einen flexiblen

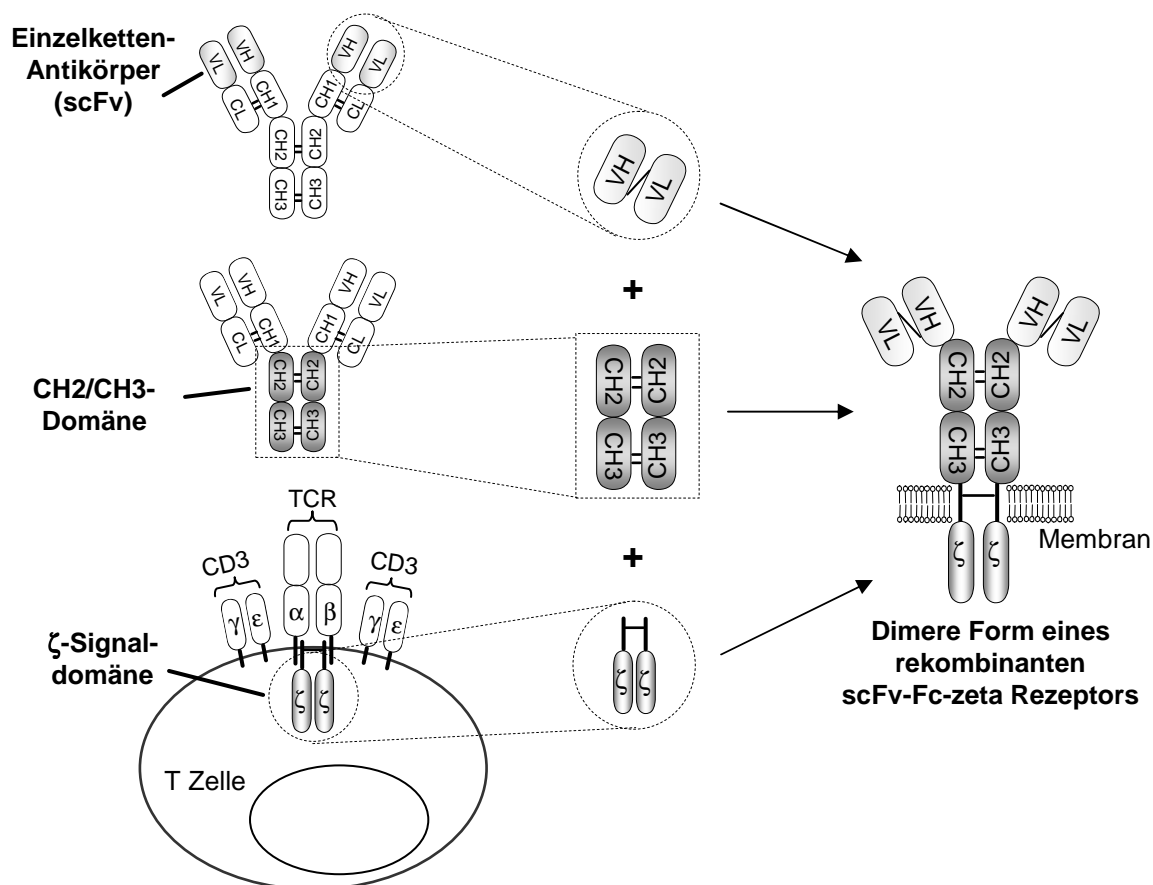


Abbildung 1.2: Konstruktion eines rekombinanten Immunrezeptors. Die antigenbindende Domäne des Rezeptors besteht aus dem rekombinanten Einzelkettenfragment (scFv) eines monoklonalen Antikörpers mit Spezifität für ein tumorassoziiertes Antigen (TAA). Diese ist durch den stabilisierenden konstanten Fc-Teil (CH2/CH3) eines humanen IgG₁ Antikörpers mit der transmembranen und intrazellulären CD3ζ Signalkette verbunden.

Gly₄Ser₃-Linker verbunden sind (Huston und George, 2001). Mit Hilfe von *phage-display*-Bibliotheken wurde eine Reihe dieser TAA-spezifischen Antikörperfragmente isoliert. Das Einfügen einer konstanten IgG₁-(CH2/CH3)-Gelenkregion zwischen der antigenbindenden scFv-Domäne und der Signaldomäne führt zu einer stabileren Expression des Immunrezeptors auf der Zelloberfläche und stärkeren Signalgenerierung durch Rezeptorquervernetzung (Moritz und Groner, 1995). Zudem verleiht der Abstandhalter dem Rezeptormolekül eine höhere Flexibilität zur Bindung der jeweiligen Epitope. Die Bindung des rekombinanten Immunrezeptors an Antigen führt zur intrazellulären Aktivierung der T-Zelle, deren Ausmaß unmittelbar von der Signaltransduktionskette des Immunrezeptors abhängt (Haynes *et al.*, 2001). Bevorzugt wird die endogene CD3ζ Signalkette des TCR-Komplexes als Aktivierungsdomäne eingesetzt, da sie über drei *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* (ITAMs) verfügt. Rezeptorassoziierte Proteintyrosinkinasen der Src-Familie, Lck und Fyn (Weiss und Littman, 1994; van Oers *et al.*, 1996) führen zu ersten Phosphorylierungsreaktionen an den ITAMs. Zugleich wird das ZAP-70 Protein rekrutiert und in die phosphorylierte und somit katalytisch aktive Form umgewandelt (Hatada *et al.*, 1995), welche dann die Phosphorylierungskaskade weiterleitet (Abschnitt 1.4).

Tabelle 1.1: Auflistung von bereits generierten und getesteten rekombinanten Immunrezeptoren mit Spezifität für tumorassoziierte Antigene.

Tumor	TAA	Signaldomäne	Referenz
B-Zell-Lymphom	CD19	CD3 ζ ; 4-1BB-CD3 ζ	Brentjens <i>et al.</i> , 2003; Imai <i>et al.</i> , 2004
Kolonkarzinom	CEA CA19-9	CD3 ζ ; CD28-CD3 ζ	Haynes <i>et al.</i> , 2001 und 2002; Hombach <i>et al.</i> , 2000
Ovarialkarzinom	FBP	Fc ϵ RI γ	Hwu <i>et al.</i> , 1995; Kershaw <i>et al.</i> , 2002
Brust-, Ovarial-, Kolonkarzinom	ErbB2	CD3 ζ ; CD28-CD3 ζ	Chmielewski <i>et al.</i> , 2004; Teng <i>et al.</i> , 2004; Stancovski <i>et al.</i> , 1993
Prostatakarzinom	PSMA	CD3 ζ ; CD28-CD3 ζ	Gade <i>et al.</i> , 2005; Maher <i>et al.</i> , 2002
verschiedene Karzinome	KDR EGP2	CD3 ζ	Kershaw <i>et al.</i> , 2000; Ren-Heidenreich <i>et al.</i> , 2000
Adenokarzinom	TAG72	Fc ϵ RI γ ; CD3 ζ	Hombach <i>et al.</i> , 1998b; McGuinness <i>et al.</i> , 1999
Melanom	GD3 HMW-MAA	CD3 ζ ; Fc ϵ RI γ	Yun <i>et al.</i> , 2000; Reinhold <i>et al.</i> , 1999
Neuroblastom	GD2	CD3 ζ	Rossig <i>et al.</i> , 2001
Nierenkarzinom	CA9	Fc ϵ RI γ ; CD4-Fc ϵ RI γ	Weijtens <i>et al.</i> , 1996; Lamers <i>et al.</i> , 2002
Hodgkin Lymphom	CD30	Fc ϵ RI γ	Hombach <i>et al.</i> , 1998a

1.4 Molekulare Mechanismen der T-Zellaktivierung

Die Aktivierung von T Helferzellen (T_H) ist essentiell für die adaptive Immunantwort. Die Initiierung einer T-Zellantwort erfolgt dabei in mehreren Schritten, in denen die Bindung eines extrazellulären Liganden durch den T-Zellrezeptor in ein intrazelluläres biochemisches Signal umgewandelt wird. Diese Signalübertragung basiert grundsätzlich auf der Rezeptoraggregation innerhalb der Zellmembran, die zu einer intrazellulären Signalkaskade auf der Grundlage von reversiblen Proteinphosphorylierungen führt. Auf dem Weg in den Zellkern wird dabei das Signal um ein Vielfaches verstärkt.

Professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) prozessieren Antigene in kleinere Peptidfragmente, die den T-Zellen im MHC-Komplex auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Bindet die korrespondierende antigenspezifische naive T-Zelle, führt eine molekulare Reorganisation in der T-Zellmembran zur Ausbildung der immunologischen Synapse (IS). Diese besteht aus einem zentralen Cluster mehrerer T-Zellrezeptoren (*central supramolecular activation clusters*, c-SMAC), der von einem Ring aus Adhäsionsmolekülen umgeben ist (*peripheral*

supramolecular activation clusters, p-SMAC) (Grakoui *et al.*, 1999). Im Anschluss an das Zusammentreffen des TCR mit dem Peptid-MHC-Komplex und eines unerlässlichen zweiten costimulatorischen Signals durch Rekrutierung costimulatorischer Proteine in die IS, werden verschiedene Signalkaskaden der T-Zelle initiiert. Diese führen schließlich zur klonalen Expansion und Differenzierung zu einer funktionellen Effektorzelle. Durch den costimulatorischen Dialog zahlreicher Oberflächenmoleküle kann die Signalübertragung je nach Entwicklungsstadium der T-Zelle auch die Inaktivierung (Anergie) oder den programmierten Zelltod hervorrufen. So verbleibt eine T-Zelle ohne ein costimulierendes CD28-Signal trotz Antigenkontakt des TCR im Zustand der Anergie (Greenfield *et al.*, 1998). Dieser Zustand der peripheren Immuntoleranz schützt neben der zentralen Immuntoleranz gesundes Gewebe vor einer autoimmunologischen Reaktion.

Im folgenden Abschnitt werden die notwendigen Signalkaskaden, die zu einer vollständigen T-Zellaktivierung führen, zusammenfassend dargestellt. Die Aggregation der Rezeptorkomplexe auf der Zelloberfläche führt zur Konformationsänderung des TCR/CD3-Komplexes, wodurch die rezeptorassoziierten Proteintyrosinkinasen Lck, Fyn und die 70 kDa zeta-assoziierte Kinase Zap-70 aktiviert werden. Dies löst wiederum die sequentielle Aktivierung weiterer intrazellulärer Signale aus, die in einer Kaskade schließlich zur Translokation von spezifischen Transkriptionsfaktoren in den Zellkern führen. Diese aktivieren dann die Expression früherer Gene wie z. B. IL-2. Die nachgeschalteten Signalkaskaden lassen sich in 3 Hauptwege untergliedern (Abbildung 1.3):

1. Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Wege
2. Proteinkinase C (PKC) Weg
3. Calcium-Calcineurin Weg

Die **MAP-Kinase Wege** zeichnen sich durch Kaskaden sequentieller Phosphorylierungen von MAPK-Proteinen aus, an deren Ende mehrere Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, die an der T-Zellantwort beteiligt sind. Die Signalgebung durch den Antigenrezeptor führt zur Aktivierung des kleinen G-Proteins RAS, welches dann die MAP-Kinase Kaskade auslöst. Verschiedene endständige MAP-Kinasen werden in den Zellkern verlagert, in dem sie dann genregulatorische Proteine phosphorylieren. Zu den endständigen MAP-Kinasen, die durch zweifache Phosphorylierung eines Tyrosin- und Threoninrests aktiviert werden, zählen u. a. die Proteine ERK und JNK. Dabei wird ERK durch den Antigenrezeptor allein aktiviert, während die Aktivierung der MAP-Kinase JNK durch eine weitere Signalkaskade erfolgt, die durch das costimulatorische CD28-Signal der T-Zelle ausgelöst wird. Die Kombination der beiden MAP-Kinase Wege führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren FOS und JUN, die als Heterodimere in Form von AP-1 die Expression vieler am Zellwachstum beteiligter Gene regulieren (Jacinto *et al.*, 1998).

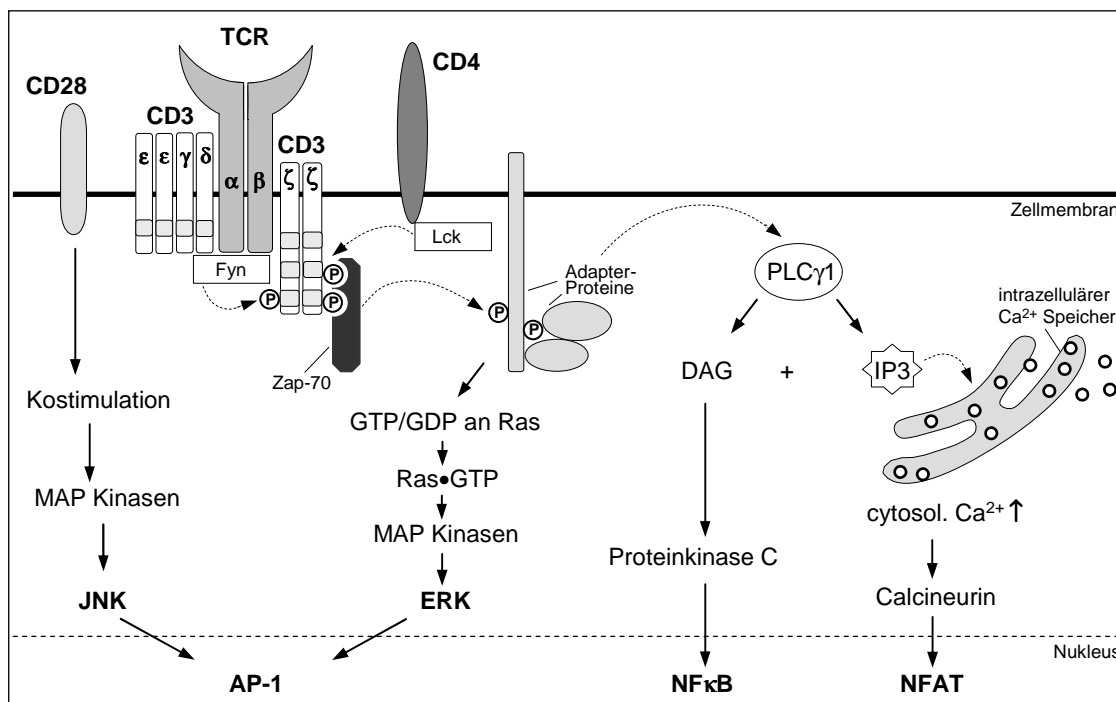


Abbildung 1.3: Signaltransduktion in T-Zellen. Vereinfachte schematische Darstellung der 3 Hauptwege der T-Zellaktivierung, welche gemeinsam die Expression früher Gene induzieren: MAPK Wege, Proteinkinase C (PKC) Weg, und Calcium-Calcineurin Weg.

Der **Proteinkinase C Weg** wird durch Membranphospholipide, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und der PI3-Kinase aktiviert. Die PKC wiederum aktiviert zahlreiche Enzyme und ermöglicht vor allem den Transport des Transkriptionsfaktors $\text{NF}\kappa\text{B}$ in den Nukleus, indem sie inhibitorische Proteine durch Phosphorylierung deaktiviert. Bisher sind 7 verschiedene Isoformen von PKC in T-Zellen bekannt, wobei für die T-Zellaktivierung hauptsächlich $\text{PKC}\theta$ verantwortlich ist (Arendt *et al.*, 2002).

Der **Calcium-Calcineurin-Weg** wird ausschließlich durch die $\text{CD3}\zeta$ Kette und die ζ -assoziierte Zap-70 Kinase ausgelöst, weder das costimulatorische Molekül CD28 noch Zytokine wirken über diese Signalkaskade. Durch Phosphorylierung wird das Enzym Phospholipase C ($\text{PLC}\gamma 1$) aktiviert, welches das Membranphospholipid Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP_2) in Diacylglycerin (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP_3) spaltet. Die Bindung von IP_3 an seinen Rezeptor im endoplasmatischen Retikulum (ER) führt zur Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen, einem universellen *second messenger* in eukaryotischen Zellen (Feske, 2007). Das Protein STIM1 ermittelt permanent die Ca^{2+} -Konzentration im ER und führt in Folge des geleerten Speichers zur Öffnung von *calcium-release-activated calcium* (CRAC) Kanälen in der Zellmembran, die einen Ca^{2+} -Influx in die Zelle zur Folge hat (Zhang *et al.*, 2005). Auf diese Weise steigt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ in ruhenden T-Zellen auf $1 \mu\text{M}$ nach TCR-Stimulation an. Der Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration aktiviert die Phosphatase Calcineurin, welche die cytosolische Form des Transkriptionsfaktors NFAT dephosphoryliert. Dabei wird

das Kernlokalisierungssignal von NFAT demaskiert, so dass NFAT in den Zellkern eindringen, und dort als Regulatorprotein für die Transkription fungieren kann (Macian, 2005).

1.4.1 T-Zellaktivierung durch rekombinante Immunrezeptoren

Humane T-Lymphozyten mit einem rekombinanten Immunrezeptor mit CEA-spezifischen Binde-domänen und einer CD3 ζ Signalkette werden nach Kreuzvernetzung durch Bindung von CEA⁺ Tumorzellen zu IFN- γ Sekretion und antigenspezifischer Lyse der Tumorzellen aktiviert (Haynes *et al.*, 2001). T-Zellen, deren rekombinante Immunrezeptoren eine kombinierte CD28-CD3 ζ Signalkette enthalten, sezernieren dagegen nach Antigenbindung zusätzlich IL-2 (Abbildung 1.4), ohne dass eine extrazelluläre CD28/B7 Costimulation erforderlich ist. Die Effizienz der rezeptorvermittelten spezifischen Zellyse durch Rezeptoren mit CD3 ζ oder kombinierter CD28-CD3 ζ Signalkette ist jedoch ähnlich hoch (Hombach *et al.*, 2001). Eine weitere wichtige Folge der CD28-Kostimulation ist die Transkription von *bcl-2* und *bcl-x1*, die den programmierten apoptotischen Zelltod der Effektorzellen inhibieren (Mor und Cohen, 1996; Mueller *et al.*, 1996; Radvanyi *et al.*, 1996). Für die Optimierung der rezeptorvermittelten T-Zellaktivierung stehen neben CD ζ und CD28 weitere Signalmodule, wie beispielsweise Fc ϵ RI γ oder costimulatorische Domänen der CD28 Familie, Ox40 oder 4-1BB, zur Verfügung.

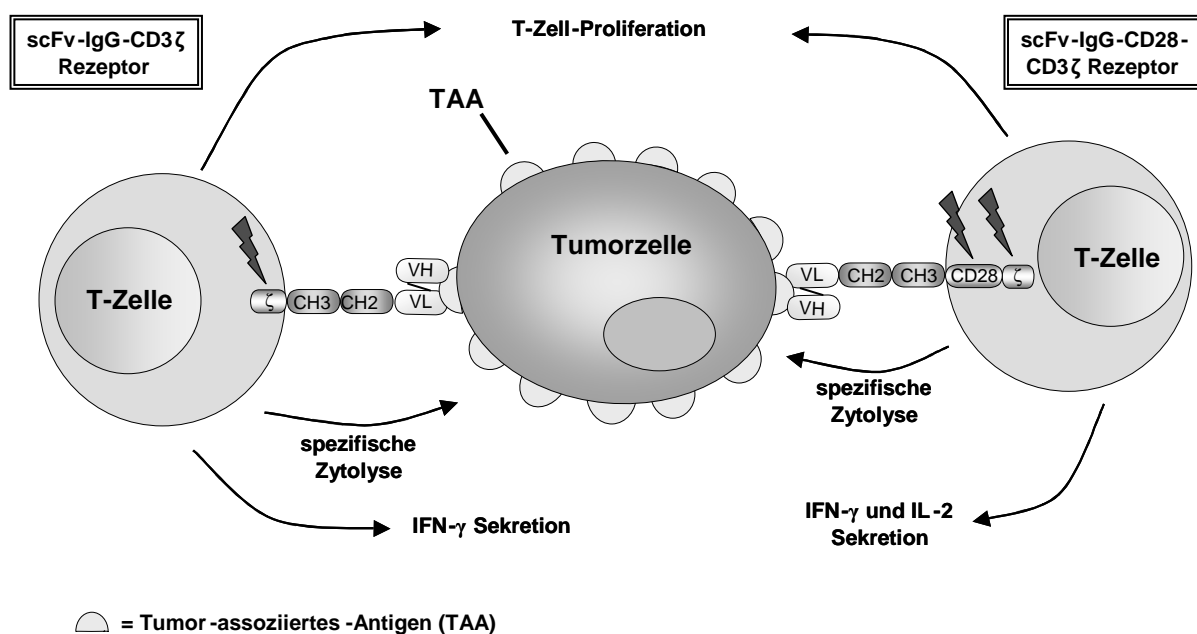


Abbildung 1.4: T-Lymphozyten mit rekombinanten Immunrezeptoren werden MHC-unabhängig durch TAA⁺ Tumorzellen aktiviert.

Durch *in vitro* Experimente wurde gezeigt, dass die Effektorfunktionen der T-Zellen auch bei niedriger Expression der rekombinanten Rezeptoren auf der Zelloberfläche vermittelt werden (Alvarez-Vallina, 2001). Dagegen kommt es bei schwacher Expression des Antigens, wie der

Expression von TAAs in gesundem Gewebe, nicht zur Aktivierung Immunrezeptor tragender T-Lymphozyten (Berinstein, 2002; Chmielewski *et al.*, 2004).

1.4.2 Steigerung der rezeptorvermittelten T-Zellaktivierung durch IL-12

Zusätzlich zu einer modularen Anpassung der Rezeptorsignaldomänen kann eine immunologische anti-Tumor Reaktion mit Hilfe rekombinanter Immunrezeptoren auch durch die Gabe von Zytokinen beeinflusst werden. So führt das Zytokin IL-12 zu einer Steigerung der Immunrezeptor vermittelten T-Zellantwort (Gardemann, 2007).

IL-12 ist ein heterodimeres Zytokin, das sich aus den Untereinheiten p35 und p40 zusammensetzt. Werden beide Untereinheiten koexprimiert, bildet sich das biologisch aktive Heterodimer IL-12p70 (Gubler *et al.*, 1991). IL-12 wird T-zellunabhängig durch Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen (DC), neutrophile Granulozyten und B-Zellen produziert als Reaktion auf verschiedene pathogene Organismen, wie Bakterien, Parasiten, Viren und deren Produkte. Die IL-12 Produktion kann zudem T-zellabhängig über die Wechselwirkung des CD40-Liganden (CD40L), der auf der Oberfläche aktivierter T-Zellen exprimiert wird, mit CD40 auf Makrophagen und DCs vermittelt werden (Macatonia *et al.*, 1995). Ferner wird die Sekretion von IL-12 durch Zytokine wie IFN- γ induziert. Umgekehrt induziert IL-12 wiederum die IFN- γ Produktion in Monozyten und neutrophilen Granulozyten, und folgt damit einer Autoregulation (Ma *et al.*, 1996). Zusätzlich dazu unterliegt IL-12 einer negativen Regulation durch die Zytokine IL-10, IL-11, IL-13, Interferone vom Typ 1 und TGF- β (Du und Sriram, 1998).

IL-12 wird hauptsächlich von aktivierten inflammatorischen Zellen wie Monozyten, Makrophagen, Mikroglia, Neutrophilen und DCs sezerniert. Die wichtigste biologische Funktion von IL-12 besteht in der Regulation adaptiver Immunantworten (Janeway, 2002). Neben der Differenzierung naiver CD4⁺ T-Lymphozyten in Th1-Zellen fördert IL-12 die Sekretion von IFN- γ durch NK-Zellen, unterstützt die Generierung von zytotoxischen T-Zellen (CTLs) und lymphokinaktivierten Killerzellen und potenziert die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen und CTLs. So stimuliert IL-12 T-Effektorzellen zur Expression von Adhäsionsmolekülen und Rezeptoren für Chemokine (King und Segal, 2005), welche die Migration der T-Zellen zum Entzündungsherd erleichtern. Die vielfältigen Funktionen von IL-12 zeigen, dass diesem Zytokin eine zentrale Rolle in der Koordination zwischen frühen antigenunspezifischen angeborenen Immunreaktionen und den antigenspezifischen Prozessen der adaptiven Immunantwort zukommt (Watford *et al.*, 2003).

Neben diesen immunologischen Eigenschaften wurde zudem ein supprimierender Effekt von IL-12 auf die Neovaskularisierung wachsender Tumoren nachgewiesen (Yao *et al.*, 1999; Paul *et al.*, 2002). Gemeinsam mit seinen stimulierenden Eigenschaften auf die T-Zellaktivierung ist IL-12 für den Einsatz in der Immuntherapie von besonderem Interesse.

1.5 Zielsetzung

Zahlreiche maligne Erkrankungen führen durch die Bildung von Sekundärtumoren zum Tod des Patienten. Ursache der Metastasierung sind seltene zirkulierende Tumorzellen oder Zellverbände in der Blutbahn, die sich vom Primärtumor ablösen. Derzeitige Verfahren zur spezifischen Detektion der disseminierten Tumorzellen zur Krankheitsprognose oder postoperativen Verlaufskontrolle sind aufwändig und noch wenig sensitiv, so dass die Forderung nach neuen Nachweisverfahren besteht. Tumorassoziierte Antigene (TAA), die auf der Zelloberfläche von Tumorzellen hoch exprimiert werden, können als Zielstruktur zur Detektion dienen. Ein vielversprechender Ansatz in diesem Zusammenhang sind rekombinante Immunrezeptoren auf der Oberfläche von T-Zellen, welche selektiv TAAs auf Tumorzellen auch in Gegenwart einer hohen Serumkonzentration des Antigens erkennen und gleichzeitig von gesundem Gewebe mit schwacher Expression des Selbstantigens unterscheiden können.

Ziel dieser Arbeit ist es, in einem Modellsystem einen hoch sensitiven zellulären Biosensor für carcinoembryonales Antigen (CEA) zu generieren. Dabei soll der Biosensor in der Lage sein, spezifisch die zellgebundene, nicht aber die lösliche Form des Antigens zeitnah durch ein optisches Signal zu detektieren. Erreicht werden soll das Ziel mit Hilfe einer T-Indikatorzelle, die einen CEA-spezifischen rekombinanten Immunrezeptor auf der Zelloberfläche trägt und nach Kreuzvernetzung ein intrazelluläres Signal generiert, welches durch genetische Modifikation von Signalkomponenten in ein messbares Signal umgewandelt wird. Dies soll dadurch verwirklicht werden, dass eine Jurkat T-Indikatorzelle mit einem Reportersystem generiert wird, das auf der Anreicherung von Signalprodukten in der Zelle unter Kontrolle von Transkriptionsfaktoren basiert. Mit Hilfe künstlicher korpuskulärer versus löslicher Analyten soll die Detektionsgrenze des Biosensors für den korpuskulären Analyten in Gegenwart von löslichem Antigen untersucht werden. Durch verschiedene Anpassungen des Reportersystems oder der Rezeptorsignalketten sollen weitere Möglichkeiten zur Optimierung oder Modulation des Biosensors aufgezeigt werden. Unter Ausnutzung der T-zellspezifischen Signalweiterleitung und -verstärkung in Kombination mit der durch den Immunrezeptor verliehenen definierten Antigenespezifität bietet das zelluläre Biosensorsystem die Möglichkeit eines hoch sensitiven Nachweises korpuskulärer Antigene, der spezifisch zwischen korpuskulärem und löslichem Analyten diskriminiert.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll das molekulare Konzept des Biosensorsystems im Rahmen eines immuntherapeutischen Ansatzes in humanen T-Lymphozyten angewendet werden. Die NFAT-induzierte Sekretion des Zytokins IL-12 soll dabei lokal zu einer Steigerung der antigenspezifischen T-Zellaktivierung durch rekombinante Immunrezeptoren beitragen. Dafür kommt ein selbstinaktivierendes retrovirales Konstrukt mit rekombinantem IL-12 unter Kontrolle eines NFAT-Minimalpromotors zur Anwendung, um nach retroviraler Transduktion eine trans-Aktivierung des Promotors durch die LTR-Region zu vermeiden. Die eigene rezeptorinduzierte Sekretion von IL-12 durch zytolytische T-Zellen mit rekombinantem Immunrezeptor

soll es ermöglichen, die immunstimulierenden Eigenschaften von IL-12 *in vivo* lokal am Tumor zu konzentrieren, um die Gefahr einer systemischen Toxizität von IL-12 zu vermeiden. Diese Untersuchungen sollen dazu beitragen, die Effizienz der adoptiven Immuntherapie mit rekombinanten Immunrezeptoren durch ein autoregulatorisches System zur Freisetzung eines kostimulierenden Adjuvans zu optimieren. Eine Persistenz der genetisch modifizierten T-Zellen in der Blutbahn könnte zudem zur Vorbeugung früher Rezidive beitragen.

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: BioRad (München, D), Boehringer (Mannheim, D), Fluka (Neu-Ulm, D), Gibco BRL (Karlsruhe, D), Kodak (Stuttgart, D), Merck (Darmstadt, D), Pharmacia (Freiburg, D), Promega (Madison, WI, USA), Serva (Heidelberg, D) und Sigma-Aldrich (München, D).

Das Verbrauchsmaterial stammte von folgenden Firmen: Biozym (Hessisch Oldendorf, D), Eppendorf (Hamburg, D), Greiner (Solingen, D), Hewlett-Packard (München, D), Millipore (Bedford, USA), Nunc (Wiesbaden, D), Roth (Karlsruhe, D), Satorius (Göttingen, D), Schott-Glaswerke (Mainz, D), Sigma-Aldrich (München, D), Whatman (Maidstone, England) und Zeiss (Oberkochen, D).

2.1.2 Geräte, Apparaturen und Zubehör

Brutschränke, CO ₂ -Inkubatoren	Heraeus, Hanau, Deutschland
DNA-Sequenzierung	ABI Prism [®] 3700 DNA-Analyser, Applied Biosystems, California, USA
Durchflusszytometer	FACSCalibur [™] , FACSCanto [™] , BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Elektrotransformation	GenePulser II, BioRad, München, Deutschland
Elektrotransfektion	Nucleofector II, Amaxa, Köln, Deutschland
ELISA-Reader	EMax [®] microplate reader, Molecular Devices, Ismaning, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 25C, Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
Gelelektrophorese	BioRad, München, Deutschland
konfokales Laser Scanning Mikroskop	CLSM 410, Zeiss, Jena, Deutschland

Luminometer	MicroLumatPlus LB 96 P, EG & G Berthold, Bad Wildbad, Deutschland
Mikroskop	Diavert, Leitz GmbH, Wetzlar, Deutschland
Monochromator, CCD-Kamera, TillVISION [®]	Polychrome V, TILL Photonics, Martinsried, Deutschland
pH-Meter	inoLab [®] ph 720, WTW, Weilheim, Deutschland
Photometer	UV/Visible Spectrophotometer Ultrospec 1000, GeneQuant RNA/DNA-Calculator, Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Proteinaufreinigung	ÄKTAprime, Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Schüttelinkubator	Innova 4300, New Brunswick Scientific, USA
Sterilwerkbänke	HERAsafe [®] HS12, LaminAir [®] LB-48C, Heraeus, Hanau, Deutschland KojAIR [®] KR200, Kojair Tech Oy, LS Helvoirt, Holland BDK-S 1200, BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Thermocycler	Mastercycler Gradient, Eppendorf, Hamburg, Deutschland Tpersonal, T3000, Biometra, Göttingen, Deutschland
UV-Transilluminator, CCD-Photokamera	LTF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland
Vortex-Mixer	Stuart-Vortex SA8, Barloworld Scientific, USA
Zellseparation	AutoMACS, MIDI-MACS MS/RS-Säulen, Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Zentrifugen	SIGMA 113, 1-14, 1-15K, Sigma, Osterode, Deutschland Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau, Deutschland Hermle Z252MK, HermleZ320K, Kühlzentrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland Avanti TM J-20XP, J-6B, Beckman, Fullerton, USA

2.1.3 Enzyme und Reaktionskits

Die verwendeten Enzyme zur Restriktion, Modifikation und Amplifikation von DNA wurden von den Firmen Roche Diagnostics (Basel, CH) und Fermentas (St. Leon-Rot, D) bezogen. Sie wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Herstellerangaben eingesetzt. Desweiteren wurden folgende Reaktionskits verwendet:

Aufreinigung von DNA QIAquick Gelextraction Kit, PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland

DNA-Sequenzierung	BigDye [®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Warrington, GB
Transfektion	Cell Line Nucleofector [™] Kit V, Amaxa, Köln, Deutschland PolyFect [®] , SuperFect [®] , Qiagen, Hilden, Deutschland
Viabilitätstest	Cell Proliferation Kit II (XTT), Cell Proliferation ELISA, Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
Luciferase-Messung	Luciferase Assay Reporter Kit (nicht mehr hergestellt), BD Clontech, Heidelberg, Deutschland Luciferase-Assay-Kit, Stratagene, Heidelberg, Deutschland
Plasmid-Präparation	Plasmid Miniprep Kit I, PeqLab, Erlangen, Deutschland Qiagen Midiprep Kit, Qiagen Maxiprep Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland
Zellsortierung	Pan T Cell Isolation Kit II, Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland

2.1.4 Lösungen, Medien und Puffer

Die Standard-Lösungen, -Puffer, und -Medien wurden nach Sambrook *et al.*, 1996, Ausubel *et al.*, 1995, oder Coligan *et al.*, 1995 hergestellt. Die Zusammensetzung spezieller Lösungen und Puffer sind in den jeweiligen Methoden angegeben. Alle Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt und, falls nicht anders angegeben, bei 121 °C und 1 bar für 25 min autoklaviert. Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit 1 M HCl oder 1 M NaOH eingestellt, thermolabile Substanzen (z. B. Antibiotika) wurden sterilfiltriert (Ausschlußgröße 0,2 µm), und dem Medium erst nach Abkühlung auf mind. 50 °C separat zugesetzt.

2.1.5 Bakterienstämme

Für die Klonierung, Transformation und Plasmidamplifikation wurde der *E.coli*-Stamm DH5α verwendet (Ausubel *et al.*, 1995):

F⁻, endA, hsdR17, supE44, thi-1, recA1, gyrA, relA1, Δ(lacZYA-argF), ϕ 80d lacZΔM15

2.1.6 Zelllinien und primäre Zellen

Zelllinie	Charakteristika	Referenz
293T	Derivat der humanen Nierenkarzinomzelllinie 293, exprimiert das SV40 T-Antigen; G418 resistent.	Bolhuis <i>et al.</i> , 1998; Pear <i>et al.</i> , 1993
Colo320	Humane Kolonkarzinomzelllinie, keine Expression von CEA- und TAG-72-Antigen.	ATCC: CCL-220.1™
Jurkat	Akute Leukämie T-Zelllinie, exprimiert u.a. CD30 und TAG-72 Antigen.	ATCC: TIB-152™
LS174T	Humane Kolonkarzinomzelllinie, exprimiert CEA und TAG-72 Antigen.	ATCC: CL-188™
LS-C	Derivat der humanen LS174T Zelllinie, exprimiert CEA und in großen Mengen TAG-72 Antigen.	Gata <i>et al.</i> , 1994
OKT3	Murine Hybridomazelllinie, sezerniert den monoklonalen mIgG _{2a} Antikörper OKT3 mit Spezifität für humanes CD3.	ATCC: CRL-8001™
15E8	Murine Hybridomazelllinie, sezerniert den monoklonalen mIgG ₁ Antikörper 15E8 mit Spezifität für humanes CD28.	R. van Lier (NCB, Amsterdam, The Netherlands)
9G10	Murine Hybridomazelllinie, sezerniert den gleichnamigen monoklonalen mIgG ₁ Antikörper, mit anti-idiotypischer Spezifität für die Bindedomäne des humanen, CD30-spezifischen Antikörpers HRS3.	Pear <i>et al.</i> , 1993
BW2064/36	Murine Hybridomazelllinie, sezerniert den gleichnamigen monoklonalen mIgG ₁ Antikörper, mit anti-idiotypischer Spezifität für die Bindedomäne des humanen CEA-spezifischen Antikörpers BW431/26.	Kaulen <i>et al.</i> , 1993

Humane periphere Blutlymphozyten (PBL):

Die Lymphozyten wurden aus bei der Blutspende anfallenden „Buffy Coats“ mittels Dichtezentrifugation (Abschnitt 2.8.7) gewonnen und stammen von gesunden Spendern der Transfusionsmedizin der Universität zu Köln. Die isolierten Lymphozyten wurden in RPMI 1640 Medium (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), 10 % (v/v) FCS, IL-2 (1000 U/ml), OKT3 (100 ng/ml) kultiviert.

2.1.7 Plasmide

Tabelle 2.1: Plasmide

Labor Nr.	Plasmid	Charakteristika/Referenz
145	pHyg	Selektionsplasmid zur stabilen Transfektion eukaryotischer Zellen, enthält die Expressionscassette für das Hygromycinresistenzgen
392	pCOLT-GALV	retrovirales Helferplasmid, enthält die Expressionscassette für das GALV <i>env</i> Protein (Weijtens <i>et al.</i> , 1998)
393	pHIT60	retrovirales Helferplasmid, enthält die Expressionscassette für das MLV <i>gag</i> und MLV <i>pol</i> Protein. (Weijtens <i>et al.</i> , 1998)
435	pBullet-Lk-CC49scFv-Fc-zeta	enthält die Expressionscassette für den TAG-72-spezifischen Rezeptor CC49scFv-hFc-CD3 ζ (Hombach <i>et al.</i> , 1998b)
440	pRSV-Lk-HRS3scFv-Fc	enthält die Expressionscassette für das Fusionsprotein aus CD30-Bindedomäne HRS3scFv und dem human-IgG Fc-Teil CH ₂ /CH ₃
443	pRSV-Lk-BW431/26scFv-Fc	enthält die Expressionscassette für das Fusionsprotein aus CEA-Bindedomäne BW431/26scFv und dem human-IgG Fc-Teil CH ₂ /CH ₃ (Eshhar <i>et al.</i> , 1993)
520	pSFG-mIL-12-p40deltap35	enthält die Expressionscassette für das rekombinante Protein p40deltap35 für sekretorisches, murines IL-12 (Lieschke <i>et al.</i> , 1997)
523	pBullet-Lk-HRS3scFv-Fc-zeta	enthält die Expressionscassette für den CD30-spezifischen Rezeptor HRS3scFv-humanFc-CD3 ζ (unpubliziert)
557	pQBI-25	GFP Expressionsvektor (QBIOgene, Heidelberg, Deutschland)
607	pBullet-Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28-zeta	enthält die Expressionscassette für den CEA-spezifischen Rezeptor BW431/26scFv-humanFc-CD28-CD3 ζ (Hombach <i>et al.</i> , 2001)
700	pBullet-Lk-BW431/26scFv-Fc-zeta	enthält die Expressionscassette für den CEA-spezifischen Rezeptor BW431/26scFv-humanFc-CD3 ζ (Hombach <i>et al.</i> , 2000)
735	pQCXIN	retroviraler Expressionsvektor mit selbst-inaktivierender 3'LTR-Region, enthält die bicistronische Expressionscassette MCS-IRES-Neo mit multipler Klonierungsstelle, Ribosomen Eintrittsstelle, und Geneticin-Resistenzgen (BD Clontech, Heidelberg, Deutschland)
815	pcDNA-Lk-BW431/26scFv-Fc	Klonierungsvektor, enthält die Expressionscassette für den CEA-spezifischen BW431/26scFv und humanem Fc-Teil ohne Stop-Codon (unpubliziert)
822	pNFAT-hrGFP	Reporterplasmid mit NFAT-Minimalpromotor und hrGFP Expressionscassette (Statagene, Heidelberg, Deutschland)
824	pNF κ B-hrGFP	Reporterplasmid mit NF κ B-Minimalpromotor und hrGFP Expressionscassette (Statagene, Heidelberg, Deutschland)

Tabelle 2.1: Plasmide: Fortsetzung.

Labor Nr.	Plasmid	Charakteristika/Referenz
852	pEGFP-N1	GFP Expressionsvektor (BD Clontech, Heidelberg, Deutschland)
879	pNFAT-Luc	Reporterplasmid, enthält das Luciferasegen unter Kontrolle des NFAT-Minimalpromotors NFAT ₄ -TATA mit 4 NFAT-Erkennungssequenzen und einer rudimentären TATA-Box (Statogene, Heidelberg, Deutschland)
880	pNFκB-Luc	Reporterplasmid mit NFκB-Minimalpromotor und Luciferase Expressionscassette (Statogene, Heidelberg, Deutschland)
934	pDSred	DSred Expressionsvektor (BD Clontech, Heidelberg, Deutschland)
950	pSIN-(NFAT)6-GFP	retroviraler Expressionsvektor mit selbst-inaktivierender 3'LTR-Region, enthält einen Promotor mit 6 NFAT-Erkennungssequenzen und IL-2 Minimalpromotor und das GFP Gen (Hooijberg <i>et al.</i> , 2000)
1076	pcDNA3.1-YC3.60 Superior Cameleon	Expressionsvektor für das Yellow Cameleon Protein YC3.60 (Nagai <i>et al.</i> , 2004)

2.1.8 Synthetische Oligonukleotide

Alle synthetischen Oligonukleotide (Primer) wurden von MWG-Biotech (München) bezogen.

Tabelle 2.2: Oligonukleotide zur Klonierung: Die Restriktionsschnittstellen zur Klonierung und inserierte Punktmutationen sind durch Fettdruck gekennzeichnet, zusätzliche Restriktionsschnittstellen kursiv hervorgehoben.

Labor Nr.	Name	Sequenz
56	Hum IgG-CH3-3'	5'-TCC CTG TCT CCG GGT AAG ATC TAG <i>CTC GAG GCC</i> -3'
70	61-BglAS	5'-ACA TAG ATC TGC ACC TAG GAC GGT CAG CTT-3'
72	L49-3Bgl	5'-CTG ACA GAT CTG TCC GTT TGA TTT CCA GCT TGG T-3'
98	L-kappa5	5'-CTA CGT ACC ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT TTC-3'
169	Zeta Xho-AS-2	5'-CTG CTA CTC GAG GAT TAG CGA GGG GGC AGG GC -3'
198	5zeta-TM-ICbam	5'-CTG AGT CTG GAT CCC AAA CTC TGC TAC CTG CTG GAT GGA ATC-3'
200	SCD4TmZ-Bam	5'-ACT GGA TCC TCA GCC AAT GGC CCT GAT TGT GCT GGG GGG CGT CGC CGG CCT CCT GCT TTT CAT TGG GCT AGG CAT CTT CTT CTG TGT CAG GAG AGT GAA GTT CAG CA-3'
201	3zetaXho-SalBgl	5'-CTG GCA GAT CTG <i>TCG ACC TCG</i> AGT TAG CGA GGG GGC-3'
211	3GFPXho	5'-CTG CTA CTC GAG <i>GTC GAC</i> TCA GTT GTA CAG TTC ATC CAT GCC-3'

Tabelle 2.2: Oligonukleotide zur Klonierung: Fortsetzung.

Labor Nr.	Name	Sequenz
231	5zetaGFP	5'-ACA TGC AGG CCC TGC CCC CTC GCG GAG GCG GAG GTG GAA TGG TGA GCA AAG GAG AAG AAC TCT TCA CT-3'
232	3zetaGFP	5'-GTG AAG AGT TCT TCT CCT TTG CTC ACC ATT CCA CCT CCG CCT CCG CGA GGG GGC AGG GCC TGC ATG TG-3'
234	GFPzeS	5'-GCA TGG ATG AAC TGT ACA AC T CCG GAC TGA GAG TGA AGT TCA GCA GGA GCG CAG AC-3'
235	GFPzeAS	5'-TCT GCG CTC CTG CTG AAC TTC ACT CTC AGT CCG GAG TTG TAC AGT TCA TCC ATG CC-3'
236	SCDTmGFP-Bam	5'-TAC TGG ATC CTC AGC CAA TGG CCC TGA TTG TGC TGG GGG GCG TCG CCG GCC TCC TGC TTT TCA TTG GGC TAG GCA TCT TCT TCT GTG TCA GGA TGG TGA GCA AAG GAG AAG AAC TCT TCA CT-3'
258	5' cis-hrGFP	5'-GGG GCC ATG GCA TGT CTG GAT CCA AGC T-3'
259	3' cis-hrGFP	5'-CCC GCT CGA GCT ATT ACA CCC A-3'
266	5' -cisLuc	5'-GGG GCC ATG GTC TTA TCA TGT CTG GAT C-3'
267	3' -cisLuc	5'-GGG GCT CGA GTT ACA ATT TGG ACT TTC C-3'
271	GFP-NcoMut-Fw	5'-CAA ACT GCC TGT TCC CTG GCC AAC ACT AG-3'
272	GFP-NcoMut-Bw	5'-CTA GTG TTG GCC AGG GAA CAG GCA GTT TG-3'
291	5-IL12KpnI	5'-GGG GGG TAC CAG ATC TTA GAC TGC CAT GGG TCC TCA G-3'
292	3-IL12XhoI	5'-GGG GCT CGA GTC AGG CGG AGC TCA GAT AGC C-3'
293	5-763.74scFv-Xba	5'-GGG GTC TAG AAT GGC CCA GGT CAA ACT GAA G-3'
294	763.74FcS	5'-GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GTA GAT CCC GCC GAG CCC AAA TCT CCT GAC-3'
295	763.74FcAS	5'-GTC AGG AGA TTT GGG CTC GGC GGG ATC TAC CCG TTT TAT TTC CAG CTT GGT CCC-3'
355	5eGFPBamHI	5'-GGG CGG ATC CAT GGT GAG CAA GGG CGA GGA G-3'
356	3eGFP EcoRI	5'-GGG CGA ATT CTT ACT TGT ACA GCT CGT CCA T-3'
369	BamHI-IL-12-S	5'-GGG CGG ATC CAT GGG TCC TCA GAA GCT A-3'
370	IL-12-EcoRI-AS	5'-GGG GGA ATT CTC AGG CGG AGC TCA GAT AGC C-3'
384	5-NFAT6-BglII	5'-GGG CAG ATC TAA GCT TGA TAT CGA ATT AGG-3'
385	3-NFAT6-BamHI	5'-CCG AGG ATC CAG GAG TTG AGG TTA CTG TGA-3'
386	5-NFAT4-BamHI	5'-CAT GTC TGG ATC CAA GCT GGA-3'

Tabelle 2.2: Oligonukleotide zur Klonierung: Fortsetzung.

Labor Nr.	Name	Sequenz
387	3-NFAT4-BamHI	5'-CGG CGG ATC CTT ATA TAC CCT CTA GAG TCT C-3'

Tabelle 2.3: Oligonukleotide zur Sequenzierung und Kolonie-PCR

Labor Nr.	Name	Sequenz
26	CEA 5' XbaI	5'-TTT CTC TCT AGA GGT GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTG-3'
76	Seq Fc AS	5'-CGG TCC CCC CAG GAG TTC AGG TGC-3'
78	IgG SE5	5'-TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA-3'
127	hIgG-Seq-S	5'-CAA CTG GTA CGT GGA CGG CG-3'
128	hIgG-Seq-AS	5'-CAT TGC TCT CCC ACT CCA CGG-3'
135	pBullet5' seqneu	5'-GGA CCT TAC ACA GTC CTG CTG ACC A-3'
136	pBullet3' seqneu	5'-CGT ACT ATA GGC TTC AGC TGG TGA TAT TG-3'
248	hrGFP-bw	5'-TGC GGT TGC CGT ACT GGA AG-3'
357	eGFPseqAS	5'-TTT ACG TCG CCG TCC AGC TCG A-3'
371	CMV-SeqAS	5'-TCA TTA TTG ACG TCA ATG GGC-3'
400	5-phi-SEQ	5'-CCC GCC TCG ATC CTC CCT TTA T-3'

2.1.9 Antikörper und Antikörpercocktails

Primärantikörper	Charakteristika
Maus anti-human IFN- γ (capture) Antikörper	muriner monoklonaler Antikörper gegen humanes Interferon- γ , Klon-Nr.: NIB42 (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)
Maus anti-human IL-2 Antikörper	muriner monoklonaler Antikörper gegen humanes Interleukin-2, Klon-Nr.: 5344-111 (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)
Ratte anti-Maus IL-12 (p40/p70) Antikörper	monoklonaler Ratte Antikörper gegen murines Interleukin-12 (p40/p70 Protein), Klon-Nr.: C15.6 (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)

Maus IgG ₁ Isotyp-Kontrolle	muriner monoklonaler IgG ₁ Antikörper, Klon-Nr.: 15H6 (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, USA)
Human IgG Isotyp-Kontrolle	polyklonales Serum (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, USA)
Ziege anti-human IgG ₁	polyklonales Serum (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, USA)
Ziege anti-Maus IgG ₁	polyklonales Serum (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, USA)
9G10 Antikörper	muriner monoklonaler anti-HRS3 idiotypischer Antikörper mit Spezifität für den humanen monoklonalen Antikörper HRS3, der spezifisch an das CD30 Antigen bindet (Hybridomzellen, Labor für Tumorgenetik, Klinik I für Innere Medizin, Universität zu Köln)
BW2064/36 Antikörper	muriner monoklonaler anti-BW431/26 idiotypischer IgG ₁ Antikörper mit Spezifität für den humanen monoklonalen Antikörper BW431/26, der spezifisch an CEA bindet (Kaulen <i>et al.</i> , 1993)
OKT3 Antikörper	muriner monoklonaler IgG _{2a} Antikörper gegen die humane CD3ε Domäne (Hybridomzellen, ATCC-CRL 8001, Rockville, USA)
Hit3A und Ucht1 Antikörper	murine monoklonale Antikörper gegen humanes CD3; Klone: Hit3a, Ucht1 (eBioscience, San Diego, USA)
15E8 Antikörper	muriner monoklonaler Antikörper gegen humanes CD28 (Hybridomzellen, ATCC Rockville, USA)
CD28.2 Antikörper	muriner monoklonaler Antikörper gegen humanes CD28; Klon: CD28.2 (eBioscience, San Diego, USA)
Konjugierte Sekundärantikörper	Charakteristika
Biotin-konjugiert:	
Biotin konjugierter Maus anti-human IFN-γ Antikörper	muriner monoklonaler Antikörper gegen humanes Interferon-γ, Klon-Nr.: 4S.B3 (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)

Biotin konjugierter Kaninchen anti-human IL-2 Antikörper	monoklonaler Antikörper, Klon-Nr.: B33-2 (Biosource, Camarillo, USA)
Biotin konjugierter Ratte anti-Maus IL-12 (p40/p70) Antikörper	monoklonaler Ratte Antikörper gegen murines Interleukin-12 (p40/p70 Protein) Klon-Nr.: 17.8 (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)
Biotin konjugierter Ziege F(ab') ₂ anti-human IgG	F(ab') ₂ Antikörperfragment gegen den Fc-Teil von humanem IgG (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, USA)

Phcoerythrin-konjugiert:

PE-konjugierter Ziege F(ab') ₂ anti-human IgG	polyklonales Serum (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, USA)
PE-konjugierter Ziege F(ab') ₂ anti-Maus IgG2a	polyklonales Serum (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, USA)
PE-konjugierter Maus anti-human CD3 Antikörper	polyklonales Serum (DAKO, Glostrup, Dänemark)
PE-konjugierter Maus anti-human CD28 Antikörper	polyklonales Serum (DAKO, Glostrup, Dänemark)

FITC-konjugiert:

FITC-konjugierter Ziege F(ab') ₂ anti-human IgG	polyklonales Serum (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, USA)
FITC-konjugierter Ziege F(ab') ₂ anti-Maus IgG	polyklonales Serum (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, USA)
PE-konjugierter Maus anti-human CD3 Antikörper	polyklonales Serum (DAKO, Glostrup, Dänemark)

2.1.10 Sonstige Proteine

rekombinantes humanes IFN- γ	Molekulargewicht: 15,5 kDa; produziert in <i>E.coli.</i> , Kat.-Bez.: R-IFNG-50 (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)
rekombinantes humanes IL-2	Molekulargewicht: 15,3 kDa; produziert in <i>E.coli.</i> (Chiron GmbH, Ratingen, Deutschland)
rekombinantes murines IL-12	Molekulargewicht: 54,0 kDa, produziert in <i>Spodoptera frugiperda</i> (Merck Biosciences, Calbiochem, Darmstadt, Deutschland)

Streptavidin-POD
Streptavidin-APC

Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
eBioscience, San Diego, USA

2.2 Bakterienkultur

2.2.1 Anzucht und Lagerung von *E. coli* DH5 α Bakterien

Die Anzucht von *E.coli* erfolgte in LB-Medium (1 % (w/v) Pepton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) Natriumchlorid) bei 37 °C und 200 UpM über Nacht. Zur Selektion rekombinanter Bakterien wurden dem Medium die Antibiotika Ampicillin 200 μ g/ml (Stocklösung 100 mg/ml in H₂O) oder Kanamycin 50 μ g/ml (Stocklösung 50 mg/ml in H₂O) zugegeben. Zur kurzfristigen Lagerung bei 4 °C (1-2 Wochen), wurden LB-Agarplatten (LB-Medium, 1,5 % (w/v) Agar) verwendet, die langfristige Lagerung erfolgte mittels Glycerin Stammkulturen. Dazu wurden 700 μ l einer dicht bewachsenen Übernachtskultur mit 300 μ l 87 % (v/v) Glycerin gemischt und bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Herstellung kompetenter *E. coli* DH5 α Bakterien

Elektrokompetente Bakterien nach Dower *et al.*, 1988:

Zur Herstellung elektrokompetenter *E.coli* Bakterien wurden 500 ml LB-Medium 1:100 mit einer ÜN-Vorkultur inokuliert und bei 37 °C und 200 UpM auf dem Schüttelinkubator bis zu einer OD_{600nm} = 1,0 kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien 15 Minuten auf Eis gekühlt und zentrifugiert (3500 rpm, 15 min, 4 °C). Das Bakterienpellet wurde 2x mit 100 ml eiskaltem, sterilen H₂O_{dest.} gewaschen und erneut sedimentiert. Danach wurde der Waschvorgang 2x mit abnehmenden Volumina 10 %igen (v/v), eiskalten Glycerins wiederholt und das gewaschene Pellet in 2 ml eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Die Suspension wurde auf Eis aliquotiert (100 μ l), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Bakterien wurden anschließend auf ihre Transformationseffizienz mit 1 ng Plasmid DNA getestet (ca. 1 x 10⁷ CFU / 1 μ g DNA).

Chemokompetente Bakterien nach Hanahan, 1983:

Die Herstellung hitzeschockkompetenter Bakterien wurde mit Hilfe von RbCl durchgeführt. Hierzu wurden 500 ml LB-Medium 1:100 mit einer *E.coli* Übernachtskultur (37 °C, 200 UpM) angeimpft. Die Bakterien wurden bei gleichen Bedingungen bis zu einer OD_{600nm} = 0,5 kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien 15 Minuten auf Eis gekühlt und durch Zentrifugation (3500 rpm, 15 min, 4 °C) sedimentiert. Das Pellet wurde sofort in 60 ml eiskaltem TfBI Puffer resuspendiert, 10 Minuten auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Die sedimentierten Bakterienzellen wurden in 4 ml eiskaltem TfBII Puffer aufgenommen und aliquotiert (100 μ l).

Die Zellen wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und die Transformationseffizienz mit 1 ng Plasmid DNA getestet (ca. $1 \times 10^6\text{ CFU} / 1\text{ }\mu\text{g DNA}$).

TfBI		TfBII	
100 mM	RbCl	10 mM	RbCl
50 mM	MnCl ₂	10 mM	MOPS
30 mM	Kaliumacetat	75 mM	CaCl ₂
10 mM	CaCl ₂	15% (v/v)	Glycerin in H ₂ O _{dest.}
15% (v/v)	Glycerin in H ₂ O _{dest.}	mit 1 M NaOH auf pH 6,8; sterilfiltriert	
mit 200 mM Essigsäure auf pH 5,8; sterilfiltriert			

2.2.3 Transformation kompetenter *E. coli* DH5 α Bakterien

Elektrotransformation (Dower *et al.*, 1988):

Zur Elektrotransformation wurden $100\text{ }\mu\text{l}$ elektrokompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit $1\text{--}10\text{ ng}$ Plasmid DNA gemischt. Zur Transformation eines Ligationsansatzes (Abschnitt 2.7.2) wurde dieser zuvor durch 30 Minuten Membrandialyse (MF-Millipore $0025\text{ }\mu\text{m}$; Millipore, Schwalbach, Deutschland) gegen destilliertes Wasser entsalzt. Die Elektroporation erfolgte mit Hilfe des „Gene Pulser II“ (BioRad) in gekühlten Küvetten mit $0,2\text{ cm}$ Elektrodenabstand bei $2,1\text{ kV}$, $200\text{ }\Omega$ und $25\text{ }\mu\text{F}$. Direkt nach dem Puls wurde den Bakterien $500\text{ }\mu\text{l}$ RT warmes LB-Medium zugesetzt und die Zellen zur Regeneration 1 Stunde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ kultiviert. Der Transformationsansatz wurde auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und ÜN bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Hitzeschocktransformation (Hanahan, 1983):

Chemokompetente *E. coli* DH5 α Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit $10\text{--}100\text{ ng}$ Plasmid DNA oder einem Ligationsansatz (Abschnitt 2.7.2) gemischt, und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Hitzeschocktransformation wurden die Bakterien für 90 Sekunden bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Danach wurden die Bakterien kurz auf Eis abgekühlt und mit $500\text{ }\mu\text{l}$ LB-Medium versetzt. Die Bakterien wurden zur Regeneration 1 Stunde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ kultiviert und auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen.

2.3 Isolierung von Plasmid DNA aus *Escherichia coli*

2.3.1 Schnellpräparation von Plasmid DNA nach der Koch-(boiling) Methode

Zur Analyse rekombinanter Bakterienklone wurde eine Plasmid DNA Präparation mittels alkalischer Lyse durchgeführt (Birnboim, 1983). Dazu wurden $1,5\text{ ml}$ einer ÜN Bakterienkultur 1

Minute bei 1100 x g sedimentiert und das Zellsediment 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) versetzt, für 30 Sekunden gekocht und anschließend für 10 Minuten bei 13 000 x g bei RT zentrifugiert. Das Zellysate wurde abgenommen und die Plasmid DNA durch Zugabe von 40 µl 3 M NaAc, pH 5,2 und 420 µl Isopropanol präzipitiert. Die DNA wurde für 20 Minuten bei 13 000 x g sedimentiert, zweimal mit je 1 ml 70 %-igem EtOH gewaschen und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die Plasmid DNA in 20 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,4 resuspendiert. Noch verbliebene RNA wurde durch Zugabe von 10 % (v/v) RNase degradiert. Im Anschluß wurde die isolierte Plasmid DNA einer Kontrollrestriktion (Abschnitt 2.7.1) unterzogen und mittels Agarosegelelektrophorese (Abschnitt 2.4) aufgetrennt. Zur Gewinnung von sehr reiner DNA für nachfolgende Klonierungsschritte oder Sequenzierungen erfolgte die Präparation der Plasmid DNA aus 3 ml einer Übernachtskultur mit Hilfe des „Plasmid Miniprep Kit I“ (PeqLab) gemäß Herstellerangaben.

2.3.2 Midi-Präparation von Plasmid DNA durch Bindung an eine Anionenaustauscher-Säule

Größere Mengen Plasmid DNA wurden mittels Anionenaustausch-Chromatographie mit Hilfe des „QIAGEN Plasmid Midi Kit“ (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch oder durch Abschätzung in einem analytischen Agarosegel bestimmt (Abschnitt 2.5.3).

2.4 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die Agarosegelelektrophorese erfolgte nach Sambrook *et al.*, 1996 mit 1 %igen (w/v) Agarosegelen in 1x TAE-Puffer mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid. Die Dokumentation der Agarosegele erfolgte im UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 254 nm. Die DNA Größenmarker wurden von der Firma MBI Fermentas, St. Leon-Rot bezogen („GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, SM0311“ und „GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, SM0243“).

50x TAE

2 M Tris-Base, 57,1 ml/l Eisessig, 50 mM EDTA, pH 8,0

2.5 Präzipitation, Reinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA

2.5.1 DNA-Präzipitation mit Ethanol

Die Präzipitation von DNA dient der Konzentrierung, Reinigung und Umpufferung. Dazu wurden DNA Proben mit 1/10tel Vol. 3 M Natrium-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Vol. Ethanol (96 %) für 30 min bei -20°C gefällt. Anschließend wurde die gefällte DNA durch Zentrifugation pelletiert ($13\,000 \times g$, 25 min, 4°C), mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert ($13\,000 \times g$, 20 min, 4°C). Die DNA wurde bei RT getrocknet und dann in sterilem 10 mM Tris/HCl (pH 8,4) aufgenommen.

2.5.2 Reinigung von DNA-Fragmenten mittels präparativer Agarosegelelektrophorese

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus PCR-Ansätzen und Restriktionen (Abschnitt 2.6.1 und 2.7.1) wurde eine präparative Agarosegelelektrophorese (1 % v/v) durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte wie unter Abschnitt 2.4 beschrieben, wobei die Fragmente der gewünschten Größe nach ihrer Auftrennung unter UV-Licht (312 nm) mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten wurden. Mit Hilfe des „Qiaquick Gelextraction Kit“ (Qiagen) wurde die DNA aus dem Gel nach Herstellerangaben isoliert.

2.5.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Photometrische Konzentrationsbestimmung:

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte durch photometrische Messung bei 260 nm gegen $\text{H}_2\text{O}_{dest}$ als Leerwert. Bei 1 cm Dicke der Quarzküvette entspricht eine $OD_{260nm} = 1$ einer Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA. Der Reinheitsgrad der Lösung wurde durch den Extinktionskoeffizienten E_{260}/E_{280} ermittelt, der bei höchstem Reinheitsgrad einen Quotienten von 1,8 ergibt.

Quantitative Abschätzung im Agarosegel:

Alternativ wurde die DNA Konzentration durch eine analytische Agarosegelelektrophorese abgeschätzt (Abschnitt 2.4, Sambrook *et al.*, 1996), indem die Fluoreszenzintensitäten der Probenbanden mit Markerbanden gleicher Größe und bekannter Konzentration verglichen wurden („MassRuler™ DNA Ladder, Low Range“ oder „MassRuler™ DNA Ladder, High Range“). Zirkuläre Plasmid DNA wurde zuvor durch Restriktionsendonukleasen linearisiert. Die quantitative Abschätzung der DNA-Konzentration erfolgte bei 254 nm UV-Licht.

2.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

2.6.1 PCR Amplifikation von DNA Fragmenten

Mit Hilfe der PCR (*Polymerase Chain Reaction*) können DNA Sequenzen *in vitro* amplifiziert und modifiziert werden (Mullis und Faloona, 1987). Die PCR besteht aus zyklischen Wiederholungen der Teilschritte Denaturierung von dsDNA, Primeranlagerung und Kettenverlängerung entlang der einzelsträngigen DNA Matrize. Die PCR-Reaktionen wurden mit einem Volumen von 50 µl in 200 µl PCR-Reaktionsgefäßen in einem Thermocycler (Biometra) durchgeführt. Um ein Verdunsten während der Reaktion zu vermeiden, wurde der Deckel des Thermocyclers auf 104 °C erhitzt. Zur Amplifikation von DNA Fragmenten wurde folgender Standardansatz verwendet:

Komponente	Endkonzentration/Volumen
Matrizen-DNA	1-10 ng
Primer	je 10 pmol
MgCl ₂	2,5 mM
dNTP-Mix	0,2 mM
10x Polymerase Puffer	1x
Taq- oder Pwo-Polymerase	1 U
H ₂ O _{dest.}	ad 50 µl

Der PCR-Reaktionsansatz wurde nach folgendem Zyklusprogramm amplifiziert:

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Dauer
Initiale Denaturierung	96	4 min
35 Zyklen:		
Denaturierung	96	1 min
Primeranlagerung	52-60	1 min
Kettenverlängerung	72	1 min
Finale Verlängerung	72	4 min

Die individuelle Hybridisierungstemperatur (T_P) der Primer wurde entweder experimentell ermittelt, oder mit der folgenden empirischen Formel nach Wu *et al.*, 1991 in Annäherung berechnet:

$$T_P = \text{Primer(Bp)} + 1,46 \cdot [2 \cdot (G + C) + A + T]$$

Um die Größe, Reinheit und Konzentration der spezifischen PCR-Produkte zu bestimmen wurden die Ansätze anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

2.6.2 SOE-PCR

Die SOE-PCR (*Splice-Overlap-Extension*) dient der Fusion zweier DNA-Fragmente, die um mindestens 30 bp überlappen (Ho *et al.*, 1989). Dabei werden in einer ersten PCR-Reaktion

mit den entsprechenden Oligonukleotiden zunächst zwei Einzelfragmente amplifiziert. Zur Depletion der eingesetzten Oligonukleotide wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des „Qiaquick Gelextraction Kit“ (Qiagen) aus einem Agarosegel aufgereinigt. Mit Hilfe der überlappenden Sequenzbereiche wurden die DNA-Fragmente in einem Zwischenschritt hybridisiert. Dazu wurden die DNA-Fragmente im gleichen molaren stöchiometrischen Verhältnis in einem PCR-Ansatz mit 10 Zyklen ohne Oligonukleotide eingesetzt. 10 µl dieser Zwischenreaktion wurden mit 40 µl eines neuen PCR-Ansatzes versetzt, der zusätzlich die zwei außen flankierenden Oligonukleotide enthielt. Anschließend erfolgte die Amplifikation des Fusionsprodukts in einer zweiten PCR-Reaktion.

2.6.3 „Site-directed“ Mutagenese-PCR

Die ortsgerichtete Mutagenese-PCR wurde zur Mutation von Restriktionsschnittstellen für die Klonierung eingesetzt. Mit Hilfe von zwei komplementären Primern von mindestens 30 bp Länge wurde dabei in einer PCR-Reaktion eine Punktmutation in eine interne *NcoI* Erkennungssequenz eingeführt („CCA TGG“ zu „CCC TGG“), die zu keiner Änderung der Aminosäuresequenz führte. Die Mutagenese-PCR der vollständigen Plasmid DNA erfolgte mit Hilfe der *Pfu*-Polymerase bei verlängerter Amplifikationszeit. Anschließend wurde der PCR-Reaktionsansatz mit *DpnI* für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, um selektiv die methylierte Matrizen-DNA und nicht die mutierte amplifizierte Plasmid DNA zu restringieren. Anschließend wurden 10 ng der mutierten Plasmid DNA in *E. coli* DH5α Bakterien transformiert (Abschnitt 2.2.3).

Der PCR-Reaktionsansatz wurde nach folgendem Zyklusprogramm amplifiziert:

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Dauer
Initiale Denaturierung	96	4 min
20 Zyklen:		
Denaturierung	96	30 sec
Primeranlagerung	55-62	1 min
Kettenverlängerung	68	17 min
Finale Verlängerung	68	20 min

2.6.4 Identifikation rekombinanter Bakterienklone mittels Kolonie-PCR

Zur schnellen Identifikation rekombinanter Bakterienklone ohne Plasmidpräparation und Kontrollrestriktion wurde die direkte PCR-Analyse in Anlehnung der für Hefen beschriebenen Methode nach Jesnowski *et al.*, 1995 eingesetzt. Einzelne Bakterien-Kolonien wurden steril von den Agarplatten gepickt und in einem PCR-Ansatz von 10 µl resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Standard PCR-Reaktion (Abschnitt 2.6.1) mit Insert-spezifischen Oligonukleotiden

(Tabelle 2.3). Die initiale Denaturierung (96 °C, 4 min) diente dabei der Freisetzung der Plasmide aus den Bakterien und lieferte so die zu analysierende DNA. Der PCR-Reaktionsansatz wurde mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.6.5 DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.*, 1977. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf dem zufälligen Einbau von fluoreszenzmarkierten 2', 3'-dideoxy-Nukleotidtriphosphaten (ddNTPs) anstelle von 2'-desoxy-Nukleotidtriphosphaten (dNTPs) während einer PCR-Reaktion. Aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe kommt es dabei zum Abbruch der DNA-Synthese. Auf diese Weise entsteht eine Vielzahl unterschiedlich langer DNA-Fragmente, die in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel getrennt werden können. Zur Sequenzierung wurde das „BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems) und der ABI Prism[®] 3700 DNA-Analyser eingesetzt. Die Auftrennung der synthetisierten Sequenzierungsprodukte erfolgte durch Kapillarelektrophorese mit laservermittelter Fluoreszenzmessung mittels einer CCD-Kamera. Die Sequenzdaten wurden mit der systemeigenen Software aufgezeichnet und mit dem Programm VectorNTI Advance[™] 10 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) ausgewertet.

Reaktionsansatz für die Sequenzreaktion:

Komponente	Endkonzentration/Volumen
Matrizen-DNA	150-300 ng
Oligonukleotid zur Sequenzierung	5 pmol
BigDye Terminator Mix v3.1	0,5 µl
BigDye-Puffer	1x
H ₂ O _{dest}	ad 10 µl

Der PCR-Reaktionsansatz wurde nach folgendem Zyklusprogramm amplifiziert:

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Dauer
90 Zyklen:		
Denaturierung	96	30 sec
Primeranlagerung	50	15 sec
Kettenverlängerung	60	4 min

2.7 Enzymkatalysierte Modifikation von DNA

2.7.1 DNA-Restriktion

DNA-Restriktionen wurden nach den Vorgaben des Herstellers (Roche Diagnostics) in den mitgelieferten Puffern unter Einhaltung der jeweiligen optimalen Inkubationszeiten und Tempe-

raturen durchgeführt. Die Restriktion mit zwei Enzymen erfolgte in einem Ansatz, sofern die Reaktionsbedingungen der Enzyme kompatibel waren. Anderenfalls wurden die Restriktionen hintereinander durchgeführt, wobei die DNA nach der ersten Restriktion durch DNA-Fällung (Abschnitt 2.5.1) präzipitiert wurde und die zweite Restriktion anschließend unter optimalen Bedingungen erfolgte.

2.7.2 Ligation restringierter DNA

Die Ligation isolierter DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase in dem vom Hersteller angegebenen Puffersystem (Roche Diagnostics). Dabei wurde das DNA-Insert im dreifachen molaren Überschuß zum Vektor in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 14 °C inkubiert und anschließend zur Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt (Abschnitt 2.2.3).

2.7.3 5'-Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten mit identischen Überhängen wurde die restringierte Vektor DNA 5'-wärts dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu vermeiden. Die Reaktion erfolgte mittels SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) im entsprechenden Puffersystem (Roche Diagnostics) für 30 Minuten bei 37 °C. Anschließend wurde die Phosphatase durch Inkubation bei 65 °C für 15 Minuten vollständig inaktiviert und die dephosphorylierte Vektor DNA ohne vorherige Aufreinigung zur Ligation eingesetzt.

2.8 Zellkultur

2.8.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Alle Zellkulturarbeiten wurden in Laboren der Sicherheitsstufe I oder II unter einer Sterilbank der Sicherheitsklasse II (Heraeus Biotech, Hanau) durchgeführt. Die Zellen wurden in Inkubatoren (Heraeus) unter 5 % CO₂-Versorgung bei 37 °C und 95 bis 100 %-iger Luftfeuchtigkeit kultiviert. 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 37 °C vorgewärmt oder auf 4 °C abgekühlt. Für die Kultivierung von Zelllinien und primären Zellen wurde das Vollmedium RPMI 1640 mit GlutaMAX™ oder das Minimalmedium DMEM mit GlutaMAX™ (beide GibcoBRL, Eggenheim) verwendet. Die Zellkultur Medien wurden jeweils mit 10 % (v/v) Fetalem Kälberserum (FCS, Biochrom KG, Berlin) und Penicillin-Streptomycin (50 U/ml Penicillin + 50 µg/ml Streptomycin;

GibcoBRL, Eggenheim) versetzt. Die Kultivierung in DMEM Medium erforderte eine Inkubation unter 10 % CO₂-Versorgung.

2.8.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur langfristigen Lagerung von Zelllinien wurden etwa 5×10^6 Zellen sedimentiert (300 x g, 5 min, RT), in 900 µl Kulturmedium aufgenommen und mit 10 % (v/v) DMSO versetzt. Die Zellsuspensionen wurden in thermostabilen Kryoröhrchen zunächst langsam bei -20 °C 4–24 Stunden eingefroren, anschließend für 2 Tage bis maximal 6 Monate bei -80 °C gelagert, und zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

2.8.3 Passage adhärenter Zellen durch Trypsinierung

Zur Passagierung adhärenter Zellen wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, die Zellen einmal mit 10 ml PBS (137mM NaCl, 2,6 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen und mit 1 x konzentrierter Trypsin-EDTA Lösung (1 ml 10 x-fach Trypsin-EDTA (Sigma, Deisenhofen) pro 10 ml PBS) überschichtet. Für die enzymatische Reaktion wurden die Zellkulturen 1-5 Minuten bei 37 °C inkubiert und von der Kulturschalenoberfläche abgelöst. Anschließend wurden die gelösten Zellen in 9 ml Kulturmedium mit 10 % FCS resuspendiert, wodurch die Trypsin-Aktivität gestoppt wurde. Die Passage der Zellen erfolgte je nach Zelllinie nach einem individuellen Verdünnungsfaktor.

2.8.4 Transfektion von 293T-Zellen mittels Lipofektion

Bei der Lipofektion wird die Plasmid-DNA mit Hilfe von fein verzweigten Trägermolekülen verpackt, deren positiv geladene Amino-Gruppen die DNA umschließen und die Passage durch die Zellmembran erleichtern (Felgner *et al.*, 1987).

Zur Transfektion eukaryotischer Zellen wurde das PolyFect[®] Reagenz (Qiagen, Hilden) verwendet, das in serumfreiem Kulturmedium die Plasmid-DNA komplexiert. Der DNA-PolyFect-Komplex bindet an negativ geladene Rezeptoren (Glykoproteine) der eukaryotischen Zelle und ermöglicht so die Endozytose in ein von einer einschichtigen Membran umhülltes Lysosom. Das alkalische PolyFect- Reagenz wirkt bei pH < 5 als Puffer-Substanz und erhöht den pH-Wert des Lysosomenkompartiments, so dass lysosomale Nukleasen erfolgreich inhibiert werden. Jeweils $1,2 \times 10^5$ Zellen der Linie 293T wurden 24 Stunden vor der Transfektion in 2 ml Kulturmedium (DMEM, 10 % FCS) pro 9,5 cm² well einer 6-well Kulturplatte ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 10 % CO₂ inkubiert. Pro Transfektionsansatz wurde 1 µg Plasmid-DNA in 50 µl serum- und antibiotikafreiem Kulturmedium verdünnt und mit 10 µl PolyFect-Reagenz

vermischt. Zur Komplexbildung wurde der Ansatz 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz mit 300 µl DMEM Medium, 10 % (v/v) FCS versetzt und tropfenweise zu den kultivierten 293T Zellen in das Kulturmedium gegeben. Nach 48 Stunden wurde die Expression der transfizierten DNA in 293T Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie analysiert. Bei löslichen Proteinen wurde der Kulturüberstand gesammelt und mit Hilfe eines ELISA analysiert.

2.8.5 Elektrotransfektion von Jurkat-Zellen

Bei der Elektrotransfektion wird durch das Anlegen eines (oder mehrerer kurz aufeinander folgender) elektrischen Impulses die Permeabilität der Zellmembran kurzfristig so erhöht, daß auch größere DNA-Moleküle in die Zellen eindringen können (Chu *et al.*, 1987).

Jeweils 3×10^6 Jurkat Zellen in logarithmischer Wachstumsphase wurden abzentrifugiert (1400 rpm, 4 min, 4 °C), einmal mit PBS gewaschen, in 100 µl „Solution V“ des „Cell Line Nucleofector Kit V“ (Amaxa) resuspendiert und mit 3 µg der zu transfizierenden DNA gemischt. Der Ansatz wurde luftblasenfrei in eine Küvette überführt und im „Nucleofector II“ (Amaxa) mit dem Programm A-17 elektroporiert. Unmittelbar nach dem Puls wurden 500 µl 37 °C vorgewärmtes RPMI 1640 Medium, 10 % (v/v) FCS zugegeben. Der Ansatz wurde mit Hilfe einer Plastikpipette in eine Vertiefung einer 6-well Kulturplatte mit 2,5 ml vorgewärmtem Medium pipettiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 48 Stunden wurde die Expression der transfizierten DNA in Jurkat Zellen durchflußzytometrisch analysiert. Mit dem GFP-Vektor #852 pEGFP-N1 wurden Transfektionseffizienzen von 25–50 % erzielt.

2.8.6 Selektion stabil transfizierter Zellen durch limitierende Verdünnungsreihen

Bei der Transfektion eukaryotischer Zellen kommt es meist zu einer vorübergehenden starken Expression der transferierten Gene (transiente Expression). Diese Expression geht jedoch durch die Verdünnung des episomalen Vektors mit jeder Zellteilung rasch verloren. Als sehr seltenes Ereignis kann der Vektor in das Genom einer Zelle durch „illegitime“ Rekombination integriert werden (Yano *et al.*, 1991). Enthält der Vektor ein selektierbares Gen, können solche Zellen mit integrierten Vektoren dann als stabile Transformanten aus der Gesamt-Zellpopulation isoliert werden. Der Selektionsmarker muss dabei nicht zwangsweise auf dem selben Vektor lokalisiert sein, sondern kann durch Co-Transformation mit einem zweiten Resistenzplasmid in die Zelle eingebracht werden. Die Effizienz der Co-Transformation ist relativ hoch, (60-80 %), was darauf zurückzuführen ist, daß die transgenen DNA-Fragmente in das Genom kointegrieren.

Zur Selektion stabil transfizierter Zellklone wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion in geeignetes Selektionsmedium überführt und limitierende Verdünnungsreihen angelegt.

Die optimale Konzentration des Selektionsantibiotikums wurde für jeden Zelltyp zuvor ermittelt (z. B. 200 µg/ml Hygromycin B oder 2 mg/ml G418 (Geneticin[®]) für Jurkat Zellen). Die Zellen wurden ausgehend von 100 Zellen pro Vertiefung in einer geometrischen Verdünnungsreihe auf einer Mikrotiterplatte ausgesät und mehrere Wochen unter Selektionsdruck kultiviert. Einzeln wachsende Zellklone wurden expandiert und die Expression des transferierten Gens durchflusszytometrisch analysiert.

Übersicht der generierten Zelllinienderivate:

Zelllinie	Charakteristika
Jurkat879	Derivat der Leukämie T-Zelllinie Jurkat; NFAT-induzierbare Expression von Luciferase (#879); Hygromycin Resistenz
Jurkat879_523	Derivat der Jurkat NFAT-Luciferase Indikatorzelllinie; Expression von anti-CD30 Rezeptor HRS3scFv-Fc-zeta (#523)
Jurkat879_700	Derivat der Jurkat NFAT-Luciferase Indikatorzelllinie; Expression von anti-CEA Rezeptor BW431/26scFv-Fc-zeta (#700)
Jurkat-Cameleon	Derivat der Leukämie T-Zelllinie Jurkat; cytoplasmatische Expression von Cameleon pcDNA3.1-YC3.60 (#1076); Emission 485nm und 535nm; G418 Resistenz
Jurkat-Cameleon_523	Derivat der Jurkat-Cameleon Zelllinie; Expression von anti-CD30 Rezeptor HRS3scFv-Fc-zeta (#523)
Jurkat-Cameleon_700	Derivat der Jurkat-Cameleon Zelllinie; Expression von anti-CEA Rezeptor BW431/26scFv-Fc-zeta (#700)
LS174T_Dsred	Derivat der humanen Kolonkarzinomzelllinie LS174T; cytoplasmatische Expression von Dsred (#934); G418 Resistenz
Colo320_Dsred	Derivat der humanen Kolonkarzinomzelllinie Colo320; cytoplasmatische Expression von Dsred (#934); G418 Resistenz

2.8.7 Lymphozytenseparation mittels Dichtezentrifugation

Humane T-Lymphozyten wurden mittels Dichtezentrifugation aus „buffy-coat“-Konserven der Transfusionsmedizin, Uniklinik Köln separiert. Dieses Verfahren macht sich die unterschiedliche Dichte der verschiedenen Zellen des humanen Blutes zunutze. Dabei wird das Blut über eine hochmolekulare Flüssigkeit geschichtet, in welcher sich die Blutzellen nach der Zentrifugation in verschiedene, dichteabhängige Phasen aufteilen.

Hierfür wurden 15 ml des Blutes eines gesunden Spenders 1:2 mit PBS verdünnt und auf 15 ml Ficoll Paque (Pharmacia Biotech, Freiburg) geschichtet. Anschließend erfolgte die Dichtegradientenzentrifugation für 20 Minuten bei 838 x g und 20 °C ohne Bremse. Nach der Zentrifugation wurde die obere Phase verworfen. Die Interphase mit den mononukleären Zellen wurde vorsichtig abgenommen, mit 20 ml PBS gewaschen und bei 300 x g, 20 °C für 10 Minuten

zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment resuspendiert und der Waschschritt zweimal wiederholt. Anschließend wurden die T-Lymphozyten in 50 ml RPMI 1640 Medium, 10 % (v/v) FCS resuspendiert und die Zellen mit 1000 U/ml IL-2 und 100 ng/ml OKT-3 stimuliert. Die separierten primären Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.8.8 Magnetische Zellsortierung (MACS) humaner CD3⁺ T-Lymphozyten

Die Zellsortierung humaner CD3⁺ T-Lymphozyten erfolgte unmittelbar nach der Lymphozytenseparation aus „buffy coat“-Konserven (Abschnitt 2.8.7) mittels magnetischer Zellsortierung (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach). CD3⁺ Zellen wurden entweder mittels positiver Selektion mit „CD3 MicroBeads“ und MidiMACS[®] LS Handsäulen gewonnen, oder durch Depletion von anderen Blutzellen mit Hilfe des „Pan T Cell Isolation Kit II“ im AutoMACS[®] getrennt. Die Überprüfung der Reinheit von sortierten Zellpopulationen erfolgte mit Hilfe der Durchflussszytometrie.

Direkte Selektion von CD3⁺ Zellen:

Zur direkten Selektion von CD3⁺ Zellen wurde das Gemisch peripherer Blutlymphozyten (PBL) in PBS aufgenommen, nach Herstellerangaben mit Magnetkügelchen-gekoppelten, CD3 spezifischen Antikörpern inkubiert, gewaschen und in 1–2 ml Trennpuffer (PBS, 2 mM EDTA, 0,5 % FCS) resuspendiert. Durch das angelegte Magnetfeld wurden markierte CD3⁺ Zellen in den MidiMACS[®] LS Handsäulen zurückgehalten, während andere Blutzellen die Säule ungehindert passierten. Nach mehrmaligem Waschen wurde die Handsäule vom Magnetfeld genommen. Die Fraktion der CD3⁺ Zellen wurde mit PBS (2 mM EDTA, 0,5 % FCS) von der Säule gewaschen und in einem Sammelgefäß aufgefangen.

Indirekte Selektion von CD3⁺ Zellen:

Bei der indirekten Anreicherung wird ein Cocktail Biotin-konjugierter Antikörper gegen die Oberflächenantigene CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, und CD235a zur Markierung von B Zellen, NK Zellen, Dendritischen Zellen, Monozyten, Granulozyten und Erythroiden Zellen eingesetzt. Die markierten Nicht-T-Zellen werden durch anti-Biotin Magnetkügelchen (Beads) in der ferromagnetischen Trennsäule des AutoMACS[®] Geräts bei eingeschaltetem Magnetfeld zurückgehalten und so von der Fraktion humaner CD3⁺ Zellen separiert. Die Vorbereitung und Durchführung der Negativanreicherung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.8.9 Retrovirale Transduktion von humanen T-Lymphozyten und Jurkat Zellen

Zur retroviralen Transduktion wurde die retrovirale Vektor DNA mit der DNA zweier Helferplasmide #392 pColt-GALV und #393 pHit60 im stöchiometrischen Verhältnis 1:1:1 mittels

Lipofektion (Abschnitt 2.8.4) in Zellen der Linie 293T transfiziert. Die Helferplasmide kodieren für das GALV (Gibbon Ape Leukemia Virus) env Gen (pColt) und für die MuLV (Moloney murine Leukemia Virus) gag und pol Gene (pHit60). Diese Verpackungsgene stehen unter der Kontrolle des CMV Promotors/Enhancers (Weijtens et al., 1996).

Periphere Blutlymphozyten oder isolierte CD3⁺ T-Zellen wurden nach der Lymphozytenseparation für 48 Stunden mit dem CD3 spezifischen monoklonalen Antikörper OKT3 (100 ng/ml) und IL-2 (1000 U/ml) stimuliert. Anschließend wurden die stimulierten T-Zellen mit den transfizierten 293T Zellen in RPMI 1640 Medium, 10 % (v/v) FCS, 1000 U/ml IL-2 in Kokultur gebracht und für 48 Stunden inkubiert. Proliferierende Zellen der Linie Jurkat wurden unstimuliert zur Transduktion mit den 293T Produzentenzellen eingesetzt. Während der Kokultur kommt es zur Infektion der T-Zellen durch amphotrophe Viruspartikel, die durch die adhärennten 293T Zellen in den Kulturüberstand sezerniert werden. Die T-Zellen wurden von der Kokultur abgenommen und die Transduktionseffizienz durchflußzytometrisch bestimmt.

2.8.10 Stimulation humaner T-Lymphozyten und Jurkat Zellen durch oberflächengebundene Antikörper

Sterile ELISA-Mikrotiterplatten (MaxiSorb™, Nunc GmbH, Wiesbaden) wurden mit monoklonalen Antikörpern (BW2064/36, 9G10, OKT3, 15E8, je 2 µg/ml; Maus IgG₁ Isotyp, 1 µg/ml) oder Muzin (BSM, TypII, je 1 µg/ml) in PBS beschichtet (50 µl/Vertiefung), 2 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend einmal mit PBS (200 µl/Vertiefung) gewaschen. Transduzierte und nicht-transduzierte T-Lymphozyten oder Jurkat Zellen wurden 5 min bei 400 x g sedimentiert und in PBS resuspendiert. Der Waschschrift wurde dreimal wiederholt um eventuell verbliebenes IL-2 für die T-Zellstimulation zu entfernen. Die Zellen wurden in frischem RPMI 1640 Medium mit 10 % (v/v) FCS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden auf Immunrezeptor tragende Effektorzellen normiert und in einem Volumen von 200 µl auf den beschichteten Mikrotiterplatten bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach 48 Stunden wurde ein Teil des Kulturüberstands abgenommen und für Zytokin-ELISA weiterverwendet. Die verbleibenden T-Zellen wurden für einen colorimetrischen Zell-Proliferations ELISA eingesetzt (Abschnitt 2.8.11), Jurkat Zellen wurden zur Luciferase-Messung lysiert (Abschnitt 2.9).

2.8.11 BrdU-Proliferationstest

Mit Hilfe des colorimetrischen BrdU-Proliferationstest wurde die Proliferation von rezeptortragenden T-Lymphozyten nach spezifischer Stimulation durch immobilisierte Antikörper ermittelt. Bei 5-Brom-2'-desoxy-Uridin (BrdU) handelt es sich um modifiziertes Uridin, das während der DNA-Synthese in proliferierende Zellen inkorporiert wird und anschließend mittels eines

monoklonalen Antikörpers nachgewiesen werden kann (Maghni *et al.*, 1999). Es wurde der „Cell-Proliferation-ELISA“ (Roche Diagnostics, Basel, CH) verwendet.

Rezeptortragende T-Lymphozyten (2×10^4 Effektorzellen/Vertiefung) sowie Lymphozyten ohne Rezeptoren wurden in einem Volumen von 200 μ l Medium auf beschichteten Kulturplatten (Abschnitt 2.8.10) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 48 Stunden wurden pro Vertiefung 20 μ l des 1:100 in RPMI 1640 Medium verdünnten BrdU Labeling and Detection Kit I (Roche Diagnostics, Basel, CH) zu den T-Lymphozyten gegeben und für weitere 6 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Der Kulturüberstand wurde anschließend abgesaugt und die Zellen mit einem Fön 5–10 min getrocknet. Mit 200 μ l Fixierungs-/Denaturierungslösung pro Vertiefung wurden die Zellen für 30 min bei RT an die Zellkulturplatte gebunden und die DNA denaturiert. Zur Detektion BrdU-markierter DNA wurden je 50 μ l einer 1:100 Verdünnung des anti-BrdU-POD Antikörpers zugegeben und für 90 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschlösung wurde der Test mit 50 μ l ABTS-Substratlösung/Vertiefung (1 mg/ml ABTS[®], Roche Diagnostics) bei RT entwickelt und die Absorption bei 405 nm (OD₄₀₅) gemessen. Der Test wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt, aus denen Mittelwert und Standardabweichung bestimmt wurde.

2.8.12 Stimulation humaner T-Lymphozyten und Jurkat Zellen durch Kokultivierung mit Antigen-positiven Tumorzellen

Transduzierte und nicht-transduzierte T-Lymphozyten oder Jurkat Zellen wurden 5 Minuten bei 400 x g abzentrifugiert und das Zellsediment in PBS resuspendiert. Der Waschschrift wurde dreimal wiederholt um eventuell verbliebenes IL-2 für die T-Zellstimulation zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in frischem RPMI 1640 Medium, 10 % (v/v) FCS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die T-Zellen wurden auf Immunrezeptor tragende Effektorzellen normiert und in einer Verdünnungsreihe auf Rundboden-Mikrotiterplatten mit einer konstanten Zahl Tumorzellen kokultiviert. Nach 48 h wurde ein Teil des Kulturüberstands abgenommen und für Zytokin-ELISA weiterverwendet. Die Zellen wurden in einem XTT basierten Viabilitätstest (Abschnitt 2.8.13) eingesetzt. Je nach Ansatz variiert die Anzahl der eingesetzten Effektorzellen und Zielzellen.

2.8.13 XTT basierter Viabilitätstest

Die Zytolyse von Tumorzellen wurde mit Hilfe eines XTT-basierenden Zytotoxizitäts-Test bestimmt („Cell proliferation Kit II (XTT)“, Roche Diagnostics, Mannheim). Hierbei wurde der Umsatz des durch mitochondriale Dehydrogenasen metabolisierten XTT (Natrium 3'-[1-phenylaminocarbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) Benzen-Sulfonsäure-hydrat] zu ei-

nem wasserlöslichen Formazan-Salz photometrisch bestimmt. Die Höhe des XTT-Umsatzes hängt direkt von der Viabilität der kokultivierten Zellen ab (Jost *et al.*, 1992).

Es wurden jeweils 50 µl/Vertiefung XTT-Markierungslösung (1 mg/ml XTT; 1,25 mM PMS, Roche Diagnostics, Mannheim) zu 50 µl Medium/Vertiefung gegeben, der Ansatz bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und die Extinktion alle 30 min photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm mit 650 nm Referenzwellenlänge (OD_{450–650}) bestimmt. Es wurde der maximale Umsatz von XTT durch Tumorzellen allein gemessen und die OD der Vertiefungen bestimmt, die nur RPMI 1640 Medium mit 10 % (v/v) FCS enthielten. Ebenso wurde der Anteil am Gesamtumsatz des XTT-Substrates durch die Effektorzellen bestimmt. Hierfür wurde die gleiche Anzahl T-Zellen wie auch im Versuchansatz in RPMI 1640 Medium, 10 % (v/v) FCS ausplattiert und die OD_{450–650} dieser Vertiefungen nach Zugabe des XTT-Substrats gemessen.

Die Anzahl der lebenden Tumorzellen [%] wurde wie folgt bestimmt:

$$\% \text{ Viabilität} = \frac{\text{OD}_{(\text{Vertiefung des Versuchsansatzes})} - \text{OD}_{(\text{Effektorzellen allein})}}{\text{OD}_{(\text{Tumorzellen allein})} - \text{OD}_{(\text{Medium})}} \cdot 100$$

2.9 Luciferase-Messung transfizierter Jurkat-Zellen

Zur Luciferase-Messung diente das „Luciferase Assay Reporter Kit“ (BD Clontech) und das „Luciferase-Assay Kit“ (Stratagene). Die Jurkat Zellen wurden mit jeweils 2-5 x 10⁵ Zellen pro Vertiefung auf einer 96-Loch Kulturplatte zur Stimulation (Abschnitt 2.8.10) ausgesät. Nach 48 Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert (400 x g, 5 min, 4 °C), mit PBS gewaschen und anschließend in je 40 µl 1 x Lyse-Puffer resuspendiert. Die Zelllyse erfolgte bei RT für 20 Minuten. Anschließend wurden die Zelltrümmer pelletiert (500 x g, 5 min, RT), und jeweils 30 µl des Zelllysats zur Luciferase-Messung auf eine weiße Mikrotiterplatte überführt. Bei dem „Luciferase Assay Reporter Kit“ von BD Clontech wurden pro Vertiefung nacheinander je 50 µl der beiden mitgelieferten Substrate A und B zugegeben. Messungen mit dem „Luciferase-Assay-Kit“ (Stratagene) wurden nach Zugabe von 30 µl Luciferase-Substrat durchgeführt. Die Detektion der Luciferaseaktivität erfolgte für 5 Sekunden in relativen Lichteinheiten pro 0,1 ms (RLU) im Luminometer (Berthold, Bad Wildbad).

2.10 Immunfluoreszenz (FACS)-Analysen

Die Zellen wurden zweimal mit PBS (4 °C) gewaschen, adhärent wachsende Zellen trypsiniert und in 10 ml RPMI 1640 Medium, 10 % (v/v) FCS resuspendiert. Etwa 2 x 10⁵ Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen überführt, 3 min bei 400 x g zentrifugiert und einmal mit PBS (4 °C) gewaschen. Danach wurden die Zellen in etwa 100 µl PBS resuspendiert. Ein Detektionsantikörper

(Endkonzentration 0,5 µg/ml) wurde zugegeben und die Probe 30 min auf Eis inkubiert. Da die Flourochrom-gekoppelten Antikörper lichtempfindlich sind, wurden die Proben vor direkten Lichteinstrahlung geschützt. Die Zellen wurden zweimal mit 2 ml eiskaltem PBS gewaschen und bei 400 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment in 500 µl PBS resuspendiert und mit 1 µl Propidiumjodid (0,5 mg/ml, Sigma, Deisenhofen) zur Markierung toter Zellen versetzt. Die Auswertung der Immunfluoreszenz-Tests erfolgte mit Hilfe eines FACSCalibur™ oder FACSCanto™ Durchflußzytometers (Becton Dickinson, Heidelberg).

2.11 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Konfokale Aufnahmen fluoreszierender Zellen wurden in Zusammenarbeit mit Annette Schmidt (Abteilung molekulare und zelluläre Sportmedizin, Sporthochschule Köln) am CLSM 410 (Carl Zeiss AG, Jena) durchgeführt. Beim CLSM wird im Gegensatz zu einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop ein Schnittbild über sequentielle punktförmige Abtastung mit konfokaler Filterung erzeugt. Dies erlaubt die Betrachtung optischer Schnitte des Präparates und somit eine exakte Kolokalisation unterschiedlich gefärbter Strukturen. Dabei wird jeweils ein Schwarz/Weiß-Bild erzeugt, dem nachträglich ein Farbkanal zugewiesen wird. Verschiedene Fluoreszenzen können auf diese Weise in unterschiedliche Farbkanäle eingelesen werden, die anschließend digital zu einem Farbbild kombiniert werden können (Matsumoto, 1993).

Zur Mikroskopie wurden die Zellen auf Deckglas-Mikroskopierschälchen kultiviert (Ø 35 mm Kulturschälchen mit Ø 5 mm Deckglasboden), und mit Hilfe eines 63 x 1,4 NA Ölimmersionsobjektivs und der systemeigenen Software „Carl Zeiss LSM“ Bilder mit einer Größe von 514 x 514 Bildpunkten aufgenommen. Adhärend wachsende, transfizierte 293T Zellen wurden im grünen Kanal in Bildstapeln durch alle Zellebenen aufgenommen (Anregung: 488 nm, Erfassung mit Bandpass-Filter 505–530 nm). Mit transduzierten T-Lymphozyten wurden Zeitserien (1 min/Bild) in lediglich einer fokussierten Zellebene aufgenommen. Für die Bilderserien wurden pro Bild die selben Einstellungsparameter ausgewählt. Zur Clusteranalyse GFP-fusionierter Immunrezeptoren mit Spezifität für CEA wurden 2×10^5 T-Lymphozyten in die Ø 5 mm Vertiefung der Deckglas-Mikroskopierschälchen gegeben, und nach Absinken der Zellen das Laser Scan Mikroskop auf die Zellebene fokussiert. Anschließend wurde den Zellen der anti-idiotypische Antikörper BW2064/36 (4 µg/ml) und der quervernetzende Sekundärantikörper anti-Maus IgG₁ (20 µg/ml) zugegeben und die Bilderserie für 45 Minuten im grünen Kanal aufgenommen (Anregung: 488 nm, Erfassung mit Bandpass-Filter 505–530 nm). Für die Mikroskopie koinkubierter T-Zellen mit GFP-Fusionsrezeptor und DSred markierten Tumorzellen wurden je $0,8 \times 10^6$ LS174T_DSred oder 1×10^6 Colo320_DSred in 3 ml RPMI 1640 Medium, 10 % (v/v) FCS 24 Stunden vor der Messung zur Adhärenz auf den Deckglas-Mikroskopierschälchen ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Das Kulturmedium wurde vollstän-

dig abgenommen, und die Ebene der rot fluoreszierenden Tumorzellen fokussiert. Anschließend wurden 2×10^5 T-Lymphozyten in die \varnothing 5 mm Vertiefung der Deckglas-Mikroskopierschälchen gegeben, und nach Absinken der Zellen die Bilderserie im grünen (505-530 nm) und roten Kanal (Anregung: 543 nm, Erfassung mit LP 560 nm) aufgenommen. Die kokultivierten Zellen wurden für einen Zeitraum von 60–90 Minuten beobachtet.

2.12 Ca^{2+} -Messung von Jurkat-Cameleon Zellen

Die Messung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration fluoreszierender Jurkat-Cameleon Zellen wurde in Zusammenarbeit mit Matthias Matzkies (Institut für Neurophysiologie, Uniklinik Köln) am Polychrome V Monochromator (TILL Photonics GmbH, Martinsried) durchgeführt. Für die Messung wurden die Cameleon-fluoreszierenden Zellen mit Hilfe des Monochromators mit Licht der Wellenlänge 440 nm angeregt. Die Fluoreszenz der Zellen wurde durch einen 535 nm Emmissionsfilter mit einem 64 x Ölimmersionsobjektiv im Inversmikroskop aufgenommen und mit Hilfe einer CCD-Kamera und der systemeigenen Software TILLvisION[®] (TILL Photonics GmbH) aufgezeichnet. Um ein Photobleaching der Zellen zu vermeiden, erfolgte die Aufzeichnung der fluoreszierenden Zellen in Intervallen von 15–30 Sekunden (Puls jeweils 100 ms, Binning 4 x 4) über einen Zeitraum von 30 Minuten.

Es wurden $0,5 \times 10^6$ Jurkat-Cameleon Zellen sedimentiert (1400 rpm, 4 min, 4 °C), einmal mit PBS gewaschen und die Zellen in 500 μl Hank's balanced salt solution (HBSS) resuspendiert. Zur Adhärenz der Suspensionszellen wurden diese auf Mikroskopierschälchen mit Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläschen (Abschnitt 2.13.1) 30 Minuten bei RT inkubiert. Für die Rezeptorstimulation wurde CEA-spezifischen Jurkat-Cameleon_700 Zellen zuvor der anti-idiotypische Antikörper BW2064/36 (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder Maus-IgG₁ Isotyp Kontrollantikörper (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugesetzt. Fünf Minuten nach Beginn der Messung wurde der quervernetzende Sekundärantikörper anti-Maus IgG₁ am Rand des Mikroskopierschälchens dazupipettiert. Zum Vergleich wurde die Fluoreszenz der Zellen ohne Antikörper-Inkubation aufgezeichnet. In einem Ansatz wurden die Zellen rezeptorunabhängig durch Ionomycin (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert, das zu einem unmittelbaren Ca^{2+} -Influx in den Zellen führt.

HBSS-Puffer:

137,93 mM	8 g	NaCl
5,33 mM	0,4 g	KCl
0,441 mM	0,06 g	KH ₂ PO ₄
4,17 mM	0,35 g	NaHCO ₃
0,338 mM	0,06 g	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
5,56 mM	1 g	Glucose
5 mM	0,555 g	CaCl ₂
<hr/>		
ad 1 Liter H ₂ O _{dest.} , mit HEPES-Puffer auf pH 7,4 eingestellt (15 mM); sterilfiltriert		

2.13 Proteinchemische Methoden

2.13.1 Beschichtung von Deckgläschen mit Poly-D-Lysin

Mehrere Deckgläschen (22 x 22 mm) wurden in 70 %igem EtOH für 5 Minuten sterilisiert und getrocknet. Zur Beschichtung wurden die Deckgläschen in 15 ml 0,02 mg/ml Poly-D-Lysin für 2 Stunden bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet. Die beschichteten Deckgläschen bleiben bei kühler Lagerung (4°C) für 5–6 Wochen verwendbar.

2.13.2 Kopplung von Antikörpern an NHS-aktivierte Sepharose

Zur Kopplung von Antikörpern an Sepharosekügelchen wurde die „NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow“ (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) eingesetzt. Die Sepharose besteht aus quervernetzter Agarose (Kügelchen mit einer Partikelgröße von 45–165 nm), die mit N-Hydroxy Succinimidyl-Ester (NHS) aktiviert wurde. Die Kopplung von Proteinen an die aktivierte Sepharose erfolgt kovalent über freie Aminogruppen ($-\text{NH}_2$). Da die Sepharosekügelchen zur Stimulation von Zellen dienen sollten, wurde die Kopplungsreaktion mit sterilfiltrierten Puffern durchgeführt. Zur Kopplung der anti-idiotypischen Antikörper BW2064/36 oder 9G10 wurden 500 μl NHS-aktivierte Sepharose mit 1 ml HCL (1 mM) für 15 Minuten bei RT inkubiert und anschließend je einmal mit HCL (1 mM) und mit Kupplungspuffer (PBS) gewaschen. Direkt im Anschluß wurde der aufgereinigte und konzentrierte Antikörper (1,4 mg/ml in PBS) auf die Sepharose gegeben und für 3 Stunden unter langsamer Rotation bei RT immobilisiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die noch reaktiven Bindungsstellen der Sepharose durch Zugabe von 1 M Tris in PBS (pH 8,7) für 2 Stunden unter Rotation bei RT abgesättigt. Auf diese Weise gekoppelte BW2064/36-Sepharose und 9G10-Sepharose wurde nach Herstellerangaben zweimal abwechselnd mit Tris-Puffer (1 M in PBS, pH 8,7) / Acetat-Puffer (NaCl 0,5 M, Essigsäure 0,1 M, pH 3,5), und abschließend einmal mit PBS gewaschen. Die Sepharose wurde in 1 ml PBS aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

2.13.3 Reinigung und Konzentration von Antikörpern und Proteinen aus Zellkulturüberständen

Zur Expression der monoklonalen Antikörper OKT3, 15E8, BW2064/36 und 9G10 wurden die gleichnamigen Hybridomzellen bei 37 °C und 5 % CO_2 in RPMI 1640 Medium, 10 % (v/v) FCS kultiviert. Der antikörperhaltige Kulturüberstand wurde etwa alle 72 Std. erneuert, gesammelt und bei -20 °C gelagert. Für FACS-Analysen verwendete Fusionsproteine #440 HRS3scFv-Fc und #443 BW431/26scFv-Fc wurden durch stabil exprimierende 293T Zellen in den Kul-

turüberstand sekretiert, der ebenfalls gesammelt, und bei -20°C gelagert wurde. Je 1 Liter des Kulturüberstands wurde zentrifugiert (5000 rpm, 15 min, 4°C), filtriert (Ausschlussgröße $0,45\ \mu\text{m}$) und affinitätschromatographisch unter Verwendung Antikörper-gekoppelter Agarose (je 5 ml anti-Maus IgG_{2a}, anti-Maus IgG₁, anti-human Fc, alle Sigma-Aldrich, München) aufgereinigt. Die Überstände wurden über Nacht mit 1,5 ml/min bei 4°C mit Hilfe einer Peristaltikpumpe über die Agarosesäule gegeben (C 10/10 Säule, Amersham Pharmacia, Freiburg). Im Anschluss wurden die nicht gebundenen Proteine mit 50 ml PBS, pH 7,4 ausgewaschen. Die Elution des Antikörpers oder Fusionsproteins erfolgte mit 25 ml 0,1 M Glycinpuffer, pH 3,0 in Fraktionen zu je 1,5 ml mit Hilfe der ÄKTAprime[®] (Amersham Pharmacia, Freiburg). Die Absorption der einzelnen Fraktionen wurde während der Elution photometrisch bei 280 nm Wellenlänge gemessen. Proteinhaltige Fraktionen wurden zusammengegeben und in einem Dialyseschlauch (Spectra/Por[®], Roth, Karlsruhe) der Ausschlussgröße 12 000–14 000 MWCO (*Molecular Weight Cut Off*) über Nacht bei 4°C in 2 Liter PBS, pH 7,4 unter leichtem Rühren umgepuffert. Anschließend wurden die Antikörper und Fusionsproteine mit Hilfe von Vivaspin-Röhrchen (Ausschlussgröße 10 000 MWCO, Sartorius) durch mehrmalige Zentrifugation (3500 rpm, 30 min, 4°C) auf etwa 1 ml aufkonzentriert. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch ermittelt (Abschnitt 2.13.4).

2.13.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Ultraviolettes (UV) Licht wird von den aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin, sowie von Disulfidbrücken (Cystinen) in einem Wellenlängenbereich von 250 bis 300 nm unterschiedlich stark absorbiert. Aus der Aminosäuresequenz kann nach Pace und Scholtz, 1995 der molare Extinktionskoeffizient ϵ_{280} und daraus, unter Einbeziehung des Molekulargewichtes, der biologische Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280\text{biol}}$ errechnet werden:

$$\epsilon_{280\text{biol}} = \frac{\epsilon_{280}}{\text{MW}} = \frac{\sum \text{Trp} \cdot 5500 + \sum \text{Tyr} \cdot 1490 + \sum \text{Cys} \cdot 125}{\text{MW}}$$

ϵ_{280} : Molarer Extinktionskoeffizient bei 280nm [$\frac{1}{\text{M}\cdot\text{cm}}$]

MW : Molekulargewicht des Proteins [$\frac{\text{g}}{\text{mol}}$]

Der biologische Extinktionskoeffizient für Antikörper (160 kDa) liegt bei $1,4 \frac{\text{ml}}{\text{mg}\cdot\text{cm}}$, für Fusionsproteine (55 kDa) bei $1,5 \frac{\text{ml}}{\text{mg}\cdot\text{cm}}$. Damit kann mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Proteinkonzentration durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt werden:

$$Abs_{280\text{nm}} = \epsilon_{280\text{biol}} \cdot c \cdot d$$

Abs_{280nm}	: Absorption
$\epsilon_{280biol}$: biologischer Extinktionskoeffizient [$\frac{ml}{mg \cdot cm}$]
c	: Proteinkonzentration [$\frac{mg}{ml}$]
d	: Schichtdicke der Küvette [cm]

2.13.5 „Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay“ (ELISA)

Beim ELISA handelt es sich um eine Festphasenmethode zum quantitativen und qualitativen Nachweis von Antigenen oder Antikörpern (Engvall und Perlman, 1971). Hierbei werden Mikrotiterplatten verwendet, die in einer bestimmten Abfolge mit Antigen, Antikörper und enzymkonjugiertem Antikörper beschichtet werden.

Die Beschichtung der Mikrotiterplatten (PolySorb™ oder MaxiSorb™, Nunc GmbH, Wiesbaden) erfolgte durch Inkubation (ÜN bei 4 °C) mit einem Fangantikörper in 50 µl/Vertiefung Beschichtungspuffer (1,7 ml 0,2 M Na₂CO₃, 0,8 ml 0,2 M NaHCO₃, ad 10 ml H₂O_{dest.}). Zur Absättigung der freien Bindungsstellen wurde die Platte für 2 h bei RT mit 3 % (w/v) BSA in 200 µl/Vertiefung PBS-T (PBS, 0,1 % (v/v) Tween-20) inkubiert und dreimal mit 200 µl PBS-T gewaschen. Anschließend erfolgte mit je 50 µl/Vertiefung im Wechsel die Inkubation der Proben (2 h, RT), des Biotin-konjugierten Detektionsantikörpers (1 h, RT) und einer Streptavidin-konjugierten Peroxidase (Streptavidin-POD, 500 U/ml; 1:10 000 Verdünnung in PBS; Roche Diagnostics; 30 min, RT). Zwischen den Inkubationsschritten wurde die Platte jeweils dreimal mit 200 µl PBS-T pro Vertiefung gewaschen. Durch Zugabe von 50 µl ABTS-Substratlösung/Vertiefung (1 mg/ml ABTS-Puffer®, Roche Diagnostics) wurde der Test bei RT entwickelt und die Absorption bei 405 nm Wellenlänge (OD₄₀₅) bestimmt.

Übersicht der verschiedenen ELISA-Tests:

ELISA	Primärantikörper	Detektionsantikörper
IFN- γ (MaxiSorb™)	Maus anti-human Interferon- γ (capture) (1 µg/ml)	Biotin konjugierter Maus anti-human IFN- γ (0,5 µg/ml)
Interleukin-2 (PolySorb™)	Maus anti-human Interleukin-2 (1 µg/ml)	Biotin konjugierter Kaninchen anti-human IL-2 (0,5 µg/ml)
Interleukin-12 (MaxiSorb™)	Ratte anti-Maus Interleukin-12 (p40/p70) (1 µg/ml)	Biotin konjugierter Ratte anti-Maus IL-12 (p40/p70) (0,5 µg/ml)

Ergebnisse

3.1 Insertion von Green Fluorescent Protein (GFP) in rekombinante Immunrezeptoren

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Visualisierung der Aggregation rekombinanter Immunrezeptoren in der Zellmembran mit Hilfe der Laser Scan Mikroskopie. Geklärt werden soll die Frage, ob die rekombinanten Immunrezeptoren nach Antigenbindung sogenannte immunologische Cluster bilden, wie für den nativen T-Zellrezeptor bekannt (Grakoui *et al.*, 1999). Dazu sollte GFP in den intrazellulären Teil der Immunrezeptoren fusioniert werden, wobei die Interaktion der Rezeptormoleküle auf der Zelloberfläche sterisch nicht beeinflusst werden soll. Um zudem den Einfluss auf die Funktionalität der Immunrezeptoren nach GFP-Fusion zu minimieren, wurden zunächst verschiedene Derivate des anti-TAG72 Rezeptors CC49scFv-Fc-zeta mit intrazellulärem GFP in unterschiedlicher Konfiguration generiert und die Expression in 293T Zellen überprüft. Weiterhin wurde in einem Ansatz der Rezeptor BW431/26scFv-Fv-zeta mit Spezifität für das Carcinoembryonale Antigen (CEA) mit GFP modifiziert.

anti-TAG-72 Rezeptoren	#435	CC49scFv-Fc	zeta		
	#849	CC49scFv-Fc	zeta		GFP
	#850	CC49scFv-Fc	CD4 _{TM}	zeta	GFP
	#851	CC49scFv-Fc	CD4 _{TM}		GFP
anti-CEA Rezeptoren	#439	BW431/26scFv-Fc	zeta		
	#915	BW431/26scFv-Fc	zeta		GFP
	#916	BW431/26scFv-Fc	CD4 _{TM}	zeta	GFP

Abbildung 3.1: Expressionscassetten der anti-TAG72 und anti-CEA Rezeptoren und den generierten Derivaten mit intrazellulär fusioniertem GFP.

3.1.1 Generierung von anti-TAG72 Rezeptoren mit eGFP

Der anti-TAG72 Rezeptor #435 CC49scFv-Fc-zeta sollte C-terminal mit GFP fusioniert werden. Dazu wurde neben der Konfiguration mit vollständiger CD3zeta Signalkette eine weitere

Variante mit alternativer Transmembranregion des CD4 Moleküls generiert, die die Expression der Rezeptormoleküle in der Zellmembran stabilisiert. Zur Klonierung der anti-TAG72 Rezeptoren #849 CC49scFv-Fc-zeta-eGFP und #850 CC49scFv-Fc-CD4TM/zetaIC-eGFP wurde im ersten Schritt die eGFP-DNA mit den Oligonukleotiden 5zetaGFP (#231) und 3GFPXho (#211) aus dem Plasmid pQBI-25 mittels PCR amplifiziert, wobei am 3'-Ende eine *XhoI*-Schnittstelle inseriert wurde. Am 5'-Ende wurde ein 38 bp langes Fragment eingefügt, das unter Deletion des Stop-Codons für den terminalen Abschnitt der CD3zeta Signalkette und einen 5 Aminosäure langen Glycin-Linker kodiert. Gleichzeitig wurde die Signaldomäne CD3zeta mit den Oligonukleotiden 5zeta-TM-ICbam (#198) und 3zetaGFP (#232) und mit den Oligonukleotiden SCD4TmZ-Bam (#200) und 3zetaGFP (#232) aus dem Plasmid #435 pBullet-CC49scFv-Fc-zeta amplifiziert. Am 5'-Ende beider Signalfragmente wurde eine *BamHI* Schnittstelle inseriert. Mit dem Oligonukleotid #200 wurde in einem der DNA-Fragmente zusätzlich die Transmembranregion der CD3zeta Signalkette durch den Transmembranteil des CD4-Moleküls ersetzt. Das 3'-Ende der Signalketten wurde mit einer 39 bp langen Sequenz versehen, das den Glycin-Linker inseriert und für einen kurzen initialen Abschnitt des GFP-Gens kodiert. Durch eine SOE-PCR wurden die jeweiligen Signalkettenfragmente mit Hilfe der flankierenden Oligonukleotide #198 oder #200 und jeweils #211 mit GFP fusioniert. Die Fragmente CD3zeta-eGFP und CD4TM/CD3zetaIC-eGFP wurden mit Hilfe der eingefügten Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *XhoI* in das Plasmid #435 ligiert, in welchem die einfache CD3zeta Signalkette durch Restriktion deletiert wurde. Die Identifikation der Konstrukte erfolgte durch eine Kontrollrestriktion mit den Klonierungsenzymen *BamHI* und *XhoI* und wurde durch DNA-Sequenzierung verifiziert. Dabei fand sich in der Sequenz des Konstrukts #849 C49scFv-Fc-zeta-eGFP eine Punktmutation an der Verknüpfungsstelle CD3zeta und eGFP (Nukleotidposition 1988), die zu einem Austausch der neutralen Aminosäuren Valin zu Alanin am Anfang des GFP-Gens führt. Das Klonierungsschema ist in Abbildung 3.2, die vollständigen DNA- und Aminosäuresequenzen der Konstrukte #849 pBullet-CC49scFv-Fc-zeta-eGFP und #850 pBullet-CC49scFv-Fc-CD4TM/zetaIC-eGFP im Anhang 5.1.1 und 5.1.2 dargestellt.

Für die alternative Konfiguration mit intramolekularem GFP zwischen einer CD4 Transmembrandomäne und dem intrazellulären Teil der CD3zeta Signalkette wurde eGFP mit den Oligonukleotiden SCDTmGFP-Bam (#236) und GFPzeAS (#235) aus dem Plasmid #557 pQBI-25 mittels PCR amplifiziert. Am 5'-Ende wurde eine *BamHI* Schnittstelle und die CD4 Transmembrandomäne inseriert. Das 3'-Ende wurde unter Deletion des GFP Stop-Codons durch ein 35 bp langes Sequenzfragment verlängert, das hinter einem minimalen Serin-Glycin Linker für einen Teil der CD3zeta Signalkette kodiert. Gleichzeitig wurde das intrazelluläre Teilstück der CD3zeta Signalkette mit den Oligonukleotiden GFPzeS (#234) und 3zetaXhoSalBgl (#201) aus dem Plasmid #435 pBullet-CC49scFv-Fc-zeta amplifiziert. Am 5'-Ende wurde dabei eine 26 bp lange Sequenz komplementär zum terminalen Abschnitt des GFP mit SG-Linker und 3'-wärts eine *XhoI* Schnittstelle inseriert. Durch die Assemblierung der Teilstücke und an-

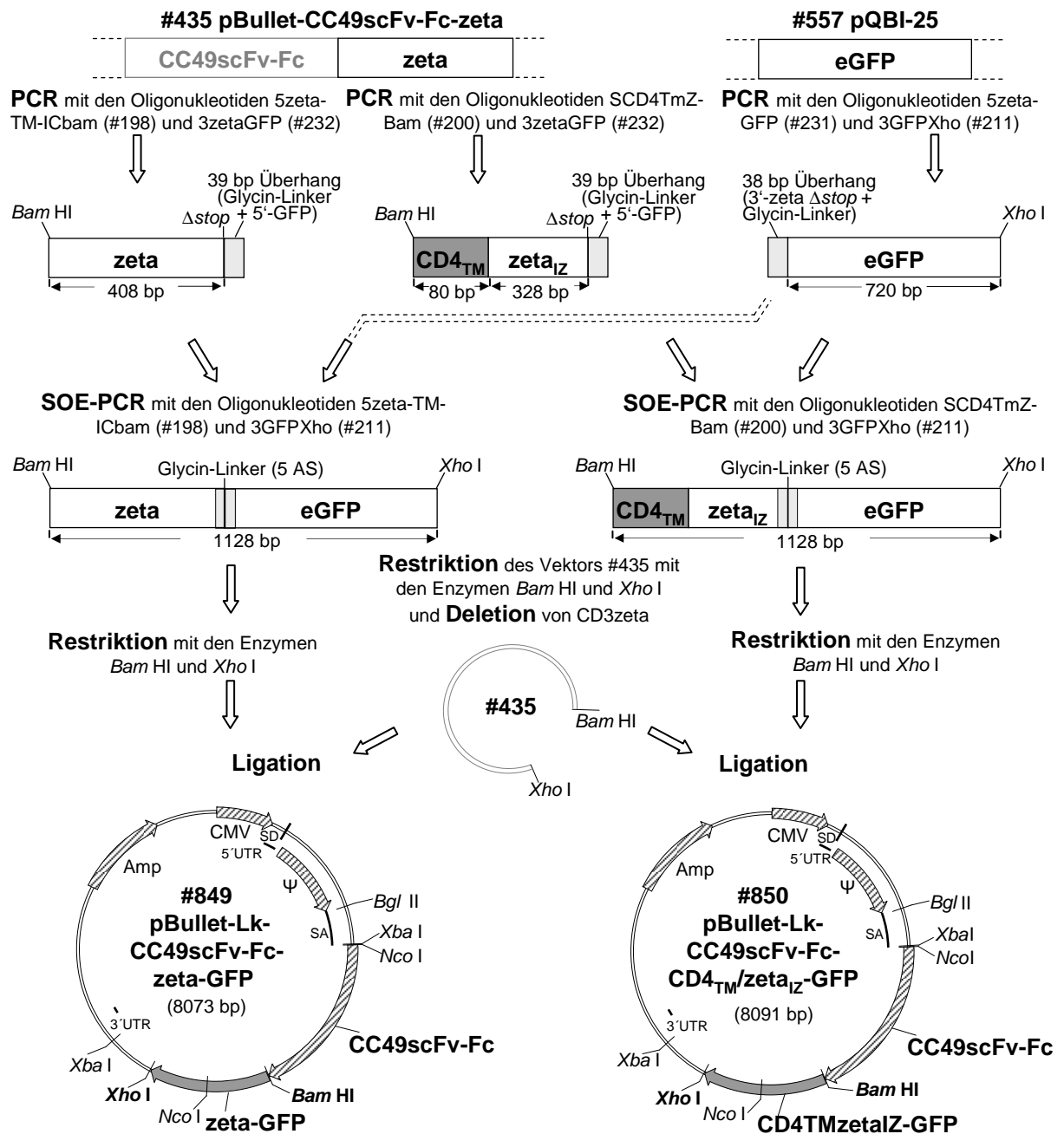


Abbildung 3.2: Klonierungsschema der anti-TAG72 Rezeptoren #849 und #850 mit terminalem eGFP.

schließende PCR mit den flankierenden Oligonukleotiden #236 und #201 wurde das Fragment CD4_{TM}/eGFP-zetaIC amplifiziert, das nach Restriktion mit den Enzymen *Bam*HI und *Xho*I mit der restringierten und CD3zeta deletierten Vektor-DNA #435 ligiert wurde (Klonierungsschema Abbildung 3.3).

Das Konstrukt #851 CC49scFv-Fc-CD4_{TM}/eGFP-zetaIC wurde anschließend durch Kontrollrestriktion mit den Klonierungsenzymen *Bam*HI und *Xho*I und DNA-Sequenzierung mit plasmidspezifischen Oligonukleotiden überprüft. Die vollständige DNA- und Aminosäuresequenz ist im Anhang 5.1.3 dargestellt.

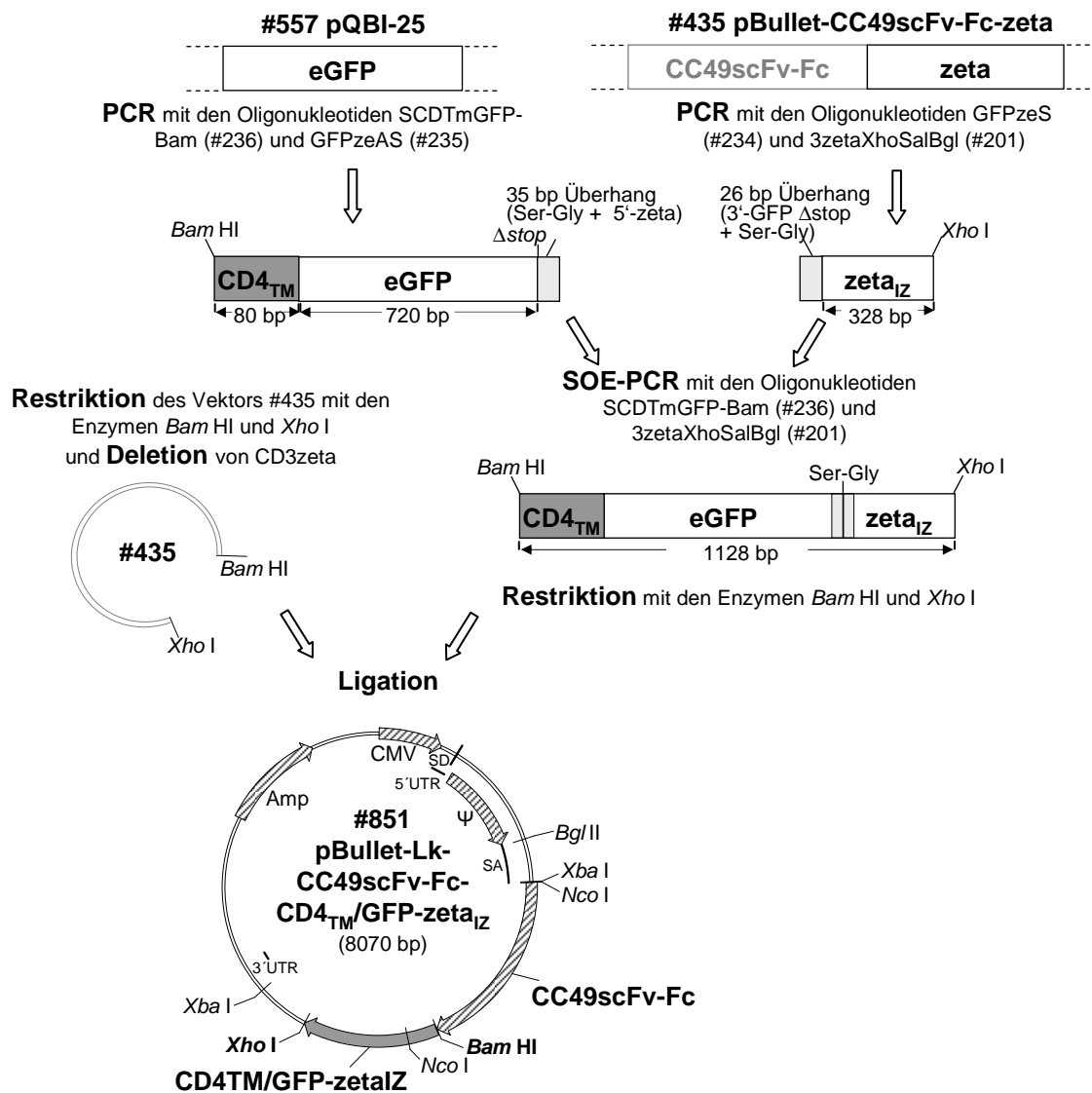


Abbildung 3.3: Klonierungsschema des anti-TAG72 Rezeptors #851 mit intramolekularem eGFP.

3.1.2 Expression von anti-TAG72-eGFP Immunrezeptoren in 293T-Zellen

Es wurde überprüft, ob die unterschiedlich konfigurierten GFP-Varianten des anti-TAG72 Rezeptors #435 CC49scFv-Fc-zeta in 293T Zellen exprimiert werden. Die Plasmid-DNA der Rezeptoren CC49scFv-Fc-zeta-eGFP (#849), CC49scFv-Fc-CD4_{TM}/zeta_{IZ}-eGFP (#850), und CC49scFv-Fc-CD4_{TM}/eGFP-zeta_{IZ} (#851) mit inseriertem GFP wurde in 293T Zellen transfiziert. Zur Kontrolle wurden 293T Zellen mit der DNA kodierend für den Rezeptor #435 CC49scFv-Fc-zeta ohne GFP transfiziert. In einem weiteren Ansatz wurde zur cytoplasmatischen Expression von GFP das Plasmid #852 pEGFP-N1 in 293T Zellen eingeführt. Nach 48 Stunden wurde die Expression der rekombinanten Rezeptoren auf der Oberfläche transfizierter 293T Zellen mit gleichzeitiger GFP-Fluoreszenz mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Die durch GFP vermittelte Fluoreszenz der Zellen wurde im Fluoreszenzkanal 1 bei 525 nm ge-

messen. Der Immunrezeptor auf der Oberfläche wurde mittels PE-konjugiertem anti-human IgG Antikörper detektiert, der an die extrazelluläre Fc-Domäne der Rezeptoren bindet. Zusätzlich wurden GFP-exprimierende 293T Zellen im Fluoreszenzmikroskop untersucht und im Laser Scan Mikroskop konfokale Aufnahmen transfizierter Zellen angefertigt (Abbildung 3.4).

Die FACS-Analyse ergab für die Rezeptorkonstrukte #849 und #850 mit terminal fusioniertem GFP deutlich fluoreszierende Zellen im Vergleich zu den nicht transfizierten 293T Zellen. Auch #852 transfizierte Kontrollzellen zeigten eine durch die cytoplasmatische Expression von GFP vermittelte Fluoreszenz. Dagegen zeigten 293T Zellen mit dem Rezeptor #851 mit intramolekularer GFP-Konfiguration nur schwache Fluoreszenz. Bei zusätzlicher Detektion des Immunrezeptors auf der Zelloberfläche wurde für #849 und #850 eine doppelt markierte Zellpopulation detektiert (Abbildung 3.4 A). Dies zeigt die simultane Expression des Immunrezeptors und des fusionierten GFP-Proteins. Im Gegensatz dazu zeigten #851 transfizierte Zellen lediglich den Immunrezeptor auf der Oberfläche und nur schwache Expression von GFP. Auch die Fluoreszenzmikroskopie der transfizierten Zellen zeigte nahezu keine Fluoreszenz des Rezeptors #851 im Vergleich zu den Rezeptoren #849 und #850 oder dem konstitutiven GFP-Konstrukt #852.

Die in Abbildung 3.4 B dargestellten konfokalen LSM-Aufnahmen zeigen die Verteilung von GFP innerhalb einzelner Zellen. Dabei ist die Fluoreszenz der Rezeptoren #849 und #850 weitgehend in der Zellmembran konzentriert. Zusätzlich werden offenbar vesikuläre Strukturen innerhalb der Zellen durch den membrangebundenen Rezeptor mit GFP hervorgehoben. Dies könnte das ER darstellen, in welches die integralen Rezeptorproteine translatiert werden, um in die Zellmembran transportiert zu werden. Zum Vergleich dienen GFP-transfizierte 293T Zellen, die eine cytoplasmatische Verteilung des GFP-Signals innerhalb der gesamten Zelle zeigen.

Hier wird gezeigt, dass die Fusion von GFP an den Immunrezeptor die Visualisierung der Rezeptoren auf mikroskopischer Ebene ermöglicht. Dabei wird ausschließlich durch eine C-terminale GFP-Fusion der Rezeptoren #849 und #850 im Gegensatz zu intramolekularem GFP #851 ein membranlokalisiertes Fluoreszenzsignal erreicht.

3.1.3 Generierung von anti-CEA Rezeptoren mit terminalem eGFP

Die beiden anti-TAG72 Rezeptoren mit terminalem GFP #849 CC49scFv-Fc-zeta-eGFP und #850 CC49scFv-Fc-CD4TM/zetaIZ-eGFP dienten als Ausgangsvektoren zur Generierung von anti-CEA Rezeptoren mit analoger Konfiguration. Um die CEA-spezifische Bindedomäne BW431/26scFv durch singuläre Schnittstellen einfügen zu können, wurde in einem ersten Schritt die *NcoI* Erkennungssequenz innerhalb des eGFP durch eine PCR mutiert. Dazu wurde sowohl das Plasmid #849 pBullet-CC49scFv-Fc-zeta-eGFP als auch #850 pBullet-CC49scFv-Fc-CD4TM/CD3zetaIC-eGFP mit den Mutagenese-Oligonukleotiden GFP-NcoMut-Fw (#271)

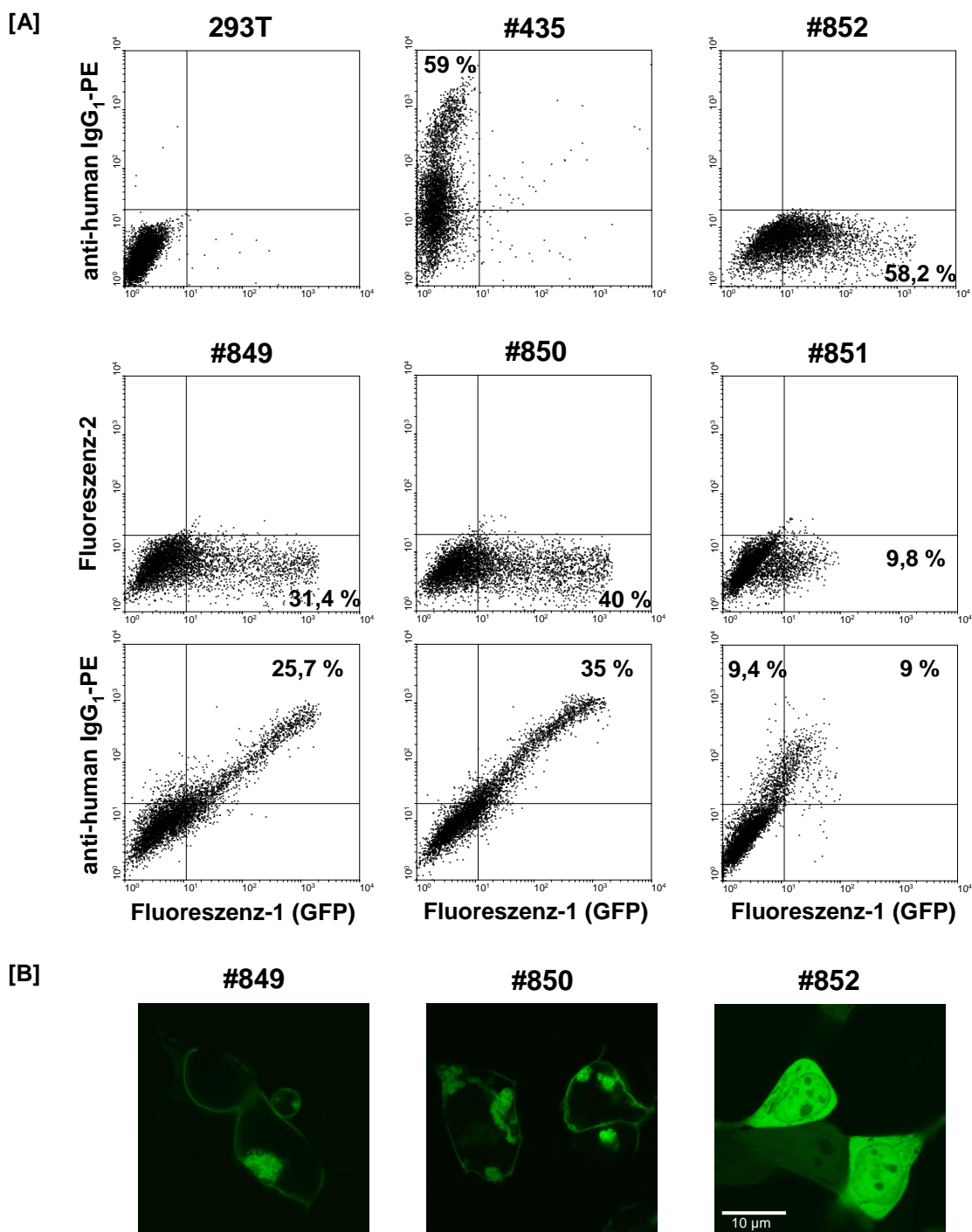


Abbildung 3.4: FACS-Analysen und LSM-Aufnahmen zum Nachweis der Expression der anti-TAG72-GFP Rezeptoren #849, #850 und #851 auf der Oberfläche transfizierter 293T Zellen. Je 2×10^5 293T Zellen wurden mit der Rezeptor-DNA #435 CC49scFv-Fc-zeta, #849 CC49scFv-Fc-zeta-eGFP, #850 CC49scFv-Fc-CD4TM/zetalZ-eGFP, #851 CC49scFv-Fc-CD4TM/eGFP-zetalZ, und dem GFP-Plasmid #852 pEGFP-N1 transfiziert. Nicht transfizierte und transfizierte Zellen wurden mit PE-konjugiertem anti-human IgG Antikörper inkubiert. Parallel wurden Rezeptor-GFP transfizierte Zellen #849, #850, und #851 ohne Antikörper inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert **(A)**, und konfokale LSM-Aufnahmen fluoreszierender Zellen mit GFP angefertigt **(B)**. **A:** Der Prozentsatz Rezeptor und/oder GFP-exprimierender Zellen ist im jeweiligen Quadranten angegeben. **B:** Dargestellt ist jeweils eine Fokusebene der Bildstapel-Aufnahme #849, #850 und #852 transfizierter 293T Zellen (weißer Balken = 10 μ m).

und GFP-NcoMut-Bw (#272) amplifiziert, die eine Punktmutation innerhalb der *Nco*I-Schnittstelle ohne Veränderung der Aminosäuresequenz inserieren. Um die mutierten Plasmide von den DNA-Matrizen zu isolieren wurde der PCR-Ansatz anschließend mit *Dpn*I versetzt, welches selektiv die methylierte DNA erkennt und restringiert. Die Zwischenkonstrukte #924 CC49scFv-Fc-zeta-eGFP Δ NcoI und #925 CC49scFv-Fc-CD4TM/CD3zetaIC-eGFP Δ NcoI wurden mittels einer Kontrollrestriktion überprüft.

Im zweiten Schritt wurden die Plasmide mit eGFP Δ NcoI #924 und #925 mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Bam*HI geschnitten und das L κ -CC49scFv-Fc Teilstück deletiert. Durch Restriktion des Klonierungsvektors #815 pCR2.1-L κ -BW431/26scFv-Fc mit den Enzymen *Nco*I und *Bgl*III wurde das Fragment L κ -BW431/26scFv-Fc isoliert und mit der restringierten Vektor-DNA #924 oder #925 ligiert. Dabei ging durch die Fusion der identischen Nukleotidüberhänge die Erkennungssequenz der Enzyme *Bam*HI und *Bgl*III verloren (Abbildung 3.5).

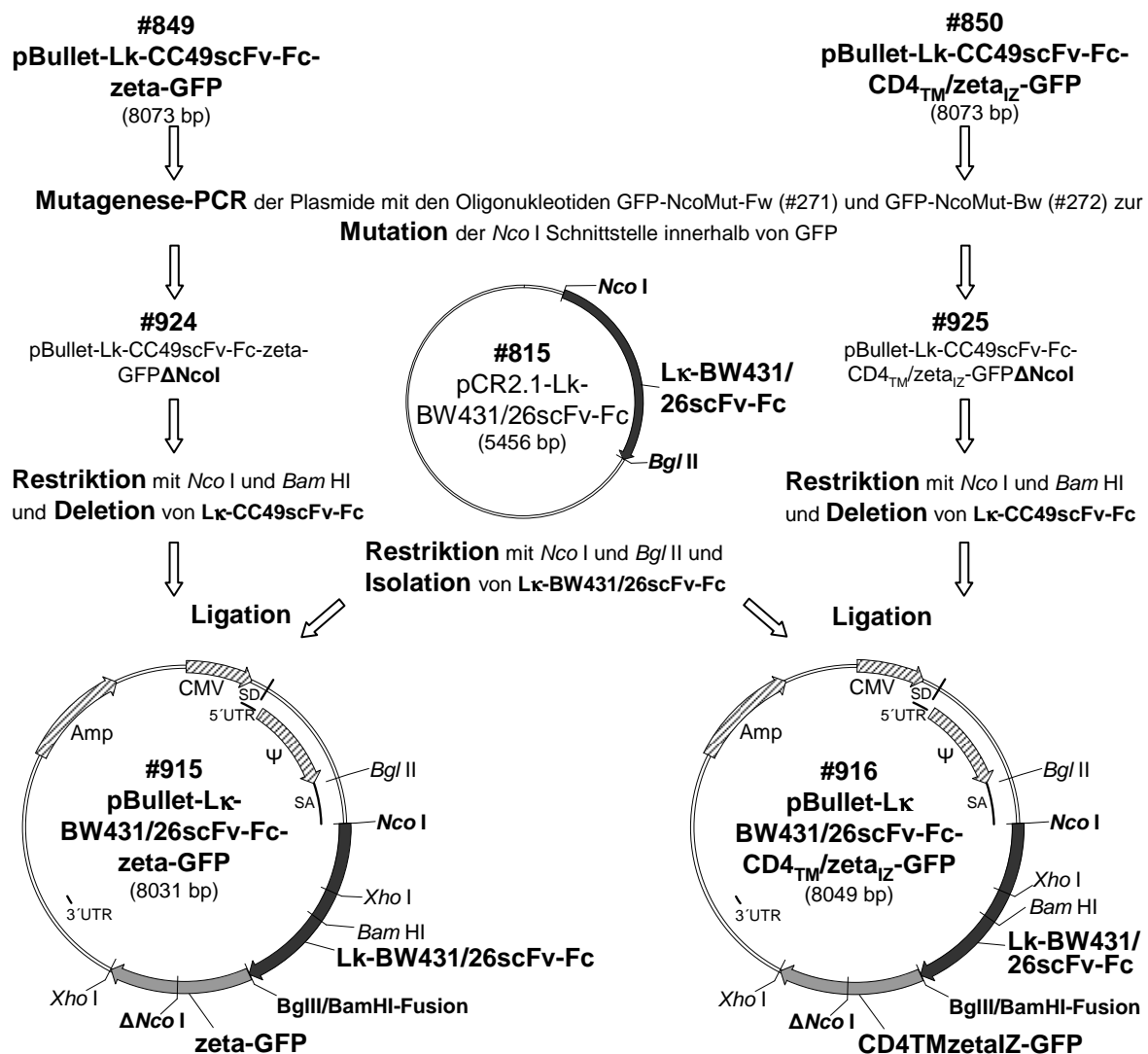


Abbildung 3.5: Klonierungsschema der anti-CEA Rezeptoren #915 und #916 mit terminalem eGFP.

Mit Hilfe einer Kolonie-PCR wurden Klone mit dem BW431/26scFv-spezifischen Oligonukleotid CEA5'XbaI (#26) und dem Oligonukleotid SeqFcAS (#76), das innerhalb des Fc-Teils bindet, überprüft. Aus Klonen, in denen sich ein BW431/26scFv-Fc Fragment der erwarteten Länge amplifizieren ließ, wurde die Plasmid-DNA isoliert und die Rezeptoren vollständig sequenziert. Die vollständigen DNA- und Aminosäuresequenzen der Rezeptoren #915 pBullet-BW431/26scFv-Fc-zeta-eGFP und #916 pBullet-BW431/scFv-Fc-CD4TM/zetaIZ-eGFP sind im Anhang 5.2.1 und 5.2.2 dargestellt.

3.1.4 Expression von anti-CEA-eGFP Immunrezeptoren in 293T-Zellen

Zur Expression der generierten anti-CEA Immunrezeptoren BW431/26scFv-Fc-zeta-eGFP (#915) und BW431/26scFv-Fc-CD4TM/zetaIZ-eGFP (#916) wurde die jeweilige Plasmid-DNA in 293T Zellen transfiziert. Mit Hilfe der FACS-Analyse wurde die Expression der grün fluoreszierenden Rezeptoren im Fluoreszenzkanal 1 (525 nm) überprüft. Der Nachweis der rekombinanten Rezeptoren auf der Oberfläche transfizierter 293T Zellen erfolgte mit einem PE-konjugierten anti-human IgG Antikörper, der an die extrazelluläre Fc-Domäne der Rezeptoren bindet.

Abbildung 3.6 demonstriert durch GFP⁺ und anti-IgG⁺ zweifach markierte Zellpopulationen, dass der anti-CEA Immunrezeptor und GFP in den #915 und #916 transfizierten 293T Zellen koexprimiert werden. Durch die Fusion mit GFP wird mit hoher Effizienz eine Eigenfluoreszenz der Rezeptoren erreicht. Nicht transfizierte 293T Zellen zeigen weder Oberflächenrezeptoren noch durch GFP vermittelte Fluoreszenz.

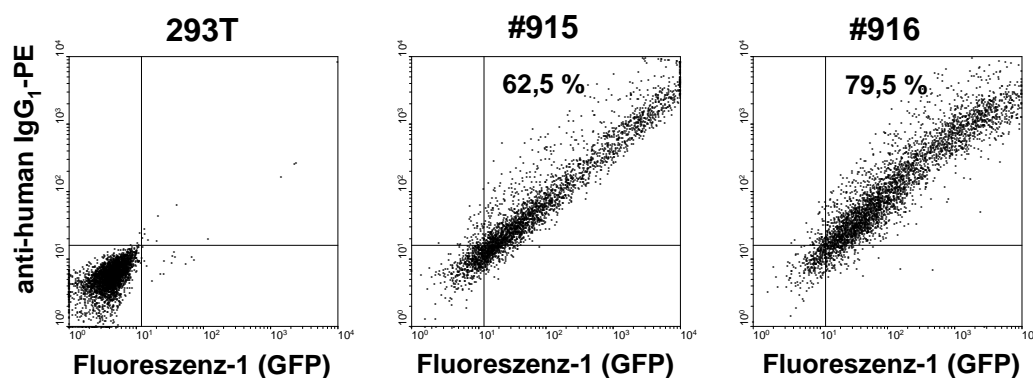


Abbildung 3.6: FACS-Analysen zum Nachweis der Expression der anti-CEA Rezeptoren #915 und #916 mit GFP auf der Oberfläche transfizierter 293T Zellen. Je 2×10^5 293T Zellen wurden mit der Rezeptor-DNA #915 BW431/26scFv-Fc-zeta-eGFP oder #916 BW431/26scFv-Fc-CD4TM/zetaIZ-eGFP transfiziert. Zur Kontrolle dienten nicht transfizierte 293T Zellen. Die Zellen wurden mit PE-konjugiertem anti-human IgG Antikörper inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Der prozentuale Anteil Rezeptor exprimierender und durch GFP fluoreszierender Zellen ist im oberen rechten Quadranten angegeben.

3.2 Funktionalitätsanalyse der rekombinanten Immunrezeptoren mit fusioniertem GFP

Nachdem Immunrezeptoren durch terminale Insertion von GFP innerhalb der Zellmembran direkt markiert werden, sollte im weiteren Verlauf durch *in vitro* Analysen die Funktionalität der GFP-fusionierten Rezeptoren in T-Lymphozyten überprüft werden. Dazu wurden die fluoreszierenden anti-TAG72 Rezeptoren #849 und #850 und anti-CEA Rezeptoren #915 und #916 mit unterschiedlicher Transmembranregion und terminal fusioniertem GFP in T-Lymphozyten exprimiert und die T-Zellaktivierung nach Antigenbindung untersucht.

3.2.1 Expression von anti-TAG72-eGFP und anti-CEA-eGFP Immunrezeptoren in humanen T-Lymphozyten

Die anti-TAG72 Rezeptoren CC49scFv-Fc-zeta (#435), CC49scFv-Fc-zeta-eGFP (#849) und CC49scFv-Fc-CD4TM/zetaIZ-eGFP (#850), sowie die anti-CEA Rezeptoren BW431/26scFv-Fc-zeta-eGFP (#915) und BW431/26scFv-Fc-CD4TM/zetaIZ-eGFP (#916) wurden mit Hilfe des retroviralen Gentransfers in humanen T-Lymphozyten exprimiert.

Zur Produktion von replikationsdefizienten Viruspartikeln wurde die retrovirale Plasmid-DNA der Rezeptoren zusammen mit den Helferplasmiden pHit60 (#392) und pColt-GALV (#393) in 293T Zellen kotransfiziert. Nach 48 Stunden wurden stimulierte T-Lymphozyten mit den Virusproduzenten koinkubiert, um die T-Zellen mit den amphiotrophen Retroviren zu infizieren. Die T-Lymphozyten wurden nach 48 Stunden Kokultur in Gegenwart von IL-2 auf eine Expression der Rezeptoren mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Die Expression des #435 Rezeptors CC49scFv-Fc-zeta in T-Zellen wurde mit einem FITC-konjugierten anti-human IgG Antikörper und dem PE-konjugierten anti-human CD3 Antikörper gezeigt. Der Nachweis der Rezeptorkonstrukte #849, #850, #915 und #916 erfolgte durch GFP-Fluoreszenz der Rezeptoren. Als Kontrolle dienten nicht transduzierte T-Zellen desselben Spenders (Abbildung 3.7).

Die FACS-Analysen weisen die Expression der rekombinanten Rezeptoren in T-Lymphozyten auf der Oberfläche oder durch GFP-Fluoreszenz des Rezeptors nach. Nicht transduzierte T-Zellen werden durch den PE-konjugierten anti-human CD3 Antikörper erkannt, tragen jedoch keine rekombinanten Rezeptoren auf ihrer Oberfläche.

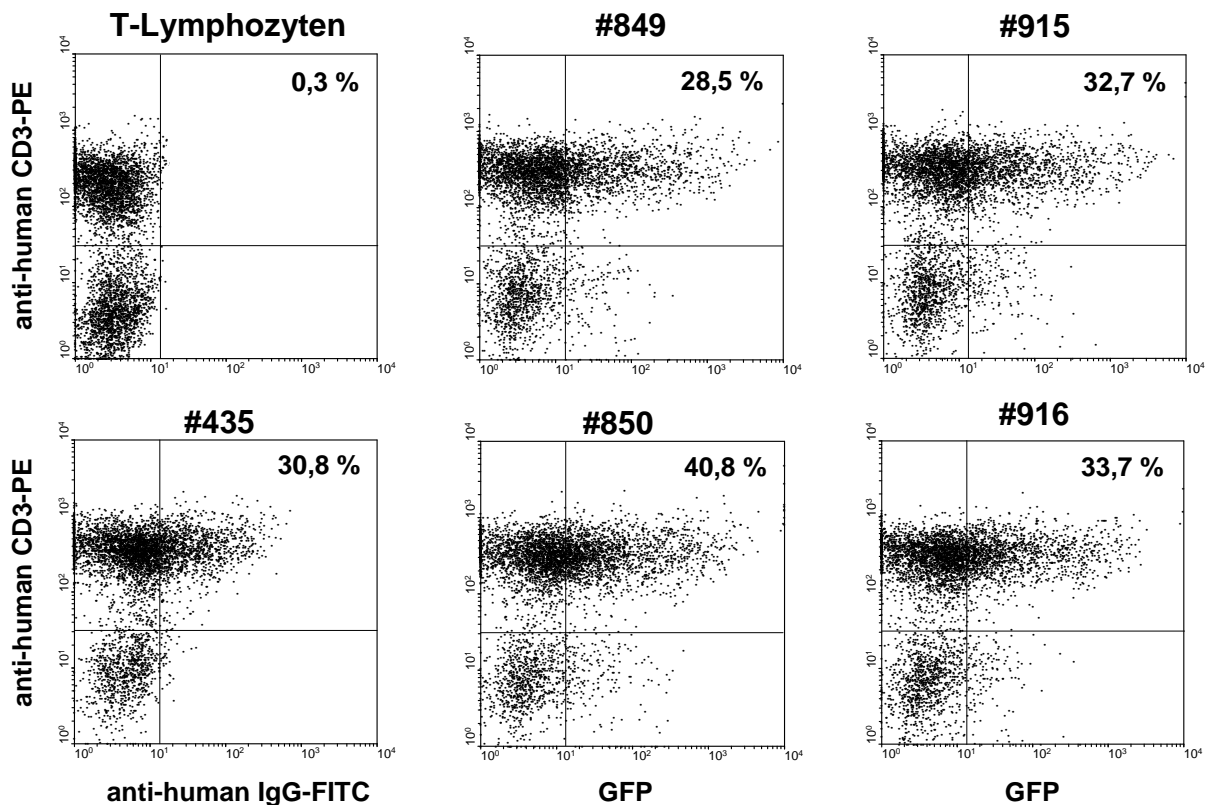


Abbildung 3.7: FACS-Analysen zum Nachweis der Expression der anti-TAG72 und anti-CEA Rezeptoren mit GFP auf der Oberfläche von T-Lymphozyten. Je 1×10^6 periphere Blutlymphozyten (PBL) wurden retroviral zur Expression der anti-TAG72 Rezeptoren #435 CC49scFv-Fc-zeta, #849 CC49scFv-Fc-zeta-eGFP, #850 CC49scFv-Fc-CD4TM/zetaIz-eGFP, sowie der anti-CEA Rezeptoren #915 BW431/26scFv-Fc-zeta-eGFP und #916 BW431/26scFv-Fc-CD4TM/zetaIz-eGFP transduziert. Nach 48 Stunden der zur Infektion dienenden Kokultur wurde die Expression der rekombinanten Rezeptoren auf der Oberfläche der T-Zellen analysiert. Dazu wurden die transduzierten und zum Vergleich nicht transduzierte T-Lymphozyten mit dem PE-konjugierten anti-human CD3 Antikörper inkubiert und der Rezeptor durch GFP-Fluoreszenz oder durch FITC-konjugierten anti-human IgG Antikörper markiert. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Der prozentuale Anteil rezeptortragender T-Lymphozyten von der Gesamtzahl ist im oberen rechten Quadranten angegeben.

3.2.2 Analyse der Funktion von $CD3^+$ T-Zellen mit GFP-Fusionsrezeptor nach Antigenbindung

In den folgenden Experimenten wurde geprüft, ob T-Zellen mit C-terminalem GFP-Fusionsrezeptor weiterhin aktivierbar sind. Als Indikator für die T-Zellaktivierung wurde zunächst die Proliferation (a) und die $IFN-\gamma$ Sekretion (b) rezeptortragender T-Zellen nach Kreuzvernetzung durch immobilisiertes Antigen bestimmt. Weiterhin wurde die Aktivierung der T-Zellen zur spezifischen Zytolyse von Tumorzellen (c) mittels GFP-Fusionsrezeptoren im Vergleich zu Immunrezeptoren ohne GFP Domäne ermittelt.

Mikrotiterplatten wurden mit Rindermuzin TypI-S (*Bovine Submaxillary Mucin*, BSM), das TAG72-Antigendeterminanten enthält, oder als Kontrolle mit Schweinemuzin TypII beschichtet. Transduzierte $CD3^+$ T-Lymphozyten mit den Rezeptoren CC49scFv-Fc-zeta (#435), CC49scFv-Fc-zeta-eGFP (#849) und CC49scFv-Fc-CD4TM/zetaIz-eGFP (#850) sowie nicht trans-

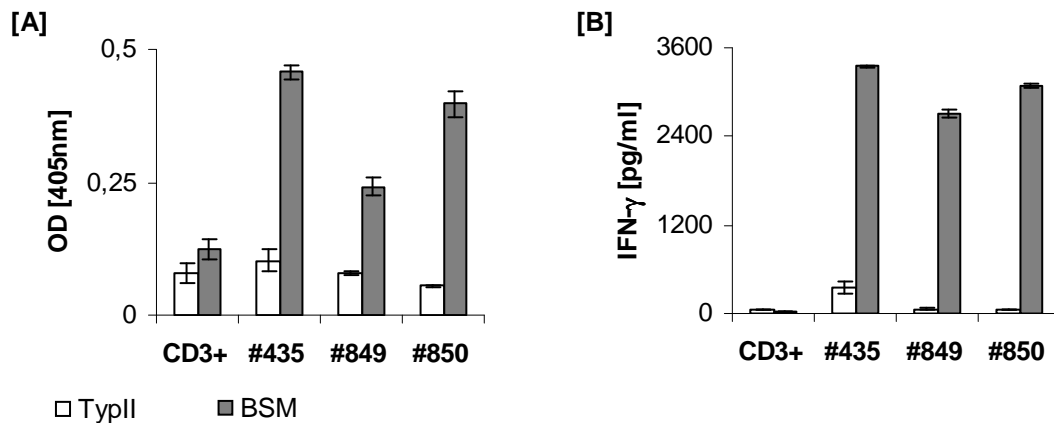


Abbildung 3.8: Proliferation und IFN- γ Sekretion von CD3⁺ T-Zellen mit rekombinanten anti-TAG72 Immunrezeptoren nach Antigenbindung. Je 1×10^6 CD3⁺ T-Zellen wurden retroviral zur Expression der Rezeptoren #435 CC49scFv-Fc-zeta, #849 CC49scFv-Fc-zeta-eGFP und #850 CC49scFv-Fc-CD4TM/zetaIZ-eGFP transduziert und je 2×10^4 transduzierte oder untransduzierte Zellen auf BSM oder Typ II (je $1 \mu\text{g/ml}$) beschichteten Mikrotiterplatten ausgesät. Nach 48 Stunden wurde die Proliferation der T-Zellen mit Hilfe eines BrdU-ELISA bestimmt (A), und mittels ELISA die IFN- γ Sekretion in den Kulturüberstand ermittelt (B). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus Dreifachansätzen \pm Standardabweichung.

duzierte CD3⁺ Zellen wurden auf den beschichteten Mikrotiterplatten kultiviert. Nach 48 Stunden wurde die Zellproliferation durch Inkorporation von BrdU in die DNA während der Replikation untersucht. Der Nachweis erfolgte mit einem Peroxidase-konjugierten anti-BrdU Antikörper. Zusätzlich wurde die IFN- γ Sekretion der T-Zellen in den Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt (Abbildung 3.8).

CD3⁺ Zellen mit anti-TAG72 Rezeptor wurden durch Bindung an BSM zur Proliferation und IFN γ Sekretion induziert, nicht jedoch durch das immobilisierte Typ II Muzin. Dabei wurden Lymphozyten mit dem Ausgangsrezeptor #435 CC49scFv-Fc-zeta stärker aktiviert als T-Zellen mit den GFP-fusionierten Rezeptoren #849 und #850. T-Zellen ohne Rezeptor zeigten keine induzierte Zellproliferation oder IFN- γ Sekretion.

Hier wird gezeigt, dass T-Zellen mit den anti-TAG72 Rezeptoren #435, #849 und #850 nach Antigenbindung spezifisch zu Proliferation und IFN- γ Sekretion aktiviert werden. Dabei führt die C-terminale Fusion von GFP zu einer Beeinträchtigung der T-Zellaktivierung. Dieser Effekt wird offenbar teilweise durch die stabilisierende CD4 Transmembranregion des Rezeptors #850 kompensiert, da dieser im Vergleich zu #849 zu stärkerer Proliferation und IFN- γ Sekretion führt.

In weiteren Experimenten wurde die Aktivierung von CD3⁺ T-Lymphozyten mit GFP-Fusionsrezeptoren zur antigenspezifischen Zytolyse von Tumorzellen untersucht. Dazu wurden CD3⁺ T-Zellen retroviral zur Expression des anti-TAG72 Rezeptors CC49scFv-Fc-zeta (#435) und dessen Derivaten mit C-terminal fusioniertem GFP CC49scFv-Fc-zeta-eGFP (#849) und CC49scFv-Fc-CD4TM/zetaIZ-eGFP (#850) transduziert. Zusätzlich wurden die analog konfigurierten Rezeptoren der Spezifität gegen CEA BW431/26scFv-Fc-zeta (#700), BW431/26scFv-

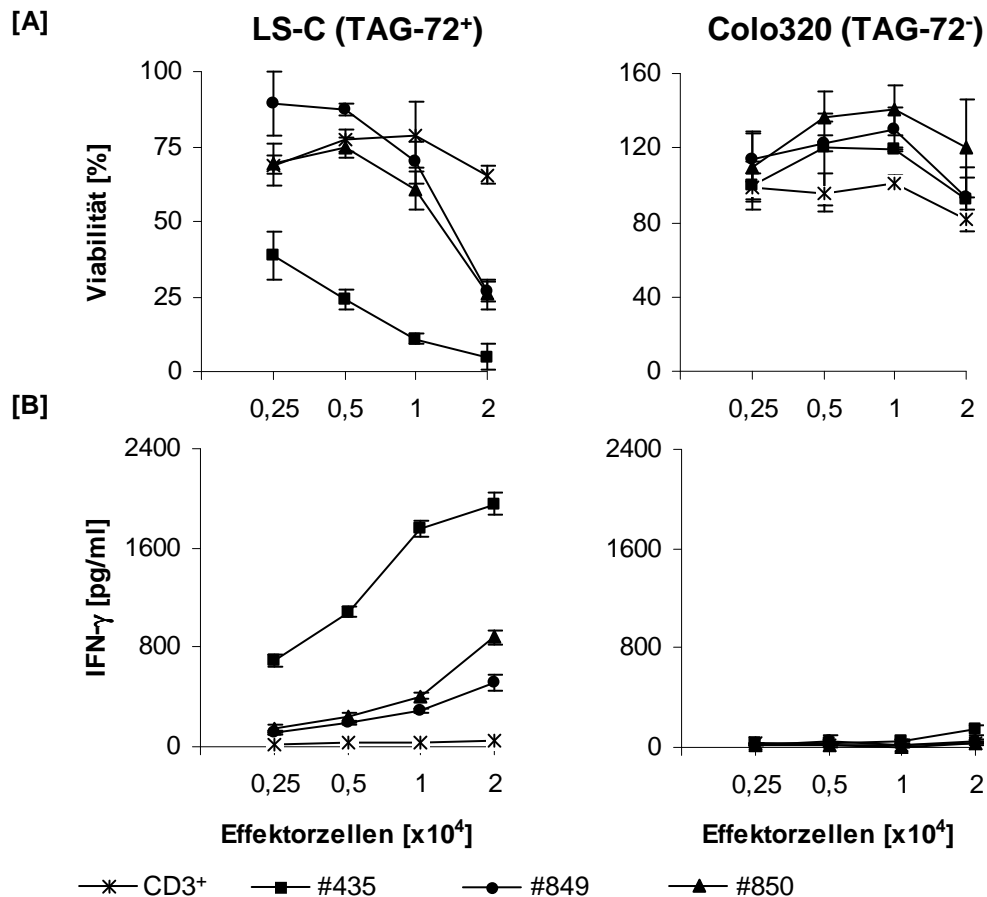


Abbildung 3.9: Aktivierung von CD3⁺ T-Zellen mit anti-TAG72-eGFP Rezeptoren bei Kokultivierung mit Antigen-positiven Tumorzellen. Je 1×10^6 CD3⁺ Lymphozyten wurden retroviral mit den Rezeptoren #435 CC49scFv-Fc-zeta, #849 CC49scFv-Fc-zeta-eGFP und #850 CC49scFv-Fc-CD4TM/zetaIZ-eGFP transduziert und die Expressionseffizienz der Rezeptoren durch FACS-Analyse bestimmt. In einer Verdünnungsreihe wurden rezeptorexprimierende und nicht transduzierte T-Zellen ($0,25$ – 2×10^4) mit je 5×10^4 TAG72⁺ LS-C oder TAG72⁻ Colo320 Tumorzellen auf Mikrotiterplatten kokultiviert. Nach 48 Stunden wurde die Viabilität der Tumorzellen durch Umsetzung des XTT-Substrates bestimmt (A) und die IFN- γ Konzentration der Kulturüberstände in einem ELISA ermittelt (B). Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachansätzen \pm Standardabweichung.

Fc-zeta-eGFP (#915) und BW431/26scFv-Fc-CD4TM/zetaIZ-eGFP (#916) retroviral in CD3⁺ T-Lymphozyten transduziert. Die anti-TAG72 rezeptortragenden Zellen #435, #849 und #850, sowie nicht transduzierte Zellen wurden mit TAG72⁺ LS-C Tumorzellen und zum Vergleich mit TAG72⁻ Colo320 Tumorzellen für 48 Stunden kokultiviert. Zur Aktivierung der CEA-spezifischen T-Zellen wurden #700, #915 und #916 transduzierte und nicht transduzierte T-Zellen mit CEA⁺ LS174T Tumorzellen und zum Vergleich mit CEA⁻ Colo320 Tumorzellen kokultiviert. Im Anschluss an die Kokultivierung wurde jeweils die Viabilität der Tumorzellen als Maß für die rezeptorvermittelte Zytolyse, und die IFN- γ Konzentration im Kulturüberstand mit Hilfe eines ELISA ermittelt (Abbildung 3.9 und 3.10).

Die anti-TAG72 rezeptortragenden T-Zellen #435, #849 und #850 vermitteln eine dosisabhängige spezifische Zytolyse der TAG72⁺ LS-C Tumorzellen. Die Antgenspezifität der rezeptorvermittelten Zytolyse wird dadurch demonstriert, dass die TAG72-spezifischen Lymphozyten

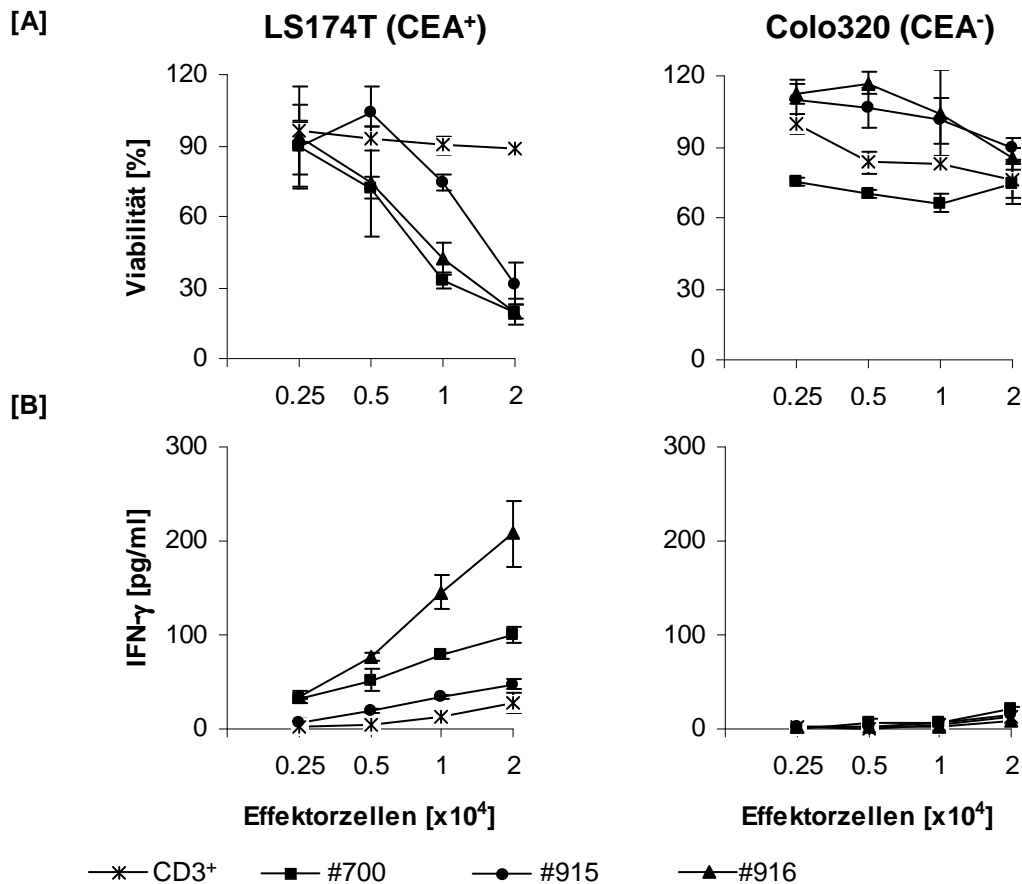


Abbildung 3.10: Aktivierung von CD3⁺ T-Zellen mit anti-CEA-eGFP Rezeptoren bei Kokultivierung mit Antigen-positiven Tumorzellen. Je 1×10^6 CD3⁺ Lymphozyten wurden retroviral mit den Rezeptoren #700 BW431/26scFv-Fc-zeta, #915 BW431/26scFv-Fc-zeta-eGFP und #916 BW431/26scFv-Fc-CD4TM/zetaI-eGFP transduziert und die Expressionseffizienz der Rezeptoren durch FACS-Analyse bestimmt. In einer Verdünnungsreihe wurden rezeptorexprimierende und nicht transduzierte T-Zellen ($0,25$ – 2×10^4) mit je 5×10^4 CEA⁺ LS174T oder CEA⁻ Colo320 Tumorzellen auf Mikrotiterplatten kokultiviert. Nach 48 Stunden wurde die Viabilität der Tumorzellen durch Umsetzung des XTT-Substrates bestimmt (A) und die IFN- γ Konzentration der Kulturüberstände in einem ELISA ermittelt (B). Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachansätzen \pm Standardabweichung.

keine zytolytische Aktivität gegenüber TAG72⁻ Colo320 Kontrollzellen zeigen. T-Zellen ohne Rezeptor zeigten keine Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen mit oder ohne TAG72 Antigen. Gleichzeitig sezernierten die T-Zellen mit anti-TAG72 Rezeptor in Abhängigkeit von der Effektorzellzahl nach Koinkubation mit TAG72⁺ LS-C Tumorzellen und nicht TAG72⁻ Colo320 Zellen spezifisch IFN- γ . Die rezeptorvermittelte T-Zellaktivierung zur Zytolyse von Tumorzellen und IFN- γ Sekretion war mit den GFP-Fusionsrezeptoren #849 und #850 gegenüber dem Rezeptor #435 ohne GFP reduziert. Dies ist vermutlich auf die C-terminale Fusion der GFP Domäne zurückzuführen.

T-Lymphozyten mit den anti-CEA Rezeptoren #700, #915 und #916 zeigten nach Koinkubation mit CEA⁺ LS174T Tumorzellen eine durch die rezeptortragenden T-Zellen vermittelte spezifische Zelllyse, sowie mit den Effektorzellzahlen zunehmende IFN- γ Sekretion. Die Koinkubation mit CEA⁻ Colo320 Tumorzellen führte dagegen weder zur Zelllyse noch IFN- γ

Sekretion in den Kulturüberstand. CD3⁺ T-Zellen ohne Rezeptor wurden weder durch CEA⁺ noch CEA⁻ Tumorzellen zur Zytolyse aktiviert. Der Vergleich der Rezeptoren untereinander zeigte eine Beeinträchtigung der Funktion des Rezeptors #915 durch die C-terminale Fusion mit GFP. Der GFP-Fusionsrezeptor #916 mit stabilisierender CD4-Transmembrandomäne führte dagegen zu vergleichbarer Zytotoxizität und gesteigerter IFN- γ Sekretion gegenüber dem #700 Rezeptor ohne GFP Domäne.

Die Funktionsanalysen (a)–(c) zeigen, dass die anti-TAG72 Rezeptoren #849 und #850 und anti-CEA Rezeptoren #915 und #916 mit C-terminal fusioniertem GFP funktional sind, da rezeptortragende T-Zellen nach Antigenbindung spezifisch zur Proliferation induziert werden, IFN- γ sezernieren und antigenspezifische Zytotoxizität vermitteln. Die T-Zellaktivierung ist spezifisch, da nur Antigen⁺ und nicht Antigen⁻ Tumorzellen zur rezeptorvermittelten Zytolyse führen. Eine z.T. geringere Effektivität der Rezeptoren nach C-terminaler GFP-Fusion wird durch Einführung der stabilisierenden CD4 Transmembranregion kompensiert. Die GFP-Fusionsrezeptoren vermitteln die spezifische T-Zellaktivierung und sind damit für visuelle Untersuchungen zur Ausbildung von Rezeptorclustern mit Hilfe des Laser Scan Mikroskops verwendbar.

3.3 Visualisierung der Interaktion membrangebundener GFP-Fusionsrezeptoren auf der Oberfläche von CD3⁺ T-Zellen nach Antigenbindung

Die Ausbildung von Rezeptorclustern nach Antigenbindung stellt die Voraussetzung zur spezifischen T-Zellaktivierung dar. Der dynamische Prozess der Antigenerkennung und T-Zellaktivierung durch die Ausbildung von Microclustern und der immunologischen Synapse des endogenen T-Zellrezeptors sind gut untersucht (Abbas *et al.*, 2007). Da auch rekombinante Immunrezeptoren mit nur einer einfachen Polypeptidkette die T-Zellaktivierung vermitteln, ist anzunehmen, dass auch diese durch initiale Clusterbildung nach Antigenkontakt erfolgt. Um Clusterstrukturen rekombinanter Immunrezeptoren visuell nachzuweisen, wurde der anti-CEA-eGFP Rezeptor #916 BW431/26scFv-Fc-CD4TM/zetaIZ-eGFP auf der Zelloberfläche von CD3⁺ T-Zellen exprimiert und die vitalen Zellen mit Hilfe der Laser Scan Mikroskopie (LSM) untersucht. Um eine Aggregation der Rezeptormoleküle in der Zellmembran sichtbar zu machen, wurden Zeitserien der T-Zellen in Gegenwart von quervernetztem löslichen Antigen einerseits, und in Kokultur mit CEA⁺ oder CEA⁻ Tumorzellen andererseits, aufgenommen.

3.3.1 Clusterbildung von anti-CEA-eGFP Rezeptoren auf der Oberfläche von CD3⁺ T-Zellen durch Antigenbindung

Es sollte geprüft werden, ob die Ausbildung von Rezeptorclustern innerhalb der Zellmembran von CD3⁺ T-Lymphozyten durch die Bindung von anti-CEA-GFP Rezeptoren an Antigen mit Hilfe mikroskopischer Analyse zeitauflösend visualisiert werden kann.

Dazu wurden CD3⁺ T-Zellen retroviral zur Expression des anti-CEA-GFP Rezeptors #916 BW431/26scFv-Fc-CD4TM/zetaIZ-eGFP transduziert. Die Frequenz rezeptorexprimierender Zellen wurde durchflusszytometrisch anhand des Anteils GFP-fluoreszierender Zellen ermittelt. Mit einer Frequenz von mindestens 30 % wurden rezeptortragende T-Zellen auf Deckglas-Mikroskopierschälchen ausplattiert. Die CD3⁺ T-Zellen wurden mit anti-idiotypischem Antikörper BW2064/36 mit Spezifität für die CEA-Bindedomäne des Rezeptors und anti-mIgG₁ Sekundärantikörper versetzt. Zur Kontrolle wurde in einem Ansatz der Isotyp-Antikörper mIgG₁ in Kombination mit dem anti-mIgG₁ Antikörper eingesetzt. In jeweils 1 Minute Abstand wurden Bilder der fluoreszierenden T-Zellen mit GFP-Fusionsrezeptor im grünen Kanal (505–530 nm) des Laser Scan Mikroskops aufgenommen (Abbildung 3.11).

Wie in Abbildung 3.11 dargestellt, zeigten die fluoreszierenden T-Zellen mit GFP-Fusionsrezeptor in Gegenwart von anti-idiotypischem BW2064/36 Antikörper und anti-mIgG₁ Sekundärantikörper nach 12 Minuten Inkubation eine deutliche Clusterbildung in der Zellmembran. Im Vergleich dazu zeigten Zellen der Isotyp-Kontrolle eine homogene Fluoreszenzverteilung.

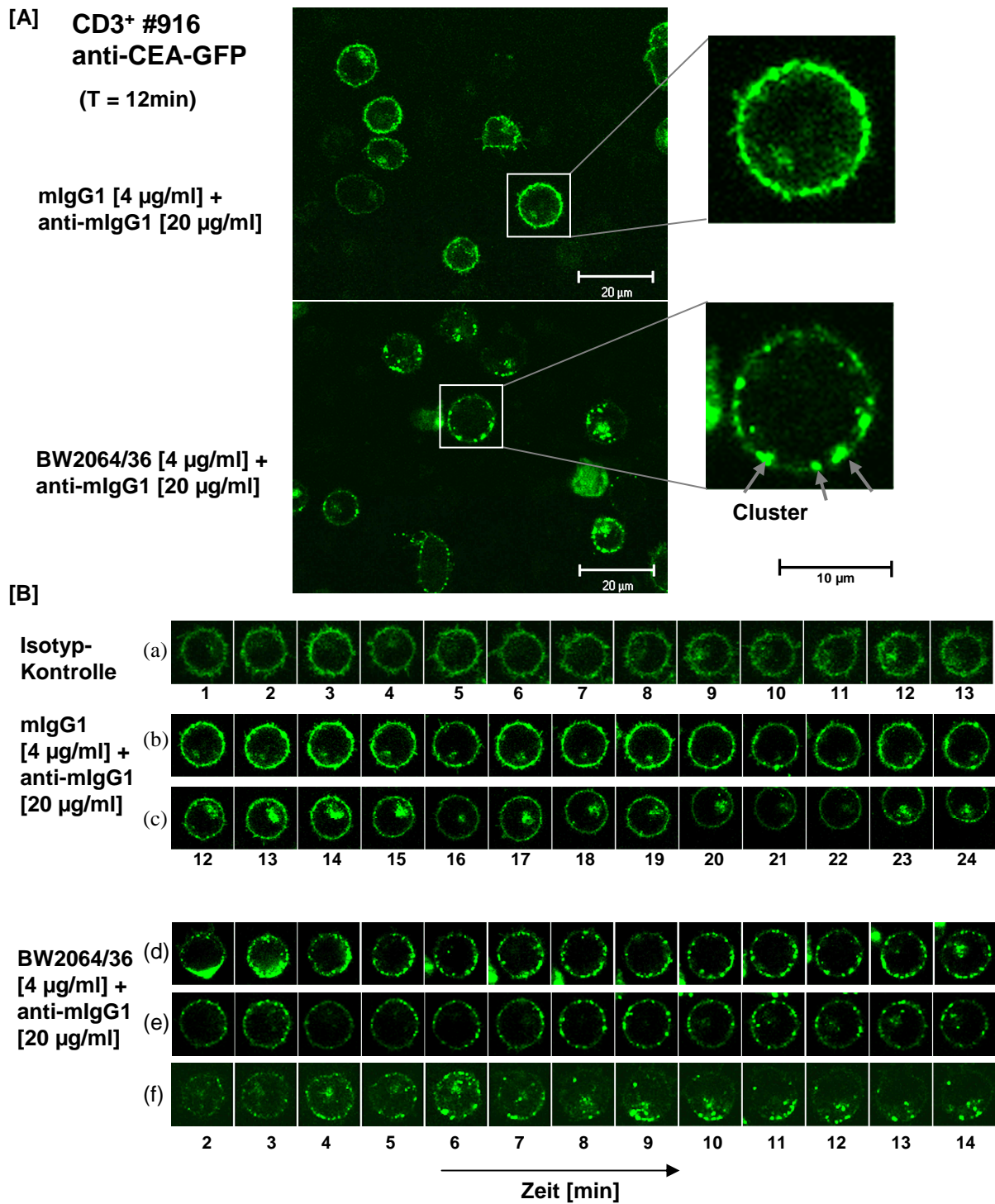


Abbildung 3.11: Analyse der Clusterbildung von anti-CEA-eGFP Rezeptoren auf der Oberfläche von CD3⁺ T-Zellen. Je 4×10^6 CD3⁺ T-Zellen wurden retroviral zur Expression des Rezeptors #916 BW431/26scFv-Fc-CD4TM/zetaIz-eGFP transduziert. Die Zellen wurden mit 1×10^6 Zellen in $200 \mu\text{l}$ Medium auf Deckglas-Schälchen ausplattiert, mit anti-idiotypischem Antikörper BW2064/36 gegen die CEA-Bindedomäne, oder mlgG₁ Isotyp-Antikörper (je $4 \mu\text{g/ml}$) mit anti-mlgG₁ Sekundärantikörper ($20 \mu\text{g/ml}$) versetzt. Im LSM wurden mit einem Ölimmersionsobjektiv (63x) im Abstand von je 1 Minute Zeitserienbilder im grünen Kanal (505–530 nm) aufgenommen. **A:** Dargestellt ist die Aufnahme zum Zeitpunkt T = 12 min mit Vergrößerung einer Einzelzelle. **B:** Zeitserienaufnahmen einzelner Zellen ((a)–(f)) im Minutenabstand.

Die Zeitserien einzelner Zellen in Abbildung 3.11 B zeigen, dass die Ausbildung von Rezeptorclustern bereits wenige Minuten nach Zugabe der quervernetzenden Antikörper eintritt. Die Zellen der Isotyp-Kontrolle zeigten ebenfalls wenige Stellen akkumulierter Fluoreszenz, insgesamt jedoch eine gleichmäßigere Verteilung der Rezeptor-GFP Moleküle in der Zellmembran als mit quervernetzten Rezeptoren.

Hier wird gezeigt, dass die Bindung rekombinanter anti-CEA Immunrezeptoren mit durch den anti-idiotypischen Antikörper BW2064/36 nach Komplexierung durch den anti-IgG₁ Antikörper zur Clusterbildung führt. Der Zeitraum bis zur Ausbildung von deutlichen Rezeptorclustern beträgt etwa 4–6 Minuten.

3.3.2 Aggregation von anti-CEA-eGFP Rezeptoren auf der Oberfläche von CD3⁺ T-Zellen nach Koinkubation mit Tumorzellen

In diesem Abschnitt soll die Interaktion von anti-CEA-eGFP Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Lymphozyten mit Antigen⁺ Tumorzellen mikroskopisch analysiert werden. Dies erfordert die eindeutige Identifizierung der kokultivierten T-Lymphozyten und Tumorzellen.

Zur Markierung der Tumorzellen wurde das rot fluoreszierende Protein DSred zur cytoplasmatischen Expression in CEA⁺ LS174T und CEA⁻ Colo320 Tumorzellen eingebracht. Dazu wurde das Plasmid #934 pDSred in LS174T und Colo320 Tumorzellen transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in G418 (Geneticin[®]) haltiges Selektionsmedium überführt, und auf Mikrotiterplatten verteilt. Innerhalb von 3–4 Wochen wurden einzeln wachsende Zellklone isoliert und die stabile Expression von DSred durchflusszytometrisch nachgewiesen (Abbildung 3.12). Es wurden rot fluoreszierende Derivate der CEA⁺ LS174T und CEA⁻ Colo320 Tumorzellen mit G418 Resistenz und Expression von DSred generiert. Mit Hilfe von DSred sind die Tumorzellen identifizierbar, so dass der Zellkontakt von T-Zellen und Tumorzellen mikroskopisch dargestellt werden kann.

Zur mikroskopischen Analyse wurden CD3⁺ T-Zellen retroviral zur Expression des anti-CEA-eGFP Rezeptors BW431/26scFv-Fc-CD4TM/zetaIZ-eGFP (#916) transduziert und nach 48 Stunden die Frequenz rezeptortragender T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die rot fluoreszierenden LS174T oder Colo320 Tumorzellen wurden zur Adhärenz auf Deckglas-Schälchen für 24 Stunden inkubiert. Die CD3⁺ T-Zellen mit GFP-Fusionsrezeptor wurden zu den Tumorzellen gegeben und Zeitserien im Minutenabstand aufgenommen, wobei die Zellen jeweils im grünen (505–530 nm) und roten (560 nm) Fluoreszenzbereich gescannt wurden. Die koinkubierten Zellen wurden über einen Zeitraum von 60–80 Minuten erfasst.

Abbildung 3.13 A zeigt exemplarisch jeweils eine größere Übersichtsaufnahme der koinkubierten roten LS174T oder Colo320 Tumorzellen mit den grün markierten CEA-spezifischen

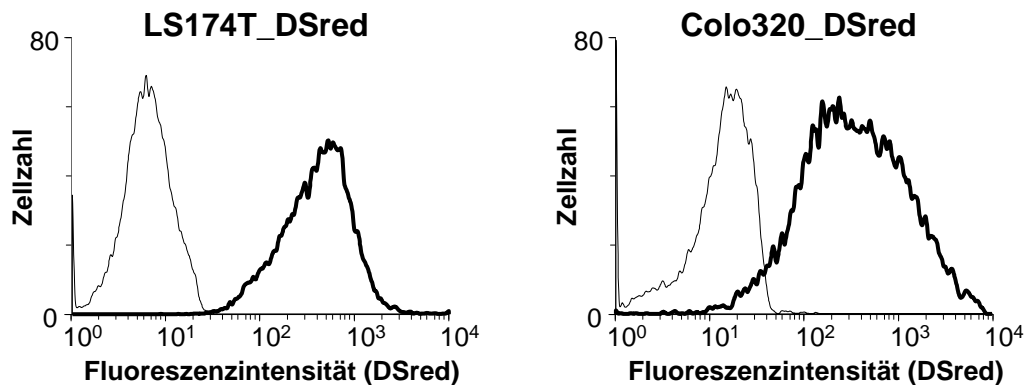


Abbildung 3.12: FACS-Analyse zum Nachweis der stabilen Expression von DSred in CEA⁺ LS174T und CEA⁻ Colo320 Tumorzellen. Je 1×10^5 LS174T oder Colo320 Tumorzellen wurden mit der Plasmid-DNA #934 pDSred transfiziert und nach 24 Stunden in G418-haltiges RPMI 1640 Medium (2 mg/ml) auf Mikrotiterplatten verteilt. Nach 4 Wochen Selektion und Zellexpansion wurden stabile rot fluoreszierende Zellklone durchflusszytometrisch im PE-Kanal identifiziert. Dargestellt sind die übereinandergelegten Histogramme der rot fluoreszierenden Zelllinienderivate (breite Linien) mit den nicht transfizierten Tumorzellen (schmale Linien).

CD3⁺ T-Zellen nach einigen Minuten Inkubation. Zu erkennen ist, dass die T-Zellen vermehrt zu CEA⁺ LS174T Zellen, und nicht zu den CEA⁻ Colo320 Zellen Kontakt aufnehmen. An verschiedenen Kontaktstellen ist eine Akkumulation der GFP-Fluoreszenz zu erkennen, die durch Aggregation der Rezeptormoleküle durch das membranständige Antigen auf der Oberfläche der Tumorzellen hervorgerufen wird. Die Cap-Struktur der Rezeptoren von CEA-spezifischen T-Zellen bildet sich innerhalb von einer Minute nach Bindung des Antigens auf der Oberfläche der LS174T Tumorzellen aus (Abbildung 3.13 B). CEA⁻ Colo320 Tumorzellen induzierten dagegen selbst in unmittelbarer Nachbarschaft zu T-Zellen mit Immunrezeptor keine Rezeptoraggregation und vermittelten keinen dauerhaften Zellkontakt.

Dieses Experiment macht auf mikroskopischer Ebene sichtbar, dass anti-CEA Rezeptoren in der Zellmembran von T-Zellen nach Bindung von Antigen⁺ Tumorzellen aggregieren. Dies findet nicht statt bei Antigen⁻ Tumorzellen. Die Zeitserien zeigen, dass der Zeitraum zwischen Kontaktaufnahme der T-Zelle zur Antigen⁺ Tumorzelle und der Ausbildung einer Cap-Struktur weniger als 2 Minuten beträgt.

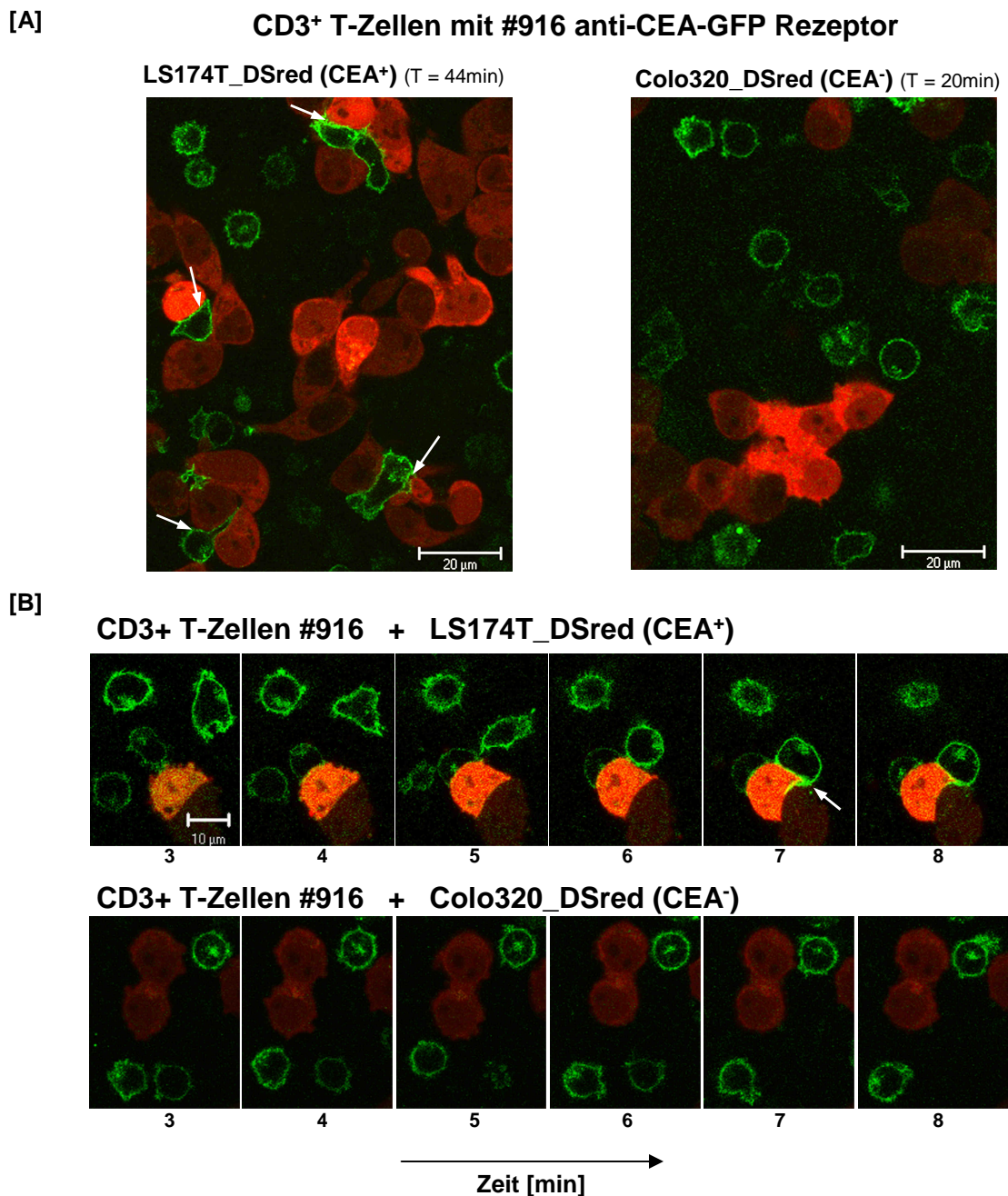


Abbildung 3.13: Analyse der Rezeptoraggregation von anti-CEA-eGFP Rezeptoren auf der Oberfläche von CD3⁺ T-Zellen nach Kontakt mit rot fluoreszierenden CEA⁺ LS174T Tumorzellen. Je 4×10^6 CD3⁺ T-Zellen wurden retroviral zur Expression des Rezeptors #916 BW431/26scFv-Fc-CD4TM/zetaIz-eGFP transduziert. Zur Adhärenz der Tumorzellen wurden je 1×10^6 CEA⁺ LS174T_DSred oder CEA⁻ Colo320_DSred Tumorzellen auf 35mm Deckglas-Schälchen für 24 Stunden inkubiert. Für die Mikroskopie wurde das Medium abgenommen, die Ebene der Tumorzellen fokussiert, und je 1×10^6 anti-CEA-eGFP transduzierte CD3⁺ T-Zellen in 200 μ l Medium zugegeben. Mit einem Ölimmersionsobjektiv (63x) wurden im Minutenabstand konfokale Bilder im grünen (505–530 nm) und roten Kanal (560 nm) des Laser Scan Mikroskops aufgenommen. **A:** Übersichtsaufnahme nach 44 Minuten (LS174T_DSred) und 20 Minuten (Colo320_DSred) Koinkubation. **B:** Ausschnittsaufnahmen der Zeitserie. Die weißen Pfeile zeigen Zellkontaktstellen mit akkumuliertem GFP-Fluoreszenzsignal innerhalb der T-Zellmembran.

3.4 Charakterisierung der humanen T-Zelllinie Jurkat und von Reportergenen für den Einsatz in einem T-Zell-basierten Biosensor

Es soll ein T-Zell basiertes Indikatorsystem generiert werden, das aus den Komponenten rekombinanter Immunrezeptor einerseits und einer sensitiven Indikatorzelle andererseits besteht. Als zellulärer Indikator wurde die humane T-Zelllinie Jurkat gewählt. Die Aktivierung des zellulären Sensors nach Stimulation des Immunrezeptors sollte über die Transkriptionsfaktoren NFAT oder NF κ B erfolgen. Daher wurde zunächst die Funktionalität des entsprechenden Signaltransduktionsweges für die Modellzellen Jurkat überprüft. Anschließend wurden verschiedene Reporter gene unter NFAT oder NF κ B Kontrolle als Signalgeber des Biosensors untersucht.

3.4.1 Charakterisierung der humanen T-Zelllinie Jurkat als Indikatorzelle

Um den T-Zell spezifischen Signaltransduktionsweg von Jurkat Zellen zu überprüfen, wurden zunächst die endogenen Rezeptormoleküle CD3 und CD28 als iniszierender Teil der Signaltransduktion mit Hilfe der FACS-Analyse auf der Zelloberfläche nachgewiesen (Abbildung 3.14 A). Zum Nachweis einer resultierenden Effektorfunktion in Jurkat Zellen nach Aktivierung des Signaltransduktionswegs wurde zusätzlich die Sekretion von IL-2 nach Stimulation durch anti-CD3 und anti-CD28 agonistische Antikörper untersucht. Die Antikörper wurden auf einer ELISA-Platte immobilisiert, mit Jurkat-Zellen für 48 Stunden inkubiert und anschließend die Konzentration von sezerniertem IL-2 im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt (Abbildung 3.14 B).

Sowohl der Kontrollansatz ohne Antikörper als auch die Stimulation durch den anti-CD3 Antikörper OKT3 führte zu keiner IL-2 Sekretion durch die Jurkat Zellen. Die Stimulation mit den kombinierten anti-CD3 Antikörpern OKT3 oder Hit3A mit kostimulatorischen anti-CD28 Antikörpern CD28.2 oder 15E8 ergab einen deutlichen Anstieg der IL-2 Konzentration. Dabei führte der anti-CD28 Antikörper CD28.2 im Vergleich zu 15E8 zu einer stärkeren Aktivierung.

Diese Voruntersuchungen zeigen, dass Jurkat Zellen nach CD3 und CD28 Stimulation IL-2 sezernieren. Dies demonstriert die Funktionalität der endogenen T-Zell spezifischen Signaltransduktion in Jurkat Zellen.

Da im T-Zell basierten Biosensor rekombinante Immunrezeptoren zum Einsatz kommen sollen, wurde zusätzlich die Aktivierung von Jurkat Zellen nach Quervernetzung der Immunrezeptoren untersucht. Dazu wurden Jurkat Zellen zur Expression der anti-CEA Immunrezeptoren BW431/26scFv-Fc-CD28-zeta und BW431/26scFv-Fc-zeta retroviral transduziert. Die Expression der Rezeptoren auf der Oberfläche der Jurkat Zellen wurde mit PE-konjugiertem, anti-human IgG Antikörper durchflusszytometrisch ermittelt. Die transduzierten Jurkat Zellen

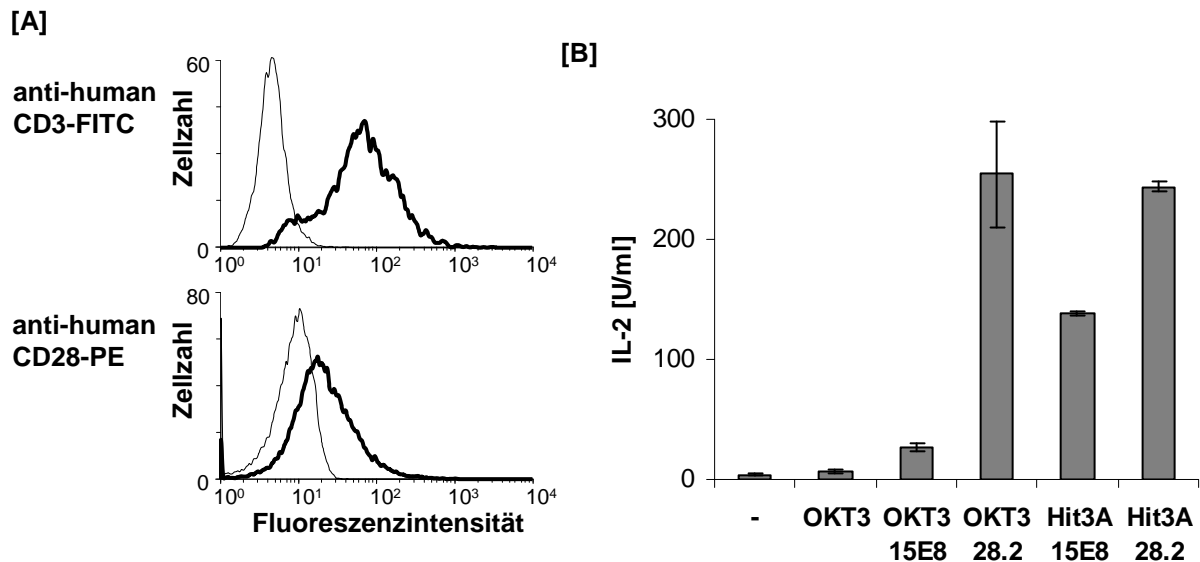


Abbildung 3.14: FACS-Analyse der Expression der T-Zellrezeptormoleküle CD3 und CD28 auf der Oberfläche von Jurkat Zellen und Induktion der IL-2 Sekretion nach Stimulation durch agonistische Antikörper. **A:** Jeweils 1×10^6 Jurkat Zellen wurden mit dem FITC-konjugierten anti-human CD3 Antikörper, einem PE-konjugiertem anti-human CD28 Antikörper, oder einer jeweiligen FITC- oder PE-konjugierten Isotyp-Kontrolle für 30 Minuten inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Die Histogramme der korrespondierenden Isotyp-Kontrolle (schmale Linien) und der mit anti-CD3-FITC oder anti-CD28-PE gefärbten Jurkat Zellen (breite Linien) wurden zum Vergleich übereinandergelegt. **B:** Verschiedene Antikörper mit Spezifität gegen CD3 (OKT3, Hit3A) und gegen CD28 (15E8, CD28.2) wurden auf einer ELISA-Platte immobilisiert [je $2 \mu\text{g/ml}$] und darauf je $1-2 \times 10^5$ Jurkat Zellen pro Vertiefung für 48 Stunden inkubiert. Die IL-2 Konzentration im Kulturüberstand wurde anschließend im ELISA bestimmt. Angegeben ist jeweils der Mittelwert des dreifachen Ansatzes \pm Standardabweichung.

wurden 48 Stunden in Gegenwart von anti-idiotypischem Antikörper BW2064/36, der an die BW431/26scFv Bindedomäne des Immunrezeptors bindet, und steigenden Konzentrationen des quervernetzenden Sekundärantikörpers anti-mIgG₁ inkubiert. Anschließend wurde die IL-2 Konzentration im Kulturüberstand bestimmt (Abbildung 3.15). Mit steigender Konzentration des quervernetzenden Sekundärantikörpers nahm die IL-2 Sekretion rezeptortragender Jurkat Zellen zu.

Dieses Experiment zeigt, dass die Quervernetzung rekombinanter Immunrezeptoren auf der Zelloberfläche von Jurkat Zellen zu antigenspezifischer Sekretion von IL-2 führt.

3.4.2 Generierung von Jurkat-Indikatorzellen mit Reporter genen

Reportergene, in denen T-Zell-spezifische Transkriptionsfaktoren die Expression eines Reporters steuern, wurden hinsichtlich ihrer Indikator-Eigenschaften für die Eignung als Biosensor in der humanen T-Zelllinie Jurkat untersucht. Als Reporter wurden GFP und Luciferase gewählt.

Zwei GFP-Reportergene mit vorgeschalteten Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren NFAT oder NF κ B, NFAT-hrGFP (#822) und NF κ B-hrGFP (#824), wurden mittels Elektroporation in Jurkat Zellen transfiziert. Als Kontrolle diente das Plasmid #852 pEGFP-N1, in

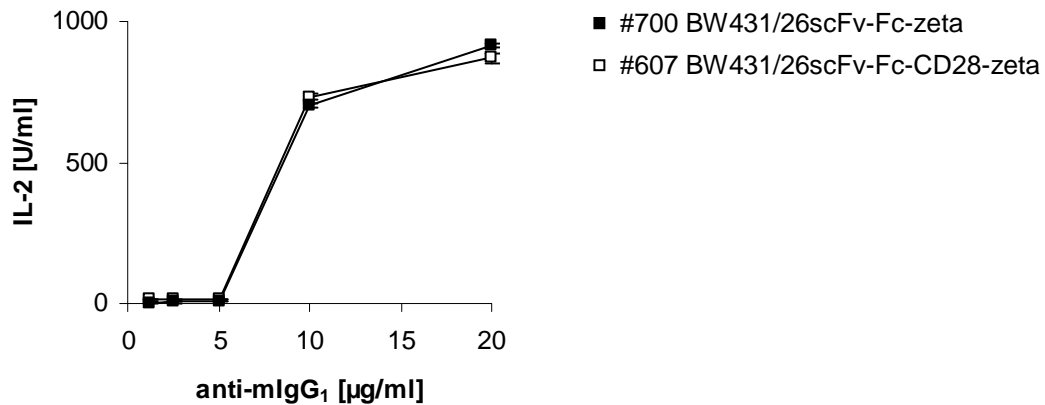


Abbildung 3.15: Jurkat Zellen werden durch Quervernetzung von Immunrezeptoren aktiviert und zur Sekretion von IL-2 angeregt. Je 2×10^4 Jurkat Zellen mit dem Immunrezeptor #700 BW431/26scFv-Fc-zeta oder #607 BW431/26scFv-Fc-CD28-zeta wurden in $200 \mu\text{l}$ RPMI 1640 Medium pro Vertiefung auf einer Mikrotiterplatte in Gegenwart des mIgG₁ Antikörpers BW2064/36 (anti-idiotypischer Antikörper gegen BW431/26scFv) [$2 \mu\text{g/ml}$] und steigenden Konzentrationen des quervernetzenden anti-mIgG₁ Antikörpers ($0\text{--}20 \mu\text{g/ml}$) für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde mittels ELISA die IL-2 Konzentration im Zellkulturüberstand bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

dem eGFP unter der Kontrolle des konstitutiven CMV-Promotors steht. Die mit #852 transfizierten Zellen zeigten in verschiedenen Ansätzen GFP-Expression mit einer Frequenz von 20–50 % (Abbildung 3.16 A). Die Jurkat Zellen wurden anschließend auf einer ELISA-Platte mit den immobilisierten anti-CD3 Antikörpern Hit3A, Ucht1 und anti-CD28 Antikörper CD28.2 mit Spezifität gegen den endogenen T-Zellrezeptor für 48 Stunden stimuliert. Um eine vom T-Zellrezeptor unabhängige Zellaktivierung zu erreichen, wurden die Jurkat Zellen zusätzlich Antigen-unabhängig mit PMA und Ionomycin inkubiert. Anschließend wurde die Expression von GFP durch Messung der Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch bestimmt. Die mit den GFP-Reportergenen transfizierten Jurkat Zellen zeigten nach Stimulation des endogenen T-Zellrezeptors keine GFP-vermittelte Fluoreszenz. Bei der Antigen-unabhängigen Stimulation der Zellen durch PMA und Ionomycin zeigte sich lediglich für das NF κ B-kontrollierte Reporter ein schwacher Anstieg in der Fluoreszenzintensität (Abbildung 3.16 B).

Auch stabil exprimierende Jurkat-Klone, die durch Hygromycinselektion gewonnen wurden mit den integrierten Reportergenen pNFAT-hrGFP (#822) oder pNF κ B-hrGFP (#824), zeigten keine durch Antikörper-Stimulation induzierbare GFP-Expression (ohne Abbildung). Offensichtlich ist GFP als Reporter in Jurkat Zellen im Rahmen dieses Ansatzes nicht geeignet.

Aufgrund der schwachen GFP-Signalstärke der Indikatorzelle mit GFP wurde im weiteren Verlauf ein enzymatisches System mit Luciferase-Reportergenen getestet, da eine Akkumulation des Signals und damit eine erhöhte Signalstärke im Vergleich zu GFP zu erwarten ist. Dazu wurden die Reporterstrukturen pNFAT-Luc (#879) oder pNF κ B-Luc (#880) mittels Elektroporation in Jurkat Zellen transfiziert. Die mit DNA oder in einem Parallel-Ansatz ohne DNA scheintransfizierten Jurkat Zellen wurden auf einer Mikrotiterplatte durch immobilisierte An-

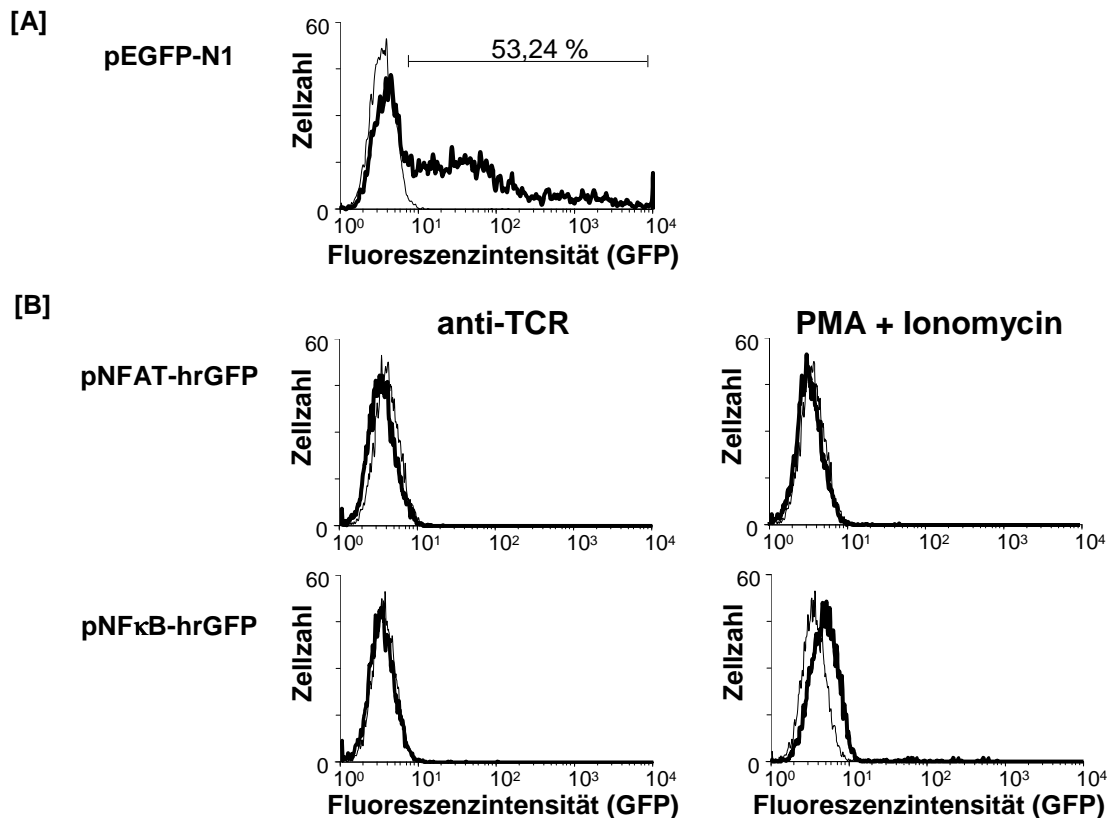


Abbildung 3.16: FACS-Analyse zum Nachweis der GFP-Expression in transfizierten Jurkat Zellen. [A] Expression von GFP unter Kontrolle des konstitutiven CMV-Promotors. [B] Induktion von NFAT- oder NFκB-kontrollierten GFP-Reportergenen in Jurkat Zellen durch Stimulation. Jeweils 2×10^6 Jurkat Zellen wurden mit $5 \mu\text{g}$ DNA des konstitutiven GFP-Plasmids pEGFP-N1 (#852) oder der Reportergene pNFAT-hrGFP (#822) oder pNFκB-hrGFP (#824) elektrotransfiziert. **A:** Die mit pEGFP-N1 transfizierten Zellen (breite Linie), wurden untransfizierten Zellen (schmale Linie) gegenübergestellt. Die FACS-Analyse ergab in diesem Ansatz eine Transfektionsrate von 53 %. **B:** Zur Stimulation wurden die Jurkat Zellen mit den Reportergenen #822 oder #824 mit ca. 2×10^5 Zellen pro Vertiefung auf einer Mikrotiterplatte durch immobilisierte Antikörper Hit3A, Ucht1 und CD28.2, oder Antigen-unabhängig mit PMA (60 ng/ml) und Ionomycin (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 48 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Im Histogramm sind unstimulierte Jurkat Zellen (schmale Linien) den Antikörper-stimulierten (anti-TCR) oder PMA und Ionomycin stimulierten Jurkat Zellen (breite Linien) gegenübergestellt.

tikörper, immobilisiertes Phytohämagglutinin (PHA), oder durch die Zugabe von PMA und Ionomycin für 48 Stunden stimuliert. Anschließend wurde die Luciferaseaktivität im Zelllysat bestimmt. Die Stimulation der Jurkat Zellen mit Luciferase-Reportergenen führte zu erhöhter Luciferaseaktivität gegenüber dem Leerwert untransfizierter Zellen und im jeweiligen Vergleich zu Inkubation ohne Stimulation (Abbildung 3.17 A). Die Kombination der anti-CD3 Antikörper Hit3A und Ucht1 mit dem anti-CD28 Antikörper CD28.2 führte mit beiden Luciferase-Reportergenen zu einer höheren Luciferaseexpression als Stimulation durch die Antikörper OKT3 (anti-CD3) und 15E8 (anti-CD28). Zudem ergab die Stimulation durch Phytohämagglutinin (PHA) für das NFκB-kontrollierte Luciferasegen, im Gegensatz zu NFAT, ein gesteigertes Luciferasesignal. Die Antigen-unabhängige Stimulation mit PMA und Ionomycin führte zu einem ca. 10fachen Anstieg des Luciferasesignals (Abbildung 3.17 B).

Beide Luciferase-Reportergenkonstrukte zeigen eine sensitive Indikatorfunktion und erschei-

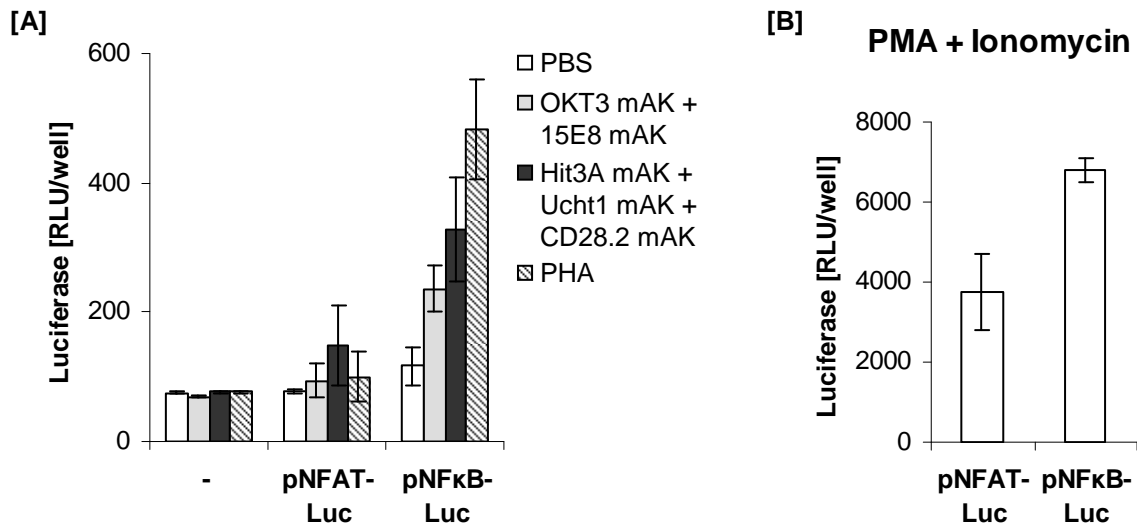


Abbildung 3.17: Induktion von NFAT- oder NFκB-kontrollierten Luciferase-Reportergenen in transfizierten Jurkat Zellen nach Stimulation. Die Luciferase-Reportergene pNFAT-Luc, pNFκB-Luc, oder das GFP-Plasmid pEGFP-N1 wurden mittels Elektroporation in 2×10^6 Jurkat Zellen transfiziert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne DNA (-). Nach 3 Stunden Regeneration wurden je 2×10^5 Zellen in 200 μ l RPMI 1640 Medium pro Vertiefung auf eine mit PBS, den Antikörpern OKT3 (anti-CD3) und 15E8 (anti-CD28), den Antikörpern Hit3A, Ucht1 (anti-CD3) und CD28.2 (anti-CD28), oder mit Phytohämagglutinin (PHA) (je 2 μ g/ml in PBS) beschichteten Mikrotiterplatte überführt (A). Zusätzlich wurden mit den Reportergenen transfizierte Jurkat Zellen (2×10^5 in 200 μ l RPMI 1640 Medium) mit PMA (60 ng/ml) und Ionomycin (2 μ g/ml) stimuliert (B). Nach 48 Stunden wurde die Luciferaseaktivität des Zellysats bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Dreifachansätze \pm Standardabweichung. In diesem Experiment exprimierten 23% der Jurkat Zellen GFP, wie durch FACS-Analyse ermittelt wurde (nicht in Abbildung).

nen für den Einsatz in einem zellbasierten Biosensor geeignet. Die durch den Transkriptionsfaktor NFAT vermittelte Reporter-Gen-Aktivierung diskriminiert im Gegensatz zu NFκB zwischen rezeptorvermittelter und mitogener Stimulation. Zudem zeigte das NFAT kontrollierte Luciferasekonstrukt eine niedrigere Grundaktivität im Vergleich zu dem analogen Konstrukt mit NFκB-Promotor.

3.4.3 Generierung eines stabilen Jurkat Zellklons mit NFAT-Luciferase Reportergen

Im Folgenden wurde ein stabiler Jurkatklon mit dem Luciferase-Reportergen NFAT-Luc (#879) durch Transfektion generiert. Dazu wurde das entsprechende Reportergenkonstrukt gemeinsam mit einem Hygromycinresistenz vermittelnden Plasmid pHygr (#145) in Jurkat Zellen elektrotansfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in Hygromycin B Selektionsmedium auf eine Mikrotiterplatte überführt. Nach etwa einem Monat wurden 12 hygromycinrestistente Einzelklone expandiert. Um eine Integration des Reportergens NFAT-Luciferase nachzuweisen, wurden die Jurkat-Klone durch Stimulation mit immobilisierten, agonistischen Antikörpern gegen CD3 und CD28 Moleküle zur Expression von Luciferase überprüft. Einer der 12 hygromycinrestistenten Jurkatklone zeigte Luciferaseexpression und erhielt die Bezeichnung Jurkat879 (Abbildung 3.18 A).

Um in der generierten Zelllinie Jurkat879 die Funktionalität des NFAT-Luciferasegens nach stabiler Integration detaillierter zu prüfen, wurde die Zelllinie Jurkat879 auf immobilisiertem anti-CD3 Antikörper OKT3, einer Kombination aus anti-CD3 und kostimulatorischem anti-CD28 Antikörper 15E8, oder immobilisiertem Phytohämagglutinin PHA inkubiert. In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen nicht stimuliert. Nach 72 Stunden wurde die Luciferaseaktivität im Zelllysat bestimmt. Wie in Abbildung 3.18 B dargestellt, erfolgte gegenüber dem nicht stimulierten Kontrollansatz sowohl nach CD3 Stimulation allein, als auch nach CD3 und CD28 Stimulation die Expression von Luciferase. Dagegen führte eine Stimulation mit Phytohämagglutinin zu geringer Luciferaseaktivität.

Durch Transfektion von pNFAT-Luc und pHygr und anschließender Selektion in Gegenwart von Hygromycin wurde der stabile Jurkatklon Jurkat879 generiert, in dem nach Stimulation des endogenen T-Zellrezeptors die Expression von Luciferase induziert wird.

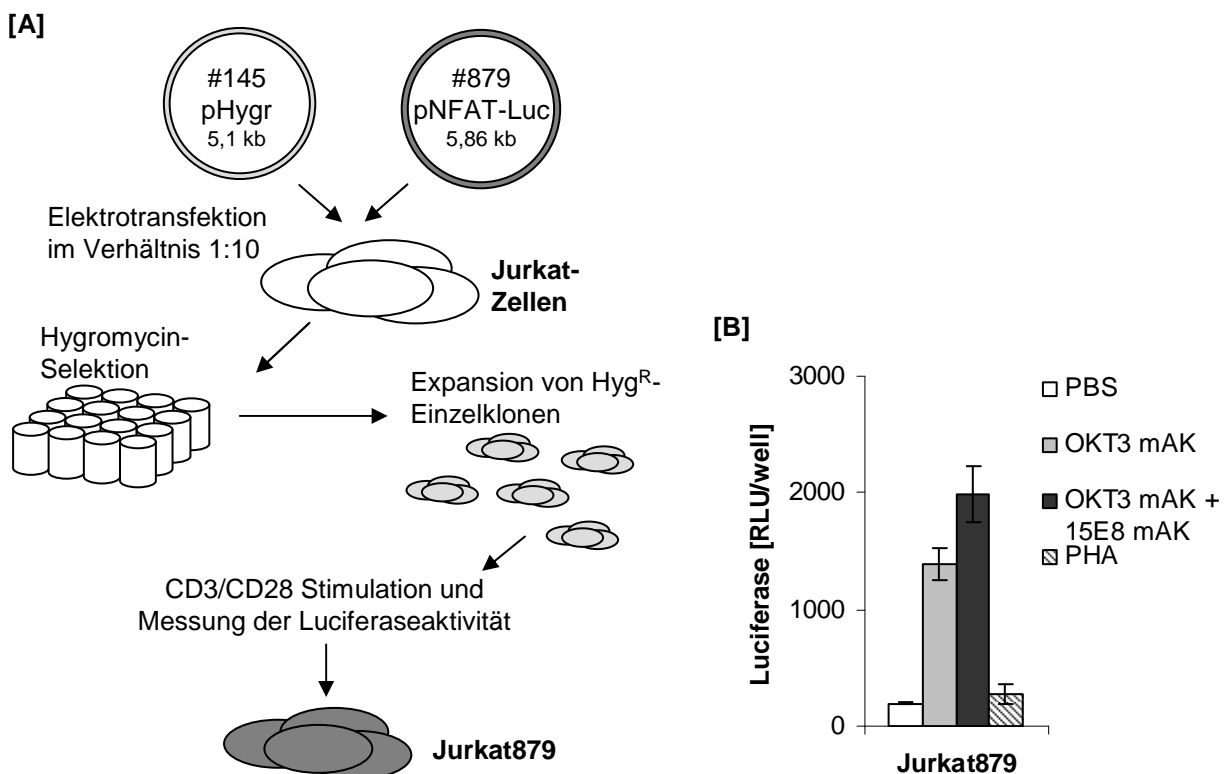


Abbildung 3.18: Generierung von Jurkat Zellen mit stabiler NFAT-Luciferase Expression **A:** Das Reporterkonstrukt #879 pNFAT-Luc wurde im molaren Verhältnis 10:1 mit dem Hygromycinresistenz-Plasmid pHygr #145 mittels Elektroporation in 2×10^6 Jurkat Zellen kotransfiziert. Nach 24 Stunden Regeneration wurden 1×10^4 Zellen pro Vertiefung in Hygromycin-Selektionsmedium (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) auf einer Mikrotiterplatte ausgesät. Zwölf hygromycinresistente Einzelklone wurden expandiert und je 2×10^5 Zellen durch immobilisierte anti-CD3 (OKT3) und anti-CD28-Antikörper (15E8) (je 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 72 Stunden stimuliert. Anschließend wurde die Luciferaseaktivität im Zelllysat bestimmt. **B:** Je 2×10^5 Zellen eines Luciferase exprimierenden Jurkat-Klons (im Folgenden Jurkat879 bezeichnet) wurden auf einer mit PBS, OKT3, OKT3 und 15E8, oder Phytohämagglutinin (PHA) beschichteten Mikrotiterplatte (je 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ausgesät. Nach 72 Stunden erfolgte die Zellyse und Messung der Luciferaseaktivität. Dargestellt ist der Mittelwert der Messungen von Dreifachansätzen \pm Standardabweichung.

3.5 Funktionelle Charakterisierung des zellulären Biosensors zur Indikation von Carcinoembryonalem Antigen (CEA)

Es wurde ein Biosensor generiert mit dem Ziel, die zellgebundene, nicht aber die lösliche Form des Carcinoembryonalen Antigens (CEA) spezifisch nachweisen zu können. Diese Diskriminierung ist entscheidend, da zahlreiche Tumorantigene gleichzeitig auch in löslicher Form vorkommen und die diagnostische Aussage verfälschen könnten. Die Indikatorfunktion des Biosensors übernimmt der Zellklon Jurkat879 (Abschnitt 3.4.3), der das Reporterogen Luciferase unter Kontrolle des NFAT-Promotors enthält. Zur spezifischen Bindung des CEA Antigens werden rekombinante Immunrezeptoren auf der Zelloberfläche dieser Indikatorzelllinie verwendet, die nach Kreuzvernetzung ein intrazelluläres Signal generieren, indem mittels NFAT-Promoter die Expression von Luciferase induziert wird, deren enzymatische Aktivität detektiert werden kann (Abbildung 3.19).

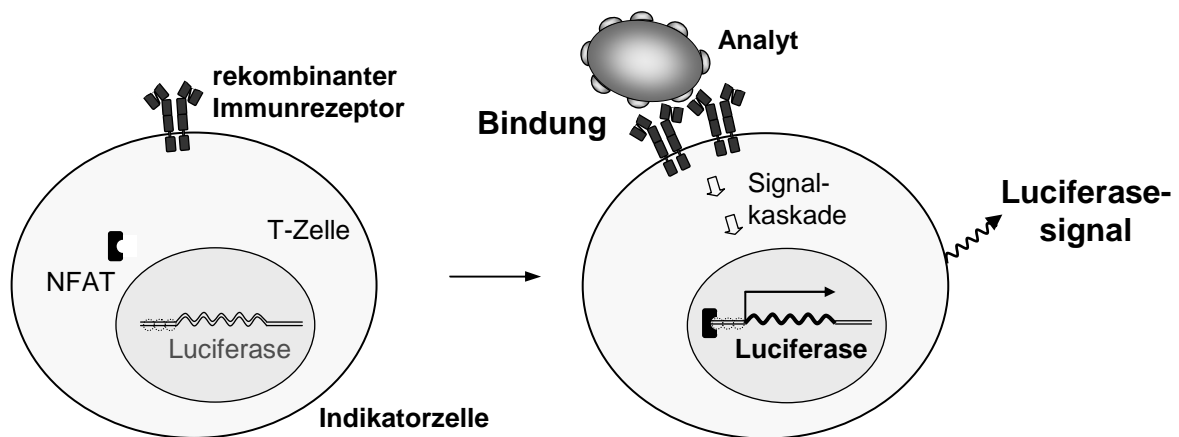


Abbildung 3.19: Schematische Darstellung der Komponenten des zellulären Biosensors.

3.5.1 Generierung des zellulären CEA-Biosensors durch Expression des rekombinanten anti-CEA Immunrezeptors in Jurkat879 Zellen

Für die Generierung des zellulären CEA-Biosensors wurde die Zelllinie Jurkat879, die nach stabiler Transfektion das Reporterogen NFAT-Luciferase trägt, zur Expression der rekombinanten Immunrezeptoren BW431/26scFv-Fc-zeta (#700) und BW431/26scFv-Fc-CD28-zeta (#607) mit Spezifität gegen das Carcinoembryonale Antigen (CEA) retroviral transduziert. Dazu wurde die entsprechende Immunrezeptor DNA gemeinsam mit den Helferplasmiden pColt-GALV (#392) und pHit60 (#393) in die Verpackungszelllinie 293T kotransfiziert. Nach 48 Stunden wurden Jurkat879 Zellen zur Infektion mit den virusproduzierenden 293T Zellen für weitere 48 Stunden koinkubiert. Die Expression der rekombinanten Immunrezeptoren auf der Oberfläche von Jurkat879 Zellen wurde mit Hilfe eines PE-konjugierten anti-human IgG Antikörpers

durchflusszytometrisch nachgewiesen. Als Kontrolle dienten nicht-transduzierte Jurkat879 Zellen. Diese Untersuchungen weisen die Expression der anti-CEA Immunrezeptoren BW431/26scFv-Fc-zeta (#700) und BW431/26scFv-Fc-CD28-zeta (#607) auf der Oberfläche von Jurkat879 Zellen nach (Abbildung 3.20 A).

Im Folgenden sollte die Aktivierung des NFAT-Luciferasegens von Jurkat879 Indikatorzellen durch Bindung der rekombinanten Immunrezeptoren an immobilisierte, anti-idiotypische Antikörper nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgte durch Messung der Luciferaseaktivität im Zelllysate. Mikrotiterplatten wurden mit dem gegen den Immunrezeptor gerichteten anti-idiotypischen mIgG₁ Antikörper BW2064/36, als Kontrolle mit einem Maus IgG₁ Isotyp-Antikörper, oder mit den agonistischen Antikörpern OKT3 gegen CD3 und 15E8 gegen CD28 beschichtet. Zum zusätzlichen Vergleich diente ein Ansatz ohne Antikörper. Die Jurkat879 Zellen mit den Immunrezeptoren BW431/26scFv-Fc-zeta (#700) und BW431/26scFv-Fc-CD28-zeta (#607) wurden mit gleicher Expressionsfrequenz der Rezeptoren auf diesen Beschichtungen für 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Luciferaseaktivität im Zelllysate gemessen (Abbildung 3.20 B).

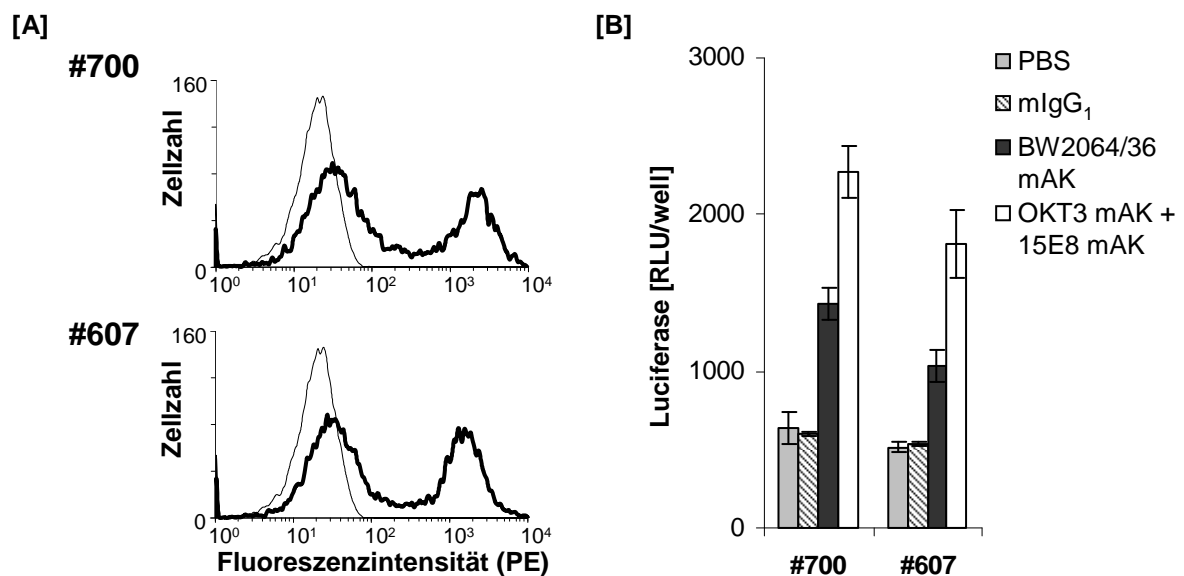


Abbildung 3.20: Nachweis der Expression der anti-CEA Immunrezeptoren auf der Oberfläche von Jurkat879 Indikatorzellen und Aktivierung des Reportergens nach Kreuzvernetzung der Rezeptoren. A: Jurkat879 Zellen wurden retroviral mit den anti-CEA Rezeptoren BW431/26scFv-Fc-zeta (#700) oder BW431/26scFv-Fc-CD28-zeta (#607) transduziert. Nach 48 Stunden wurde die Expression der Immunrezeptoren auf der Zelloberfläche untersucht. Dazu wurden transduzierte (breite Linien) und zum Vergleich nicht transduzierte Jurkat879 Zellen (schmale Linien) mit je 0,5 µg/ml PE-konjugierten anti-human IgG Antikörper 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. **B:** Je 2×10^4 transduzierte Jurkat879 Zellen mit Spezifität gegen CEA wurden in 200 µl pro Vertiefung auf einer mit PBS, mIgG₁ Isotyp-Antikörper (1 µg/ml), anti-idiotypischem mIgG₁ Antikörper BW2064/36 (4 µg/ml), mit Spezifität gegen die BW431/26scFv Bindedomäne der anti-CEA Rezeptoren, oder den anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern OKT3 und 15E8 (je 2 µg/ml) beschichteten Mikrotiterplatte 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert der Messungen im Dreifachansatz +/- Standardabweichung.

Nach Kreuzvernetzung der anti-CEA Immunrezeptoren auf Jurkat879 Indikatorzellen mit dem immobilisierten anti-idiotypischen Antikörper BW2064/36 wurde ein spezifischer Anstieg der Luciferaseaktivität detektiert im Vergleich zu unbehandelten Zellen und zur Maus IgG₁ Isotypkontrolle. Die Kontrollstimulation durch agonistische Antikörper gegen die endogenen Rezeptormoleküle CD3 und CD28 führte ebenfalls zu einem Anstieg der Luciferaseexpression.

Das induzierbare Luciferasesignal durch Stimulation der anti-CEA Immunrezeptoren auf der Zelloberfläche von Jurkat879 Zellen zeigt, dass die NFAT-Luciferase Indikatorzellen durch Kombination mit einem anti-CEA Immunrezeptor zu einem zellulären, CEA-spezifischen Biosensor wird.

3.5.2 Aktivierung des CEA-Biosensors Jurkat879 durch immobilisiertes Antigen

Um die sensorischen Eigenschaften des generierten CEA-Biosensors in Abhängigkeit von der Beschaffenheit und Konzentration des dargebotenen Antigens zu ermitteln, wurde der CEA-Biosensor zunächst durch steigende Konzentrationen immobilisierten Antigens stimuliert.

Retroviral transduzierte Jurkat879 Zellen mit den anti-CEA Immunrezeptoren BW431/26-scFv-Fc-zeta (#700) oder BW431/26scFv-Fc-CD28-zeta (#607) wurden auf einer ELISA-Platte inkubiert, die mit steigenden Konzentrationen des anti-idiotypischen Antikörpers BW2064/36, der gegen den BW431/26scFv gerichtet ist, beschichtet wurde. Zum Vergleich wurde zusätzlich Maus IgG₁ Antikörper und die agonistischen Antikörper OKT3 und 15E8, die gegen CD3 und CD28 gerichtet sind, auf der Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität des Zelllysats gemessen (Abbildung 3.21).

Die Jurkat879 Zellen mit anti-CEA Rezeptoren zeigten bei zunehmender Konzentration des immobilisierten, anti-idiotypischen Antikörpers BW2064/36 im Vergleich zur Isotypkontrolle mIgG₁ steigende Luciferaseaktivität. Auch die Stimulation durch den endogenen T-Zellrezeptor mit den immobilisierten anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern, OKT3 und 15E8 führte zur Induktion der Luciferaseexpression.

Der CEA-Biosensor aus Jurkat879 Zellen und anti-CEA Immunrezeptor #700 oder #607 wird durch den immobilisierten, anti-idiotypischen Antikörper BW2064/36 konzentrationsabhängig aktiviert. Dabei zeigen sich zwischen den beiden untersuchten anti-CEA Rezeptoren #700 und #607 keine quantitativen Unterschiede bezüglich der Höhe des Luciferasesignals.

3.5.3 Aktivierung des CEA-Biosensors Jurkat879 durch quervernetztes, lösliches Antigen

Im Folgenden wird die Aktivierung des CEA-Biosensors alternativ durch quervernetztes, lösliches Antigen untersucht. Jurkat879 Zellen wurden retroviral mit den Immunrezeptoren #700

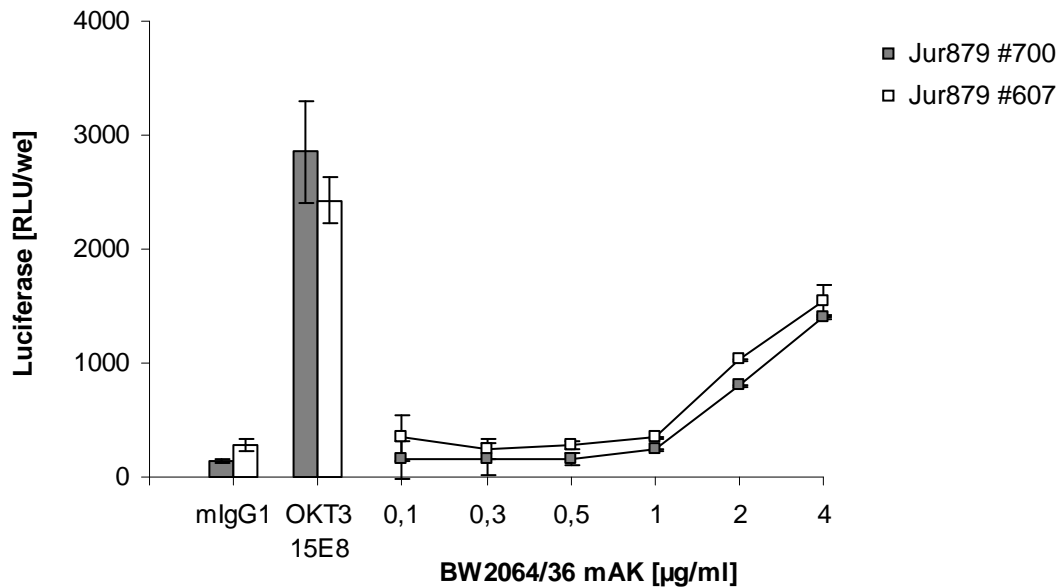


Abbildung 3.21: Aktivierung von Jurkat879 Zellen mit anti-CEA Immunrezeptoren als CEA-spezifischer Biosensor durch Bindung an immobilisiertes Antigen. Jurkat879 Zellen wurden mit den Immunrezeptoren BW431/26scFv-Fc-zeta (#700) oder BW431/26scFv-Fc-CD28-zeta (#607) retroviral transduziert und die Expressionseffizienz durchflusszytometrisch ermittelt. Je 2×10^4 transduzierte Zellen wurden in $200 \mu\text{l}$ Medium pro Vertiefung auf einer Mikrotiterplatte ausplattiert, die zuvor mit steigenden Konzentrationen anti-idiotypischen Antikörpers BW2064/36 ($0,125\text{--}4 \mu\text{g/ml}$), Maus Isotyp-Antikörper mIgG₁ ($2 \mu\text{g/ml}$), oder mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper (OKT3 und 15E8, je $2 \mu\text{g/ml}$) beschichtet wurde. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität bestimmt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert eines Dreifachansatzes \pm Standardabweichung.

BW431/26scFv-Fc-zeta oder #607 BW431/26scFv-Fc-CD28-zeta ausgestattet. Die Expressionsrate der rekombinanten Rezeptoren wurde mit Hilfe PE-konjugierten anti-human IgG-Antikörpers durchflusszytometrisch bestimmt. Anschließend wurden die anti-CEA rezeptortragenden Jurkat879 Zellen auf einer Mikrotiterplatte in Gegenwart des anti-idiotypischen Antikörpers BW2064/36, der gegen die Bindedomäne der anti-CEA Rezeptoren gerichtet ist, in konstanter Konzentration und mit steigenden Konzentrationen eines quervernetzenden anti-Maus IgG₁ Antikörpers inkubiert. Zum Vergleich wurden die CEA-Biosensorzellen ohne Antikörper inkubiert, und Antigen-unabhängig durch PMA und Ionomycin stimuliert. Nach 48 Stunden wurde sowohl die Luciferaseaktivität im Zelllysat als auch die IL-2 Konzentration der Zellkulturüberstände bestimmt (Abbildung 3.22).

Beide, #700 und #607 anti-CEA rezeptortragende Jurkat879 Zellen, zeigten zunehmende Luciferaseaktivität mit steigenden Konzentrationen des quervernetzenden Sekundärantikörpers anti-mIgG₁ und nach Antigen-unabhängiger Stimulation durch PMA und Ionomycin. Demgegenüber stand eine niedrige Grundaktivität ohne Stimulation. In Gegenwart des anti-idiotypischen Antikörpers BW2064/36 und quervernetzendem mIgG₁ Antikörper der Verdünnungsstufen $0\text{--}10 \mu\text{g/ml}$ sezernierten #607 CEA-Biosensorzellen im Vergleich zu den #700 rezeptortragenden Zellen und gegenüber der Kontrolle ohne Antikörper geringe Mengen IL-2. Erst bei einer Konzentration des Sekundärantikörpers mIgG₁ von $15 \mu\text{g/ml}$ stieg die Menge sezernier-

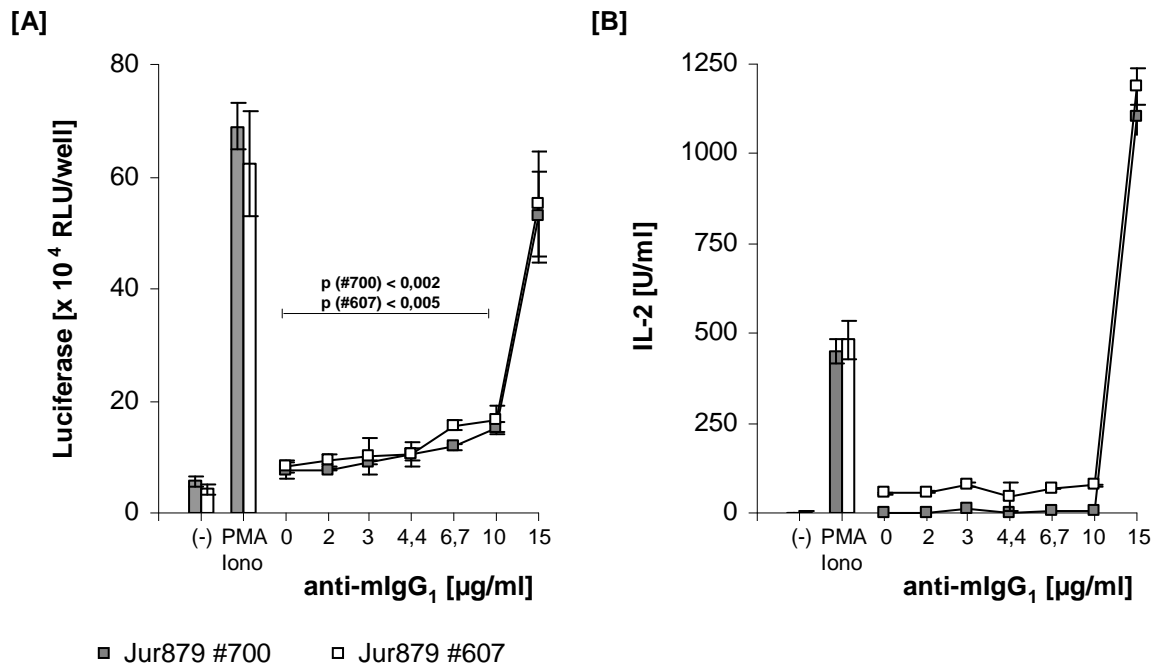


Abbildung 3.22: Aktivierung von Jurkat879 Zellen mit anti-CEA Immunrezeptoren als CEA-spezifischer Biosensor durch quervernetztes, lösliches Antigen. Jurkat879 Zellen wurden mit den Immunrezeptoren BW431/26scFv-Fc-zeta (#700) oder BW431/26scFv-Fc-CD28-zeta (#607) retroviral transduziert und die Expressionseffizienz durchflusszytometrisch ermittelt. Je 2×10^4 rezeptortragende Zellen wurden in 200 µl Medium pro Vertiefung auf einer Mikrotiterplatte verteilt und in Gegenwart von 2 µg/ml anti-idiotypischem Antikörper BW2064/36 (gegen BW431/26scFv) und steigenden Konzentrationen des quervernetzenden Sekundäntikörpers anti-mIgG₁ (0–15 µg/ml) inkubiert. Als Kontrolle diente die Inkubation ohne beide Antikörper (-), oder die Stimulation durch PMA (60 ng/ml) und Ionomycin (2 µg/ml). Nach 48 Stunden wurde die Luciferaseaktivität der Zelllysate gemessen (A) und die IL-2 Konzentration der Zellkulturüberstände mittels ELISA (B) bestimmt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert des Dreifachansatzes +/- Standardabweichung und die Irrtumswahrscheinlichkeit p nach Student's T-Test.

ten IL-2 durch beide CEA-Biosensoren #607 und #700 an. Die Stimulation durch PMA und Ionomycin führte ebenfalls zu einem Anstieg der IL-2-Sekretion.

Hier wird gezeigt, dass die CEA-Biosensoren #700 und #607 nach Quervernetzung des löslichen Antigens durch den Sekundäntikörper konzentrationsabhängig aktiviert werden und Luciferase exprimieren. Die Sekretion von IL-2 steigt dagegen erst bei hohen Konzentrationen des Sekundäntikörpers unvermittelt an. Das Luciferase-Reportersignal der Jurkat879 Zellen ermöglicht offenbar eine sensitivere Indikation des quervernetzten, löslichen Antigens als die IL-2 Konzentration.

3.5.4 Aktivierung des CEA-Biosensors Jurkat879 durch Antigen-positive Tumorzellen

Es wurde gezeigt, dass der CEA-Biosensor aus Jurkat879 Zellen mit anti-CEA Immunrezeptoren nach Kreuzvernetzung der rekombinanten Immunrezeptoren aktiviert wird. Im weiteren Verlauf sollte der CEA-Biosensor hinsichtlich der Indikation Antigen-positiver Tumorzellen untersucht werden. Dazu wurden Jurkat879 Zellen retroviral mit den anti-CEA Immunrezept-

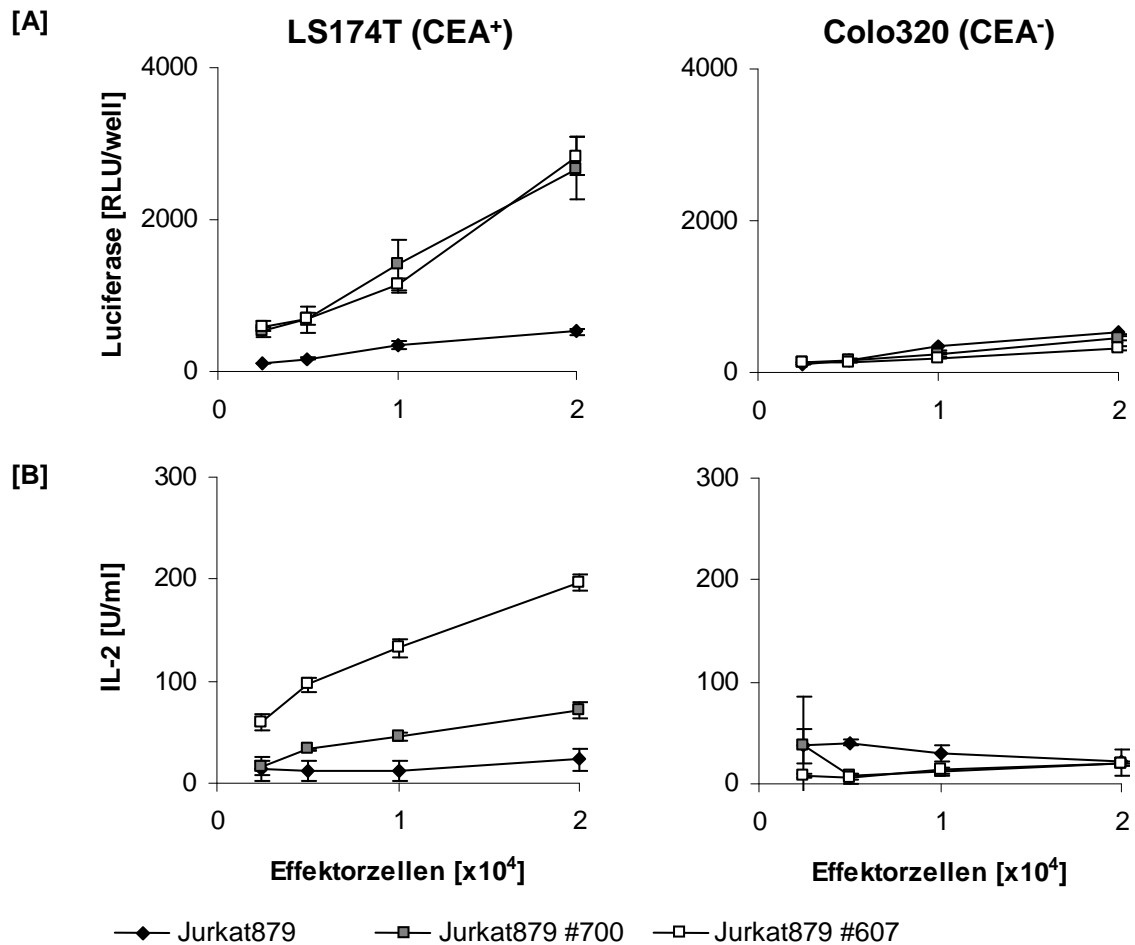


Abbildung 3.23: Aktivierung von Jurkat879 Zellen mit anti-CEA Immunrezeptoren als CEA-spezifischer Biosensor durch Kokultivierung mit Antigen-positiven Tumorzellen. Jurkat879 Zellen wurden retroviral mit den Immunrezeptoren #700 oder #607 transduziert und die Transduktionseffizienz durchflusszytometrisch bestimmt. Es wurden $0,25\text{--}2 \times 10^4$ Effektorzellen pro Vertiefung in einer Verdünnungsreihe ausplattiert, und mit je 4×10^4 Tumorzellen der Zelllinie LS174T (CEA⁺) oder Colo320 (CEA⁻) in einem Gesamtvolumen von $200 \mu\text{l}$ RPMI 1640 Medium für 48 Stunden kokultiviert. Anschließend wurde die Luciferaseaktivität des Zelllysats (A), und die IL-2 Konzentration im Kulturüberstand mit Hilfe eines ELISA (B) ermittelt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert des Dreifachansatzes \pm Standardabweichung.

toren BW431/26scFv-Fc-zeta (#700) oder BW431/26scFv-Fc-CD28-zeta (#607) transduziert, die Expressionseffizienz der Rezeptoren im Durchflusszytometer ermittelt und die Jurkat879 Zellen anschließend in einer Verdünnungsreihe mit CEA⁺ LS174T Zellen oder CEA⁻ Colo320 Tumorzellen kokultiviert. Als Kontrolle wurden Jurkat879 Zellen ohne rekombinanten Immunrezeptor mitgeführt. Nach 48 Stunden Kokultur wurde die Luciferaseaktivität der Zelllysate bestimmt und die IL-2 Konzentration im Zellkulturüberstand mit Hilfe eines ELISA ermittelt (Abbildung 3.23).

Beide anti-CEA rezeptortragenden Jurkat879 Zellen #700 und #607 zeigten nach Kokultur mit CEA⁺ LS174T Zellen im Gegensatz zu nicht transduzierten Jurkat879 Zellen einen Anstieg der Luciferaseaktivität proportional zu der Effektorzellzahl. Im Gegensatz dazu führte die Kultivierung mit CEA⁻ Colo320 Zellen zu keiner Aktivierung des NFAT-Luciferasesgens, sowohl

in untransduzierten, als auch in anti-CEA rezeptortragenden Jurkat879 Zellen.

Die IL-2 Konzentration im Zellkulturüberstand nahm mit steigenden Effektorzellzahlen bei Kokultivierung von #700 und #607 Jurkat879 Zellen mit CEA-positiven LS174T Zellen, nicht aber mit CEA-negativen Colo320 Zellen zu. Dabei sezernierten Jurkat879 Zellen mit dem anti-CEA Rezeptor #607 deutlich mehr IL-2 als Jurkat879 Zellen mit #700 Rezeptor, trotz eines gleich hohen Luciferasesignals. Diese erhöhte IL-2 Sekretion erklärt sich durch die zusätzliche, kostimulatorische Signaldomäne CD28 des Rezeptors #607 BW431/26scFv-Fc-CD28-zeta, die in dem Rezeptor #700 BW431/26scFv-Fc-zeta nicht enthalten ist.

Die Kokultivierung des CEA-Biosensors auf Tumorzellen zeigt, dass der Sensor spezifisch durch CEA⁺ Tumorzellen und proportional zur Effektorzellzahl aktiviert wird, wobei beide anti-CEA Rezeptoren #700 und #607 das NFAT gesteuerte Luciferasegen in den Jurkat879 Zellen induzieren. Die zusätzliche kostimulatorische CD28 Signaldomäne des Rezeptors #607 führt zudem bei Inkubation mit CEA⁺ Tumorzellen zu einer erhöhten IL-2 Sekretion gegenüber dem #700 Biosensor.

3.5.5 Aktivierung des Biosensors Jurkat879 durch lösliches Antigen mit CD28-CD3zeta Immunrezeptoren

Der anti-CEA Biosensor mit #607 Immunrezeptor führte im Vergleich zu #700 Biosensorzellen bei Inkubation mit Antigen-positiven Tumorzellen zu erhöhter IL-2 Sekretion. Dieser Unterschied basiert auf der kostimulatorischen CD28 Signaldomäne des Rezeptors #607. Im Folgenden sollte nun geklärt werden, inwiefern die Rezeptorkonfiguration mit alleiniger CD3zeta oder kombinierter CD28-CD3zeta Signaldomäne einen Einfluss auf die Toleranz des zellulären Biosensors gegenüber löslichem Antigen hat. Dazu wurde zum Vergleich neben den bisher eingesetzten anti-CEA Immunrezeptoren BW431/26scFv-Fc-zeta (#700) und BW431/26scFv-Fc-CD28-zeta (#607) ein weiteres Rezeptorpaar analoger Konfiguration mit Spezifität für das CD30-Antigen, HRS3scFv-Fc-zeta (#523) und HRS3scFv-Fc-CD28-zeta (#926), verwendet.

Die CD3zeta Rezeptoren (#700, #523) und kombinierten CD28-CD3zeta Rezeptoren (#607, #926) wurden retroviral in Jurkat879 Zellen transduziert und die Expressionseffizienz durchflusszytometrisch ermittelt. Anschließend wurden die Jurkat879 Zellen mit gleichen Effektorzellzahlen ausplattiert, und jeweils mit dem anti-idiotypischen Antikörper, BW2064/36 für die anti-CEA Rezeptoren #700 und #607 und 9G10 für die anti-CD30 Rezeptoren #523 und #926, in einer Verdünnungsreihe inkubiert. Nach 96 Stunden wurde die Luciferaseaktivität des Zelllysats gemessen und die IL-2 Konzentration im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt (Abbildung 3.24).

Jurkat879 Zellen mit den kombinierten CD28-CD3zeta Rezeptoren #607 und #926 mit Spezifität für CEA bzw. CD30 zeigten eine vom anti-idiotypischen Antikörper konzentrationsabhän-

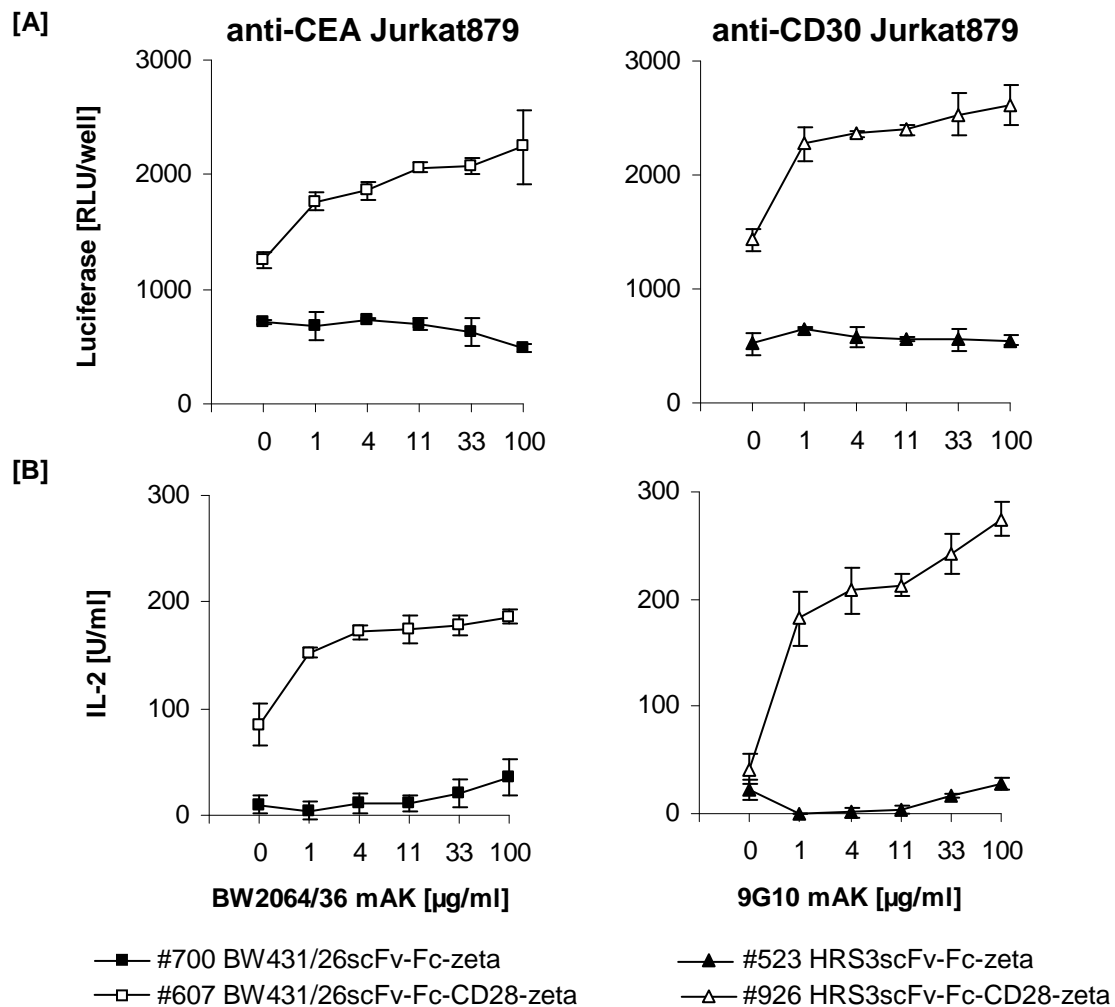


Abbildung 3.24: Jurkat879 Zellen mit CD28-CD3zeta Immunrezeptoren werden durch lösliches Antigen konzentrationsabhängig zur Expression von Luciferase **[A]** und Sekretion von IL-2 **[B]** stimuliert. Jurkat879 Zellen wurden retroviral mit CD3zeta Immunrezeptoren (#700, #523) oder mit CD28-CD3zeta Immunrezeptoren (#607, #926) transduziert, mit je 3×10^4 Effektorzellen pro Vertiefung ausplattiert und mit steigenden Konzentrationen anti-idiotypischen Antikörpers, BW2064/36 für anti-CEA Rezeptor #700 und #607, und 9G10 für anti-CD30 Rezeptor #523 und #926 (0–100 µg/ml) für 96 Stunden inkubiert. Die Luciferaseaktivität der Zelllysate **A** und IL-2 Konzentration der Kulturüberstände **B** wurde ermittelt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Dreifachansätzen +/- Standardabweichung.

gige Aktivierung, sowohl in Form von zunehmender Luciferaseaktivität, als auch gesteigerter IL-2 Sekretion in den Kulturüberstand. Im Gegensatz dazu führten die CD3zeta Immunrezeptoren #700 und #523 nach Inkubation mit dem löslichen Antigen zu keiner Steigerung der Luciferaseexpression und signifikanten Sekretion von IL-2. Hinsichtlich des Luciferasesignals wird zudem deutlich, dass die CD28-CD3zeta Rezeptoren im Vergleich zu den CD3zeta Rezeptoren auch ohne idiotypischen Antikörper eine gesteigerte Grundaktivität der Jurkat879 Zellen bewirken. Diese unterschiedliche Grundaktivität in Abhängigkeit von der Rezeptorsignaldomäne wurde bei Untersuchungen des CEA-Biosensors mit kürzeren Inkubationszeiten von 24 - 48 Stunden nicht beobachtet, und offenbar erst durch die lange Inkubationszeit dieses Experiments

deutlich. Im Vergleich der beiden CD28-CD3zeta Rezeptoren mit analoger Konfiguration der Signaldomäne zeigten anti-CD30 spezifische #926 Jurkat879 Zellen eine höhere Aktivierung als #607 Zellen mit CEA Spezifität, sowohl bezüglich des Luciferasesignals, als auch der IL-2 Sekretion.

Diese Untersuchungen zeigen, dass Jurkat879 Zellen mit Immunrezeptoren der intrazellulären Konfiguration CD28-CD3zeta die Indikation von löslichem Antigen ermöglichen. Gleichzeitig wird deutlich, dass der Biosensor mit CD3zeta Immunrezeptoren nicht durch lösliches Antigen aktiviert wird. Zur Diskriminierung zwischen korpuskulärem und löslichem Antigen ist demnach der Biosensor mit CD3zeta Immunrezeptoren geeignet.

3.6 Aktivierung des Biosensors durch Quervernetzung des CD3zeta Immunrezeptors in Gegenwart von löslichem Antigen

Der zelluläre Biosensor soll die spezifische Detektion korpuskulär gebundenen Antigens durch Quervernetzung eines CD3zeta Immunrezeptors auf der Zelloberfläche auch in Gegenwart von löslichem Antigen ermöglichen. Da Oberflächenantigene auf Tumorzellen oft abgespalten werden und damit in unbestimmten Mengen auch löslich vorliegen, wurde diese Eigenschaft des Biosensors mit Hilfe künstlicher, korpuskulärer Antigene untersucht. Dazu wurden NHS-aktivierte Sepharosekügelchen eingesetzt, an die jeweils ein anti-idiotypischer Antikörper mit Spezifität gegen die CEA oder gegen die CD30 Bindedomäne verschiedener Immunrezeptoren gekoppelt wurde. Zwei Immunrezeptoren mit CD3zeta Signaldomäne und unterschiedlicher Spezifität für CEA oder CD30 Antigen wurden reziprok auf den Sepharosekügelchen beider Spezifitäten in Gegenwart von löslichem Antigen eingesetzt.

3.6.1 Funktionsanalyse von anti-idiotyp Antikörper gekoppelter Sepharose

Die anti-idiotypischen Antikörper BW2064/36 und 9G10 mit Spezifität für die CEA-Bindedomäne bzw. CD30-Bindedomäne rekombinanter Immunrezeptoren wurden jeweils an NHS-aktivierte Sepharosekügelchen gekoppelt. Zum Nachweis der Antikörperbindung an die Sepharose wurden humane periphere Blutlymphozyten (PBL) mit anti-CEA BW431/26scFv-Fc-zeta (#700), und anti-CD30 HRS3scFv-Fc-zeta (#523) Immunrezeptoren retroviral transduziert und mit steigenden Konzentrationen der generierten Sepharosekügelchen unterschiedlicher Spezifität für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Aktivierung der T-Lymphozyten durch Messung der Interferon- γ Konzentration im Kulturüberstand bestimmt (Abbildung 3.25).

T-Lymphozyten mit anti-CEA und anti-CD30 Immunrezeptor wurden konzentrationsabhängig durch die jeweils anti-idiotypischen Sepharosekügelchen zur Sekretion von IFN- γ angeregt, nicht jedoch durch die Sepharose anderer Spezifität. Die spezifische Aktivierung der T-Lymphozyten durch die jeweils korrespondierenden anti-idiotypischen Sepharosekügelchen weist die Antikörperbindung an die Sepharose und die Funktionalität der korpuskulären Antigene BW2064/36AK-Sepharose und 9G10AK-Sepharose nach.

Zusätzlich wurde die Funktionalität der korpuskulären anti-idiotypischen Sepharosekügelchen in Kombination mit den Jurkat879 Indikatorzellen überprüft, um die optimale Konzentration für die Aktivierung des Biosensors zu ermitteln. Dazu wurden Jurkat879 Zellen ebenfalls mit den CD3zeta Immunrezeptoren gegen CEA (#700) und CD30 (#523) retroviral transduziert und mit jeweils BW2064/36AK-Sepharose (CEA-idiotyp) und 9G10AK-Sepharose (CD30-idiotyp) in einer Verdünnungsreihe koinkubiert. Als Kontrolle wurden die anti-CEA und anti-CD30 Jurkat879 Zellen mit PMA und Ionomycin stimuliert. Nach 48 Stunden wurde die Luciferaseak-

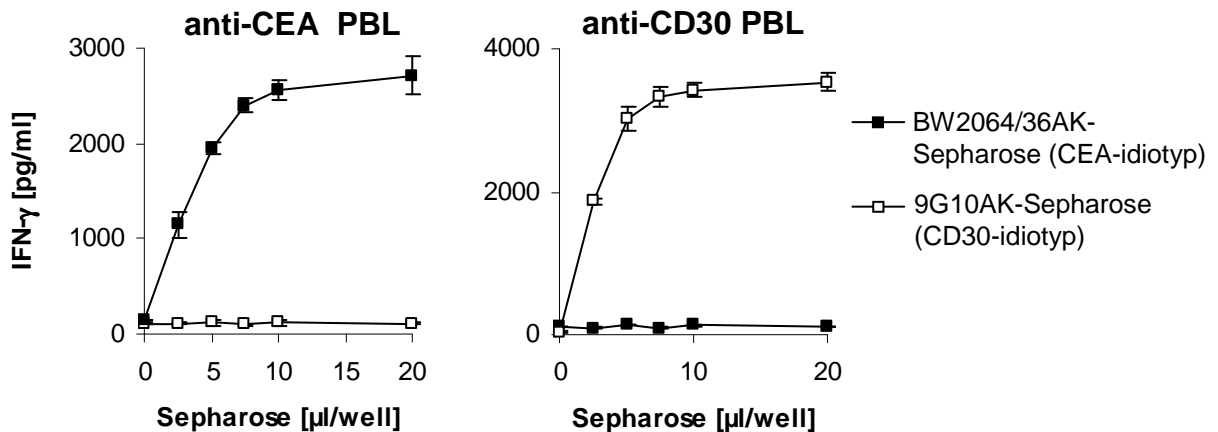


Abbildung 3.25: Reziproke Aktivierung von T-Lymphozyten mit anti-CEA und anti-CD30 CD3zeta Immunrezeptoren durch spezifische, anti-idiotyp Antikörper gekoppelte Sepharosekügelchen. Je 2×10^4 retroviral transduzierte humane periphere Blutlymphozyten (PBL) mit den Immunrezeptoren BW431/26scFv-Fc-zeta (#700) und HRS3scFv-Fc-zeta (#523) gegen CEA und CD30 Antigen, wurden mit steigenden Konzentrationen (je 0–20 µl/Vertiefung) BW2064/36AK-Sepharose (CEA-idiotyp) oder 9G10AK-Sepharose (CD30-idiotyp) für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die IFN- γ Konzentration des Zellkulturüberstands im ELISA bestimmt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus Dreifachansätzen \pm Standardabweichung.

tivität im Zelllysat und die IL-2 Konzentration in den Kulturüberständen ermittelt (Abbildung 3.26).

Die Jurkat879 Zellen mit anti-CEA oder anti-CD30 Immunrezeptor zeigten nach Koinkubation mit der jeweils rezeptorspezifischen Sepharose eine konzentrationsabhängige Steigerung sowohl der Luciferaseaktivität als auch der IL-2-Expression. Demgegenüber führte die Inkubation mit AK-Sepharose der jeweils anderen Spezifität zu keiner Zunahme von Luciferase und IL-2. Die Antigen-unabhängige Stimulation der transduzierten Jurkat879 Zellen mit PMA und Ionomycin führte zu einer Erhöhung der Luciferaseaktivität und IL-2 Sekretion in den Kulturüberstand.

Die konzentrationsabhängige Zunahme der Luciferaseaktivität und IL-2 Sekretion rezeptor-tragender Jurkat879 Zellen #700 oder #523 nach Koinkubation mit den jeweils korrespondierenden anti-idiotypischen Sepharosekügelchen belegt die Spezifität der Aktivierung der Biosensorzellen durch das künstliche korpuskuläre Antigen.

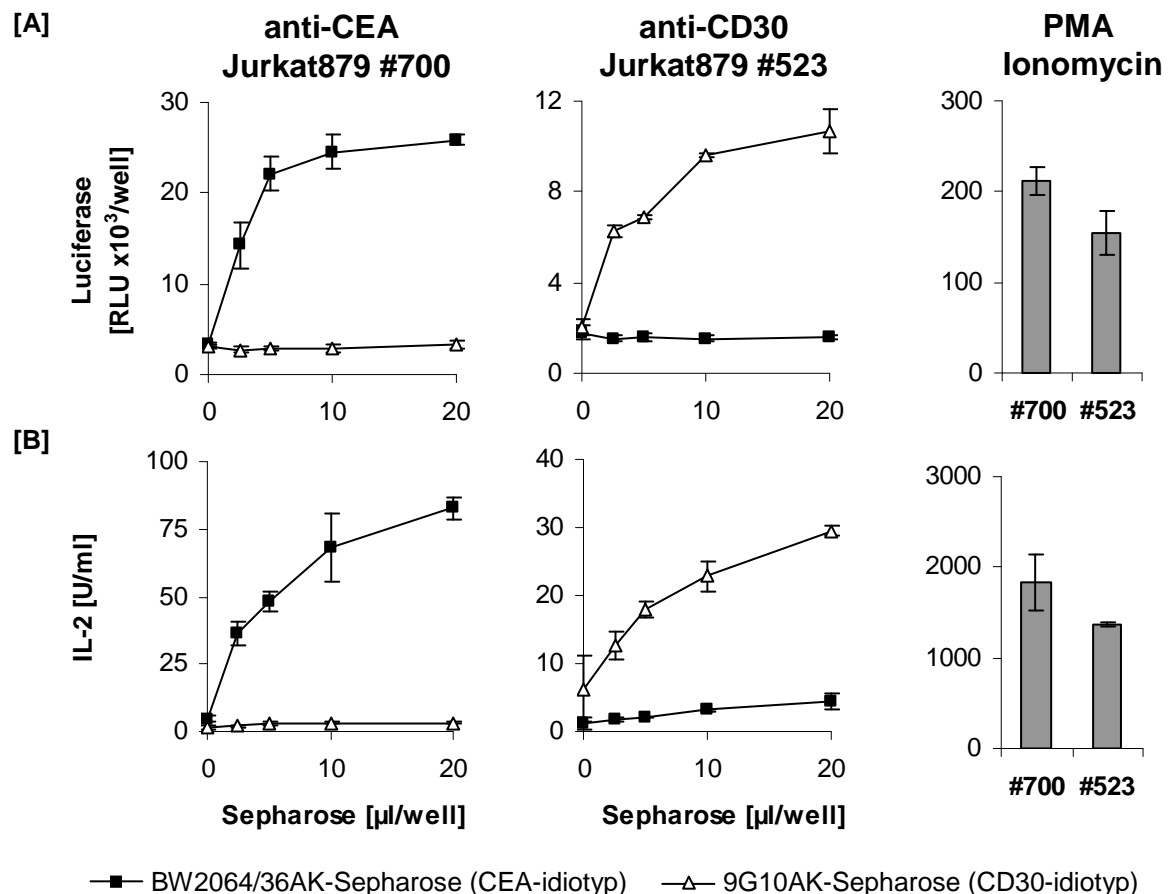


Abbildung 3.26: Reziproke Aktivierung von Jurkat879 Zellen mit anti-CEA und anti-CD30 CD3zeta Immunrezeptoren durch spezifische, anti-idiotyp Antikörper gekoppelte Sepharosekügelchen. Je $1,5 \times 10^5$ Jurkat879 Zellen mit den Immunrezeptoren BW431/26scFv-Fc-zeta (#700) und HRS3scFv-Fc-zeta (#523) gegen CEA und CD30, wurden auf einer Mikrotiterplatte mit steigenden Konzentrationen (jeweils 0–20 μl pro Vertiefung) BW2064/36AK-Sepharose (CEA-idiotyp) oder 9G10AK-Sepharose (CD30-idiotyp) koinkubiert. Zur Kontrolle wurden #700 und #523 transduzierten Jurkat879 Zellen PMA (60 ng/ml) und Ionomycin (2 $\mu\text{g/ml}$) zugesetzt. Nach 48 Stunden wurde die Luciferaseaktivität des Zelllysats (A) und die IL-2 Konzentration der Kulturüberstände mittels ELISA (B) bestimmt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus Dreifachansätzen mit Standardabweichung.

3.6.2 Generierung von Jurkat879 Biosensorzellen mit stabiler Expression von Immunrezeptoren

Die nachfolgenden Untersuchungen haben das Ziel, die spezifische Diskriminierung des Biosensors zwischen korpuskulärem und löslichem Antigen zu demonstrieren. Deswegen wurden Biosensorzellen mit stabiler Expression von CD3zeta Immunrezeptoren generiert. Dazu wurde der anti-CEA Rezeptor BW431/26scFv-Fc-zeta (#700) und anti-CD30 Rezeptor HRS3scFv-Fc-zeta (#523) retroviral in Jurkat879 Zellen transduziert. Mit Hilfe limitierender Verdünnungsreihen wurden anschließend Einzelklone expandiert. Jurkat879 Klone mit stabiler Expression des anti-CEA oder anti-CD30 Rezeptors wurden durchflusszytometrisch identifiziert (Abbildung 3.27). Es wurden Jurkat879 Indikatorzellen mit stabiler Expression von CD3zeta Immunrezeptoren gegen CEA und gegen CD30 generiert.

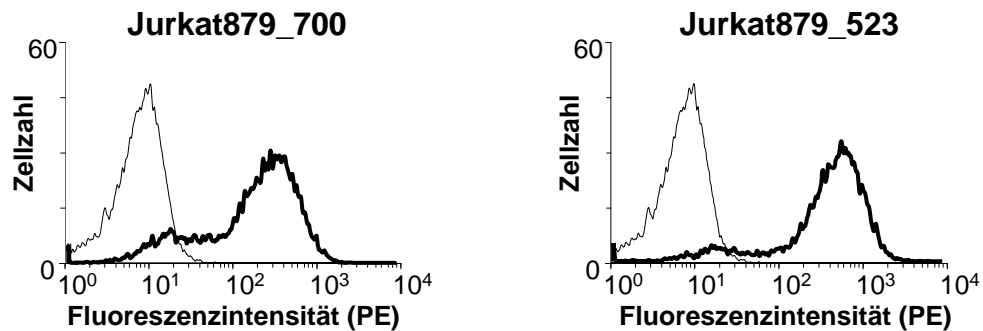


Abbildung 3.27: FACS-Analyse zum Nachweis der stabilen Expression von CD3zeta Immunrezeptoren der Spezifität CEA und CD30 auf der Oberfläche von Jurkat879 Zellen. Jurkat879 Zellen wurden mit den Immunrezeptoren BW431/26scFv-Fc-zeta (#700) gegen CEA, und HRS3scFv-Fc-zeta (#523) gegen CD30 retroviral transduziert. Durch limitierende Verdünnungsreihen wurden nach 3–4 Wochen Einzelklone expandiert und rezeptortragende Jurkat879 Klone mit Hilfe eines PE-konjugierten anti-human IgG Antikörpers durchflusszytometrisch identifiziert. Dargestellt sind die übereinandergelegten Histogramme jeweils eines anti-CEA und anti-CD30 Jurkat879 Klons (breite Linie) mit nicht transduzierten Jurkat879 Zellen (schmale Linie).

3.6.3 Aktivierung des Biosensors Jurkat879 durch korpuskuläres Antigen in Gegenwart von löslichem Antigen.

Die stabilen Biosensorzellen anti-CEA Jurkat879 und anti-CD30 Jurkat879 wurden zur Ab-sättigung der Bindestellen auf einer Verdünnungsreihe des jeweils korrespondierenden anti-idiotypischen Antikörpers BW2064/36 (CEA-idiotyp) oder 9G10 (CD30-idiotyp) inkubiert. Anschließend wurden den Zellen die korpuskulären Sepharosekügelchen der beiden unterschiedlichen Spezifitäten, BW2064/36AK-Sepharose oder 9G10AK-Sepharose, zugesetzt. Nach 48 Stunden wurde die Luciferaseaktivität der Zelllysate und IL-2 Sekretion in den Kulturüberstand bestimmt (Abbildung 3.28).

Nach 24 Stunden Inkubation war ohne lösliches Antigen eine Bindung rezeptortragender Jurkat879 Zellen an die korrespondierenden anti-idiotypischen Sepharosekügelchen beobachtet worden (Abbildung 3.28 A). Anti-CEA Jurkat879 Zellen banden an BW2064/36AK-Sepharose und anti-CD30 Jurkat879 Zellen an 9G10AK-Sepharose. Die jeweils andere AK-Sepharose wurde nicht gebunden. Zusätzlich fällt im morphologischen Vergleich der beiden stabilen Zelllinien anti-CEA Jurkat879 und anti-CD30 Jurkat879 auf, dass anti-CD30 Jurkat879 Zellen aggregieren. Diese Zellaggregate resultieren vermutlich aus einer gegenseitigen Bindung der anti-CD30 rezeptortragenden Zellen, da CD30 ebenfalls auf der Oberfläche von Jurkat879 Zellen exprimiert wird (ohne Abbildung). In Gegenwart von 100 µg/ml anti-idiotypischem BW2064/36 Antikörper banden CEA-spezifische Jurkat879 Zellen die korpuskuläre BW2064/36AK-Sepharose nicht, da die Rezeptorbindestellen durch den Antikörper blockiert wurden. Auch die Spezifitätskontrolle mit anti-CD30 Jurkat879 Zellen zeigte in Gegenwart von 100 µg/ml des korrespondierenden anti-idiotypischen Antikörpers 9G10 keine Bindung an die 9G10AK-Sepharose. Die Blockierung der Rezeptorbindestellen mit 9G10 Antikörper führte zudem zur Inhibierung der Zellaggregation CD30-spezifischer Jurkat879 Zellen durch membranständiges CD30.

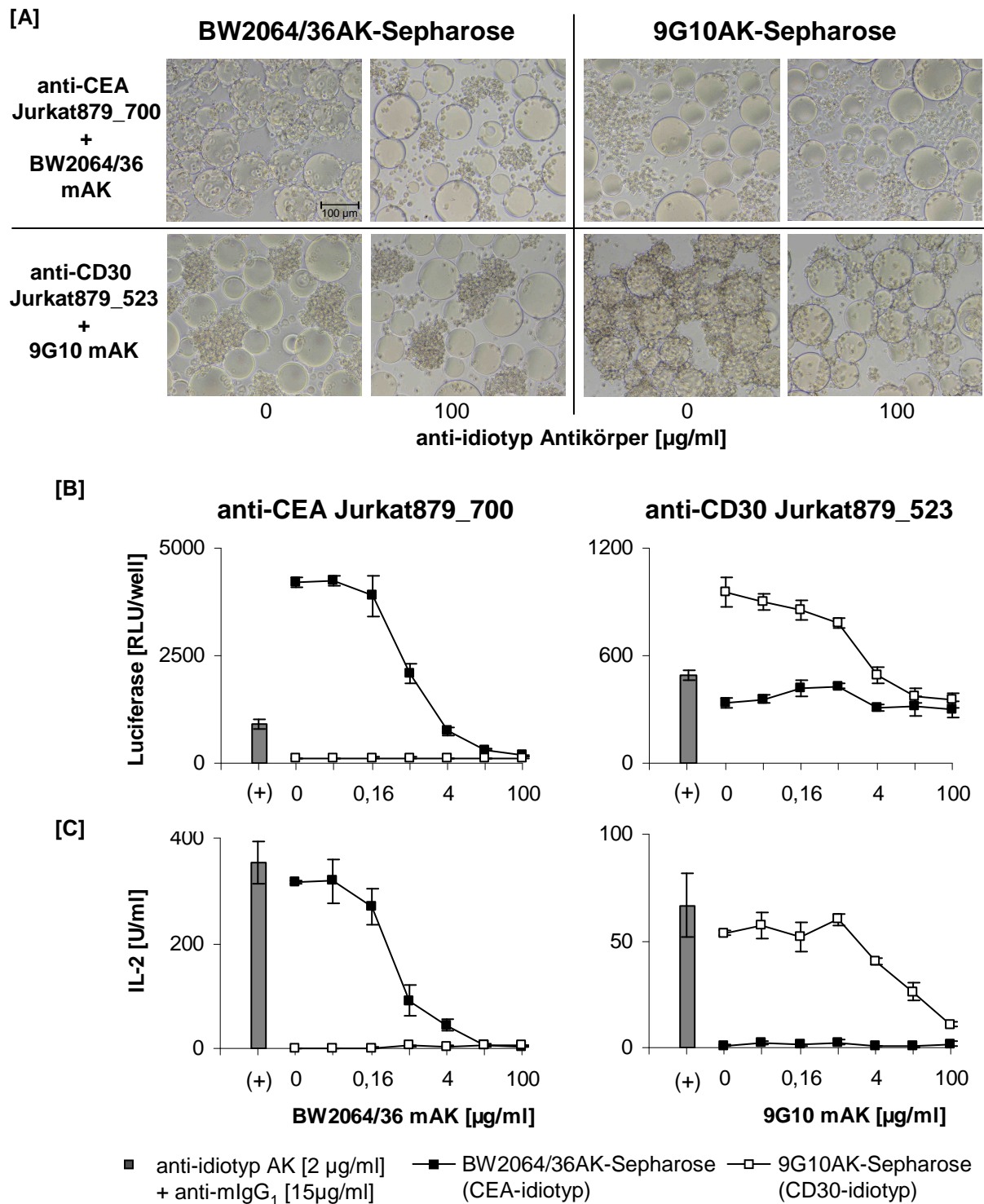


Abbildung 3.28: Aktivierung von anti-CEA und anti-CD30 Jurkat879 Zellen auf anti-idiotypischen Sepharosekügelchen in Gegenwart von löslichem Antigen. Je 3×10^4 anti-CEA oder anti-CD30 Jurkat879 Zellen wurden 30 Minuten mit unterschiedlichen Konzentrationen (0–100 µg/ml) des korrespondierenden anti-idiotypischen Antikörpers, BW2064/36 mit CEA-idiotyp oder 9G10 mit CD30-idiotyp, inkubiert und anschließend auf BW2064/36AK-Sepharose und 9G10AK-Sepharose (jeweils 10 µl/Vertiefung) verteilt. Zur Kontrolle (+) wurden die Rezeptoren mit dem jeweils anti-idiotypischen Antikörper (2 µg/ml) und anti-mIgG₁ Antikörper (15 µg/ml) quervernetzt. Nach 24 Stunden wurden die je höchsten und niedrigsten Verdünnungsstufen im Inversmikroskop bei 400facher Vergrößerung aufgenommen **A** und nach weiteren 24 Stunden die Luciferaseaktivität des Zelllysats **B** und die IL-2 Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA **C** bestimmt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte aus Dreifachansätzen +/- Standardabweichung.

Die Luciferaseaktivität im Zellysat nach 48 Stunden Inkubation (Abbildung 3.28 B) korrelierte mit dem mikroskopisch sichtbaren Bindungsverhalten der Biosensorzellen an die Sepharosekügelchen. Es wurde eine hohe Luciferaseaktivität von anti-CEA Jurkat879 Zellen auf der korrespondierenden anti-idiotypischen BW2064/36AK-Sepharose, und nicht auf der Sepharose des CD30-Idiotyps nachgewiesen. Mit steigender Konzentration des Antikörpers BW2064/36 wurde das Luciferasesignal der Biosensorzellen durch zunehmende Blockierung der Rezeptorbindestellen deaktiviert. Gleiches galt ebenfalls für die IL-2 Sekretion nach Bindung an BW2064/36AK-Sepharose, die durch den kompetitiven Antikörper BW2064/36 konzentrationsabhängig abnahm (Abbildung 3.28 C). Der Kontrollansatz mit BW2064/36 Antikörper und quervernetztem Sekundärantikörper anti-mIgG₁ führte zu Luciferaseaktivität und zu IL-2 Sekretion der anti-CEA Jurkat879 Zellen. Dabei fiel auf, dass die Bindung des Biosensors an das korpuskuläre Antigen zu einem höheren Luciferasesignal führte als die Quervernetzung löslichen Antigens. Die IL-2 Konzentration dagegen zeigte keinen quantitativen Unterschied zwischen Kontrollansatz und Inkubation mit BW2064/36AK-Sepharose.

Anti-CD30 Jurkat879 Zellen wurden spezifisch durch 9G10AK-Sepharose zur Expression von Luciferase und IL-2 aktiviert. Diese Aktivierung wurde durch steigende Konzentrationen des anti-idiotypischen Antikörpers 9G10 blockiert. Auch nach Quervernetzung der anti-CD30 Rezeptoren mit 9G10 Antikörper und anti-mIgG₁ exprimierten anti-CD30 Jurkat879 Zellen Luciferase und IL-2. Ausserdem zeigten die CD30-Biosensorzellen in Gegenwart von BW2064/36AK-Sepharose eine hohe Luciferasegrundaktivität, die offenbar auf die zusätzliche Stimulation durch CD30 auf der Zelloberfläche der Jurkat879 Zellen zurückzuführen ist.

Diese Untersuchungen demonstrieren, dass der Biosensor Jurkat879 mit CD3zeta Immunrezeptoren spezifisch korpuskulär gebundenes Antigen auch in Gegenwart von löslichem Antigen detektiert. Dabei wird das Luciferasesignal des Biosensors durch anti-idiotypische Sepharosekügelchen bei steigenden Konzentrationen anti-idiotypischen Antikörpers gleicher Spezifität blockiert, indem die Rezeptorbindestellen des Biosensors kompetitiv durch das lösliche Antigen besetzt werden wodurch die Bindungsfähigkeit an das korpuskuläre Antigen herabgesetzt wird. Der Biosensor toleriert mehr als 4 µg/ml anti-idiotypischen Antikörper als Surrogat für lösliches Antigen bei gleichzeitiger spezifischer Detektion der korpuskulären Sepharosekügelchen.

3.7 Modifikation des zellulären Biosensors für ein zeitnahes Signal mit Hilfe des Ca^{2+} -sensitiven Cameleon-Proteins YC3.60

Um den Biosensor dahingehend zu modifizieren, dass ein kurzfristiges und bildgebendes Signal generiert wird, wurde das Ca^{2+} -sensitive Cameleon-Protein YC3.60 (Nagai *et al.*, 2004) als Signalgeber in Jurkat Zellen eingeführt. Dieses Cameleon-Protein setzt sich zusammen aus den cyan und gelb fluoreszierenden Proteinen CFP (480 nm) und einer zirkulär permultierten Variante des YFP (535 nm), die durch intramolekulares Calmodulin (CaM), einen kurzen Peptidlinker, und das CaM-bindende Peptid M13 der Myosin *light chain* Kinase verbunden sind. Die Bindung von Ca^{2+} an CaM führt zur Affinitätssteigerung zu dessen physiologischen Interaktionspartner M13 und resultiert in einer Konformationsänderung, welche den Abstand der fluoreszierenden Proteine CFP und YFP zueinander verringert und zu einem Fluorescence resonance energy transfer (FRET) zwischen den Fluorophoren führt. Das Spektrum emittierten Lichts wird dadurch in den gelben Wellenlängenbereich von 535 nm verschoben (Abbildung 3.29).

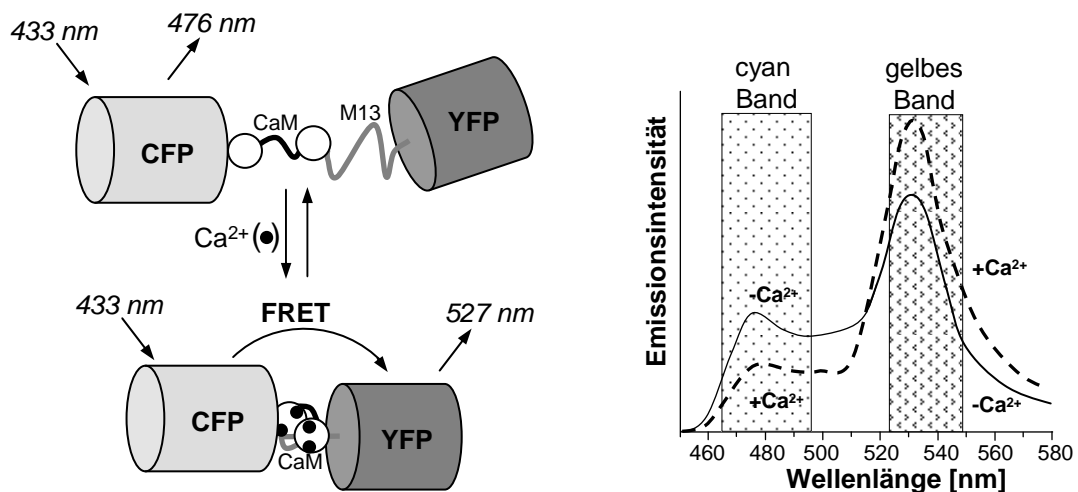


Abbildung 3.29: Schematische Darstellung des Ca^{2+} bindenden gelb fluoreszierenden „Yellow Cameleon“ Proteins mit Emissionsspektren der Ca^{2+} -freien ($-\text{Ca}^{2+}$) und gebundenen ($+\text{Ca}^{2+}$) Form.

Die Jurkat Zellen mit Cameleon Indikator sollen in Kombination mit einem rekombinanten Immunrezeptor einen Biosensor mit hoher Zeitauflösung ergeben, der unmittelbar nach Antigenbindung mit einem Fluoreszenzsignal im gelben Wellenlängenbereich reagiert, indem intrazelluläres Ca^{2+} gebunden wird, das im Zuge der CD3zeta vermittelten Signaltransduktion aus dem ER freigesetzt wird.

3.7.1 Generierung eines stabilen Jurkat Zellklons mit Cameleon-Protein YC3.60

Für die Generierung eines Ca^{2+} -sensitiven Jurkat-Cameleon Zellklons wurde der Expressionsvektor pcDNA3.1-YC3.60 Superior Cameleon (#1076) mittels Lipofektion in Jurkat Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die transfizierten Zellen in Geneticin (G418) haltigem Selektionsmedium auf einer Mikrotiterplatte ausgesät. Nach 3–4 Wochen Expansion von einzeln wachsenden Zellklonen wurden Cameleon-fluoreszierende Jurkat Zellen mit Hilfe der FACS-Analyse identifiziert (Abbildung 3.30 A). Es wurden mehrere Jurkat-Cameleon Klone generiert, die eine unterschiedlich hohe Expression des fluoreszierenden Proteins aufweisen.

Um die Funktionalität des Cameleon-Proteins in den Jurkat Zellen zu prüfen, wurden die Jurkat-Cameleon Klone #15 und #17 mit PMA und Ionomycin stimuliert. Diese bewirken in den Zellen die Aktivierung der Proteinkinase C und einen kontinuierlichen Ca^{2+} Influx in das Cytoplasma. Die Fluoreszenzintensität der Zellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 3.30 B).

Die FACS-Analyse zeigte nach 2 Stunden Inkubation mit PMA und Ionomycin im Fluoreszenzkanal 1 bei 525 nm eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität der gesamten Zellpopulation, die über den Zeitraum von 24 Stunden weiter zunahm. Diese Steigerung der Fluoreszenzintensität wird durch FRET innerhalb des Cameleon-Proteins in den gelben Wellenlängenbereich von 535 nm nach Bindung von intrazellulär freigesetztem Ca^{2+} ausgelöst. Zusätzlich dazu führt die kontinuierliche Stimulation offenbar zu einer mit der Zeit zunehmenden Konzentration des Ca^{2+} /Cameleon-Komplexes. Die schwach fluoreszierenden Jurkat-Cameleon Zellen #15 zeigten dabei ein besseres Signal-Noise Verhältnis als der Zellklon #17 mit hoher Grundfluoreszenz.

Hier wird gezeigt, dass stabil exprimierende Jurkat-Cameleon Zellen nach Stimulation mit PMA und Ionomycin mit einem Ca^{2+} -induzierten Fluoreszenzsignal reagieren, welches durchflusszytometrisch mit einer Zeitverzögerung von 2 Stunden nachweisbar ist. Durch die Konzentrierung des Ca^{2+} /Cameleon-Komplexes wird das Fluoreszenzsignal der Cameleon Zellen bei länger Stimulation zeitabhängig erhöht.

3.7.2 Generierung von Jurkat-Cameleon Zellen mit stabiler Expression von Immunrezeptoren

Für die Kombination der Jurkat-Cameleon Indikatorzelle mit rekombinantem Immunrezeptor zu einem Ca^{2+} -basierten Biosensor wurden Jurkat-Cameleon Zellen stabil mit den Immunrezeptoren BW431/26scFv-Fc-zeta (#700) gegen CEA und HRS3scFv-Fc-zeta (#523) gegen CD30 ausgestattet.

Es wurde der Jurkat-Cameleon Klon #15 verwendet, der in der durchflusszytometrischen Analyse ein günstiges Signal-Noise Verhältnis aufweist. Die Zellen wurden retroviral mit den

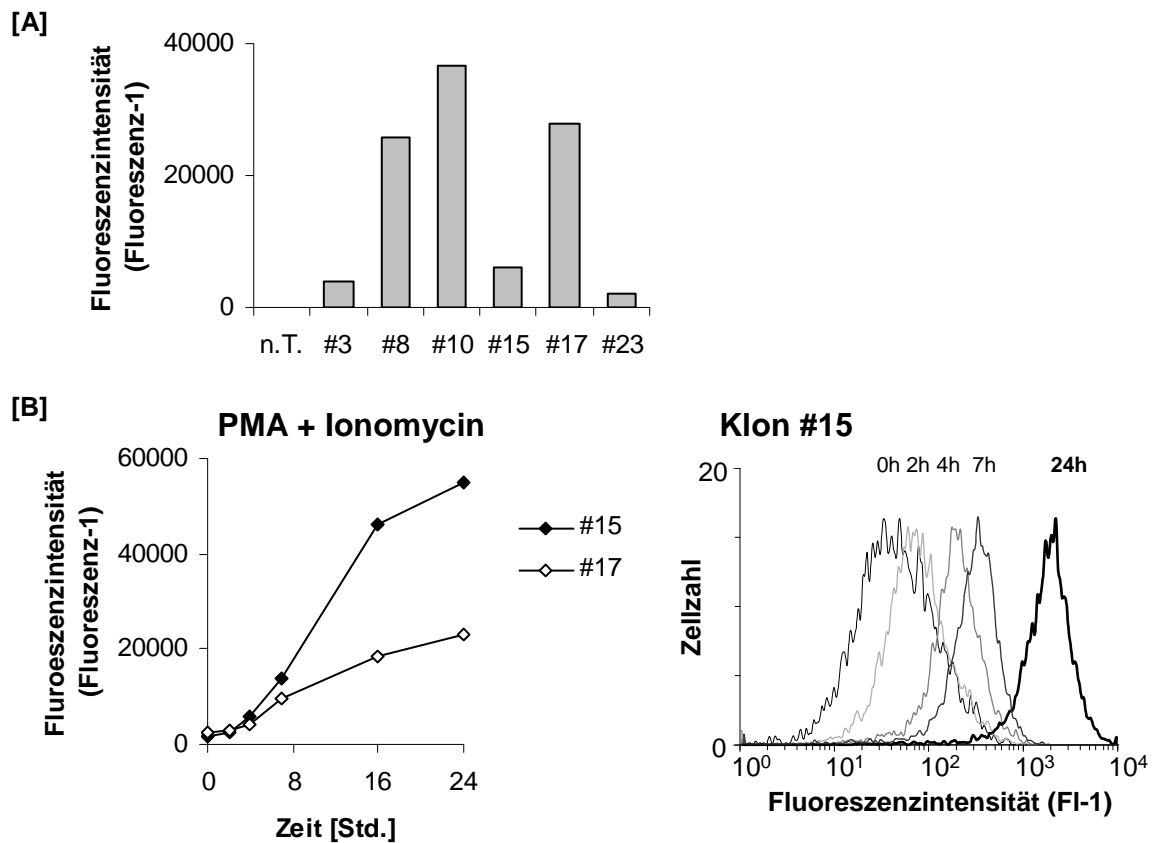


Abbildung 3.30: FACS-Analyse von Jurkat Zellen mit stabiler Expression von YC3.60 Cameleon-Protein und Aktivierung durch PMA und Ionomycin. Das Konstrukt pcDNA3.1-YC3.60 Superior Cameleon (#1076) wurde mittels Lipofektion in 3×10^6 Jurkat Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden wurden 5×10^4 Zellen pro Vertiefung in G418-haltiges Selektionsmedium (2 mg/ml) auf einer Mikrotiterplatte ausgesät. Innerhalb von 3–4 Wochen wurden 24 Einzelklone expandiert und die Expression des Cameleon-Proteins durchflusszytometrisch im Fluoreszenzkanal 1 bei gegen nicht transfizierte Jurkat Zellen (n.T.) bestimmt (**A**). Je 2×10^6 Jurkat-Cameleon Zellen der unterschiedlich stark fluoreszierenden Zellklone #15 und #17 wurden in Gegenwart von PMA (60 ng/ml) und Ionomycin (2 μ g/ml) inkubiert und die Fluoreszenzintensität der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch ermittelt (**B**). Dargestellt ist die grafische Auswertung der FACS-Analysen für beide Jurkat-Cameleon Klone und die übereinandergelegten Histogramme der verschiedenen Messzeitpunkte von Klon #15.

Rezeptoren #700 oder #523 transduziert. Anschließend wurden mittels limitierender Verdünnungsreihen Einzelklone isoliert, die durchflusszytometrisch auf die Expression des Rezeptors überprüft wurden. Zur FACS-Analyse rezeptortragender Jurkat-Cameleon Klone wurde ein Biotin-konjugierter anti-human IgG Antikörper eingesetzt und die Zellen mit APC-konjugiertem Streptavidin bei 660 nm detektiert (Abbildung 3.31). Dadurch wurde die Interferenz mit dem Cameleon-Protein vermieden, das in dem breiten Spektralbereich von 470–550 nm fluoresziert. Es wurden Jurkat-Cameleon Indikatorzellen mit stabiler Expression der CD3zeta Signalrezeptoren mit Spezifität für CEA und CD30 generiert.

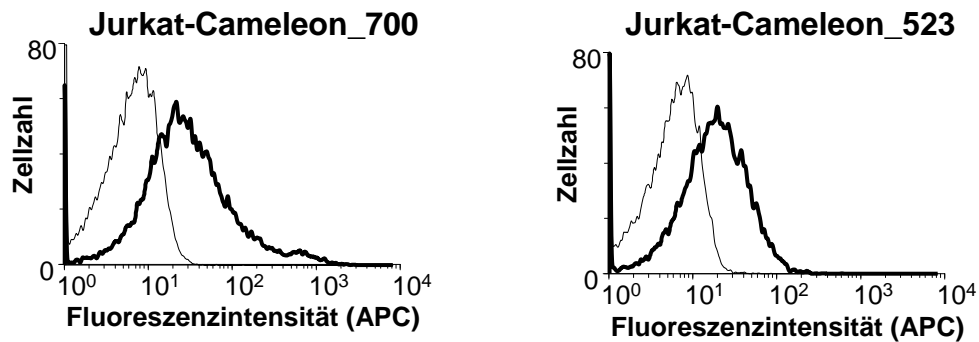


Abbildung 3.31: FACS-Analyse zum Nachweis der stabilen Expression der Immunrezeptoren mit Spezifität für CEA und CD30 auf der Oberfläche von Jurkat-Cameleon Zellen. Jurkat-Cameleon Zellen wurden mit den Immunrezeptoren BW431/26scFv-Fc-zeta (#700) gegen CEA, und HRS3scFv-Fc-zeta (#523) gegen CD30 retroviral transduziert. Nach 3–4 Wochen wurden mittels limitierender Verdünnungsreihen Einzelklone expandiert und anschließend rezeptortragende Klone mit Hilfe eines Biotin-konjugierten anti-human IgG Antikörpers und APC-konjugiertem Streptavidin durchflusszytometrisch identifiziert. Dargestellt sind die übereinandergelegten Histogramme jeweils eines anti-CEA (#700) und anti-CD30 (#523) Jurkat-Cameleon Klons (breite Linie) mit nicht transduzierten Jurkat-Cameleon Zellen (schmale Linie).

3.7.3 Aktivierung des Ca^{2+} -basierten Biosensors durch immobilisiertes Antigen

In vorangegangenen Experimenten wurde die Bindungsspezifität des rekombinanten Immunrezeptors mit Jurkat879 NFAT-Luciferase Zellen auf der Ebene eines Transkriptionsfaktor gesteuerten Sensorsignals gezeigt. Das Cameleon Reportersystem basiert dagegen auf der Freisetzung von Ca^{2+} , das bei der rezeptorvermittelten Signaltransduktion aus intrazellulären ER-Speichern freigesetzt wird, und deren cytoplasmatische Konzentration u.a. als Mediator bei der Signalweiterleitung dient. In diesem Abschnitt soll der Frage nachgegangen werden, ob Jurkat-Cameleon Zellen in Kombination mit einem rekombinanten Immunrezeptor nach Rezeptorstimulation durch immobilisiertes Antigen zu einem optischen Fluoreszenzsignal aktiviert werden.

Dazu wurden die Jurkat-Cameleon Zellen mit stabiler Expression der Rezeptoren gegen CEA BW431/26scFv-Fc-zeta (#700) und gegen CD30 HRS3scFv-Fc-zeta (#523) auf einer Mikrotiterplatte inkubiert, die mit den anti-idiotypischen Antikörpern BW2064/36 gegen die CEA-Bindedomäne und 9G10 gegen die CD30-Bindedomäne der Rezeptoren beschichtet wurde. Zur Kontrolle wurde die Platte in einem Ansatz mit PBS vorinkubiert, und die agonistischen Antikörper OKT3 und 15E8 gegen endogenes CD3 und CD28 immobilisiert. Zusätzlich zu Cameleon Zellen mit den CD3zeta Signalrezeptoren #700 und #523 wurden Jurkat-Cameleon Zellen generiert, die den anti-CEA Rezeptor BW431/26scFv-Fc-CD28-zeta (#607) mit kostimulatorischer CD28 Signaldomäne exprimieren. Nach 24 Stunden Inkubation wurde die Fluoreszenzintensität der Biosensorzellen durchflusszytometrisch bei 525 nm analysiert (Abbildung 3.32).

Die FACS-Analyse ergab einen spezifischen Anstieg der Fluoreszenzintensität von anti-CEA Jurkat-Cameleon Zellen nach Inkubation mit dem immobilisierten anti-idiotypischen Antikörper BW2064/36 gegenüber dem nicht bindenden anti-idiotypischen Antikörper 9G10 oder der Kontrolle ohne Antikörper. Cameleon Zellen mit Spezifität für CD30 zeigten dagegen mit dem

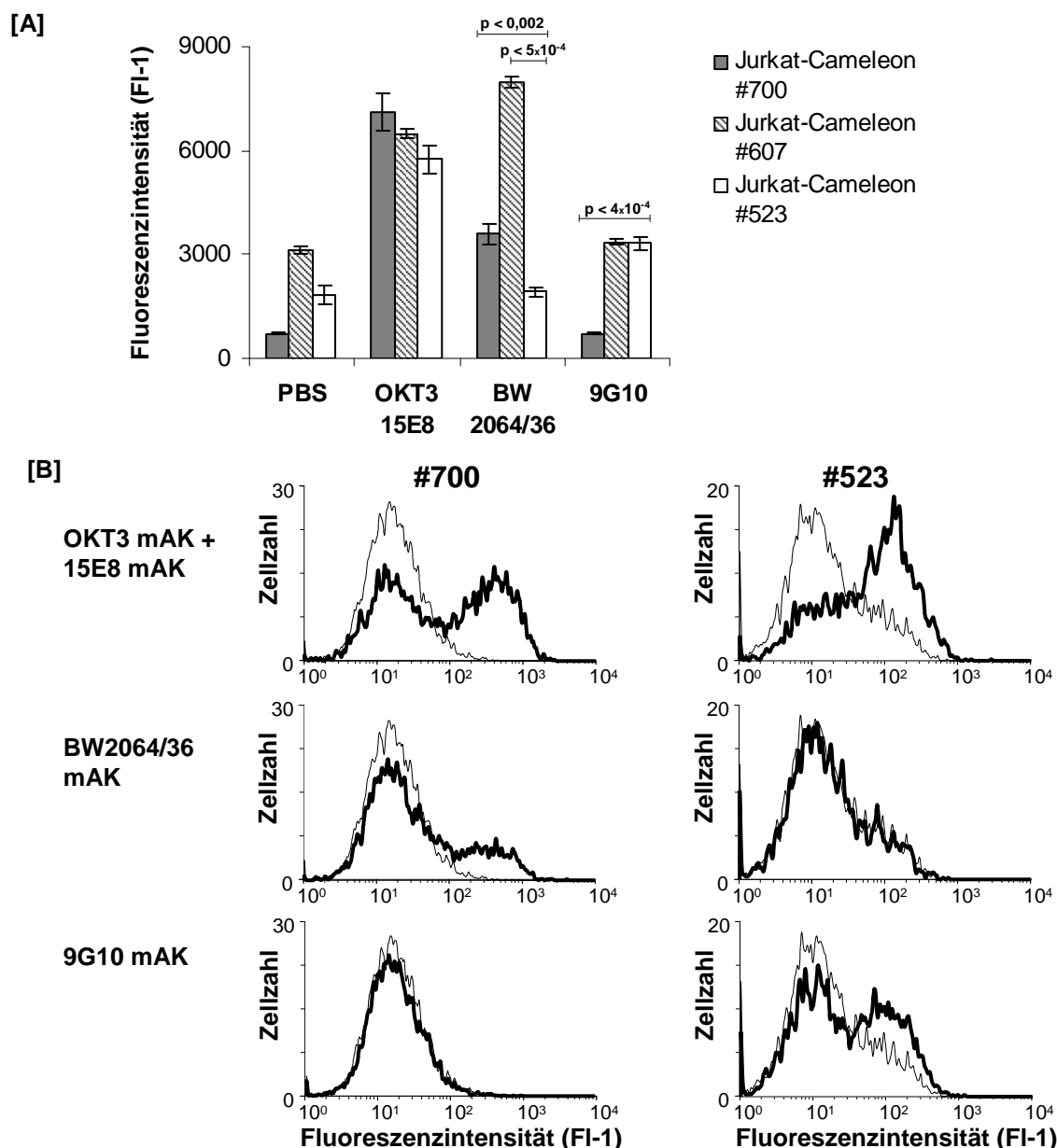


Abbildung 3.32: Reziproke Aktivierung von Jurkat-Cameleon Zellen mit anti-CEA und anti-CD30 Immunrezeptoren nach Bindung an das immobilisierte Antigen. Je 2×10^5 Jurkat-Cameleon Zellen mit Rezeptor BW431/26scFv-Fc-zeta #700 gegen CEA oder HRS3scFv-Fc-zeta #523 gegen CD30 wurden pro Vertiefung auf eine Mikrotiterplatte ausgesät, die zuvor mit PBS, den anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern OKT3 und 15E8 (je $2 \mu\text{g/ml}$), und den anti-idiotypischen Antikörpern BW2064/36 ($2 \mu\text{g/ml}$) gegen die BW431/26scFv-Bindedomäne, und 9G10 ($2 \mu\text{g/ml}$) gegen die HRS3scFv-Bindedomäne beschichtet wurde. Zusätzlich dazu wurden Jurkat-Cameleon Zellen ausplattiert, die retroviral zur Expression des Immunrezeptors BW431/26scFv-Fc-CD28-zeta (#607) transduziert wurden. Nach 24 Stunden Inkubation wurde die Fluoreszenzintensität (FI-1) der Jurkat-Cameleon Zellen mit stabil exprimierten Rezeptoren und mit retroviral transduziertem anti-CEA Rezeptor #607 durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus Dreifachansätzen \pm Standardabweichung und Irrtumswahrscheinlichkeiten p mit Hilfe des Student's T-Test(A) sowie die übereinandergelegten Histogramme der stimulierten #700 und #523 Jurkat-Cameleon Zellen (breite Linien) und nicht stimulierten Zellen (schmale Linien) (B).

Antikörper 9G10 des CD30-idiotyps ein erhöhtes Fluoreszenzsignal und nicht mit dem Antikörper BW2064/36 oder ohne Antikörper. Die Cameleon-basierten Biosensoren gegen CEA (#700) und CD30 (#523) wurden zudem beide durch die agonistischen Antikörper OKT3 und 15E8

gegen endogene T-Zellrezeptormoleküle zu erhöhter Fluoreszenz aktiviert. Im Unterschied zu Cameleon Zellen mit anti-CEA Rezeptor zeigten CD30 spezifische Zellen ohne Stimulation eine erhöhte Hintergrundfluoreszenz, die im Histogramm (Abbildung 3.32 B) durch eine breitere Verteilung der fluoreszierenden Zellpopulation angezeigt ist. Diese erhöhte Fluoreszenz ist vermutlich auf die zusätzliche interzelluläre Stimulation durch membranständiges CD30 auf der Oberfläche von Jurkat-Cameleon Zellen zurückzuführen. Zudem wird das Fluoreszenzsignal nach spezifischer Stimulation durch den korrespondierenden anti-idiotypischen Antikörper offenbar nur durch einen Teil der Zellpopulation getragen während andere Zellen nicht auf den Liganden reagieren, obwohl sie den Rezeptor exprimieren. Möglicherweise ist für eine effiziente Aktivierung die Rezeptordichte auf der Zelloberfläche der Biosensorzellen ausschlaggebend.

Auch Jurkat-Cameleon Zellen mit anti-CEA Rezeptor #607 zeigten spezifische Aktivierung nach Inkubation mit dem anti-idiotypischen Antikörper BW2064/36 gegen die CEA-Bindedomäne und den agonistischen Antikörpern OKT3 und 15E8 gegen den T-Zellrezeptor. Dagegen blieb die Fluoreszenzintensität der Zellen ohne Antikörper und mit dem 9G10 Antikörper des CD30-idiotyps im Bereich des Hintergrunds. Die hohe Grundfluoreszenz der Zellen mit #607 Rezeptor wurde vermutlich durch die kostimulatorische CD28 Signaldomäne des Rezeptors hervorgerufen, die zu einer latenten Voraktivierung der Zellen führt.

Diese Untersuchungen zeigen, dass Jurkat-Cameleon Zellen mit rekombinantem Immunrezeptor nach receptorspezifischer Stimulation durch immobilisiertes Antigen aktiviert werden und ein Fluoreszenzsignal abgeben, das zeitnah durchflusszytometrisch messbar ist.

3.7.4 Aktivierung des Ca^{2+} -basierten CEA-Biosensors durch quervernetztes, lösliches Antigen

Um in nachfolgenden Untersuchungen die zeitnahe Signalgebung einzelner Jurkat-Cameleon Zellen mit Hilfe des Monochromators bei 535 nm Wellenlänge zu untersuchen, sollte in diesem Experiment geprüft werden, ob Jurkat-Cameleon Zellen mit anti-CEA Rezeptor auch durch lösliches, quervernetztes Antigen zu einem Fluoreszenzsignal aktiviert werden. Dazu wurden die Cameleon Zellen mit stabiler Expression von anti-CEA Rezeptor #700 für 24 Stunden mit anti-idiotypischem BW2064/36 Antikörper und quervernetztem anti-human IgG_1 Sekundärantikörper inkubiert. Zum Vergleich wurden die Zellen mit dem immobilisierten BW2064/36 Antikörper stimuliert und zur zusätzlichen Kontrolle mit dem immobilisierten anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern OKT3 und 15E8 inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben der Zellen durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 3.33).

Die Jurkat-Cameleon #700 Zellen zeigten eine mit der Zeit zunehmende Fluoreszenz bei 525 nm sowohl mit quervernetztem anti-idiotypischen Antikörper als auch bei Inkubation mit

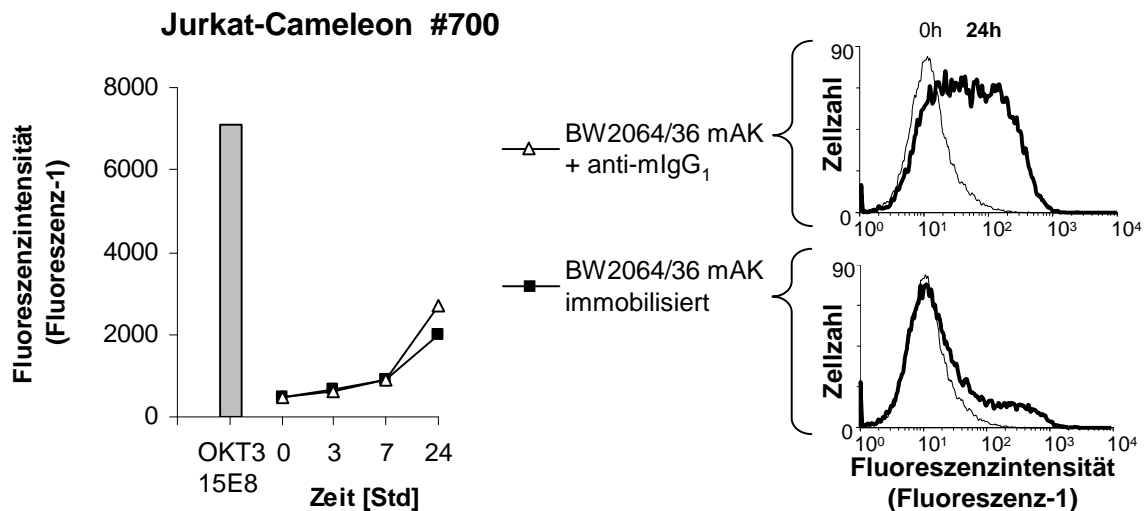


Abbildung 3.33: FACS-Analyse der Aktivierung von Jurkat-Cameleon Zellen mit anti-CEA Immunrezeptor durch quervernetztes, lösliches Antigen. Jurkat-Cameleon Zellen mit Rezeptor BW431/26scFv-Fc-zeta #700 gegen CEA wurden mit dem anti-idiotypischen Antikörper BW2064/36 (4 µg/ml) und quervernetzendem Sekundäranantikörper anti-mIgG₁ (15 µg/ml) inkubiert. Zur Kontrolle wurden je 2×10^5 Cameleon Zellen auf einer Mikrotiterplatte ausgesät, die zuvor mit dem Antikörper BW2064/36 (2 µg/ml), oder den den anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern OKT3 und 15E8 (je 2 µg/ml) beschichtet wurde. Die Fluoreszenzintensität der Zellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt ist die grafische Auswertung der FACS-Analysen und die übereinandergelegten Histogramme nach 24 Stunden Stimulation (breite Linien) mit nicht stimulierten Zellen (schmale Linien).

immobilisiertem BW2064/36 Antikörper. Zudem zeigten die Zellen ein erwartungsgemäß hohes Fluoreszenzsignal nach 24 Stunden Stimulation des T-Zellrezeptors mit den immobilisierten agonistischen Antikörpern OKT3 und 15E8. Der Vergleich der Histogramme der anti-CEA Cameleon Zellen nach antigenspezifischer Stimulation zeigt eine von der Präsentation des Antigens abhängige Fluoreszenzverteilung innerhalb der Zellpopulation, obwohl die numerischen Werte kaum voneinander abweichen. Offenbar werden die Cameleon Zellen durch die Antikörper induzierte Quervernetzung des Rezeptors anhaltender aktiviert als durch den Kontakt zu dem immobilisierten Antigen. Möglicherweise beruht die effizientere Aktivierung durch quervernetzende Antikörper darauf, dass die gelösten Antikörper eine größere Anzahl der Bindestellen des #700 Rezeptors besetzten, als das immobilisierte Antigen.

Dieses Experiment zeigt, dass der Ca²⁺-basierte CEA-Biosensor nach Quervernetzung des löslichen Antigens spezifisch aktiviert wird. Das Fluoreszenzsignal nach antigenspezifischer Aktivierung steigt zeitabhängig an, da der Ca²⁺/Cameleon-Komplex in den Zellen akkumuliert. Durch die quervernetzenden Antikörper kommt es offenbar zu einer anhaltenderen Aktivierung als durch die Stimulation mit immobilisiertem Antigen, da Rezeptorbindestellen effizienter besetzt werden.

3.7.5 Zeitabhängiges Sensorsignal der Ca^{2+} -sensitiven CEA-Biosensorzellen

Im folgenden Experiment soll geklärt werden, ob das Sensorsignal des Cameleon Biosensors unmittelbar nach Antigenkontakt mit hoher Zeitauflösung erfolgt. Dazu wurden einzelne Jurkat-Cameleon Zellen mit anti-CEA Rezeptor in der Kulturschale unter mikroskopischer Kontrolle durch einen Monochromatorlichtstrahl bei 440 nm Wellenlänge angeregt und die Fluoreszenz der Zellen im gelben Spektralbereich bei 535 nm für 30 Minuten aufgezeichnet.

Durch eine FACS-Sortierung wurden zunächst stark fluoreszierende anti-CEA Jurkat-Cameleon Zellen, die ca. 10 % der Gesamtpopulation ausmachen, angereichert. Die hohe intrazelluläre Konzentration des Cameleon-Proteins soll die Signalstärke des kurzfristigen Sensorsignals erhöhen. Um die Mobilität der Zellen in der Kulturschale herabzusetzen wurden die Jurkat-Cameleon Zellen auf Poly-D-Lysin beschichteten Mikroskopierschälchen zur Adhärenz inkubiert. Die Aufzeichnung der fluoreszierenden Zellen erfolgte in kurzen Intervallen von 30 Sekunden über einen Zeitraum von 30 Minuten, um ein Photobleaching der Zellen zu vermeiden. Die Jurkat-Cameleon Zellen #700 wurden in Gegenwart des anti-idiotypischen Antikörpers BW2064/36 auf den Mikroskopierschälchen ausgesät. Fünf Minuten nach Beginn der Aufzeichnung wurde der quervernetzende Sekundärantikörper zugesetzt. Zur Kontrolle wurden die Zellen in einem Ansatz mit einem murinen Isotyp-Antikörper vorinkubiert oder durch Ionomycin stimuliert, das zu einem Ca^{2+} -Influx in den Zellen führt. In einem weiteren Ansatz wurde die Hintergrundfluoreszenz der anti-CEA Cameleon Zellen #700 und zum Vergleich anti-CD30 Cameleon Zellen #523 mit interzellulärer CD30-Rezeptorstimulation für 30 Minuten bei 535 nm detektiert (Abbildung 3.34).

Die Stimulation der anti-CEA Cameleon Zellen #700 durch Ionomycin führte zu einem unmittelbaren Anstieg der Fluoreszenz bei 535 nm, das in ein Plateausignal überging. Dies ist auf einen kontinuierlichen Ca^{2+} -Influx zurückzuführen, und muss von dem oszillierenden Ca^{2+} Gleichgewicht abgegrenzt werden, das durch eine rezeptorvermittelte Signaltransduktion ausgelöst wird. Die Fluoreszenzintensität der Zellen nach Inkubation mit murinem Isotyp-Antikörper und anti-mIgG₁ Antikörper blieb konstant. Dagegen wurde nach Inkubation mit anti-idiotypischem Antikörper BW2064/36 und quervernetzendem Sekundärantikörper ein oszillierendes Ca^{2+} -Signal der Cameleon Zellen detektiert. Das Oszillationssignal setzte bei 21 von 36 aufgenommenen Zellen etwa 6-10 Minuten nach dem Stimulus ein. Diese Zeitverzögerung deckt sich mit dem erforderlichen Zeitraum zur sichtbaren Ausbildung von anti-CEA-eGFP Rezeptorclustern auf der Oberfläche von T-Lymphozyten, die mit Hilfe der Laser Scan Mikroskopie zuvor beobachtet wurde (Abschnitt 3.3). Im Vergleich der Hintergrundfluoreszenz von anti-CEA (#700) und anti-CD30 (#523) Cameleon Zellen fällt zudem auf, dass CD30-spezifische Zellen ein oszillierendes Fluoreszenzmuster zeigen. Dies ist auf die interzelluläre Stimulation durch membrangebundenes CD30 auf der Oberfläche von Jurkat Zellen zurückzuführen.

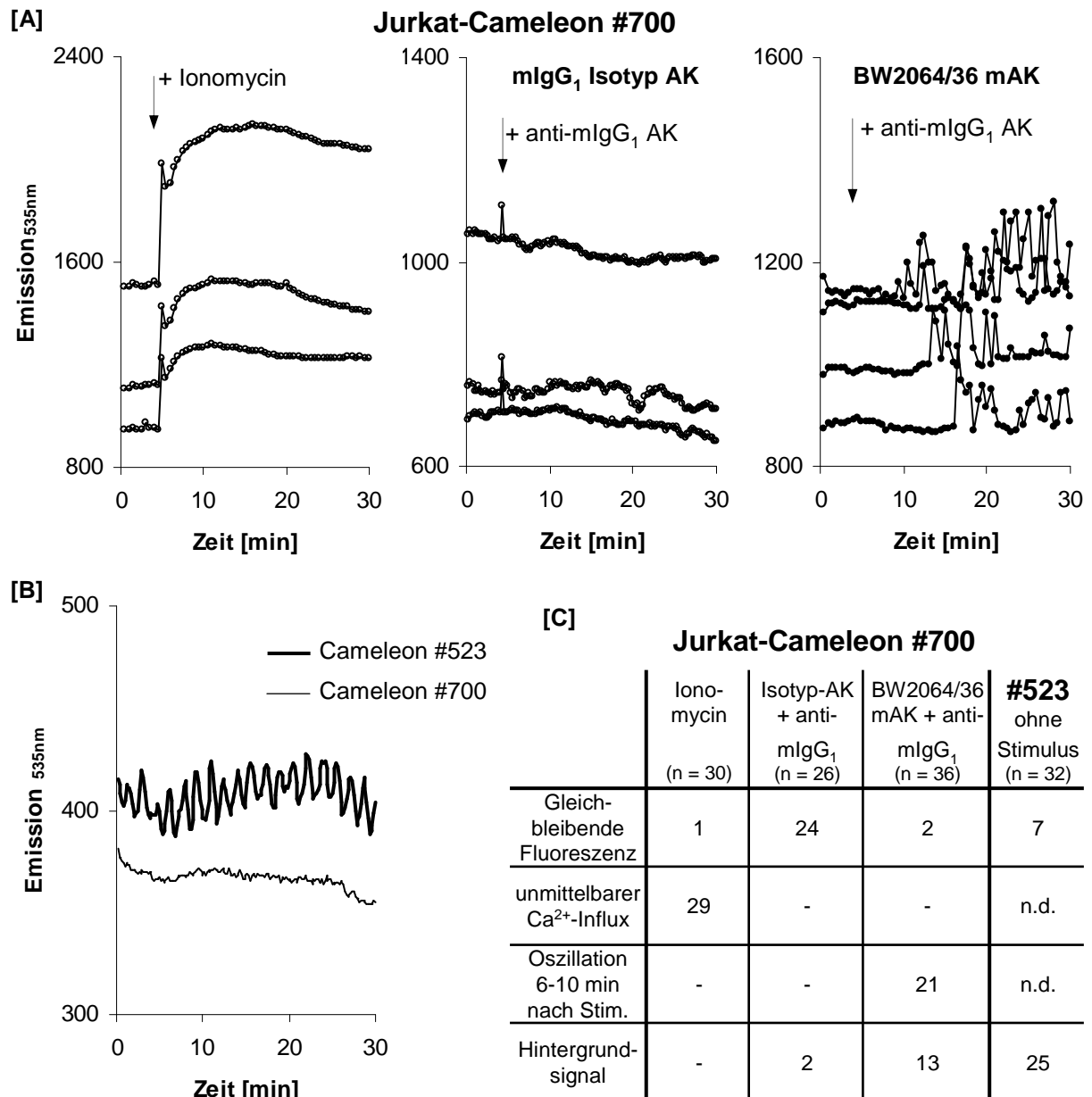


Abbildung 3.34: Zeitabhängiges, oszillierendes Fluoreszenzsignal von Jurkat-Cameleon Zellen mit anti-CEA Immunrezeptor nach Aktivierung durch lösliches, quervernetztes Antigen. Je 5×10^5 Jurkat-Cameleon Zellen mit anti-CEA Rezeptor BW431/26scFv-Fc-zeta (#700) oder anti-CD30 Rezeptor HRS3scFv-Fc-zeta (#523) wurden 15–30 Minuten vor der Messung auf Poly-D-Lysin beschichteten Mikroskopierschälchen zur Adhärenz ausgesät. Die Fluoreszenzmessung der Zellen erfolgte im Invers-Mikroskop mit einem 64 x Ölimmersionsobjektiv bei Monochromatorlicht der Anregungswellenlänge 440 nm und einem 535 nm Emissionsfilter mit Hilfe einer CCD-Kamera in Zeitintervallen von 30 (A) oder 15 (B) Sekunden. CEA-spezifische Jurkat-Cameleon Zellen wurden während der Aussaat mit dem anti-idiotypischen Antikörper BW2064/36 (4 µg/ml), dem Isotyp Antikörper mlgG₁ (4 µg/ml), oder ohne Antikörper vorinkubiert. Jeweils 5 Minuten nach Beginn der Aufzeichnung wurde der quervernetzende Sekundärantikörper anti-mlgG₁ (20 µg/ml) zugegeben, oder in dem Ansatz ohne Antikörper Ionomycin (2 µg/ml) zugesetzt (Pfeile im Diagramm, A). Zum Vergleich wurde die Hintergrundfluoreszenz von Jurkat-Cameleon Zellen #700 und CD30-spezifischen #523 Cameleon Zellen, mit interzellulärer Vorstimulation aufgenommen (B). Graphisch dargestellt sind jeweils die Messdaten einzelner exemplarischer Zellen, die statistische Auswertung der Messungen ist in C tabellarisch aufgeführt. n.d. = nicht detektiert

Hier wird gezeigt, dass der Ca^{2+} -basierte Biosensor aus Jurkat-Cameleon Zellen mit rekombinantem anti-CEA Immunrezeptor in Abhängigkeit vom Grad der Rezeptorquervernetzung ein zeitauflösendes, oszillierendes Fluoreszenzsignal liefert, das innerhalb weniger Minuten nach Rezeptorvernetzung erfolgt. Im Gegensatz zum Indikatorsystem NFAT-Luciferase bietet der Biosensor mit konstitutivem Cameleon-Protein den Vorteil einer kurzfristigen und optischen Sensorik.

3.8 Generierung von selbst-inaktivierenden retroviralen Vektoren (SIN) mit NFAT-Minimalpromotor

Im folgenden Teil dieser Arbeit wird das Prinzip der NFAT induzierten Genexpression in einem immuntherapeutischen Ansatz mit rezeptorexprimierenden T-Lymphozyten eingesetzt. In einem ersten Schritt soll ein retroviraler Vektor generiert werden mit dem Ziel, das IL-12-Gen unter Kontrolle des Transkriptionsfaktors NFAT in primären peripheren Blutlymphozyten (PBL) zu exprimieren. Dazu sollten NFAT-Erkennungssequenzen anstelle eines konstitutiven Promotors in einen selbst-inaktivierenden retroviralen Vektor kloniert werden. Durch die Deletion der LTR-Region eines solchen SIN-Vektors entfällt nach der Transduktion die trans-Aktivierung des NFAT-Minimalpromotors durch die retroviralen LTR Elemente.

3.8.1 Generierung von konstitutiven SIN-Vektoren mit GFP und murinem IL-12

Zur Überprüfung der Funktionalität des selbst-inaktivierenden und bicistronischen Ausgangsvektors pQCXIN (#735) wurde ein Kontrollkonstrukt generiert, in dem GFP unter Kontrolle des konstitutiven CMV-Promotors exprimiert wird. Dazu wurde das GFP-Gen aus dem Plasmid pEGFP-N1 (#852) mit Hilfe der Oligonukleotide 5eGFPBamHI (#355) und 3eGFPEcoRI (#356) amplifiziert und mit Hilfe der eingebrachten Schnittstellen mit den Enzymen *Bam*HI und *Eco*RI restringiert. Das GFP-Fragment wurde in den *Bam*HI und *Eco*RI geschnittenen SIN-Vektor pQCXIN ligiert. Das neu generierte Plasmid pQCXIN-eGFP (#991) mit der bicistronischen Expressionscassette eGFP-IRES-Neo, die das zusätzliche G418-Resistenzgen enthält, wurde mit den Klonierungsenzymen einer Kontrollrestriktion unterzogen und sequenziert (Abbildung 3.35). Die vollständige DNA- und Aminosäure-Sequenz ist im Anhang 5.3.1 dargestellt.

Zusätzlich wurde ein konstitutiver SIN-Vektor mit dem Gen für murines IL-12 (mIL-12, p40/p70) kloniert, dem ebenfalls der bicistronische, G418-Resistenz vermittelnde SIN-Vektor pQCXIN (#735) zugrunde lag. Mit Hilfe der PCR-Reaktion wurde das mIL-12 (p40deltap35)-Gen mit den Oligonukleotiden BamHI-IL-12-S (#369) und IL-12-EcoRI-AS (#370) aus dem Plasmid #520 pSFG-mIL-12-p40deltap35 amplifiziert. Anschließend wurde das mIL-12-Fragment zeitgleich mit dem Ausgangsvektor pQCXIN mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI verdaut und im nächsten Schritt ligiert. Aus einem der Klone, in denen mittels Kolonie-PCR die mIL-12-DNA der erwarteten Fragmentlänge 1,6 kb amplifiziert wurde, wurde die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert (Abbildung 3.35). Die vollständige DNA- und Aminosäure-Sequenz des Konstrukts pQCXIN-mIL-12 (#1018) ist im Anhang 5.3.2 dargestellt.

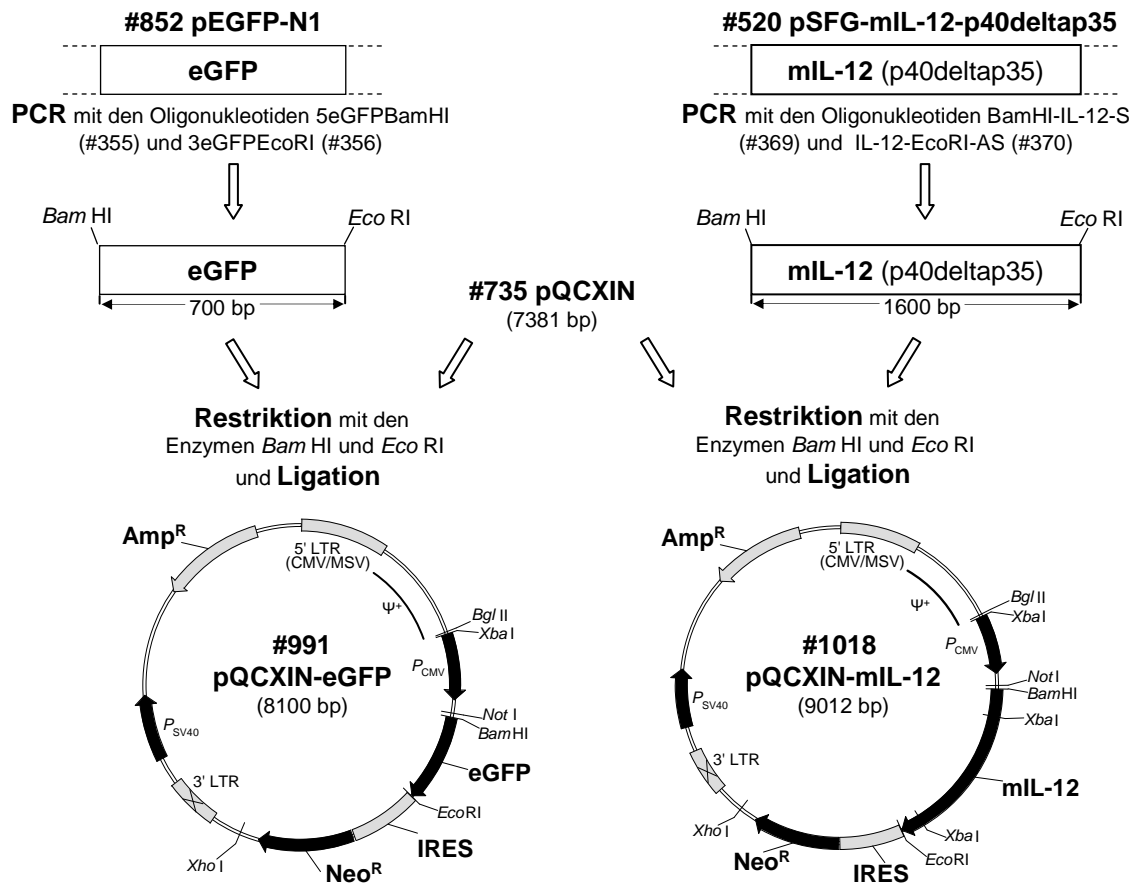


Abbildung 3.35: Klonierungsschema der konstitutiven, bicistronischen SIN-Vektoren #991 pQCXIN-eGFP und #1018 pQCXIN-mIL-12.

3.8.2 Generierung von NFAT-induzierbaren SIN-Vektoren mit murinem IL-12

Für induzierbare mIL-12-Konstrukte mit NFAT-Erkennungssequenzen wurde der konstitutive CMV-Promotor aus dem Plasmid #1018 pQCXIN-mIL-12 mit den Restriktionsenzymen *Bgl*III und *Bam*HI herausgeschnitten. Anschließend wurden zwei verschiedene NFAT-Minimalpromotoren vor das mIL-12-Gen inseriert.

Mit den Oligonukleotiden 5-NFAT6-*Bgl*III (#384) und 3-NFAT6-*Bam*HI (#385) wurde aus dem Plasmid #950 pSIN-(NFAT)6-eGFP mittels PCR ein Fragment amplifiziert, das sechs repetitive NFAT-Erkennungssequenzen und einen IL-2-Minimalpromotor enthält. Zusätzlich wurde das NFAT₄-Fragment aus dem Reporter-Plasmid #879 pNFAT-Luc, bestehend aus vier NFAT-Erkennungssequenzen und einer rudimentären TATA-Box, mit den Oligonukleotiden 5-NFAT4-*Bam*HI (#386) und 3-NFAT4-*Bam*HI (#387) amplifiziert. Die PCR-Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen *Bgl*III/*Bam*HI für NFAT₆, oder nur mit *Bam*HI für NFAT₄ geschnitten. Um die Religation des restringierten Ausgangsvektors pQCXIN-mIL-12 mittels identischer Überhänge der Enzyme *Bgl*III/*Bam*HI zu vermeiden, wurde dieser 5'-dephosphoryliert, und anschließend mit den NFAT-Promotorfragmenten NFAT₆ oder NFAT₄ ligiert (Abbildung 3.36).

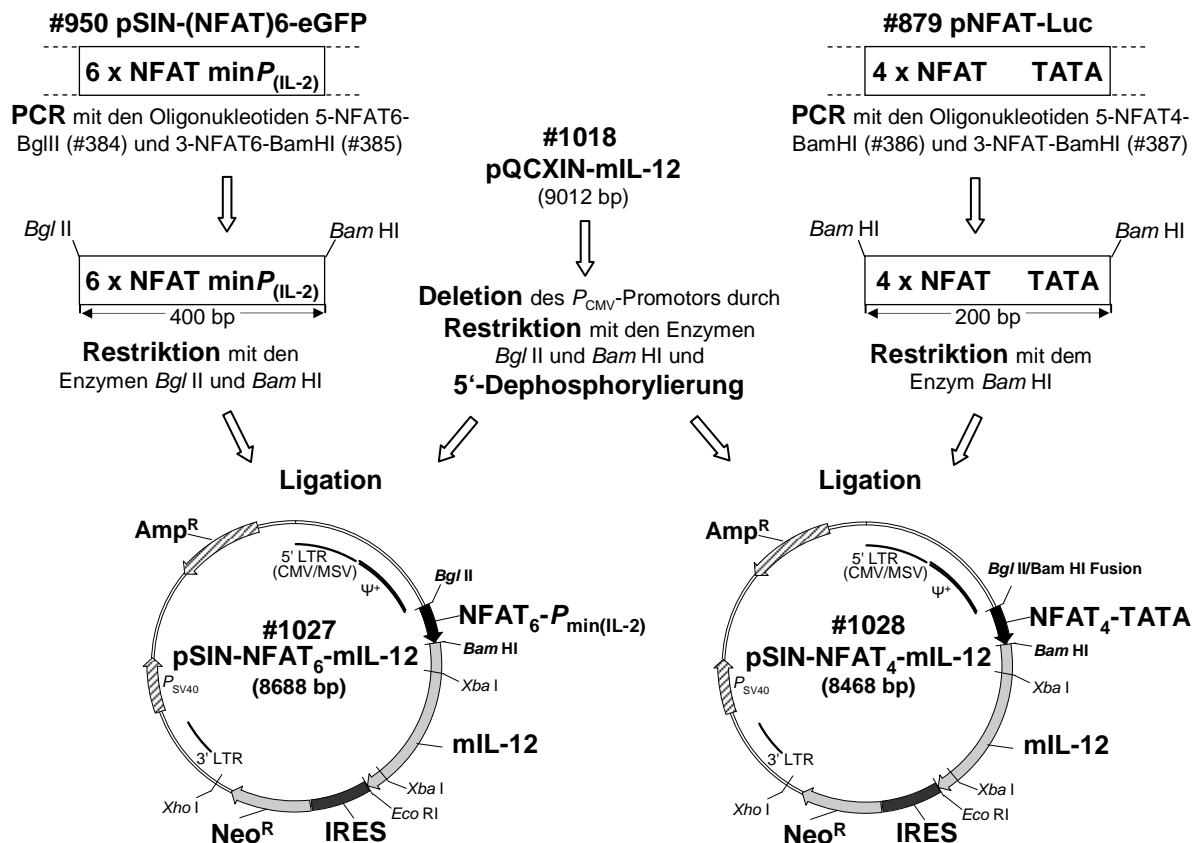


Abbildung 3.36: Klonierungsschema der NFAT-induzierbaren, bicistronischen Vektoren #1027 pSIN-NFAT₆-mIL-12 und #1028 pSIN-NFAT₄-mIL-12.

Mit den jeweiligen 5'-Oligonukleotiden dieser Klonierung und dem Oligonukleotid IL-12-EcoRI-AS (#370) wurde in einer Kolonie-PCR die Orientierung des inserierten Fragments überprüft. Zur Verifizierung wurde die Promotorregion jeweils eines Klon der neu generierten Konstrukte #1027 pSIN-NFAT₆-mIL-12 (Anhang 5.4.1) und #1028 pSIN-NFAT₄-mIL-12 (Anhang 5.4.2) sequenziert.

3.8.3 Expression der konstitutiven und induzierbaren SIN-Vektorkonstrukte in 293T Zellen

Da bei transienter Transfektion die DNA lediglich episomal vorliegt, kann die Genexpression auch der induzierbaren SIN-Vektorkonstrukte mittels LTR-Promotoraktivität nachgewiesen werden. Die DNA der generierten SIN-Vektoren pQCXIN-eGFP (#991), pQCXIN-mIL-12 (#1018), pSIN-NFAT₆-mIL-12 (#1027) und pSIN-NFAT₄-mIL-12 (#1028) wurde in 293T Zellen transfiziert. Anschließend wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie die cytoplasmatische Expression von GFP in 293T Zellen überprüft (Abbildung 3.37 A) oder mittels ELISA sezerniertes IL-12 im Kulturüberstand der Zellen bestimmt (Abbildung 3.37 B).

Durch Fluoreszenzanalyse transfizierter 293T Zellen mit pQCXIN-eGFP (#991) wurde die

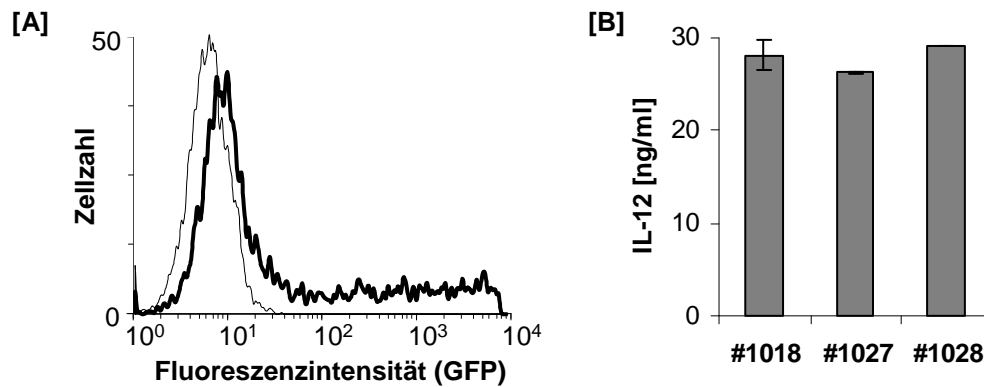


Abbildung 3.37: Nachweis der Expression der SIN-Vektorkonstrukte in 293T Zellen. Jeweils 2×10^5 293T Zellen wurden mit der DNA der SIN-Vektorkonstrukte pQCXIN-eGFP (#991), pQCXIN-mIL-12 (#1018) pSIN-NFAT₆-mIL-12 (#1027) und pSIN-NFAT₄-mIL-12 (#1028) transfiziert. Nach 48 Stunden wurde die cytoplasmatische Expression von GFP durchflusszytometrisch analysiert (A) und die IL-12-Sekretion in den Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt (B). **A:** Im Histogramm sind #991 transfizierte 293T Zellen (breite Linie) unbehandelten Zellen (schmale Linie) gegenübergestellt. **B:** Dargestellt sind jeweils Mittelwerte aus Dreifachansätzen +/- Standardabweichung.

Expression von GFP nachgewiesen. IL-12 im Kulturüberstand der 293T Zellen, die mit den SIN-Vektoren #1018, #1027 und #1028 transfiziert wurden, wies die Expression sowohl des konstitutiven Konstrukts pQCXIN-mIL-12 als auch der induzierbaren Konstrukte mit NFAT-Minimalpromotor pSIN-NFAT₆-mIL-12 und pSIN-NFAT₄-mIL-12 nach.

3.8.4 Funktionsanalyse der bicistronischen Expressionscassette GFP-IRES-Neo des Plasmids pQCXIN-eGFP in CD3⁺ T-Zellen

Um die Funktion der bicistronischen Expressionscassette des verwendeten SIN-Vektors zu überprüfen, wurde das Konstrukt pQCXIN-eGFP (#991) retroviral in CD3⁺ T-Zellen transduziert. Dazu wurde die DNA des SIN-Vektors gemeinsam mit den Helferplasmiden pColt-GALV (#392) und pHit60 (#393) in die Verpackungszelllinie 293T kotransfiziert. Anschließend wurden CD3⁺ T-Zellen zur Infektion mit den virusproduzierenden 293T Zellen für 48 Stunden kokultiviert. Die GFP Expression wurde durch Fluoreszenzanalyse nachgewiesen. Zum Nachweis der Expression des G418-Resistenzgens neo wurden die CD3⁺ T-Zellen anschließend in zwei Ansätzen mit und ohne G418 (Geneticin[®]) und in Gegenwart von IL-2 inkubiert. Nach 11 Tagen wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 3.38).

Nach retroviraler Transduktion mit dem bicistronischen selbst-inaktivierenden Expressionsvektor pQCXIN-eGFP exprimierten CD3⁺ T-Zellen GFP. Die Frequenz GFP exprimierender Zellen ließ sich durch Selektion mit G418 deutlich steigern, da mit Hilfe der internen ribosomalen Eintrittsstelle IRES gleichzeitig das G418-Resistenzgen neo exprimiert wurde. Nicht transduzierte CD3⁺ T-Zellen wurden in Gegenwart von Geneticin abgetötet. Der bicistronische Expressionsvektor pQCXIN-eGFP führt zur gleichzeitigen Expression von GFP und neo und ermöglicht die Selektion mit G418.

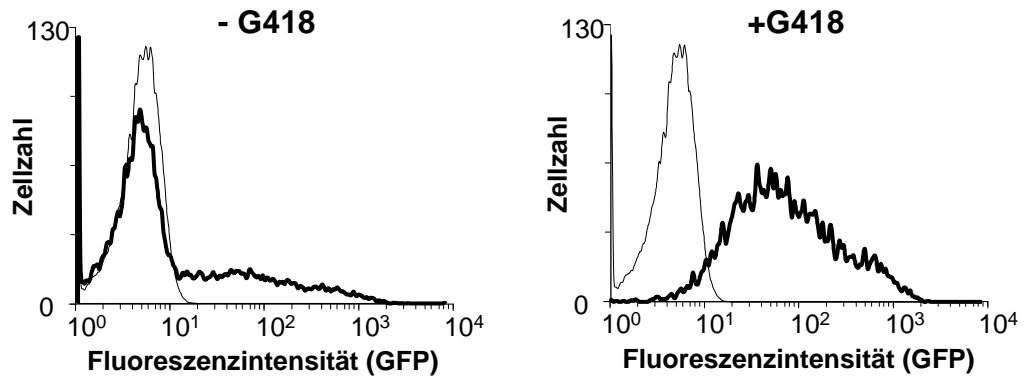


Abbildung 3.38: FACS-Analyse zum Nachweis der Funktion der bicistronischen Expressionscassette von pQCXIN-eGFP (#991) in CD3⁺ T-Zellen. CD3⁺ T-Zellen (2×10^6) wurden retroviral mit dem SIN-Vektorkonstrukt pQCXIN-eGFP (#991) transduziert, nach 48 Stunden die Expressionseffizienz des GFP durch Fluoreszenzanalyse im Durchflusszytometer bestimmt, und die Zellen in zwei Ansätzen in Gegenwart von IL-2 (1000 U/ml) mit und ohne G418 (2 mg/ml) für 11 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Transduzierte, ohne und mit Selektionsdruck (G418) inkubierte Zellen (breite Linie) sind im Histogramm nicht-transduzierten CD3⁺ T-Zellen (schmale Linie) gegenübergestellt.

3.9 Rezeptorinduzierte Sekretion von IL-12 in T-Lymphozyten mit Koexpression von anti-CEA Immunrezeptor und NFAT-mIL-12

Das Zytokin IL-12 erhöht die Aktivität immunrezeptortragender T-Lymphozyten zur Zytolyse und Interferon- γ Sekretion auf Antigen-positiven Tumorzellen (Gardemann, 2007). Da bei einer rezeptorvermittelten T-Zellantwort *in vivo* die systemische Gabe von IL-12 die Gefahr der systemischen Toxizität birgt, ist es für den therapeutischen Einsatz von Interesse, IL-12 lediglich lokal am Tumor zu applizieren. Eine Möglichkeit, dies zu erreichen ohne die Tumorzellen selbst lokalisieren zu müssen, bieten modifizierte T-Zellen, die zusätzlich zum Immunrezeptor mit einem induzierbaren Gen für IL-12 ausgestattet sind, welches durch den Rezeptor aktiviert wird. Durch die rezeptorinduzierte Expression von IL-12 wird das Zytokin unmittelbar am Tumor freigesetzt und die Aktivität der Effektorzellen erhöht.

In diesem Abschnitt soll untersucht werden, ob die generierten IL-12 Vektoren mit den NFAT-Erkennungssequenzen #1027 NFAT₆-mIL-12 und #1028 NFAT₄-mIL-12 eine rezeptorvermittelte Induktion von IL-12 in T-Lymphozyten ermöglichen. Dazu wurden die NFAT-IL-12 Konstrukte in Kombination mit dem anti-CEA Immunrezeptor #700 BW431/26scFv-Fc-zeta in T-Zellen koexprimiert. Zum Vergleich wurde der konstitutive IL-12 Vektor #1018 pQCXIN-mIL-12 mit dem anti-CEA Rezeptor #700 koexprimiert. Nach Kreuzvernetzung des Rezeptors durch Antikörper oder Antigen-positive Tumorzellen soll IL-12 induziert werden und einen steigernden Effekt auf die Aktivierung der T-Zellen bewirken.

3.9.1 Induktion der IL-12 Sekretion durch Stimulation mit immobilisierten Antikörpern

T-Lymphozyten mit NFAT-mIL-12 und koexprimiertem anti-CEA Rezeptor sollten hinsichtlich der Induktion von IL-12 nach Stimulation mit kreuzvernetzenden agonistischen Antikörpern gegen CD3 und CD28 Oberflächenmoleküle einerseits, und nach Kreuzvernetzung der rekombinanten Immunrezeptoren andererseits untersucht werden.

Für eine effiziente Koexpression von IL-12 und Immunrezeptor wurden in einem ersten Schritt zunächst die bicistronischen SIN-Vektoren #1018 pQCXIN-mIL-12 mit konstitutivem IL-12 und die induzierbaren Konstrukte #1027 NFAT₆-mIL-12 und #1028 NFAT₄-mIL-12 retroviral in T-Lymphozyten transduziert. Dazu wurde die entsprechende Vektor-DNA in Kombination mit den Helferplasmiden pColt-GALV (#392) und pHit60 (#393) in die Verpackungszelllinie 293T transfiziert und mit T-Lymphozyten für 48 Stunden kokultiviert. Die transduzierten T-Zellen wurden in Gegenwart von G418 und gleichzeitiger Stimulation durch immobilisierte agonistische Antikörper OKT3 und 15E8 gegen CD3 und CD28 11 Tage selektioniert. Durch die Stimulation des endogenen T-Zellrezeptors sollte der NFAT Transkriptionsfaktor aktiviert, und das Neo Resistenzgen der induzierbaren bicistronischen Konstrukte #1027 und

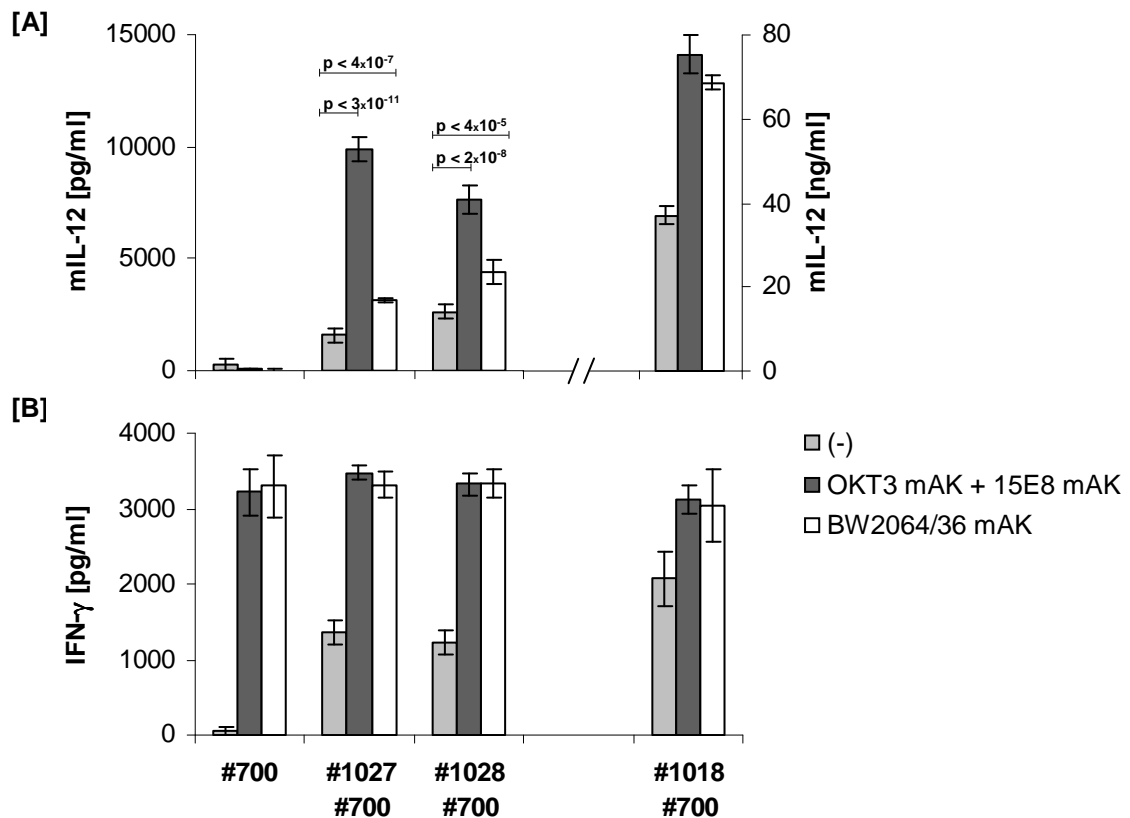


Abbildung 3.39: Induktion von IL-12 in T-Lymphozyten mit NFAT-mIL-12 und koexprimiertem anti-CEA Immunrezeptor nach Stimulation mit immobilisierten Antikörpern. Je 4×10^6 T-Lymphozyten wurden mit den Plasmiden #1018 pQCXIN-mIL-12, #1027 pSIN-NFAT₆-mIL-12 und #1028 pSIN-NFAT₄-mIL-12 retroviral transduziert und anschließend mit je 5×10^4 Zellen in $200 \mu\text{l}$ RPMI 1640 Medium auf Mikrotiterplatten mit den immobilisierten Antikörpern anti-CD3 OKT3 und anti-CD28 15E8, und in Gegenwart von G418 2mg/ml inkubiert. Nach 11 Tagen wurden die selektionierten T-Lymphozyten sowie untransduzierte Kontrollzellen retroviral zur Expression des anti-CEA Immunrezeptors BW431/26scFv-Fc-zeta (#700) transduziert. Eine Mikrotiterplatte wurde mit PBS, den Antikörpern OKT3 und 15E8, und dem anti-idiotypischen Antikörper BW2064/36 gegen den BW431/26scFv beschichtet, und je 3×10^4 rezeptortragende Effektorzellen pro Vertiefung ausgesät. Nach 5 Tagen wurde die Konzentration von IL-12 (A) und von IFN- γ (B) in den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Sechsfachansätzen mit Standardabweichung und die Irrtumswahrscheinlichkeiten mit Hilfe des Student's T-Test.

#1028 exprimiert werden. Die selektionierten T-Zellen wurden anschließend in einem zweiten Schritt retroviral mit dem anti-CEA Immunrezeptor BW431/26scFv-Fc-zeta (#700) transduziert. Zur Kontrolle dienten T-Lymphozyten, die nur mit dem Rezeptor #700 transduziert wurden. Die Expression des anti-CEA Rezeptors wurde durchflusszytometrisch ermittelt, und die T-Lymphozyten mit gleichen Effektorzellzahlen auf einer Mikrotiterplatte mit immobilisierten agonistischen Antikörpern, BW2064/36 anti-idiotypischem Antikörper gegen die CEA-Bindedomäne des #700 Rezeptors, und zur Kontrolle mit PBS, inkubiert. Nach 5 Tagen wurde die Konzentration sowohl von IL-12 als auch von Interferon- γ in den Zellkulturüberständen mit Hilfe eines ELISA bestimmt (Abbildung 3.39).

Die mit IL-12 und anti-CEA Rezeptor kotransduzierten T-Zellen sezernierten IL-12 im Gegensatz zu Zellen mit dem #700 Rezeptor allein. Dabei führte die Kontrolle mit konstitutivem

CMV-Promotor #1018 zu mehr IL-12 als die induzierbaren NFAT-mIL-12 Konstrukte #1027 und #1028. Nach Stimulation durch agonistische Antikörper gegen CD3 und CD28 exprimierten NFAT-mIL-12 T-Zellen signifikant mehr IL-12 gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle. Weiterhin führte auch die Kreuzvernetzung des koexprimierten anti-CEA Immunrezeptors durch den immobilisierten anti-idiotypischen Antikörper BW2064/36 zur Induktion der IL-12 Expression in T-Lymphozyten mit NFAT-kontrolliertem IL-12 #1027 und #1028. Auch die hohe konstitutive Expression von IL-12 durch die #1018 Kontrollzellen wurde durch Stimulation des endogenen TCR und des rekombinanten Rezeptors weiter gesteigert.

Die Stimulation der T-Lymphozyten sowohl mit den agonistischen Antikörpern OKT3 und 15E8, als auch dem anti-idiotypischen Antikörper BW2064/36 gegen die CEA-Bindedomäne des #700 Rezeptors führte zu hoher IFN- γ Sekretion. Dagegen sezernierten unstimulierte #700 Zellen kein IFN- γ . T-Lymphozyten, die mit den IL-12 Konstrukten #1018, #1027 oder #1028 und dem anti-CEA Rezeptor #700 kotransduziert waren, sezernierten auch ohne CD3 und CD28 Stimulation oder Kreuzvernetzung des Immunrezeptors geringe Mengen IFN- γ . Diese erhöhte IFN- γ Konzentration des Kontrollansatzes ist vermutlich auf eine Stimulation der T-Zellen durch das sezernierte IL-12 zurückzuführen, da IL-12 einerseits konstitutiv koexprimiert wurde und die induzierbaren Konstrukte #1027 und #1028 auch ohne Aktivierung des T-Zellrezeptors eine latente Expression von IL-12 zeigten.

In diesem Experiment wird gezeigt, dass in T-Zellen mit Koexpression der NFAT-IL-12 Konstrukte #1027 oder #1028 und anti-CEA Rezeptor #700 nach Antigenbindung des endogenen TCR oder des rekombinanten Immunrezeptors die Sekretion von IL-12 induziert wird. Auch bei hoher konstitutiver Expression von IL-12 mit dem koexprimiertem Konstrukt #1018 nimmt die IL-12 Sekretion rezeptortragender T-Zellen nach Stimulation weiter zu. Die IFN- γ Konzentration der Kulturüberstände belegt, dass die T-Zellen durch Kreuzvernetzung endogener Rezeptormoleküle oder des Immunrezeptors mit immobilisierten Antikörpern aktiviert werden. Kotransduzierte T-Zellen werden ohne CD3 oder Rezeptorstimulation offenbar zusätzlich durch das exprimierte IL-12 allein zu einer Sekretion von IFN- γ angeregt.

3.9.2 Steigerung der T-Zellantwort bei Kokultivierung mit Antigen-positiven Tumorzellen

Im Folgenden sollte die Frage geklärt werden, ob koexprimiertes IL-12 die Antigen-spezifische Aktivierung von T-Zellen mit rekombinantem Immunrezeptor nach Inkubation mit Tumorzellen steigert. Dazu wurden die NFAT-kontrollierten IL-12 Konstrukte #1027 pSIN-NFAT₆-mIL-12 oder #1028 pSIN-NFAT₄-mIL-12 und zur Kontrolle das Konstrukt #1018 pQCXIN-mIL-12 mit konstitutivem CMV-Promotor gemeinsam mit dem anti-CEA Immunrezeptor BW431/26scFv-Fc-zeta (#700) in T-Lymphozyten exprimiert. Nach Kokultur der modifizierten T-Zellen mit CEA⁺ LS174T Tumorzellen oder CEA⁻ Colo320 Tumorzellen wurde der Einfluss von expri-

miertem IL-12 auf die IFN- γ Sekretion und die spezifische Zytotoxizität der T-Zellen gegenüber CEA⁺ Tumorzellen untersucht.

Die Kotransduktion von T-Lymphozyten mit den IL-12 Konstrukten und dem anti-CEA Immunrezeptor erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde der konstitutive IL-12 Expressionsvektor #1018 pQCXIN-mIL-12 und die NFAT-IL-12 Konstrukte #1027 NFAT₆-mIL-12 und #1028 NFAT₄-mIL-12 retroviral in humane Blutlymphozyten transduziert. Mit Hilfe des Neo-Resistenzgens der bicistronischen Plasmide wurden die transduzierten Zellen in Gegenwart von G418 selektioniert, wobei durch gleichzeitige Stimulation des endogenen T-Zellrezeptors mit den immobilisierten Antikörpern OKT3 und 15E8 gegen CD3 bzw. CD28 der NFAT-Minimalpromotor von #1027 und #1028 aktiviert wurde. Nach 11 Tagen Selektion wurden die Zellen in einem zweiten Schritt retroviral mit dem anti-CEA Immunrezeptor #700 transduziert. Als Kontrolle dienten T-Zellen mit anti-CEA Rezeptor allein. Die Frequenz rezeptortragender T-Zellen lag bei 27 - 37 %. Die kotransduzierten T-Zellen, sowie Kontrollzellen mit und ohne anti-CEA Rezeptor wurden mit steigenden Effektorzellzahlen mit CEA⁺ LS174T und CEA⁻ Colo320 Tumorzellen koinkubiert. Nach 48 Stunden wurde die Menge des sezernierten IL-12 und IFN- γ im Kulturüberstand und der zytolytische Effekt auf CEA⁺ Tumorzellen bestimmt (Abbildung 3.40).

Anti-CEA Rezeptor und IL-12 (#700 / #1018) kotransduzierte T-Lymphozyten sezernierten nach Inkubation sowohl mit CEA⁺ LS174T, als auch CEA⁻ Colo320 Tumorzellen konzentrationsabhängig von den Effektorzellzahlen IL-12. Die konstitutive Expression von IL-12 war nach Koinkubation mit CEA⁺ LS174T Zellen gegenüber CEA⁻ Colo320 Tumorzellen erhöht. Nicht transduzierte Kontrollzellen und anti-CEA Rezeptor #700 tragende T-Zellen exprimierten dagegen kein IL-12. In T-Lymphozyten, die mit den NFAT-kontrollierten IL-12 Konstrukten #1027 oder #1028 und anti-CEA Rezeptor kotransduziert waren, wurde nach Koinkubation mit den CEA⁺ LS174T Tumorzellen, nicht aber CEA⁻ Colo320 Zellen die Sekretion von IL-12 induziert.

T-Zellen mit anti-CEA Rezeptor #700 sezernierten nach Koinkubation mit CEA⁺ LS174T Zellen wie erwartet erhöhte IFN- γ Mengen gegenüber nicht transduzierten Kontrollzellen oder nach Koinkubation mit CEA⁻ Colo320 Zellen. Sowohl die konstitutive (#1018) als auch induzierte (#1027, #1028) Koexpression von IL-12 führte bei CEA-spezifischen T-Lymphozyten zu gesteigerter IFN- γ Sekretion im Vergleich zu Lymphozyten mit dem Immunrezeptor #700 allein. Dabei wurde die IFN- γ Sekretion der T-Zellen bereits durch geringe Mengen IL-12 mit dem schwachen NFAT-Minimalpromotor des Konstrukts #1028 stark erhöht, und wurde auch bei hoher IL-12 Konzentration durch konstitutive Expression mit #1018 nicht weiter gesteigert.

CEA-spezifische T-Lymphozyten #700 vermittelten nach Bindung an CEA⁺ LS174T Zellen dosisabhängig die spezifische Zytolyse der CEA⁺ Tumorzellen. Sowohl das koexprimierte konstitutive IL-12 (#1018) als auch das induzierte IL-12 (#1027) mit CEA-spezifischen

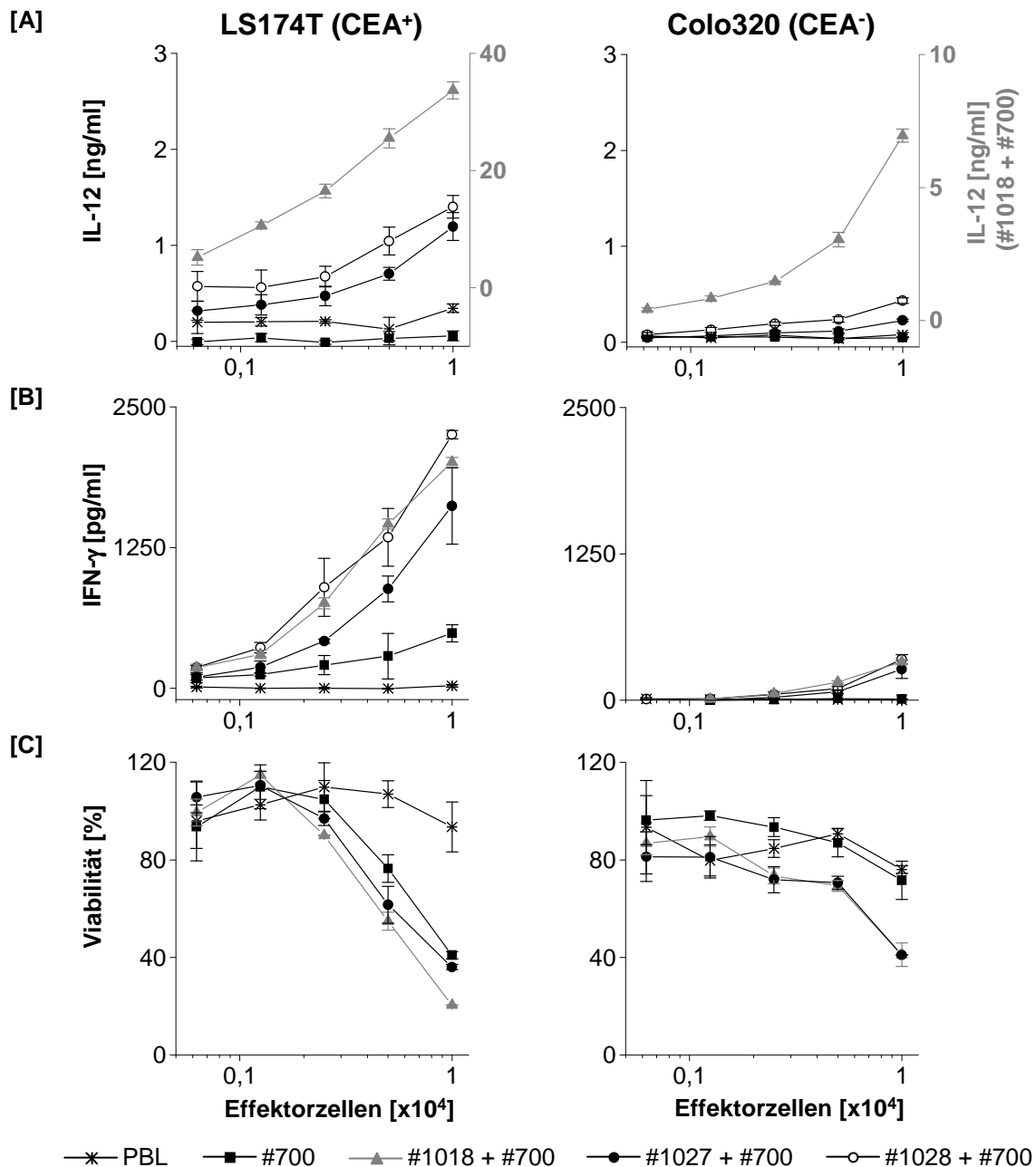


Abbildung 3.40: Einfluss der IL-12 Koexpression von anti-CEA rezeptortragenden T-Lymphozyten auf die rezeptorvermittelte IFN- γ Sekretion und spezifische Zytolyse von CEA⁺ LS174T Tumorzellen. Je 4×10^6 T-Lymphozyten wurden mit den Plasmiden #1018 pQCXIN-mIL-12, #1027 pSIN-NFAT₆-mIL-12 und #1028 pSIN-NFAT₄-mIL-12 retroviral transduziert und mit G418 (2 mg/ml) auf Mikrotiterplatten mit den immobilisierten Antikörpern OKT3 und 15E8, gegen CD3 und CD28, für 11 Tage selektioniert. Die einfach transduzierten, sowie untransduzierte T-Zellen wurden retroviral zur Expression des anti-CEA Immunrezeptors #700 BW431/26scFv-Fc-zeta transduziert. Die Expressionseffizienz wurde durchflusszytometrisch ermittelt und je $0,0625-1 \times 10^4$ Effektorzellen mit je $2,5 \times 10^4$ Tumorzellen, LS174T (CEA⁺) oder Colo320 (CEA⁻), pro Vertiefung auf einer Mikrotiterplatte kokultiert. Nach 48 Stunden wurde die IL-12 (A) und IFN- γ (B) Konzentration der Kulturüberstände mittels ELISA und die Viabilität der Tumorzellen durch Umsetzung des XTT-Substrates bestimmt (C). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Dreifachansätze +/- Standardabweichung.

T-Lymphozyten führte zu einer Erhöhung der zytolytischen Aktivität im Vergleich zu CEA-spezifischen T-Zellen ohne zusätzliche IL-12 Expression. T-Lymphozyten ohne Rezeptor zeigt

ten keine zytolytische Aktivität gegenüber CEA⁺ LS174T Tumorzellen. Nicht transduzierte und CEA-spezifische T-Lymphozyten vermittelten keine spezifische Zytolyse von CEA⁻ Colo320 Tumorzellen.

Diese Untersuchungen zeigen, dass anti-CEA rezeptortragende T-Zellen mit koexprimiertem induzierbaren IL-12 (#1027 oder #1028) nach Inkubation mit CEA⁺ LS174T Tumorzellen eine rezeptorinduzierte Sekretion von IL-12 vermitteln. T-Lymphozyten mit dem konstitutiven IL-12 Expressionsvektor #1018 sezernieren dagegen auch unabhängig von der Rezeptorstimulation hohe Konzentrationen von IL-12. Sowohl konstitutiv exprimiertes IL-12 als auch rezeptorinduziertes IL-12 erhöhen die IFN- γ Sekretion und zytolytische Aktivität von anti-CEA Rezeptor kotransduzierten T-Zellen nach Inkubation mit CEA⁺ LS174T Tumorzellen. Die Koinkubation von konstitutiv IL-12 exprimierenden T-Lymphozyten (#700 / #1018) mit CEA⁻ Colo320 Tumorzellen demonstriert, dass IL-12 allein, ohne antigenspezifische Rezeptorstimulation der T-Lymphozyten, keine IFN- γ Sekretion oder zytolytische Aktivität induziert.

Diskussion

Rekombinante Immunrezeptoren sind für den Einsatz in einem zellulären Biosensor interessant, da diese selektiv einen korpuskulären Analyten auch in Gegenwart seiner löslichen Form erkennen. Man verspricht sich davon u. a. die spezifische Detektion zirkulierender Tumorzellen mit tumorassoziiertem Antigen auch in Gegenwart hoher Serumspiegel dieses Antigens. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher am Modell des tumorassoziierten Antigens CEA ein Biosensor generiert, der spezifisch zwischen korpuskulär gebundenem und gelöstem Antigen diskriminiert. Als Ausführungsform wählten wir einen rekombinanten CEA-spezifischen Immunrezeptor als Signalgeber, der auf der Oberfläche einer signalamplifizierenden Indikatorzelle exprimiert wird. Eine Modellanwendung des Biosensor Reportersystems wurde in einem immuntherapeutischen Ansatz zur Steigerung der T-Zellantwort demonstriert, indem humane T-Zellen mit rekombinanten Immunrezeptor zusätzlich mit einem Rezeptor-induzierbaren Gen für das immunstimulierende Zytokin IL-12 ausgestattet werden. Dadurch wird erreicht, dass IL-12 *in vivo* gezielt am Tumorort sezerniert wird, welches lokal die Effektorfunktionen rezeptormodifizierter T-Zellen steigert.

Die Kreuzvernetzung des rekombinanten Immunrezeptors in der Zellmembran ist die Voraussetzung zur zellulären Aktivierung und wurde zur Generierung des Biosensors visuell untersucht. Dafür wurde die Strategie gewählt, die Rezeptoren intrazellulär durch die Fusion mit *Green Fluorescent Protein* (GFP) zu markieren, um die Interaktion der Rezeptormoleküle auf der Zelloberfläche nicht durch Fluoreszenzfarbstoffe zu beeinflussen. Die Stabilität der Expression rekombinanter Immunrezeptoren auf der Oberfläche von T-Zellen ist von der Anordnung der Domänen in dem rekombinanten Rezeptorprotein abhängig (Hombach *et al.*, 2002). Daher wurden unterschiedlich konfigurierte Immunrezeptoren generiert, die einerseits C-terminal hinter der CD3 ζ Signalkette, oder andererseits intramolekular zwischen einer CD4-Transmembranregion und CD3 ζ Signaldomäne mit GFP fusioniert wurden. Die C-terminale Fusion der TAG72 und CEA spezifischen Immunrezeptoren mit GFP (#849, #850, #915, #916) führte in 293T Zellen zur Expression fluoreszenzmarkierter Rezeptoren, die in der Zellmembran lokalisiert sind. Die Position der GFP-Domäne scheint einen Einfluss auf die Stabilität des Rezeptors zu haben, da der intramolekulare Einbau zwischen CD4-Transmembranteil und CD3 ζ Signalkette (#851) zu schwacher Expression des Rezeptors auf der T-Zelloberfläche und weitgehendem Verlust der Fluoreszenz führte. Offensichtlich sichert lediglich die C-terminale Konfiguration eine effiziente Fluoreszenzmarkierung des Immunrezeptors in der Zellmembran.

Dies ist kein allgemeingültiges Prinzip, da die Funktion kurzer kostimulatorischer CD28 oder 4-1BB Signalketten, die intramolekular vor der CD3 ζ Kette inseriert werden, erhalten bleiben (Hombach *et al.*, 2001). Die intramolekulare Anordnung des GFP führt zudem nicht zwingend zum Funktionsverlust des Fusionsproteins, z. B. ist die intramolekulare Fusion von GFP (AS 2-233) in den Shaker K⁺ Kanal zwischen dem letzten Transmembransegment und der langen cytoplasmatischen Domäne beschrieben. Das spannungsabhängige Rearrangement des modifizierten K⁺-Kanals bewirkt eine Änderung der Fluoreszenzintensität, so dass dieser als optischer Sensor für das Membranpotential eingesetzt werden kann (Siegel und Isacoff, 1997). Jedoch ist weitaus häufiger die Verknüpfung von GFP am Amino- oder Carboxy-Terminus eines Proteins in einer tandem Anordnung beschrieben. Da die Transmembranregion des CD4 Moleküls zu einer höheren Expressionsrate des generierten Proteins auf der Oberfläche humaner T-Zellen führt (Selinka *et al.*, 1992), wurde bei C-terminaler Fusion die CD3 ζ Transmembranregion alternativ durch einen CD4-Transmembranteil ersetzt. Dabei war die Expressionsfrequenz der Rezeptoren mit stabilisierender CD4-Transmembranregion (#850, #916) gegenüber den Fusionsrezeptoren mit CD3 ζ Transmembranteil erhöht (#849, #915). Dies entspricht der Erwartung, dass die CD4-Transmembranregion einen stabilisierenden Effekt auf die Expression der Rezeptorproteine ausübt.

Die Funktion der Immunrezeptoren bleibt trotz Fusion mit GFP erhalten. Unsere Analysen zeigen, dass die C-terminal mit GFP fusionierten TAG72 spezifischen Rezeptoren (#849, #850) und CEA spezifischen Rezeptoren (#915, #916) in T-Lymphozyten nach Antigenbindung die Proliferation, IFN- γ Sekretion und antigenspezifische Zytolyse von Tumorzellen induzieren, so wie die Rezeptoren ohne GFP. Dabei kommt es jedoch in beiden Fällen zu einer gewissen Beeinträchtigung, die offenbar teilweise durch den stabilisierenden Effekt der CD4-Transmembrandomäne im Rezeptormolekül mit CD4tm/CD3 ζ ^{ic}-GFP (#850, #916) kompensiert wird. Daher wurde der GFP-Fusionsrezeptor #916 zur visuellen Analyse der Rezeptorquervernetzung eingesetzt.

Die durch rekombinante Immunrezeptoren ausgelöste T-Zellaktivierung nach Antigenbindung setzt eine Rezeptoraggregation in Cluster voraus, ähnlich der immunologischen Synapse des endogenen T-Zellrezeptors. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass neben der Rekrutierung in die Synapse auch Konformationsänderungen der cytoplasmatischen Signaldomänen an der zellulären Aktivierung beteiligt sind (Minguet *et al.*, 2007; Risueño *et al.*, 2008). Über die Membrantopologie der rekombinanten Immunrezeptoren und die Interaktion mit endogenen Rezeptorproteinen ist bisher wenig bekannt. Studien mit rekombinanten Signalketten in Lösung haben gezeigt, dass ITAM-haltige Domänen die Kapazität zur Oligomerisierung besitzen (Sigalov *et al.*, 2004). Ferner ist die Fähigkeit der endogenen CD3 ζ Signalkette zur Dimerisierung bekannt (Rutledge *et al.*, 1992). Daher ist eine physikalische Interaktion der rekombinanten Rezeptorproteine mit dem endogenen TCR über die intrazelluläre CD3 ζ Signalkette möglich.

Unsere Arbeitsgruppe konnte jedoch zeigen, dass es zwischen dem rekombinanten Rezeptor und der CD3 ζ Signalkette des TCR nicht zu einer funktionalen Interaktion kommt.

Um die Clusterbildung in der Zellmembran sichtbar zu machen, wurden humane T-Zellen mit GFP-Fusionsrezeptoren ausgestattet und nach Bindung korpuskulärer Analyten *Laser Scan* mikroskopisch analysiert. Die Beobachtung der vitalen Zellen ermöglichte den Nachweis, dass sich die Rezeptoren nach Antigenbindung aus einer zuvor weitgehend homogenen Verteilung in Cluster aggregieren. Vereinzelt zeigten sich kleinere Rezeptoraggregate in der Membran der T-Zellen auch ohne den Surrogat-Analyten. Dies könnten vororganisierte Mikrokompartimente darstellen, die auch beim TCR in voraktivierten T-Effektorzellen, nicht jedoch in ruhenden naiven T Zellen zu finden sind. Diese Mikroclusterstrukturen tragen vermutlich zur Beschleunigung von dynamischen Interaktionen mit MHC-präsentierenden Zellen und zur Signalamplifikation bei (Viola, 2001). Die Aggregation rekombinanter Immunrezeptoren wurde auch bei Koinkubation mit Antigen⁺ Tumorzellen nachgewiesen. Der Zeitraum zur Kontaktaufnahme und Ausbildung der Cap-Struktur in der T-Zellmembran lag unter 2 Minuten und führte zu meist zu lang andauernder Interaktion über den gesamten Beobachtungszeitraum von 1 Std., während derer die T-Zellen abtastend über die Oberfläche der CEA⁺ LS174T_DSred Tumorzellen wanderten. Zellkontakte zu CEA⁻ Colo320_DSred Tumorzellen wurden dagegen nur sehr selten beobachtet. Dieses Bindungsverhalten rekombinanter Immunrezeptoren entspricht dem Modell der seriellen und dynamischen Kontaktaufnahme durch T-Effektorzellen mit endogenem T-Zellrezeptor, dem sogenannten *Serial Encounter Model*. Nach diesem Modell binden hochaktive T-Zellen an antigenpräsentierende Zellen, z. B. Makrophagen (Underhill *et al.*, 1999), B Zellen (Ehrlich *et al.*, 2002), dendritische Zellen (Hurez *et al.*, 2003) und Fibroblasten mit MHC II-Rezeptoren (Wetzel *et al.*, 2002) und wandern abtastend über die Oberfläche, bevor sie sich aktiv ablösen und mit der nächsten Zelle Kontakt aufnehmen. Für Dauer, Dynamik und Ablauf der Interaktion ist es interessanterweise nicht wesentlich, ob es sich um einen antigenspezifischen oder unspezifischen Kontakt handelt. Jedoch kommt es nur bei spezifischem Kontakt, der über mindestens 1,5–2 Std. anhält, zu einer T-Zellaktivierung (Friedl und Gunzer, 2001).

Auf Basis der gewonnenen Erkenntnisse zur Clusterbildung wurde die T-Zelllinie Jurkat als Indikator für einen zellulären Biosensor mit rekombinanten Immunrezeptoren ausgesucht. Jurkat Zellen verfügen über einen intakten TCR-Signalweg und werden häufig als Modellsystem für Untersuchungen der endogenen TCR-Signaltransduktion eingesetzt, indem einzelne Komponenten des Signalapparates mutiert werden (Hirata *et al.*, 2008). Sowohl nach TCR-Stimulation der Jurkat Zellen, als auch durch Kreuzvernetzung CEA-spezifischer Immunrezeptoren (#700, #607) wird die Sekretion von IL-2 induziert. Dies zeigt, dass die TCR *downstream* Signalkette in den Jurkat Zellen funktionell intakt ist. Verschiedene NFAT- und NF κ B Reportergene stehen als Indikatorsystem zur Verfügung. In diesem Zusammenhang wählten wir die

GFP-Reporter gene NFAT-GFP oder NF κ B-GFP für ein optisches Auslesesystem des Biosensors. Jedoch zeigte sich nach TCR-Stimulation keine GFP-Fluoreszenz der Zellen. Vermutlich ist die Expressionsstärke nach Induktion durch NFAT oder NF κ B *response elements* zu gering, um ein cytoplasmatisches Fluoreszenzsignal der Zelle zu erzeugen. Hinzu kommt, dass jedes GFP-Molekül nur ein Fluorophor bildet (Tsien, 1998). Basierend auf Schätzungen sind 1 μ M wildtyp GFP-Moleküle notwendig, um die Fluoreszenzintensität eukaryotischer Zellen gegenüber dem Hintergrund zu verdoppeln (Niswender *et al.*, 1995). Aus diesem Grund wurde als Reporter gen Luciferase eingesetzt, deren enzymatische Reaktion eine Signalamplifikation zur Folge hat. In Jurkat Zellen, die mit NFAT-Luciferase oder NF κ B-Luciferase transfiziert wurden, wurde nach TCR-Stimulation durch immobilisierte agonistische Antikörper die Expression von Luciferase nachgewiesen. Dabei führten NFAT *response elements* zu einem ausschließlich rezeptorvermittelten Signal, das durch Kombination des anti-CD3 Antikörpers mit einem anti-CD28 Antikörper weiter gesteigert wurde. Dagegen wurde NF κ B-kontrollierte Luciferase sowohl nach TCR-Stimulation, als auch nach mitogener Stimulation mit Phytohämagglutinin exprimiert. Dies stimmt mit bisherigen Erkenntnissen überein, dass die vollständige Aktivierung von NFAT in T-Zellen zwei Signale erfordert, wie eine anti-CD3 und anti-CD28 Stimulation, die einerseits zum Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führen und andererseits enzymatische Prozesse durch Kinasen einleiten (Ginn-Pease und Whisler, 1998). Entscheidend dabei ist der Calcium-Calcineurin-Weg, der durch die CD3 ζ -Kette, nicht aber durch mitogene Stimulation ausgelöst wird, und die Translokation von NFAT in den Nukleus bewirkt. Da die Aktivierung des angestrebten Biosensors spezifisch nach Rezeptorstimulation erfolgen soll, wurde durch stabile Transfektion von NFAT-Luciferase der Zellklon Jurkat879 generiert, der im weiteren Verlauf als Indikatormodul eines CEA-spezifischen Biosensors verwendet wurde. In einem anderen Zusammenhang finden Jurkat NFAT-Luciferase Zellen u. a. in einem methodischen Ansatz Anwendung, um neue Immunrezeptoren auf Signalebene funktionell zu validieren, da die rezeptorvermittelte Induktion von NFAT mit der tumorspezifischen Zytolyse und TNF α Sekretion modifizierter T-Lymphozyten einher geht (Schaft *et al.*, 2003). Dadurch werden aufwendige Funktionsanalysen neu generierter Immunrezeptoren vereinfacht.

Als Signalgeber des Biosensors wurden CEA-spezifische Rezeptoren mit unterschiedlicher Signaldomäne der Konfiguration mit CD3 ζ -Kette (#700) oder kombinierter CD28-CD3 ζ (#607) Signaleinheit in Jurkat879 Zellen exprimiert. Die CEA-Biosensoren wurden sowohl durch immobilisiertes Antigen als auch durch quervernetztes, lösliches Antigen konzentrationsabhängig zur Expression von Luciferase aktiviert. Offenbar wird NFAT-Luciferase in Jurkat879 Zellen abhängig vom Grad der Rezeptorquervernetzung durch beide CEA-Rezeptoren, #700 oder #607, mit gleicher Effizienz aktiviert. Im Gegensatz dazu sezernierten CEA-Biosensorzellen mit Rezeptoren der CD28-CD3 ζ Konfiguration nach Kokultur mit CEA⁺ LS174T Tumorzellen mehr IL-2 als mit CD3 ζ Signalkette. Dieses Ergebnis entspricht bisherigen Erkenntnissen in humanen T-Zellen über den Einfluss der costimulatorischen CD28-Domäne in der Signalkette

rekombinanter Immunrezeptoren (Hombach *et al.*, 2001; Maher *et al.*, 2002). Interessanterweise zeigten Jurkat und Jurkat879 Zellen, ausgestattet mit CD3 ζ (#700) oder CD28-CD3 ζ (#607) konfigurierten Rezeptoren, dagegen nach Bindung des quervernetzten Antigens keine quantitativen Unterschiede hinsichtlich der IL-2 Sekretion. Zudem wurde beobachtet, dass die Proliferation der Zellen bei höheren Konzentrationen des quervernetzenden Sekundärantikörpers abnahm. Dieses ist nicht auf die Zelllinie Jurkat beschränkt, da auch rezeptormodifizierte humane T-Lymphozyten unabhängig von einer CD3 ζ oder CD28-CD3 ζ Signaldomäne durch quervernetzte lösliche Antikörper zur IL-2 Produktion aktiviert werden. Möglicherweise ist die Aktivierung von der Art der Stimulation abhängig. So ist die T-Zellantwort durch bakterielle oder virale Superantigene, die eine anhaltende Bindung des TCR an MHC-Moleküle auslösen, durch die massive Produktion von Zytokinen gekennzeichnet. Durch bislang ungeklärte Mechanismen geht eine derartige Aktivierung mit der baldigen Apoptose der aktivierten T-Zellen einher und führt schließlich zur Immunsuppression. Auch bei der positiven und negativen Selektion heranreifender T-Zellen spielt die Spezifität und Stärke der Aktivierungssignale eine Rolle, wobei der Vorgang im Einzelnen nicht bekannt ist. Theorien besagen, dass die Avidität der Bindung einen Einfluss auf die T-Zellantwort hat (Ashton-Rickardt *et al.*, 1994). Durch *in vitro* Experimente ist bekannt, dass eine hohe Dichte spezifischer MHC-TCR Kontakte, wie sie *in vivo* nur selten erreicht wird, die Notwendigkeit der Kostimulation überwindet und zur vollständigen T-Zellaktivierung führt. Dagegen besagt die differenzielle Signalthypothese, dass verschiedene Antigene qualitativ unterschiedliche Signale hervorrufen, wie z. B. im MHC-Komplex präsentierte antagonistische Peptide, die trotz hoher Affinität zum TCR offenbar nur einen Teil der endogenen Signalkette aktivieren (Hogquist *et al.*, 1994).

Unser Ziel war es, einen Biosensor zu generieren, der spezifisch korpuskuläres Antigen erkennt. Daher stellten wir uns die Frage nach der Sensitivität und Spezifität des Biosensors mit unterschiedlichen Signalketten in Gegenwart von löslichem Antigen. Es zeigte sich, dass Rezeptoren der CD3 ζ Konfiguration auch durch hohe Dosen des löslichen Antigens nicht zu Luciferase und IL-2-Expression aktiviert werden. Dagegen zeigten Biosensoren mit Rezeptoren der CD28-CD3 ζ Konfiguration ein erhöhtes Hintergrundsignal und konzentrationsabhängige Luciferaseaktivität und IL-2 Sekretion. Offensichtlich bewirkt die kostimulatorische CD28-Signaldomäne eine Voraktivierung der Zellen und eine Herabsetzung der Aktivierungsschwelle, so dass bereits die Bindung des löslichen Antigens zur Zellaktivierung führt. Für den angestrebten Biosensor, der eine spezifische Detektion korpuskulärer Analyten vermittelt, bedeutet dies, dass ein Rezeptor der CD3 ζ Konfiguration, nicht jedoch der CD28-CD3 ζ Konfiguration geeignet ist. Andererseits zeigt dieses Ergebnis, dass der Biosensor durch Anpassung der Rezeptorsignalketten flexibel eingesetzt werden kann, um auch lösliches Antigen zu detektieren. Beispielsweise ist ein simultaner Einsatz beider CEA-Biosensoren denkbar, um neben zirkulierenden Tumorzellen auch die Serumkonzentration tumorassoziierten Antigene zu bestimmen, die ebenfalls als Indikator zur postoperativen Verlaufskontrolle genutzt wird (Bold *et al.*, 1999).

Als Modell für das Verhalten des CEA-Biosensors mit CD3 ζ konfigurierem Immunrezeptor gegenüber dem korpuskulären Analyten in Gegenwart eines löslichen Kompetitors wurde der anti-idiotypische Antikörper BW2064/36 auf Sepharosekügelchen immobilisiert, die als künstliche korpuskuläre Antigene eingesetzt wurden. Dieses ermöglichte uns, die Konkurrenz zu untersuchen, ohne dass das Ergebnis durch proteolytisch gespaltenes CEA aus Tumorzellen verfälscht wird. Es zeigte sich, dass der Biosensor das korpuskuläre Antigen in Gegenwart des gelösten anti-idiotypischen Antikörpers bis zu Konzentrationen von 20 $\mu\text{g/ml}$ spezifisch detektiert. Bei zunehmenden Konzentrationen des löslichen Antigens wird die Detektion des korpuskulären Analyten durch Blockierung der Rezeptorbindestellen kompetitiv gehemmt. Die Toleranzschwelle des CEA-Biosensors für das lösliche Antigen liegt damit weit oberhalb der CEA-Serumkonzentration bei Tumorpatienten, die bis zu 5 $\mu\text{g/ml}$ betragen kann (Moertel *et al.*, 1986). Diese Auflösung zeigte sowohl der CEA-Biosensor als auch der Vergleichssensor für CD30. Dabei kommt jedoch als Störgröße hinzu, dass CD30 zusätzlich auf der Zelloberfläche der Jurkat879 Zellen exprimiert wird, was zu einer höheren Grundaktivität des CD30-spezifischen Biosensors führt. Die Aktivierung des Biosensors entspricht anderen Untersuchungen zur Konkurrenz einer rezeptorvermittelten T-Zellantwort. So zeigten Hombach *et al.*, 1999, dass die rezeptorvermittelte Aktivierung muriner MD45 T-Zellen mit dem anti-CEA-hIgG- γ Immunrezeptor durch die Zugabe des löslichen CEA Proteins als Kompetitor bis 25 $\mu\text{g/ml}$ nicht gehemmt wird. Da CEA im Gegensatz zu dem bivalenten anti-idiotypischen Antikörper BW2064/36 lediglich eine monovalente Bindungsstelle für den Immunrezeptor BW431/26scFv-Fc-CD3zeta (#700) aufweist, könnte die Konzentration zur kompetitiven Hemmung des CEA-Biosensors für natives CEA um den Faktor ≥ 2 höher liegen. Ferner zeigte die Arbeitsgruppe um T. Zhang in einem Konkurrenzansatz, dass die antigenspezifische Zytolyse von Tumorzellen durch T-Lymphozyten mit einem rekombinanten Immunrezeptor für MICA *in vitro* erst durch 15 $\mu\text{g/ml}$ lösliches MICA gehemmt wird (Zhang *et al.*, 2006). Auch der Tumormarker MICA wird proteolytisch abgespalten und kommt im Patientenblut in erhöhter Konzentration von 0,2–10 ng/ml vor.

Ein wesentliches Merkmal leistungsfähiger Biosensoren ist die zeitnahe Sensorik. Daher wurden Jurkat Zellen generiert, die stabil mit dem Ca^{2+} -abhängigen fluoreszierenden Cameleon-Protein YC3.60 (Nagai *et al.*, 2004) modifiziert wurden. Durch die Bindung von Ca^{2+} wird eine Verschiebung der Wellenlängen des Cameleon-Proteins durch einen intramolekularen FRET von CFP nach YFP bewirkt, so dass unmittelbare Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration als Maß der Zellaktivierung nachgewiesen werden können. In den letzten Jahren haben Cameleon-Proteine aufgrund ihrer hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung zellulärer Ca^{2+} -Signale nicht nur auf Zellebene, sondern auch in lebenden Organismen breite Anwendung gefunden, z. B. im Ca^{2+} -Monitoring neuronaler Signalwege (Liu *et al.*, 2008), der Signaltransduktion in B-Zellen (Adachi und Tsubata, 2008), der frühen Embryogenese am Modell Zebrafisch (Tsuruwaka *et al.*, 2007), oder kontraktierender Skelettmuskeln in der Maus (Rudolf *et al.*,

2004). Durch die Fusion mit unterschiedlichen Lokalisatoren sind zudem physiologische Untersuchungen auf subzellulärer Ebene möglich. Beispielsweise ermöglicht ein ER-lokalisiertes Cameleon-Protein die Messung quantitativer Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration im ER während eines Hormonrezeptorsignals in modifizierten HEK293 Zellen (Yu und Hinkle, 2000).

In Jurkat-Cameleon Zellen wurde nach antigenunabhängiger Stimulation durch PMA und Ionomycin ein Anstieg der Fluoreszenzintensität nachgewiesen. Der Ca^{2+} /Cameleon-Komplex akkumulierte über einen Zeitraum von 24 Std. in den Zellen. Ferner zeigten Cameleon Indikatorzellen, die mit rekombinanten Immunrezeptoren ausgestattet wurden, nach Bindung an den spezifischen Liganden eine antigenspezifische Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, angezeigt durch die Fluoreszenzverschiebung der Zellen durch Akkumulation des Ca^{2+} /Cameleon-Komplexes. Als interessanten Umstand zeigt die histographische Fluoreszenzanalyse der stabilen Zellklone, dass offenbar nur ein Teil der rezeptortragenden Jurkat-Cameleon Zellen nach antigenspezifischer Stimulation durch den immobilisierten Surrogat-Antikörper für ein Ca^{2+} -Signal aktiviert wird. Möglicherweise werden nur Zellen mit ausreichend hoher Rezeptordichte aktiviert. Im Gegensatz dazu induzierte Antigen in Form von quervernetzten löslichen Antikörpern in nahezu der gesamten Population der CEA-spezifischen Jurkat-Cameleon_700 Zellen ein erhöhtes Fluoreszenzsignal. Offenbar ist die Akkumulation des Ca^{2+} /Cameleon-Komplexes von der Qualität oder Stärke des Signals abhängig. Dies stimmt mit den bisherigen Daten überein, dass die T-Zellaktivierung zum Teil von der Art der Stimulation, entweder durch immobilisierte oder durch quervernetzte lösliche Antikörper, abhängt. Auch das physiologische Repertoire möglicher T-Zellantworten wird durch vielfältige Mechanismen reguliert. Dazu gehört die Affinität/Avidität der TCR:MHC-Bindung, die Dauer der Interaktion und eine Rekrutierung kostimulatorischer Rezeptormoleküle.

Für die zeitnahe Messung wurde die Fluoreszenzintensität der Jurkat-Cameleon Zellen unter mikroskopischer Kontrolle aufgezeichnet. Die Rezeptorquervernetzung mit dem anti-idiotypischen Antikörper BW2064/36 und einem Sekundärantikörper führte nach 6–10 Minuten zu einem oszillierenden Fluoreszenzsignal der CEA-Biosensorzellen mit Intervallen von 1,5 min. Ebenso zeigten zellulär voraktivierte CD30-spezifische Jurkat-Cameleon Zellen im Vergleich zum CEA-Biosensor ein oszillierendes Ca^{2+} -Hintergrundsignal mit gleicher Frequenz. Im Vergleich dazu ergab die Permeabilisierung der Membran durch den Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin einen unmittelbaren Fluoreszenzanstieg durch Ca^{2+} -Influx in die Zellen. Für aktivierte T-Zellen sind Ca^{2+} -Oszillationen im Bereich von 1,5–15 min beschrieben (Lewis und Cahalan, 1989; Donnadieu *et al.*, 1992), von deren Frequenz die Effizienz der Zellaktivierung abhängt. So zeigten Tomida *et al.*, 2003, dass kurze Ca^{2+} -Impulse zu einer effizienteren Translokation von NFAT in den Nukleus führen als längere Intervallzeiten. Die Zeitverzögerung des rezeptorvermittelten Ca^{2+} -Signals von mehreren Minuten stimmt mit dem beobachteten Zeitraum überein, der zur sichtbaren Ausbildung von anti-CEA-eGFP Rezeptorclustern auf der Oberfläche von

T-Lymphozyten erforderlich ist. (Abbildung 3.11 B).

Im Vergleich zu NFAT-Luciferase Jurkat879 Zellen, die eine Inkubationszeit von mindestens 48 Std. benötigen, ist durch Jurkat-Cameleon Zellen nun eine optische Indikation von korpuskulärem CEA in nahezu Echtzeit möglich. Durch Immobilisierung des zellulären CEA-Biosensors in einem adäquaten optischen Auslesesystem könnten in einem Hochdurchsatzverfahren seltene zirkulierende Tumorzellen der Blutbahn erfasst werden, ohne die Störgröße durch lösliches Antigen. Eine weitere Anwendung unseres Biosensors könnte auch in der Identifikation von bakteriellen Pathogenen oder Pilzsporen liegen, indem der Immunrezeptor mit pathogensensitiven antigenbindenden Domänen (scFv) ausgestattet wird. Ein ähnlicher Ansatz wurde in einem B-Zell basierten System durch Rider *et al.*, 2003 beschrieben. Dieser Sensor nutzt eine genetisch modifizierte B-Zelllinie, die mit Ca^{2+} -sensitivem Aequorin und den schweren und leichten Ketten eines B-Zellrezeptors definierter Spezifität ausgestattet ist. Er ermöglicht die schnelle und sensitive Detektion pathogener Organismen wie *Yersinia pestis* und *E. coli*-Stamm O157:H7, aber auch *Bacillus anthracis* Sporen und Viren (Vaccinia Virus, VEE). Die Detektion auch kleiner viraler Strukturen basiert darauf, dass für die Aktivierung des B-Zellrezeptors im Vergleich zum T-Zellrezeptor eine schwächere Kreuzvernetzung erforderlich ist. Daher ist dieser B-Zellsensor nicht dazu geeignet, spezifisch zwischen korpuskulärem und löslichem Antigen zu diskriminieren wie der Biosensor mit rekombinanten Immunrezeptoren. Darüberhinaus kann unser Biosensor jedoch auch durch eine kostimulatorische CD28-CD3 ζ Signalkette des rekombinanten Rezeptors zur Detektion kleinerer löslicher Analyten modifiziert werden. Zudem ermöglicht die antigenbindende scFv-Domäne eine einfache Substitution der Sensorspezifität, wodurch der Sensor flexibel und vielseitig einsetzbar ist. Die Spezifität des Biosensors mit CD3 ζ konfiguriertem Immunrezeptor zur Detektion korpuskulärer Analyten unterscheidet das System deutlich von vielen anderen zellulären Sensorsystemen, die auf niedermolekulare Substanzen abzielen wie z. B. ein Östrogensensor zur Messung der Abwasserbelastung durch Hefe Zellen (Hahn *et al.*, 2006), oder das Sensorsystem „SteroCheck“ durch Prostata Zellen zur Detektion von Androgenen (Daufeldt *et al.*, 2003). Daher eignet sich unser Biosensor bevorzugt für Fragestellungen, denen eine Kreuzvernetzung durch korpuskuläre Analyten zugrunde liegt. Eine Modellanwendung ist die signalabhängige Produktion heterologer Proteine in einem immuntherapeutischen Ansatz, die am Beispiel des immunstimulierenden Zytokins IL-12 demonstriert wurde.

Aktuelle Bestrebungen in der adoptiven Immuntherapie konzentrieren sich auf die *in vivo* Optimierung der Immunrezeptoren und eine mögliche Einflussnahme auf die rezeptorvermittelte T-Zellantwort durch immunstimulierende Agenzien. Bisher ist jedoch die T-Zelle als Produzent heterologer Produkte nach Rezeptorstimulation nicht beschrieben. Ein vielversprechendes Adjuvanz in der Tumorthherapie ist das Zytokin IL-12, da IL-12 wichtige immunregulatorische Funktionen, insbesondere die Verstärkung der Th1 und CTL vermittelten Immunantwort über-

nimmt. Unsere Arbeitsgruppe hat in einem Modellsystem anhand CEA-spezifischer Immunrezeptoren gezeigt, dass die rezeptorvermittelte T-Zellaktivierung nach Koinkubation mit CEA⁺ Tumorzellen zur spezifischen Zytolyse und IFN γ Sekretion durch die Zugabe von IL-12 gesteigert wird (Gardemann, 2007). Jedoch birgt eine systemische Applikation von IL-12 *in vivo* die Gefahr der systemischen Toxizität. So zeigten klinische Studien bei i.v. oder s.c. Gabe von IL-12 Nebenwirkungen wie erhöhte Transaminasen der Leber und Zytopenien (Atkins *et al.*, 1997; Gollob *et al.*, 2000). Bereits in einer niedrigen Dosis von 3 ng/kg Körpergewicht kann Fieber, Übelkeit, Erbrechen und Kopfschmerz auftreten. Unser Ziel ist es daher, durch Anwendung des Prinzips einer NFAT-induzierten Genexpression in T-Lymphozyten nach Rezeptorstimulation die gezielte Sekretion von IL-12 am Tumorort zu induzieren. Deswegen statteten wir rezeptormodifizierte T-Zellen zusätzlich mit einem Immunrezeptor-induzierbaren Gen für IL-12 mit NFAT-Minimalpromotor aus. Dies erreichten wir durch den Einsatz selbst-inaktivierender (SIN) retroviraler Vektoren, die eine effiziente Transduktion humaner T-Lymphozyten gewährleisten ohne eine Promotoraktivität durch retrovirale LTR-Elemente zu vermitteln. Hooijberg *et al.*, 2000 zeigten, dass ein NFAT-GFP SIN-Vektorkonstrukt zur Identifizierung und Anreicherung von antigenspezifischen T-Zellen aus einer heterogenen T-Zellpopulation genutzt werden kann. Dies hat gegenüber der Anreicherung mit HLA/Peptid Tetrameren den Vorteil, dass über das Antigen zuvor keine weiteren Kenntnisse notwendig sind.

Zunächst gingen wir der Frage nach, ob eine spezifische rezeptorinduzierte Sekretion von IL-12 nach Bindung immobilisierten Antigens durch modifizierte T-Lymphozyten erfolgt. Um eine effiziente Koexpression des rekombinanten Immunrezeptors und IL-12 in T-Lymphozyten zu gewährleisten, wurden T-Zellen durch retrovirale Transduktion mit NFAT-IL-12, G418-Selektion unter TCR-Stimulation, und einer zweiten Transduktion mit dem CEA-spezifischem Immunrezeptor (#700) modifiziert. Die Sekretion von IL-12 wurde spezifisch induziert nach Inkubation der modifizierten T-Zellen auf immobilisiertem anti-idiotypischen Antikörper BW2064/36, sowie auf agonistischen Antikörpern gegen CD3 und CD28. Ohne Rezeptorstimulation wurde IL-12 nur in einem niedrigen Hintergrundbereich exprimiert. Diese geringen Mengen IL-12 führten offenbar auch allein zu einer marginalen Erhöhung der IFN- γ Sekretion der modifizierten T-Zellen gegenüber Zellen ohne NFAT-IL-12. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der Literatur, dass IL-12 in seiner Eigenschaft als proinflammatorisches Zytokin eine Steigerung der IFN- γ Produktion bewirkt (Brunda *et al.*, 1995). Dagegen führte jedoch konstitutiv exprimiertes IL-12 durch modifizierte T-Zellen nach Kokultur mit CEA⁻ Colo320 Zellen zu keiner Steigerung der IFN- γ Produktion. Die selbst-inaktivierenden, bicistronischen NFAT-IL-12 Vektoren führen offensichtlich zu dem gewünschten Ziel einer rezeptorinduzierten Sekretion von IL-12 durch die modifizierten T-Zellen. Dies geht einher mit einer signifikanten Steigerung der IFN- γ Sekretion und erhöhten spezifische Lyse von CEA⁺ LS174T Tumorzellen. Obwohl die Expression von IL-12 unter NFAT-Kontrolle um ein Vielfaches niedriger ist als durch den konstitutiven CMV-Promotor, scheinen diese Mengen *in vitro* zur Steigerung der Immunantwort

auszureichen. Die Induktion ist spezifisch, da die Kokultur modifizierter T-Zellen mit CEA⁻ Colo320 Tumorzellen nicht zur Expression von IL-12 führt.

Auf Basis dieser *in vitro* Daten erscheint die Strategie der NFAT-induzierten Sekretion von IL-12 in niedrigen Dosierungen durch gentechnisch modifizierte T-Zellen vielversprechend, um die immunstimulierende Wirkung von IL-12 lokal am Tumor zu konzentrieren und Nebenwirkungen zu minimieren. Damit würde IL-12 nur nach Antigenbindung des Immunrezeptors in einem sich selbst regulierenden System freigesetzt. Überdies ist für die gezielte Gabe von IL-12 keine Lokalisierung der Tumorzellen selbst notwendig. Die Kombination mit rekombinanten Immunrezeptoren bietet daher für IL-12 in der Tumorthherapie einen neuen Anreiz, der die moderaten Ansprechraten bei der Monotherapie mit IL-12 weit übersteigt. Das Konzept zur Steigerung der rezeptorvermittelten Immunantwort mit NFAT-IL-12 wird derzeit durch unsere Arbeitsgruppe in immundefizienten Mäusen untersucht. Erste Ergebnisse zeigen, dass Versuchstiere, denen CEA⁺ Tumorzellen und T-Zellen mit CD3 ζ Immunrezeptor (#700) und NFAT-IL-12 coinjiziert wurden, tumorfrei bleiben. Dagegen entwickeln alle Versuchstiere nach Coinjektion von Tumorzellen und T-Zellen, ausgestattet mit dem CEA-spezifischen Immunrezeptor allein, einen Tumor. Dies demonstriert den Erfolg unseres Konzepts, die Immunantwort durch IL-12 lokal zu steigern. Diese Strategie ermöglicht die optimale Ausnutzung der immunstimulierenden Wirkung von IL-12 in der Mikroumgebung des Tumors. Eine andere Möglichkeit dies zu erreichen bieten Antikörper-IL-12 Fusionsproteine, die beispielsweise für das Hodgkin's Lymphom durch Heuser *et al.*, 2003 beschrieben wurden. Diese sind jedoch durch eine schwache Gewebspenetration limitiert, die unser zelluläres System dagegen nicht aufweist. Ferner ist die rezeptorinduzierte Sekretion von IL-12 einer konstitutiven Expression in rezeptormodifizierten T-Zellen vorzuziehen, da die modifizierten Zellen über einen längeren Zeitraum von mehr als 200 Tagen *in vivo* persistieren können, infolgedessen konstitutiv exprimiertes IL-12 zu Nebenwirkungen führen könnte. Dagegen würde NFAT-kontolliertes IL-12 bei Wegfall des Rezeptorsignals nicht mehr exprimiert. Die Persistenz der genetisch modifizierten T-Zellen in der Blutzirkulation könnte einen langanhaltenden Schutz vor Rezidiven oder Mikro-metastasen bieten. Die signalabhängige Produktion heterologer Proteine könnte zukünftig auch für andere immunstimulierende Substanzen individueller Tumorerkrankungen adaptiert werden, oder die zelluläre Immuntherapie durch die gezielte Applikation von Hemmstoffen gegen das Tumorwachstum unterstützen.

Zusammenfassung

Die noch immer hohe Mortalitätsrate maligner Erkrankungen beruht zu 90 % auf einer Metastasierung des Primärtumors durch disseminierte Tumorzellen. Die spezifische Detektion der zirkulierenden Tumorzellen im Serummilieu ist für die Diagnose, eine präzisere Krankheitsprognose oder zur postoperativen Verlaufskontrolle von besonderem Interesse. Derzeitige Verfahren sind technisch aufwändig und wenig sensitiv, so dass die Forderung nach neuen Nachweisverfahren besteht. Als Zielstruktur können tumorassoziierte Antigene dienen, die jedoch in hoher Konzentration auch in das Serum abgegeben werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein zellulärer Biosensor entwickelt, der spezifisch membran-gebundenes carcinoembryonales Antigen (CEA), das in den meisten kolorektalen Karzinomen hoch exprimiert wird, auch in Gegenwart dessen löslicher Form detektiert. Signalgeber des Sensors ist ein rekombinanter Immunrezeptor, der für die adoptive Immuntherapie entwickelt wurde. Sein modularer Aufbau umfasst einen extrazellulären Teil aus einem antigenbindenden rekombinanten Antikörperfragment (scFv) mit einer CH2-CH3 Gelenkregion des humanen IgG₁, sowie der intrazellulären CD3 ζ Signalkette des T-Zellrezeptors. Der Signalgeber wird in einer gentechnisch modifizierten Jurkat T-Zelle exprimiert, die mit einem NFAT-Luciferase Reporter ausgestattet ist und nach antigenspezifischer Kreuzvernetzung des Rezeptors auf der Zelloberfläche ein optisches Signal generiert. Der Biosensor mit Spezifität für CEA wurde durch antigenbeladene Sepharosebeads bei gleichzeitiger Toleranz des löslichen CEA in hoher Dosis spezifisch aktiviert. Dies demonstriert die Fähigkeit des Biosensors zur spezifischen Detektion von membrangebundenem CEA auch in Gegenwart hoher Serumkonzentrationen, wie sie in Tumorpatienten bei fortgeschrittenem Krankheitsverlauf zu finden ist. Durch den Einsatz des fluoreszierenden Ca²⁺-sensitiven Cameleon-Proteins als Reporter ist ein Sensorsignal in nahezu Echtzeit möglich. Zudem wurde gezeigt, dass der Biosensor durch eine kombinierte CD28-CD3 ζ Rezeptorsignalkette die Detektion von löslichem Antigen ermöglicht. Der hier vorgestellte zelluläre Biosensor bietet ein attraktives und flexibles System zur schnellen, hoch spezifischen und sensitiven Detektion hämatogen zirkulierender Tumorzellen, das zwischen dem korpuskulären und dem löslichen Antigen diskriminiert.

Weiterhin wurde das Biosensorkonzept in einem immuntherapeutischen Ansatz in T-Lymphozyten angewendet, um die Sekretion des immunstimulierenden Zytokins IL-12 nach Bindung von CEA⁺ Tumorzellen zu induzieren. T-Zellen, die mit dem NFAT-induzierten Gen für IL-12 und einem CEA-spezifischen Immunrezeptor ausgestattet wurden, zeigten nach antigenspezifischer Bindung IL-12 Sekretion. Diese führte zu einer Steigerung der IFN- γ Sekretion und Lyse von CEA⁺ Tumorzellen durch modifizierte T-Zellen gegenüber T-Zellen mit Expression des Immunrezeptors allein. Das System zur signalabhängigen Produktion eines kostimulatorischen Zytokins verspricht, ein immuntherapeutisches Adjuvans spezifisch am Tumorort zu konzentrieren, infolgedessen die Gefahr der systemischen Toxizität minimiert wird.

Anhang

5.1 DNA- und Aminosäuresequenz der rekombinanten GFP-Fusionsrezeptoren mit Spezifität für TAG72

Dargestellt ist die DNA-Sequenz der generierten Immunrezeptoren pButtet-Lκ-CC49scFv-Fc-zeta-eGFP (#849), pBullet-Lκ-CC49scFv-Fc-CD4TM/zetaIZ-eGFP (#850) und pBullet-Lκ-CC49scFv-Fc-CD4TM/GFP-zeta (#851) mit Spezifität für TAG72. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist oberhalb der DNA-Sequenz im Einbuchstabencode aufgeführt. Das Stop-Codon ist mit [*] gekennzeichnet. Restriktionsschnittstellen, die der Klonierung oder Restriktionsanalyse dienen sind durch Fettdruck gekennzeichnet. Zusätzlich zu den Sequenzen sind die einzelnen kodierenden Domänen angegeben [~~].

5.1.1 #849: pBullet-Lκ-CC49scFv-Fc-zeta-eGFP

Ein Basenaustausch zu Beginn des eGFP-Gens mit Veränderung der Aminosäuresequenz von Valin zu Alanin (bp #1988) ist zusätzlich durch Fettdruck gekennzeichnet.

```

                                     Lκ
                                     ~~~~~
XbaI           NcoI
1  CTC TAG ACT GCC ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT TTC AGC TTC CTG CTA TTC AGT GCC TCA GTC ATA
   GAG ATC TGA CGG TAC CTA AAA GTC CAC GTC TAA AAG TCG AAG GAC GAT AAG TCA CGG AGT CAG TAT
                                     CC49scFv
   ~~~~~
Lκ
   ~~~~~
67  M E W S W V F L F F L S V T T G V H S Q V Q
   ATG GAA TGG AGC TGG GTC TTT CTC TTC TTC CTG TCA GTA ACT ACA GGT GTC CAC TCC CAG GTT CAG
   TAC CTT ACC TCG ACC CAG AAA GAG AAG AAG GAC AGT CAT TGA TGT CCA CAG GTG AGG GTC CAA GTC
                                     CC49scFv
   ~~~~~
133  L Q Q S D A E L V K P G A S V K I S C K A S
   TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTG AAA CCT GGG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT
   AAC GTC GTC AGA CTG CGA CTC AAC CAC TTT GGA CCC CGA AGT CAC TTC TAA AGG ACG TTC CGA AGA
                                     CC49scFv
   ~~~~~
199  G Y T F T D H A I H W V K Q N P E Q G L E W
   GGC TAC ACC TTC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TGG GTG AAA CAG AAC CCT GAA CAG GGC CTG GAA TGG
   CCG ATG TGG AAG TGA CTG GTA CGT TAA GTG ACC CAC TTT GTC TTG GGA CTT GTC CCG GAC CTT ACC
                                     CC49scFv
   ~~~~~
265  I G Y F S P G N D D F K Y N E R F K G K A T
   ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG AGG TTC AAG GGC AAG GCC ACA
   TAA CCT ATA AAA AGA GGG CCT TTA CTA CTA AAA TTT ATG TTA CTC TCC AAG TTC CCG TTC CGG TGT

```

CC49scFv

~~~~~

331 L T A D K S S S T A Y V Q L N S L T S E D S  
 CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT GCC TAC GTG CAG CTC AAC AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT  
 GAC TGA CGT CTG TTT AGG AGG TCG TGA CCG ATG CAC GTC GAG TTG TCG GAC TGT AGA CTC CTA AGA

CC49scFv

~~~~~

397 A V Y F C T R S L N M A Y W G Q G T S V T V
 GCA GTG TAT TTC TGT ACA AGA TCC CTG AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC
 CGT CAC ATA AAG ACA TGT TCT AGG GAC TTA TAC CGG ATG ACC CCA GTT CCT TGG AGT CAG TGG CAG

CC49scFv

~~~~~

463 S S G G G G S G G G G S G G G S D I V M S  
 TCC TCA GGA GGC GGA GGC AGC GGA GGC GGT GGC TCG GGA GGC GGA GGC TCG GAC ATT GTG ATG TCA  
 AGG AGT CCT CCG CCT CCG TCG CCT CCG CCA CCG AGC CCT CCG CCT CCG AGC CTG TAA CAC TAC AGT

CC49scFv

~~~~~

529 Q S P S S L P V S V G E K V T L S C K S S Q
 CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCT GTG TCA GTT GGC GAG AAG GTT ACT TTG AGC TGC AAG TCC AGT CAG
 GTC AGA GGT AGG AGG GAT GGA CAC AGT CAA CCG CTC TTC CAA TGA AAC TCG ACG TTC AGG TCA GTC

CC49scFv

~~~~~

595 S L L Y S G N Q K N Y L A W Y Q Q K P G Q S  
 AGC CTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT  
 TCG GAA AAT ATA TCA CCA TTA GTT TTC TTG ATG AAC CGG ACC ATG GTC GTC TTT GGT CCC GTC AGA

CC49scFv

~~~~~

661 P K L L I Y W A S A R E S G V P D R F T G S
 CCT AAA CTG CTG ATT TAC TGG GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT
 GGA TTT GAC GAC TAA ATG ACC CGT AGG CGA TCC CTT AGA CCC CAG GGA CTA GCG AAG TGT CCG TCA

CC49scFv

~~~~~

727 G S G T D F T L S I S S V K T E D L A V Y Y  
 GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG AAG ACT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC  
 CCT AGA CCC TGT CTA AAG TGA GAG AGG TAG TCG TCA CAC TTC TGA CTT CTG GAC CGT CAA ATA ATG

CC49scFv

~~~~~

793 C Q Q Y Y S Y P L T F G A G T K L V L K R A
 TGT CAG CAG TAT TAT AGC TAT CCC CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GTG CTG AAA CGG GCC
 ACA GTC GTC ATA ATA TCG ATA GGG GAG TGC AAG CCA CGA CCC TGG TTC GAC CAC GAC TTT GCC CGG

humanFc

~~~~~

859 A E P K S P D K T H T C P P C P A P E L L G  
 GCA GAG CCC AAA TCT CCT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG  
 CGT CTC GGG TTT AGA GGA CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC

humanFc

~~~~~

925 G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E
 GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG
 CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC

humanFc

~~~~~

991 V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D  
 GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC  
 CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG

humanFc

~~~~~

1057 G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V
 GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGG GTG
 CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCC CAC

humanFc

~~~~~

1123 V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S  
 GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC  
 CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG

humanFc

~~~~~

1189 N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P
 AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA
 TTG TTT CGG GAG GGT CGG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT


```

                                humanFc
~~~~~
1255  Q  V  Y  T  L  P  P  S  R  D  E  L  T  K  N  Q  V  S  L  T  C  L
      CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG
      GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTA CTC GAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC
                                humanFc
~~~~~
1321  V  K  G  F  Y  P  S  D  I  A  V  E  W  E  S  N  G  Q  P  E  N  N
      GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC
      CAG TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG
                                humanFc
~~~~~
1387  Y  K  T  T  P  P  V  L  D  S  D  G  S  F  F  L  Y  S  K  L  T  V
      TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG
      ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TTC GAG TGG CAC
                                humanFc
~~~~~
1453  D  K  S  R  W  Q  Q  G  N  V  F  S  C  S  V  M  H  E  A  L  H  N
      GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC
      CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG
                                humanFc
                                CD3zeta
~~~~~
                                BamHI
1519  H  Y  T  Q  K  S  L  S  L  S  P  G  K  K  D  P  K  L  C  Y  L  L
      CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA AAG GAT CCC AAA CTC TGC TAC CTG CTG
      GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT TTC CTA GGG TTT GAG ACG ATG GAC GAC
                                CD3zeta
~~~~~
1585  D  G  I  L  F  I  Y  G  V  I  L  T  A  L  F  L  R  V  K  F  S  R
      GAT GGA ATC CTC TTC ATC TAT GGT GTC ATT CTC ACT GCC TTG TTC CTG AGA GTG AAG TTC AGC AGG
      CTA CCT TAG GAG AAG TAG ATA CCA CAG TAA GAG TGA CGG AAC AAG GAC TCT CAC TTC AAG TCG TCC
                                CD3zeta
~~~~~
1651  S  A  D  A  P  A  Y  Q  Q  G  Q  N  Q  L  Y  N  E  L  N  L  G  R
      AGC GCA GAC GCC CCC GCG TAC CAG CAG GGC CAG AAC CAG CTC TAT AAC GAG CTC AAT CTA GGA CGA
      TCG CGT CTG CGG GGG CGC ATG GTC GTC CCG GTC TTG GTC GAG ATA TTG CTC GAG TTA GAT CCT GCT
                                CD3zeta
~~~~~
1717  R  E  E  Y  D  V  L  D  K  R  R  G  R  D  P  E  M  G  G  K  P  R
      AGA GAG GAG TAC GAT GTT TTG GAC AAG AGA CGT GGC CGG GAC CCT GAG ATG GGG GGA AAG CCG AGA
      TCT CTC CTC ATG CTA CAA AAC CTG TTC TCT GCA CCG GCC CTG GGA CTC TAC CCC CCT TTC GGC TCT
                                CD3zeta
~~~~~
1783  R  K  N  P  Q  E  G  L  Y  N  E  L  Q  K  D  K  M  A  E  A  Y  S
      AGG AAG AAC CCT CAG GAA GGC CTG TAC AAT GAA CTG CAG AAA GAT AAG ATG GCG GAG GCC TAC AGT
      TCC TTC TTG GGA GTC CTT CCG GAC ATG TTA CTT GAC GTC TTT CTA TTC TAC CGC CTC CGG ATG TCA
                                CD3zeta
~~~~~
1849  E  I  G  M  K  G  E  R  R  R  G  K  G  H  D  G  L  Y  Q  G  L  S
      GAG ATT GGG ATG AAA GGC GAG CGC CGG AGG GGC AAG GGG CAC GAT GGC CTT TAC CAG GGT CTC AGT
      CTC TAA CCC TAC TTT CCG CTC GCG GCC TCC CCG TTC CCC GTG CTA CCG GAA ATG GTC CCA GAG TCA
                                Glycin-Linker
                                CD3zeta
~~~~~
1915  T  A  T  K  D  T  Y  D  A  L  H  M  Q  A  L  P  P  R  G  G  G  G
      ACA GCC ACC AAG GAC ACC TAC GAC GCC CTT CAC ATG CAG GCC CTG CCC CCT CGC GGA GGC GGA GGT
      TGT CGG TGG TTC CTG TGG ATG CTG CGG GAA GTG TAC GTC CGG GAC GGG GGA GCG CCT CCG CCT CCA
      Glycin-Linker
      ~~~~
                                T z u C
                                ~
                                EGFP
~~~~~
1981  G  M  A  S  K  G  E  E  L  F  T  G  V  V  P  I  L  V  E  L  D  G
      GGA ATG GCG AGC AAA GGA GAA GAA CTC TTC ACT GGA GTT GTC CCA ATT CTT GTT GAA TTA GAT GGT
      CCT TAC GCG TCG TTT CCT CTT CTT GAG AAG TGA CCT CAA CAG GGT TAA GAA CAA CTT AAT CTA CCA
                                EGFP
~~~~~
2047  D  V  N  G  H  K  F  S  V  S  G  E  G  E  G  D  A  T  Y  G  K  L
      GAT GTT AAC GGC CAC AAG TTC TCT GTC AGT GGA GAG GGT GAA GGT GAT GCA ACA TAC GGA AAA CTT
      CTA CAA TTG CCG GTG TTC AAG AGA CAG TCA CCT CTC CCA CTT CCA CTA CGT TGT ATG CCT TTT GAA

```

EGFP

~~~~~

NcoI

2113 T L K F I C T T G K L P V P W P T L V T T L  
ACC CTG AAG TTC ATC TGC ACT ACT GGC AAA CTG CCT GTT **CCA TGG** CCA ACA CTA GTC ACT ACT CTG  
TGG GAC TTC AAG TAG ACG TGA TGA CCG TTT GAC GGA CAA **GGT ACC** GGT TGT GAT CAG TGA TGA GAC

EGFP

2179 C Y G V Q C F S R Y P D H M K R H D F F K S  
TGC TAT GGT GTT CAA TGC TTT TCA AGA TAC CCG GAT CAT ATG AAA CGG CAT GAC TTT TTC AAG AGT  
ACG ATA CCA CAA GTT ACG AAA AGT TCT ATG GGC CTA GTA TAC TTT GCC GTA CTG AAA AAG TTC TCA

EGFP

2245 A M P E G Y V Q E R T I F F K D D G N Y K T  
GCC ATG CCC GAA GGT TAT GTA CAG GAA AGG ACC ATC TTC TTC AAA GAT GAC GGC AAC TAC AAG ACA  
CGG TAC GGG CTT CCA ATA CAT GTC CTT TCC TGG TAG AAG AAG TTT CTA CTG CCG TTG ATG TTC TGT

EGFP

2311 R A E V K F E G D T L V N R I E L K G I D F  
CGT GCT GAA GTC AAG TTT GAA GGT GAT ACC CTT GTT AAT AGA ATC GAG TTA AAA GGT ATT GAC TTC  
GCA CGA CTT CAG TTC AAA CTT CCA CTA TGG GAA CAA TTA TCT TAG CTC AAT TTT CCA TAA CTG AAG

EGFP

2377 K E D G N I L G H K L E Y N Y N S H N V Y I  
AAG GAA GAT GGC AAC ATT CTG GGA CAC AAA TTG GAA TAC AAC TAT AAC TCA CAC AAT GTA TAC ATC  
TTC CTT CTA CCG TTG TAA GAC CCT GTG TTT AAC CTT ATG TTG ATA TTG AGT GTG TTA CAT ATG TAG

EGFP

2443 M A D K Q K N G I K V N F K T R H N I E D G  
ATG GCA GAC AAA CAA AAG AAT GGA ATC AAA GTG AAC TTC AAG ACC CGC CAC AAC ATT GAA GAT GGA  
TAC CGT CTG TTT GTT TTC TTA CCT TAG TTT CAC TTG AAG TTC TGG GCG GTG TTG TAA CTT CTA CCT

EGFP

2509 S V Q L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P  
AGC GTT CAA CTA GCA GAC CAT TAT CAA CAA AAT ACT CCA ATT GGC GAT GGC CCT GTC CTT TTA CCA  
TCG CAA GTT GAT CGT CTG GTA ATA GTT GTT TTA TGA GGT TAA CCG CTA CCG GGA CAG GAA AAT GGT

EGFP

2575 D N H Y L S T Q S A L S K D P N E K R D H M  
GAC AAC CAT TAC CTG TCC ACA CAA TCT GCC CTT TCG AAA GAT CCC AAC GAA AAG AGA GAC CAC ATG  
CTG TTG GTA ATG GAC AGG TGT GTT AGA CCG GAA AGC TTT CTA GGG TTG CTT TTC TCT CTG GTG TAC

EGFP

2641 V L L E F V T A A G I T H G M D E L Y N \*  
GTC CTT CTT GAG TTT GTA ACA GCT GCT GGG ATT ACA CAT GGC ATG GAT GAA CTG TAC AAC TGA GTC  
CAG GAA GAA CTC AAA CAT TGT CGA CGA CCC TAA TGT GTA CCG TAC CTA CTT GAC ATG TTG ACT CAG

XhoI

2707 GAC **CTC GAG**  
CTG **GAG CTC**

### 5.1.2 #850: pBullet-L<sub>K</sub>-CC49scFv-Fc-CD4TM/zetaI<sub>Z</sub>-eGFP

L<sub>K</sub>

~~~~~

XbaI NcoI

1 M D F Q V Q I F S F L L F S A S V I
CTC TAG ACT **GCC ATG** GAT TTT CAG GTG CAG ATT TTC AGC TTC CTG CTA TTC AGT GCC TCA GTC ATA
GAG ATC TGA **CGG TAC** CTA AAA GTC CAC GTC TAA AAG TCG AAG GAC GAT AAG TCA CGG AGT CAG TAT

CC49scFv

~~~~~

L<sub>K</sub>

67 M E W S W V F L F F L S V T T G V H S Q V Q  
ATG GAA TGG AGC TGG GTC TTT CTC TTC TTC CTG TCA GTA ACT ACA GGT GTC CAC TCC CAG GTT CAG  
TAC CTT ACC TCG ACC CAG AAA GAG AAG AAG GAC AGT CAT TGA TGT CCA CAG GTG AGG GTC CAA GTC

CC49scFv

133 L Q Q S D A E L V K P G A S V K I S C K A S  
 TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTG AAA CCT GGG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT  
 AAC GTC GTC AGA CTG CGA CTC AAC CAC TTT GGA CCC CGA AGT CAC TTC TAA AGG ACG TTC CGA AGA  
 CC49scFv

199 G Y T F T D H A I H W V K Q N P E Q G L E W  
 GGC TAC ACC TTC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TGG GTG AAA CAG AAC CCT GAA CAG GGC CTG GAA TGG  
 CCG ATG TGG AAG TGA CTG GTA CGT TAA GTG ACC CAC TTT GTC TTG GGA CTT GTC CCG GAC CTT ACC  
 CC49scFv

265 I G Y F S P G N D D F K Y N E R F K G K A T  
 ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG AGG TTC AAG GGC AAG GCC ACA  
 TAA CCT ATA AAA AGA GGG CCT TTA CTA CTA AAA TTT ATG TTA CTC TCC AAG TTC CCG TTC CGG TGT  
 CC49scFv

331 L T A D K S S S T A Y V Q L N S L T S E D S  
 CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT GCC TAC GTG CAG CTC AAC AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT  
 GAC TGA CGT CTG TTT AGG AGG TCG TGA CGG ATG CAC GTC GAG TTG TCG GAC TGT AGA CTC CTA AGA  
 CC49scFv

397 A V Y F C T R S L N M A Y W G Q G T S V T V  
 GCA GTG TAT TTC TGT ACA AGA TCC CTG AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC  
 CGT CAC ATA AAG ACA TGT TCT AGG GAC TTA TAC CGG ATG ACC CCA GTT CCT TGG AGT CAG TGG CAG  
 CC49scFv

463 S S G G G G S G G G G S G G G G S D I V M S  
 TCC TCA GGA GGC GGA GGC AGC GGA GGC GGT GGC TCG GGA GGC GGA GGC TCG GAC ATT GTG ATG TCA  
 AGG AGT CCT CCG CCT CCG TCG CCT CCG CCA CCG AGC CCT CCG CCT CCG AGC CTG TAA CAC TAC AGT  
 CC49scFv

529 Q S P S S L P V S V G E K V T L S C K S S Q  
 CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCT GTG TCA GTT GGC GAG AAG GTT ACT TTG AGC TGC AAG TCC AGT CAG  
 GTC AGA GGT AGG AGG GAT GGA CAC AGT CAA CCG CTC TTC CAA TGA AAC TCG ACG TTC AGG TCA GTC  
 CC49scFv

595 S L L Y S G N Q K N Y L A W Y Q Q K P G Q S  
 AGC CTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT  
 TCG GAA AAT ATA TCA CCA TTA GTT TTC TTG ATG AAC CGG ACC ATG GTC GTC TTT GGT CCC GTC AGA  
 CC49scFv

661 P K L L I Y W A S A R E S G V P D R F T G S  
 CCT AAA CTG CTG ATT TAC TGG GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT  
 GGA TTT GAC GAC TAA ATG ACC CGT AGG CGA TCC CTT AGA CCC CAG GGA CTA GCG AAG TGT CCG TCA  
 CC49scFv

727 G S G T D F T L S I S S V K T E D L A V Y Y  
 GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG AAG ACT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC  
 CCT AGA CCC TGT CTA AAG TGA GAG AGG TAG TCG TCA CAC TTC TGA CTT CTG GAC CGT CAA ATA ATG  
 CC49scFv

793 C Q Q Y Y S Y P L T F G A G T K L V L K R A  
 TGT CAG CAG TAT TAT AGC TAT CCC CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GTG CTG AAA CGG GCC  
 ACA GTC GTC ATA ATA TCG ATA GGG GAG TGC AAG CCA CGA CCC TGG TTC GAC CAC GAC TTT GCC CGG  
 human Fc

859 A E P K S P D K T H T C P P C P A P E L L G  
 GCA GAG CCC AAA TCT CCT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG  
 CGT CTC GGG TTT AGA GGA CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC  
 human Fc

925 G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E  
 GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG  
 CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC  
 human Fc

991 V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D  
 GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC  
 CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG

human Fc

1057 G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V  
GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGG GTG  
CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCC CAC

human Fc

1123 V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S  
GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC  
CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG

human Fc

1189 N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P  
AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA  
TTG TTT CGG GAG GGT CGG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT

human Fc

1255 Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L  
CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG  
GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTA CTC GAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC

human Fc

1321 V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N  
GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC  
CAG TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG

human Fc

1387 Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V  
TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG  
ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TTC GAG TGG CAC

human Fc

1453 D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N  
GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC  
CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG

human Fc CD4TM

BamHI

1519 H Y T Q K S L S L S P G K K D P Q P M A L I  
CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA AAG GAT CCT CAG CCA ATG GCC CTG ATT  
GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT TTC CTA GGA GTC GGT TAC CGG GAC TAA

CD4TM

1585 V L G G V A G L L L F I G L G I F F C V R L  
GTG CTG GGG GGC GTC GCC GGC CTC CTG CTT TTC ATT GGG CTA GGC ATC TTC TTC TGT GTC AGG CTG  
CAC GAC CCC CCG CAG CGG CCG GAG GAC GAA AAG TAA CCC GAT CCG TAG AAG AAG ACA CAG TCC GAC

CD3zetaIZ

1651 R V K F S R S A D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N  
AGA GTG AAG TTC AGC AGG AGC GCA GAC GCC CCC GCG TAC CAG CAG GGC CAG AAC CAG CTC TAT AAC  
TCT CAC TTC AAG TCG TCC TCG CGT CTG CGG GGC CGC ATG GTC GTC CCG GTC TTG GTC GAG ATA TTG

CD3zetaIZ

1717 E L N L G R R E E Y D V L D K R R G R D P E  
GAG CTC AAT CTA GGA CGA AGA GAG GAG TAC GAT GTT TTG GAC AAG AGA CGT GGC CGG GAC CCT GAG  
CTC GAG TTA GAT CCT GCT TCT CTC CTC ATG CTA CAA AAC CTG TTC TCT GCA CCG GCC CTG GGA CTC

CD3zetaIZ

1783 M G G K P R R K N P Q E G L Y N E L Q K D K  
ATG GGG GGA AAG CCG AGA AGG AAG AAC CCT CAG GAA GGC CTG TAC AAT GAA CTG CAG AAA GAT AAG  
TAC CCC CCT TTC GGC TCT TCC TTC TTG GGA GTC CTT CCG GAC ATG TTA CTT GAC GTC TTT CTA TTC

CD3zetaIZ

1849 M A E A Y S E I G M K G E R R R G K G H D G  
ATG GCG GAG GCC TAC AGT GAG ATT GGG ATG AAA GGC GAG CGC CGG AGG GGC AAG GGG CAC GAT GGC  
TAC CGC CTC CGG ATG TCA CTC TAA CCC TAC TTT CCG CTC GCG GCC TCC CCG TTC CCC GTG CTA CCG

CD3zetaIZ

1915 L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q A L P  
CTT TAC CAG GGT CTC AGT ACA GCC ACC AAG GAC ACC TAC GAC GCC CTT CAC ATG CAG GCC CTG CCC  
GAA ATG GTC CCA GAG TCA TGT CGG TGG TTC CTG TGG ATG CTG CGG GAA GTG TAC GTC CGG GAC GGG

## Glycin-Linker

```

~~~~~
CD3zetaIZ EGFP
~~~~~
1981 P R G G G G G M V S K G E E L F T G V V P I
CCT CGC GGA GGC GGA GGT GGA ATG GTG AGC AAA GGA GAA GAA CTC TTC ACT GGA GTT GTC CCA ATT
GGA GCG CCT CCG CCT CCA CCT TAC CAC TCG TTT CCT CTT CTT GAG AAG TGA CCT CAA CAG GGT TAA
EGFP
~~~~~
2047 L V E L D G D V N G H K F S V S G E G E G D
CTT GTT GAA TTA GAT GGT GAT GTT AAC GGC CAC AAG TTC TCT GTC AGT GGA GAG GGT GAA GGT GAT
GAA CAA CTT AAT CTA CCA CTA CAA TTG CCG GTG TTC AAG AGA CAG TCA CCT CTC CCA CTT CCA CTA
EGFP
~~~~~
2113 A T Y G K L T L K F I C T T G K L P V P W P
GCA ACA TAC GGA AAA CTT ACC CTG AAG TTC ATC TGC ACT ACT GGC AAA CTG CCT GTT CCA TGG CCA
CGT TGT ATG CCT TTT GAA TGG GAC TTC AAG TAG ACG TGA TGA CCG TTT GAC GGA CAA GGT ACC GGT
EGFP
~~~~~
2179 T L V T T L C Y G V Q C F S R Y P D H M K R
ACA CTA GTC ACT ACT CTG TGC TAT GGT GTT CAA TGC TTT TCA AGA TAC CCG GAT CAT ATG AAA CGG
TGT GAT CAG TGA TGA GAC ACG ATA CCA CAA GTT ACG AAA AGT TCT ATG GGC CTA GTA TAC TTT GCC
EGFP
~~~~~
2245 H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I F F K D
CAT GAC TTT TTC AAG AGT GCC ATG CCC GAA GGT TAT GTA CAG GAA AGG ACC ATC TTC TTC AAA GAT
GTA CTG AAA AAG TTC TCA CGG TAC GGG CTT CCA ATA CAT GTC CTT TCC TGG TAG AAG AAG TTT CTA
EGFP
~~~~~
2311 D G N Y K T R A E V K F E G D T L V N R I E
GAC GGC AAC TAC AAG ACA CGT GCT GAA GTC AAG TTT GAA GGT GAT ACC CTT GTT AAT AGA ATC GAG
CTG CCG TTG ATG TTC TGT GCA CGA CTT CAG TTC AAA CTT CCA CTA TGG GAA CAA TTA TCT TAG CTC
EGFP
~~~~~
2377 L K G I D F K E D G N I L G H K L E Y N Y N
TTA AAA GGT ATT GAC TTC AAG GAA GAT GGC AAC ATT CTG GGA CAC AAA TTG GAA TAC AAC TAT AAC
AAT TTT CCA TAA CTG AAG TTC CTT CTA CCG TTG TAA GAC CCT GTG TTT AAC CTT ATG TTG ATA TTG
EGFP
~~~~~
2443 S H N V Y I M A D K Q K N G I K V N F K T R
TCA CAC AAT GTA TAC ATC ATG GCA GAC AAA CAA AAG AAT GGA ATC AAA GTG AAC TTC AAG ACC CGC
AGT GTG TTA CAT ATG TAG TAC CGT CTG TTT GTT TTC TTA CCT TAG TTT CAC TTG AAG TTC TGG GCG
EGFP
~~~~~
2509 H N I E D G S V Q L A D H Y Q Q N T P I G D
CAC AAC ATT GAA GAT GGA AGC GTT CAA CTA GCA GAC CAT TAT CAA CAA AAT ACT CCA ATT GGC GAT
GTG TTG TAA CTT CTA CCT TCG CAA GTT GAT CGT CTG GTA ATA GTT GTT TTA TGA GGT TAA CCG CTA
EGFP
~~~~~
2575 G P V L L P D N H Y L S T Q S A L S K D P N
GGC CCT GTC CTT TTA CCA GAC AAC CAT TAC CTG TCC ACA CAA TCT GCC CTT TCG AAA GAT CCC AAC
CCG GGA CAG GAA AAT GGT CTG TTG GTA ATG GAC AGG TGT GTT AGA CGG GAA AGC TTT CTA GGG TTG
EGFP
~~~~~
2641 E K R D H M V L L E F V T A A G I T H G M D
GAA AAG AGA GAC CAC ATG GTC CTT CTT GAG TTT GTA ACA GCT GCT GGG ATT ACA CAT GGC ATG GAT
CTT TTC TCT CTG GTG TAC CAG GAA GAA CTC AAA CAT TGT CGA CGA CCC TAA TGT GTA CCG TAC CTA
EGFP
~~~~~
XhoI
2707 E L Y N *
GAA CTG TAC AAC TGA GTC GAC CTC GAG
CTT GAC ATG TTG ACT CAG CTG GAG CTC

```

5.1.3 #851: pBullet-L<sub>K</sub>-CC49scFv-Fc-CD4TM/eGFP-zetaIZ

```

 Lk
~~~~~
XbaI           NcoI
      M   D   F   Q   V   Q   I   F   S   F   L   L   F   S   A   S   V   I
1  CTC TAG ACT GCC ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT TTC AGC TTC CTG CTA TTC AGT GCC TCA GTC ATA
GAG ATC TGA CGG TAC CTA AAA GTC CAC GTC TAA AAG TCG AAG GAC GAT AAG TCA CGG AGT CAG TAT
                                     CC49scFv
~~~~~
Lk
~~~~~
      M   E   W   S   W   V   F   L   F   F   L   S   V   T   T   G   V   H   S   Q   V   Q
67  ATG GAA TGG AGC TGG GTC TTT CTC TTC TTC CTG TCA GTA ACT ACA GGT GTC CAC TCC CAG GTT CAG
TAC CTT ACC TCG ACC CAG AAA GAG AAG AAG GAC AGT CAT TGA TGT CCA CAG GTG AGG GTC CAA GTC
                                     CC49scFv
~~~~~
 L Q Q S D A E L V K P G A S V K I S C K A S
133 TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTG AAA CCT GGG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT
AAC GTC GTC AGA CTG CGA CTC AAC CAC TTT GGA CCC CGA AGT CAC TTC TAA AGG ACG TTC CGA AGA
 CC49scFv
~~~~~
      G   Y   T   F   T   D   H   A   I   H   W   V   K   Q   N   P   E   Q   G   L   E   W
199  GGC TAC ACC TTC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TGG GTG AAA CAG AAC CCT GAA CAG GGC CTG GAA TGG
CCG ATG TGG AAG TGA CTG GTA CGT TAA GTC ACC CAC TTT GTC TTG GGA CTT GTC CCG GAC CTT ACC
                                     CC49scFv
~~~~~
 I G Y F S P G N D D F K Y N E R F K G K A T
265 ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG AGG TTC AAG GGC AAG GCC ACA
TAA CCT ATA AAA AGA GGG CCT TTA CTA CTA AAA TTT ATG TTA CTC TCC AAG TTC CCG TTC CGG TGT
 CC49scFv
~~~~~
      L   T   A   D   K   S   S   S   T   A   Y   V   Q   L   N   S   L   T   S   E   D   S
331  CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT GCC TAC GTG CAG CTC AAC AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT
GAC TGA CGT CTG TTT AGG AGG TCG TGA CGG ATG CAC GTC GAG TTG TCG GAC TGT AGA CTC CTA AGA
                                     CC49scFv
~~~~~
 A V Y F C T R S L N M A Y W G Q G T S V T V
397 GCA GTG TAT TTC TGT ACA AGA TCC CTG AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC
CGT CAC ATA AAG ACA TGT TCT AGG GAC TTA TAC CGG ATG ACC CCA GTT CCT TGG AGT CAG TGG CAG
 CC49scFv
~~~~~
      S   S   G   G   G   G   S   G   G   G   G   S   G   G   G   S   D   I   V   M   S
463  TCC TCA GGA GGC GGA GGC AGC GGA GGC GGT GGC TCG GGA GGC GGA GGC TCG GAC ATT GTG ATG TCA
AGG AGT CCT CCG CCT CCG TCG CCT CCG CCA CCG AGC CCT CCG CCT CCG AGC CTG TAA CAC TAC AGT
                                     CC49scFv
~~~~~
 Q S P S S L P V S V G E K V T L S C K S S Q
529 CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCT GTG TCA GTT GGC GAG AAG GTT ACT TTG AGC TGC AAG TCC AGT CAG
GTC AGA GGT AGG AGG GAT GGA CAC AGT CAA CCG CTC TTC CAA TGA AAC TCG ACG TTC AGG TCA GTC
 CC49scFv
~~~~~
      S   L   L   Y   S   G   N   Q   K   N   Y   L   A   W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   S
595  AGC CTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT
TCG GAA AAT ATA TCA CCA TTA GTT TTC TTG ATG AAC CGG ACC ATG GTC GTC TTT GGT CCC GTC AGA
                                     CC49scFv
~~~~~
 P K L L I Y W A S A R E S G V P D R F T G S
661 CCT AAA CTG CTG ATT TAC TGG GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT
GGA TTT GAC GAC TAA ATG ACC CGT AGG CGA TCC CTT AGA CCC CAG GGA CTA GCG AAG TGT CCG TCA
 CC49scFv
~~~~~
      G   S   G   T   D   F   T   L   S   I   S   S   V   K   T   E   D   L   A   V   Y   Y
727  GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG AAG ACT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC
CCT AGA CCC TGT CTA AAG TGA GAG AGG TAG TCG TCA CAC TTC TGA CTT CTG GAC CGT CAA ATA ATG
                                     CC49scFv
~~~~~
 C Q Q Y Y S Y P L T F G A G T K L V L K R A
793 TGT CAG CAG TAT TAT AGC TAT CCC CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GTG CTG AAA CGG GCC
ACA GTC GTC ATA ATA TCG ATA GGG GAG TGC AAG CCA CGA CCC TGG TTC GAC CAC GAC TTT GCC CGG

```

```

 human Fc
~~~~~
859  A E P K S P D K T H T C P P C P A P E L L G
    GCA GAG CCC AAA TCT CCT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG
    CGT CTC GGG TTT AGA GGA CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC
                                human Fc
~~~~~
925 G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E
 GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG
 CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC
 human Fc
~~~~~
991  V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D
    GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC
    CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG CTG CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG
                                human Fc
~~~~~
1057 G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V
 GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGG GTG
 CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCC CAC
 human Fc
~~~~~
1123 V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S
    GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC
    CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG
                                human Fc
~~~~~
1189 N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P
 AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA
 TTG TTT CGG GAG GGT CGG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT
 human Fc
~~~~~
1255 Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L
    CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG
    GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTA CTC GAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC
                                human Fc
~~~~~
1321 V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N
 GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC
 CAG TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG
 human Fc
~~~~~
1387 Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V
    TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG
    ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TTC GAG TGG CAC
                                human Fc
~~~~~
1453 D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N
 GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC
 CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG
 human Fc
 CD4TM
~~~~~
                                BamHI
1519 H Y T Q K S L S L S P G K K D P Q P M A L I
    CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA AAG GAT CCT CAG CCA ATG GCC CTG ATT
    GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AAG GAC AGA GGC CCA TTT TTC CTA GGA GTC GGT TAC CGG GAC TAA
                                CD4TM
~~~~~
 EGFP
1585 V L G G V A G L L L F I G L G I F F C V R M
 GTG CTG GGG GGC GTC GCC GGC CTC CTG CTT TTC ATT GGG CTA GGC ATC TTC TTC TGT GTC AGG ATG
 CAC GAC CCC CCG CAG CGG CCG GAG GAC GAA AAG TAA CCC GAT CCG TAG AAG AAG ACA CAG TCC TAC
 EGFP
~~~~~
1651 V S K G E E L F T G V V P I L V E L D G D V
    GTG AGC AAA GGA GAA GAA CTC TTC ACT GGA GTT GTC CCA ATT CTT GTT GAA TTA GAT GGT GAT GTT
    CAC TCG TTT CCT CTT CTT GAG AAG TGA CCT CAA CAG GGT TAA GAA CAA CTT AAT CTA CCA CTA CAA

```

```

                                EGFP
~~~~~
1717 N G H K F S V S G E G E G D A T Y G K L T L
AAC GGC CAC AAG TTC TCT GTC AGT GGA GAG GGT GAA GGT GAT GCA ACA TAC GGA AAA CTT ACC CTG
TTG CCG GTG TTC AAG AGA CAG TCA CCT CTC CCA CTT CCA CTA CGT TGT ATG CCT TTT GAA TGG GAC
 EGFP
~~~~~
                                NcoI
1783  K F I C T T G K L P V P W P T L V T T L C Y
AAG TTC ATC TGC ACT ACT GGC AAA CTG CCT GTT CCA TGG CCA ACA CTA GTC ACT ACT CTG TGC TAT
TTC AAG TAG ACG TGA TGA CCG TTT GAC GGA CAA GGT ACC GGT TGT GAT CAG TGA TGA GAC ACG ATA
                                EGFP
~~~~~
1849 G V Q C F S R Y P D H M K R H D F F K S A M
GGT GTT CAA TGC TTT TCA AGA TAC CCG GAT CAT ATG AAA CGG CAT GAC TTT TTC AAG AGT GCC ATG
CCA CAA GTT ACG AAA AGT TCT ATG GGC CTA GTA TAC TTT GCC GTA CTG AAA AAG TTC TCA CGG TAC
 EGFP
~~~~~
1915  P E G Y V Q E R T I F F K D D G N Y K T R A
CCC GAA GGT TAT GTA CAG GAA AGG ACC ATC TTC TTC AAA GAT GAC GGC AAC TAC AAG ACA CGT GCT
GGG CTT CCA ATA CAT GTC CTT TCC TGG TAG AAG AAG TTT CTA CTG CCG TTG ATG TTC TGT GCA CGA
                                EGFP
~~~~~
1981 E V K F E G D T L V N R I E L K G I D F K E
GAA GTC AAG TTT GAA GGT GAT ACC CTT GTT AAT AGA ATC GAG TTA AAA GGT ATT GAC TTC AAG GAA
CTT CAG TTC AAA CTT CCA CTA TGG GAA CAA TTA TCT TAG CTC AAT TTT CCA TAA CTG AAG TTC CTT
 EGFP
~~~~~
2047  D G N I L G H K L E Y N Y N S H N V Y I M A
GAT GGC AAC ATT CTG GGA CAC AAA TTG GAA TAC AAC TAT AAC TCA CAC AAT GTA TAC ATC ATG GCA
CTA CCG TTG TAA GAC CCT GTG TTT AAC CTT ATG TTG ATA TTG AGT GTG TTA CAT ATG TAG TAC CGT
                                EGFP
~~~~~
2113 D K Q K N G I K V N F K T R H N I E D G S V
GAC AAA CAA AAG AAT GGA ATC AAA GTG AAC TTC AAG ACC CGC CAC AAC ATT GAA GAT GGA AGC GTT
CTG TTT GTT TTC TTA CCT TAG TTT CAC TTG AAG TTC TGG GCG GTG TTG TAA CTT CTA CCT TCG CAA
 EGFP
~~~~~
2179  Q L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N
CAA CTA GCA GAC CAT TAT CAA CAA AAT ACT CCA ATT GGC GAT GGC CCT GTC CTT TTA CCA GAC AAC
GTT GAT CGT CTG GTA ATA GTT GTT TTA TGA GGT TAA CCG CTA CCG GGA CAG GAA AAT GGT CTG TTG
                                EGFP
~~~~~
2245 H Y L S T Q S A L S K D P N E K R D H M V L
CAT TAC CTG TCC ACA CAA TCT GCC CTT TCG AAA GAT CCC AAC GAA AAG AGA GAC CAC ATG GTC CTT
GTA ATG GAC AGG TGT GTT AGA CCG GAA AGC TTT CTA GGG TTG CTT TTC TCT CTG GTG TAC CAG GAA
 EGFP
 CD3zetaIZ
~~~~~
2311  L E F V T A A G I T H G M D E L Y N S G L R
CTT GAG TTT GTA ACA GCT GCT GGG ATT ACA CAT GGC ATG GAT GAA CTG TAC AAC TCC GGA CTG AGA
GAA CTC AAA CAT TGT CGA CGA CCC TAA TGT GTA CCG TAC CTA CTT GAC ATG TTG AGG CCT GAC TCT
                                CD3zetaIZ
~~~~~
2377 V K F S R S A D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E
GTG AAG TTC AGC AGG AGC GCA GAC GCC CCC GCG TAC CAG CAG GGC CAG AAC CAG CTC TAT AAC GAG
CAC TTC AAG TCG TCC TCG CGT CTG CGG GGG GCG ATG GTC GTC CCG GTC TTG GTC GAG ATA TTG CTC
 CD3zetaIZ
~~~~~
2443  L N L G R R E E Y D V L D K R R G R D P E M
CTC AAT CTA GGA CGA AGA GAG GAG TAC GAT GTT TTG GAC AAG AGA CGT GGC CGG GAC CCT GAG ATG
GAG TTA GAT CCT GCT TCT CTC CTC ATG CTA CAA AAC CTG TTC TCT GCA CCG GCC CTG GGA CTC TAC
                                CD3zetaIZ
~~~~~
2509 G G K P R R K N P Q E G L Y N E L Q K D K M
GGG GGA AAG CCG AGA AGG AAG AAC CCT CAG GAA GGC CTG TAC AAT GAA CTG CAG AAA GAT AAG ATG
CCC CCT TTC GGC TCT TCC TTC TTG GGA GTC CTT CCG GAC ATG TTA CTT GAC GTC TTT CTA TTC TAC
 CD3zetaIZ
~~~~~
2575  A E A Y S E I G M K G E R R R G K G H D G L
CGC GAG GCC TAC AGT GAG ATT GGG ATG AAA GGC GAG CGC CGG AGG GGC AAG GGG CAC GAT GGC CTT
CGC CTC CGG ATG TCA CTC TAA CCC TAC TTT CCG CTC GCG GCC TCC CCG TTC CCC GTG CTA CCG GAA

```



```

                                CD3zetaIZ
~~~~~
 Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q A L P P
2641 TAC CAG GGT CTC AGT ACA GCC ACC AAG GAC ACC TAC GAC GCC CTT CAC ATG CAG GCC CTG CCC CCT
 ATG GTC CCA GAG TCA TGT CGG TGG TTC CTG TGG ATG CTG CGG GAA GTG TAC GTC CGG GAC GGG GGA
 CD3zetaIZ
~~~~~
                                XhoI
  R  *
2707 CGC TAA CTC GAG
    GCG ATT GAG CTC

```

## 5.2 DNA- und Aminosäuresequenz der rekombinanten GFP-Fusionsrezeptoren mit Spezifität für CEA

Dargestellt ist die DNA-Sequenz der generierten Immunrezeptoren pButtet-L $\kappa$ -BW431/26scFv-Fc-zeta-eGFP (#915) und pBullet-L $\kappa$ -BW431/26scFv-Fc-CD4TM/zetaIZ-eGFP (#916) mit Spezifität für CEA. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist oberhalb der DNA-Sequenz im Einbuchstabencode aufgeführt. Das Stop-Codon ist mit [\*] gekennzeichnet. Restriktionsschnittstellen, die der Klonierung oder Restriktionsanalyse dienen sind durch Fettdruck gekennzeichnet, ebenso die mutierte *NcoI*-Schnittstelle innerhalb der GFP Domäne (bp #2110 (Rezeptor #915) und bp #2118 (Rezeptor #916): CCC TGG). Zusätzlich zu den Sequenzen sind die kodierenden Domänen angegeben [~~].

### 5.2.1 #915: pButtet-L $\kappa$ -BW431/26scFv-Fc-zeta-eGFP

```

                                L $\kappa$ 
~~~~~
 XbaI NcoI
 M D F Q V Q I F S F L L I S A S V I
1 CTC TAG ACT GGC ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT TTC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GCC TCA GTC ATA
 GAG ATC TGA CGG TAC CTA AAA GTC CAC GTC TAA AAG TCG AAG GAC GAT TAG TCA CGG AGT CAG TAT
 L κ BW431/26scFv
~~~~~
  XbaI
  M  S  R  G  V  H  S  Q  V  Q  L  Q  E  S  G  P  G  L  V  R  P  S
67  ATG TCT AGA GGT GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAG GAG AGC GGT CCA GGT CTT GTG AGA CCT AGC
   TAC AGA TCT CCA CAG GTG AGG GTC CAG GTT GAC GTC CTC TCG CCA GGT CCA GAA CAC TCT GGA TCG
   BW431/26scFv
~~~~~
 Q T L S L T C T V S G F T I S S G Y S W H W
133 CAG ACC CTG AGC CTG ACC TGC ACC GTG TCT GGC TTC ACC ATC AGC AGT GGT TAT AGC TGG CAC TGG
 GTC TGG GAC TCG GAC TGG ACG TGG CAC AGA CCG AAG TGG TAG TCG TCA CCA ATA TCG ACC GTG ACC
 BW431/26scFv
~~~~~
  V  R  Q  P  P  G  R  G  L  E  W  I  G  Y  I  Q  Y  S  G  I  T  N
199 GTG AGA CAG CCA CCT GGA CGA GGT CTT GAG TGG ATT GGA TAC ATA CAG TAC AGT GGT ATC ACT AAC
   CAC TCT GTC GGT GGA CCT GCT CCA GAA CTC ACC TAA CCT ATG TAT GTC ATG TCA CCA TAG TGA TTG
   BW431/26scFv
~~~~~
 Y N P S L K S R V T M L V D T S K N Q F S L
265 TAC AAC CCC TCT CTC AAA AGT AGA GTG ACA ATG CTG GTA GAC ACC AGC AAG AAC CAG TTC AGC CTG
 ATG TTG GGG AGA GAG TTT TCA TCT CAC TGT TAC GAC CAT CTG TGG TCG TTC TTG GTC AAG TCG GAC
 BW431/26scFv
~~~~~
  R  L  S  S  V  T  A  A  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  E  D  Y  D  Y

```

331 AGA CTC AGC AGC GTG ACA GCC GCC GAC ACC GCG GTC TAT TAT TGT GCA AGA GAA GAC TAT GAT TAC  
TCT GAG TCG TCG CAC TGT CGG CGG CTG TGG CGC CAG ATA ATA ACA CGT TCT CTT CTG ATA CTA ATG  
BW431/26scFv

397 H W Y F D V W G Q G T T V T V S S G G G G S  
CAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGA GGT GGT GGA TCG  
GTG ACC ATG AAG CTA CAG ACC CCG GTT CCC TGG TGC CAG TGG CAG AGG AGT CCT CCA CCA CCT AGC  
BW431/26scFv

463 G G G G S G G G G S D I Q L T Q S P S S L S  
GGC GGT GGC GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCT GAC ATC CAG CTG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC  
CCG CCA CCG CCC AGC CCA CCG CCG CCT AGA CTG TAG GTC GAC TGG GTC TCG GGT TCG TCG GAC TCG  
BW431/26scFv

529 **XhoI**  
A S V G D R V T I T C S T S S S V S Y M H W  
GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AGT ACC AGC **TCG AGT** GTA AGT TAC ATG CAC TGG  
CCG TCG CAC CCA CTG TCT CAC TGG TAG TGG ACA TCA TGG **TCG AGC TCA** CAT TCA ATG TAC GTG ACC  
BW431/26scFv

595 Y Q Q K P G K A P K L L I Y S T S N L A S G  
TAC CAG CAG AAG CCA GGT AAG GCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC AGC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGT  
ATG GTC GTC TTC GGT CCA TTC CGA GGT TTC GAC GAC TAG ATG TCG TGT AGG TTG GAC CGA AGA CCA  
BW431/26scFv

661 V P S R F S G S G S G T D F T F T I S S L Q  
GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG  
CAC GGT TCG TCT AAG TCG CCA TCG CCA TCG CCA TGG CTG AAG TGG AAG TGG TAG TCG TCG GAG GTC  
BW431/26scFv

727 P E D I A T Y Y C H Q W S S Y P T F G Q G T  
CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC TAC TGC CAT CAG TGG AGT AGT TAT CCC ACG TTC GGC CAA GGG ACC  
GGT CTC CTG TAG CCG TGG ATG ATG ACG GTA GTC ACC TCA TCA ATA GGG TGC AAG CCG GTT CCC TGG  
BW431/26scFv humanFc

793 **BamHI**  
K V E I K V D P A E P K S P D K T H T C P P  
AAG GTG GAG ATC AAA GTG **GAT CCC** GCC GAG CCC AAA TCT CCT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG  
TTC CAC CTC TAG TTT CAC **CTA GGG** CGG CTC GGG TTT AGA GGA CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC  
humanFc

859 C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T  
TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC  
ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG  
humanFc

925 L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E  
CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG  
GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT CTG GGA CTC  
humanFc

991 V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E  
GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG  
CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC  
humanFc

1057 Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G  
CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGG GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC  
GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCC CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG  
humanFc

1123 K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K  
AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA  
TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CGG GAG GGT CGG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT  
humanFc

1189 A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K  
GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG  
CCG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTA CTC GAC TGG TTC  
humanFc

N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E

1255 AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG  
 TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC ACC CTC  
 humanFc

~~~~~

1321 S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F
 AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC
 TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG
 humanFc

~~~~~

1387 F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S  
 TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC  
 AAG GAG ATG TCG TTC GAG TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG  
 humanFc

~~~~~

1453 V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K K
 GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA AAA
 CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT TTT
 CD3zeta

~~~~~

**BamHI-Fusion**

1519 D P K L C Y L L D G I L F I Y G V I L T A L  
**GAT CCC** AAA CTC TGC TAC CTG CTG GAT GGA ATC CTC TTC ATC TAT GGT GTC ATT CTC ACT GCC TTG  
**CTA GGG** TTT GAG ACG ATG GAC GAC CTA CCT TAG GAG AAG TAG ATA CCA CAG TAA GAG TGA CGG AAC  
 CD3zeta

~~~~~

1585 F L R V K F S R S A D A P A Y Q Q G Q N Q L
 TTC CTG AGA GTG AAG TTC AGC AGG AGC GCA GAC GCC CCC GCG TAC CAG CAG GGC CAG AAC CAG CTC
 AAG GAC TCT CAC TTC AAG TCG TCC TCG CGT CTG CGG GGG CGC ATG GTC GTC CCG GTC TTG GTC GAG
 CD3zeta

~~~~~

1651 Y N E L N L G R R E E Y D V L D K R R G R D  
 TAT AAC GAG CTC AAT CTA GGA CGA AGA GAG GAG TAC GAT GTT TTG GAC AAG AGA CGT GGC CGG GAC  
 ATA TTG CTC GAG TTA GAT CCT GCT TCT CTC CTC ATG CTA CAA AAC CTG TTC TCT GCA CCG GCC CTG  
 CD3zeta

~~~~~

1717 P E M G G K P R R K N P Q E G L Y N E L Q K
 CCT GAG ATG GGG GGA AAG CCG AGA AGG AAG AAC CCT CAG GAA GGC CTG TAC AAT GAA CTG CAG AAA
 GGA CTC TAC CCC CCT TTC GGC TCT TCC TTC TTG GGA GTC CTT CCG GAC ATG TTA CTT GAC GTC TTT
 CD3zeta

~~~~~

1783 D K M A E A Y S E I G M K G E R R R G K G H  
 GAT AAG ATG GCG GAG GCC TAC AGT GAG ATT GGG ATG AAA GGC GAG CGC CGG AGG GGC AAG GGG CAC  
 CTA TTC TAC CGC CTC CGG ATG TCA CTC TAA CCC TAC TTT CCG CTC GCG GCC TCC CCG TTC CCC GTG  
 CD3zeta

~~~~~

1849 D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q A
 GAT GGC CTT TAC CAG GGT CTC AGT ACA GCC ACC AAG GAC ACC TAC GAC GCC CTT CAC ATG CAG GCC
 CTA CCG GAA ATG GTC CCA GAG TCA TGT CGG TGG TTC CTG TGG ATG CTG CGG GAA GTG TAC GTC CGG
 Glycin-Linker

~~~~~

CD3zeta EGFP

~~~~~

1915 L P P R G G G G M A S K G E E L F T G V V
 CTG CCC CCT CGC GGA GGC GGA GGT GGA ATG GCG AGC AAA GGA GAA GAA CTC TTC ACT GGA GTT GTC
 GAC GGG GGA GCG CCT CCG CCT CCA CCT TAC CAC TCG TTT CCT CTT CTT GAG AAG TGA CCT CAA CAG
 EGFP

~~~~~

1981 P I L V E L D G D V N G H K F S V S G E G E  
 CCA ATT CTT GTT GAA TTA GAT GGT GAT GTT AAC GGC CAC AAG TTC TCT GTC AGT GGA GAG GGT GAA  
 GGT TAA GAA CAA CTT AAT CTA CCA CTA CAA TTG CCG GTG TTC AAG AGA CAG TCA CCT CTC CCA CTT  
 A zu C  
 (DeltaNcoI)

~~~~~

EGFP

~~~~~

2047 G D A T Y G K L T L K F I C T T G K L P V P  
 GGT GAT GCA ACA TAC GGA AAA CTT ACC CTG AAG TTC ATC TGC ACT ACT GGC AAA CTG CCT GTT CCC  
 CCA CTA CGT TGT ATG CCT TTT GAA TGG GAC TTC AAG TAG ACG TGA TGA CCG TTT GAC GGA CAA GGG  
 EGFP

~~~~~

W P T L V T T L C Y G V Q C F S R Y P D H M

```

2113 TGG CCA ACA CTA GTC ACT ACT CTG TGC TAT GGT GTT CAA TGC TTT TCA AGA TAC CCG GAT CAT ATG
ACC GGT TGT GAT CAG TGA TGA GAC ACG ATA CCA CAA GTT ACG AAA AGT TCT ATG GGC CTA GTA TAC
EGFP

~~~~~
K R H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I F F
2179 AAA CGG CAT GAC TTT TTC AAG AGT GCC ATG CCC GAA GGT TAT GTA CAG GAA AGG ACC ATC TTC TTC
TTT GCC GTA CTG AAA AAG TTC TCA CGG TAC GGG CTT CCA ATA CAT GTC CTT TCC TGG TAG AAG AAG
EGFP

~~~~~
K D D G N Y K T R A E V K F E G D T L V N R
2245 AAA GAT GAC GGC AAC TAC AAG ACA CGT GCT GAA GTC AAG TTT GAA GGT GAT ACC CTT GTT AAT AGA
TTT CTA CTG CCG TTG ATG TTC TGT GCA CGA CTT CAG TTC AAA CTT CCA CTA TGG GAA CAA TTA TCT
EGFP

~~~~~
I E L K G I D F K E D G N I L G H K L E Y N
2311 ATC GAG TTA AAA GGT ATT GAC TTC AAG GAA GAT GGC AAC ATT CTG GGA CAC AAA TTG GAA TAC AAC
TAG CTC AAT TTT CCA TAA CTG AAG TTC CTT CTA CCG TTG TAA GAC CCT GTG TTT AAC CTT ATG TTG
EGFP

~~~~~
Y N S H N V Y I M A D K Q K N G I K V N F K
2377 TAT AAC TCA CAC AAT GTA TAC ATC ATG GCA GAC AAA CAA AAG AAT GGA ATC AAA GTG AAC TTC AAG
ATA TTG AGT GTG TTA CAT ATG TAG TAC CGT CTG TTT GTT TTC TTA CCT TAG TTT CAC TTG AAG TTC
EGFP

~~~~~
T R H N I E D G S V Q L A D H Y Q Q N T P I
2443 ACC CGC CAC AAC ATT GAA GAT GGA AGC GTT CAA CTA GCA GAC CAT TAT CAA CAA AAT ACT CCA ATT
TGG GCG GTG TTG TAA CTT CTA CCT TCG CAA GTT GAT CGT CTG GTA ATA GTT GTT TTA TGA GGT TAA
EGFP

~~~~~
G D G P V L L P D N H Y L S T Q S A L S K D
2509 GGC GAT GGC CCT GTC CTT TTA CCA GAC AAC CAT TAC CTG TCC ACA CAA TCT GCC CTT TCG AAA GAT
CCG CTA CCG GGA CAG GAA AAT GGT CTG TTG GTA ATG GAC AGG TGT GTT AGA CGG GAA AGC TTT CTA
EGFP

~~~~~
P N E K R D H M V L L E F V T A A G I T H G
2575 CCC AAC GAA AAG AGA GAC CAC ATG GTC CTT CTT GAG TTT GTA ACA GCT GCT GGG ATT ACA CAT GGC
GGG TTG CTT TTC TCT CTG GTG TAC CAG GAA GAA CTC AAA CAT TGT CGA CGA CCC TAA TGT GTA CCG
EGFP

~~~~~
M D E L Y N *
2641 ATG GAT GAA CTG TAC AAC TGA GTC GAC CTC GAG
TAC CTA CTT GAC ATG TTG ACT CAG CTG GAG CTC

```

XhoI

5.2.2 #916: pBullet-L_K-BW431/26scFv-Fc-CD4TM/zetaI_Z-eGFP

```

Lk
~~~~~
XbaI NcoI
1 CTC TAG ACT GCC ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT TTC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GCC TCA GTC ATA
GAG ATC TGA CGG TAC CTA AAA GTC CAC GTC TAA AAG TCG AAG GAC GAT TAG TCA CGG AGT CAG TAT
Lk BW431/26scFv
~~~~~
XbaI
67 M S R G V H S Q V Q L Q E S G P G L V R P S
ATG TCT AGA GGT GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAG GAG AGC GGT CCA GGT CTT GTG AGA CCT AGC
TAC AGA TCT CCA CAG GTG AGG GTC CAG GTT GAC GTC CTC TCG CCA GGT CCA GAA CAC TCT GGA TCG
BW431/26scFv
~~~~~
133 Q T L S L T C T V S G F T I S S G Y S W H W
CAG ACC CTG AGC CTG ACC TGC ACC GTG TCT GGC TTC ACC ATC AGC AGT GGT TAT AGC TGG CAC TGG
GTC TGG GAC TCG GAC TGG ACG TGG CAC AGA CCG AAG TGG TAG TCG TCA CCA ATA TCG ACC GTG ACC
BW431/26scFv
~~~~~
V R Q P P G R G L E W I G Y I Q Y S G I T N

```

199 GTG AGA CAG CCA CCT GGA CGA GGT CTT GAG TGG ATT GGA TAC ATA CAG TAC AGT GGT ATC ACT AAC
CAC TCT GTC GGT GGA CCT GCT CCA GAA CTC ACC TAA CCT ATG TAT GTC ATG TCA CCA TAG TGA TTG
BW431/26scFv

265 Y N P S L K S R V T M L V D T S K N Q F S L
TAC AAC CCC TCT CTC AAA AGT AGA GTG ACA ATG CTG GTA GAC ACC AGC AAG AAC CAG TTC AGC CTG
ATG TTG GGG AGA GAG TTT TCA TCT CAC TGT TAC GAC CAT CTG TGG TCG TTC TTG GTC AAG TCG GAC
BW431/26scFv

331 R L S S V T A A D T A V Y Y C A R E D Y D Y
AGA CTC AGC AGC GTG ACA GCC GCC GAC ACC GCG GTC TAT TAT TGT GCA AGA GAA GAC TAT GAT TAC
TCT GAG TCG TCG CAC TGT CGG CGG CTG TGG CGC CAG ATA ATA ACA CGT TCT CTT CTG ATA CTA ATG
BW431/26scFv

397 H W Y F D V W G Q G T T V T V S S G G G S
CAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGA GGT GGT GGA TCG
GTG ACC ATG AAG CTA CAG ACC CCG GTT CCC TGG TGC CAG TGG CAG AGG AGT CCT CCA CCA CCT AGC
BW431/26scFv

463 G G G G S G G G G S D I Q L T Q S P S S L S
GGC GGT GGC GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCT GAC ATC CAG CTG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC
CCG CCA CCG CCC AGC CCA CCG CCG CCT AGA CTG TAG GTC GAC TGG GTC TCG GGT TCG TCG GAC TCG
BW431/26scFv

XhoI

529 A S V G D R V T I T C S T S S S V S Y M H W
GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AGT ACC AGC **TCG AGT** GTA AGT TAC ATG CAC TGG
CGG TCG CAC CCA CTG TCT CAC TGG TAG TGG ACA TCA TGG **TCG AGC TCA** CAT TCA ATG TAC GTG ACC
BW431/26scFv

595 Y Q Q K P G K A P K L L I Y S T S N L A S G
TAC CAG CAG AAG CCA GGT AAG GCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC AGC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGT
ATG GTC GTC TTC GGT CCA TTC CGA GGT TTC GAC GAC TAG ATG TCG TGT AGG TTG GAC CGA AGA CCA
BW431/26scFv

661 V P S R F S G S G S G T D F T F T I S S L Q
GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG
CAC GGT TCG TCT AAG TCG CCA TCG CCA TCG CCA TGG CTG AAG TGG AAG TGG TAG TCG TCG GAG GTC
BW431/26scFv

727 P E D I A T Y Y C H Q W S S Y P T F G Q G T
CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC TAC TGC CAT CAG TGG AGT AGT TAT CCC ACG TTC GGC CAA GGG ACC
GGT CTC CTG TAG CGG TGG ATG ATG ACG GTA GTC ACC TCA TCA ATA GGG TGC AAG CCG GTT CCC TGG
BW431/26scFv humanFc

BamHI

793 K V E I K V D P A E P K S P D K T H T C P P
AAG GTG GAG ATC AAA **GTG GAT CCC** GCC GAG CCC AAA TCT CCT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG
TTC CAC CTC TAG TTT **CAC CTA GGG** CGG CTC GGG TTT AGA GGA CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC
humanFc

859 C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T
TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC
ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG
humanFc

925 L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E
CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG
GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT CTG GGA CTC
humanFc

991 V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E
GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG
CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC
humanFc

1057 Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G
CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGG GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC
GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCC CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG
humanFc

K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K

1123 AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA
TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CGG GAG GGT CGG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT
humanFc

1189 A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K
GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG
CGG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTA CTC GAC TGG TTC
humanFc

1255 N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E
AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG
TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC ACC CTC
humanFc

1321 S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F
AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC
TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG
humanFc

1387 F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S
TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC
AAG GAG ATG TCG TTC GAG TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG
humanFc

1453 V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K K
GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA AAA
CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT TTT
CD4TM

BamHI-Fusion

1519 D P Q P M A L I V L G G V A G L L L F I G L
GAT CCT CAG CCA ATG GCC CTG ATT GTG CTG GGG GGC GTC GCC GGC CTC CTG CTT TTC ATT GGG CTA
CTA GGA GTC GGT TAC CGG GAC TAA CAC GAC CCC CCG CAG CGG CCG GAG GAC GAA AAG TAA CCC GAT
CD3zetaIZ

CD4TM

1585 G I F F C V R L R V K F S R S A D A P A Y Q
GGC ATC TTC TTC TGT GTC AGG CTG AGA GTG AAG TTC AGC AGG AGC GCA GAC GCC CCC GCG TAC CAG
CCG TAG AAG AAG ACA CAG TCC GAC TCT CAC TTC AAG TCG TCC TCG CGT CTG CGG GGG CGC ATG GTC
CD3zetaIZ

1651 Q G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L D
CAG GGC CAG AAC CAG CTC TAT AAC GAG CTC AAT CTA GGA CGA AGA GAG GAG TAC GAT GTT TTG GAC
GTC CCG GTC TTG GTC GAG ATA TTG CTC GAG TTA GAT CCT GCT TCT CTC CTC ATG CTA CAA AAC CTG
CD3zetaIZ

1717 K R R G R D P E M G G K P R R K N P Q E G L
AAG AGA CGT GGC CGG GAC CCT GAG ATG GGG GGA AAG CCG AGA AGG AAG AAC CCT CAG GAA GGC CTG
TTC TCT GCA CCG GCC CTG GGA CTC TAC CCC CCT TTC GGC TCT TCC TTC TTG GGA GTC CTT CCG GAC
CD3zetaIZ

1783 Y N E L Q K D K M A E A Y S E I G M K G E R
TAC AAT GAA CTG CAG AAA GAT AAG ATG GCG GAG GCC TAC AGT GAG ATT GGG ATG AAA GGC GAG CGC
ATG TTA CTT GAC GTC TTT CTA TTC TAC CCG CTC CGG ATG TCA CTC TAA CCC TAC TTT CCG CTC GCG
CD3zetaIZ

1849 R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D
CGG AGG GGC AAG GGG CAC GAT GGC CTT TAC CAG GGT CTC AGT ACA GCC ACC AAG GAC ACC TAC GAC
GCC TCC CCG TTC CCC GTG CTA CCG GAA ATG GTC CCA GAG TCA TGT CGG TGG TTC CTG TGG ATG CTG
Glycin-Linker

CD3zetaIZ

EGFP

1915 A L H M Q A L P P R G G G G G M V S K G E E
GCC CTT CAC ATG CAG GCC CTG CCC CCT CGC GGA GGC GGA GGT GGA ATG GTG AGC AAA GGA GAA GAA
CGG GAA GTG TAC GTC CGG GAC GGG GGA GCG CCT CCG CCT CCA CCT TAC CAC TCG TTT CCT CTT CTT
EGFP

1981 L F T G V V P I L V E L D G D V N G H K F S
CTC TTC ACT GGA GTT GTC CCA ATT CTT GTT GAA TTA GAT GGT GAT GTT AAC GGC CAC AAG TTC TCT

```

GAG AAG TGA CCT CAA CAG GGT TAA GAA CAA CTT AAT CTA CCA CTA CAA TTG CCG GTG TTC AAG AGA

EGFP
~~~~~
V S G E G E G D A T Y G K L T L K F I C T T
2047 GTC AGT GGA GAG GGT GAA GGT GAT GCA ACA TAC GGA AAA CTT ACC CTG AAG TTC ATC TGC ACT ACT
CAG TCA CCT CTC CCA CTT CCA CTA CGT TGT ATG CCT TTT GAA TGG GAC TTC AAG TAG ACG TGA TGA

A zu C (DeltaNcoI)
~

EGFP
~~~~~
G K L P V P W P T L V T T L C Y G V Q C F S
2113 GGC AAA CTG CCT GTT CCC TGG CCA ACA CTA GTC ACT ACT CTG TGC TAT GGT GTT CAA TGC TTT TCA
CCG TTT GAC GGA CAA GGG ACC GGT TGT GAT CAG TGA TGA GAC ACG ATA CCA CAA GTT ACG AAA AGT

EGFP
~~~~~
R Y P D H M K R H D F F K S A M P E G Y V Q
2179 AGA TAC CCG GAT CAT ATG AAA CGG CAT GAC TTT TTC AAG AGT GCC ATG CCC GAA GGT TAT GTA CAG
TCT ATG GGC CTA GTA TAC TTT GCC GTA CTG AAA AAG TTC TCA CGG TAC GGG CTT CCA ATA CAT GTC

EGFP
~~~~~
E R T I F F K D D G N Y K T R A E V K F E G
2245 GAA AGG ACC ATC TTC TTC AAA GAT GAC GGC AAC TAC AAG ACA CGT GCT GAA GTC AAG TTT GAA GGT
CTT TCC TGG TAG AAG AAG TTT CTA CTG CCG TTG ATG TTC TGT GCA CGA CTT CAG TTC AAA CTT CCA

EGFP
~~~~~
D T L V N R I E L K G I D F K E D G N I L G
2311 GAT ACC CTT GTT AAT AGA ATC GAG TTA AAA GGT ATT GAC TTC AAG GAA GAT GGC AAC ATT CTG GGA
CTA TGG GAA CAA TTA TCT TAG CTC AAT TTT CCA TAA CTG AAG TTC CTT CTA CCG TTG TAA GAC CCT

EGFP
~~~~~
H K L E Y N Y N S H N V Y I M A D K Q K N G
2377 CAC AAA TTG GAA TAC AAC TAT AAC TCA CAC AAT GTA TAC ATC ATG GCA GAC AAA CAA AAG AAT GGA
GTG TTT AAC CTT ATG TTG ATA TTG AGT GTG TTA CAT ATG TAG TAC CGT CTG TTT GTT TTC TTA CCT

EGFP
~~~~~
I K V N F K T R H N I E D G S V Q L A D H Y
2443 ATC AAA GTG AAC TTC AAG ACC CGC CAC AAC ATT GAA GAT GGA AGC GTT CAA CTA GCA GAC CAT AT
TAG TTT CAC TTG AAG TTC TGG GCG GTG TTG TAA CTT CTA CCT TCG CAA GTT GAT CGT CTG GTA ATA

EGFP
~~~~~
Q Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S T Q
2509 CAA CAA AAT ACT CCA ATT GGC GAT GGC CCT GTC CTT TTA CCA GAC AAC CAT TAC CTG TCC ACA CAA
GTT GTT TTA TGA GGT TAA CCG CTA CCG GGA CAG GAA AAT GGT CTG TTG GTA ATG GAC AGG TGT GTT

EGFP
~~~~~
S A L S K D P N E K R D H M V L L E F V T A
2575 TCT GCC CTT TCG AAA GAT CCC AAC GAA AAG AGA GAC CAC ATG GTC CTT CTT GAG TTT GTA ACA GCT
AGA CGG GAA AGC TTT CTA GGG TTG CTT TTC TCT CTG GTG TAC CAG GAA GAA CTC AAA CAT TGT CGA

EGFP
~~~~~
A G I T H G M D E L Y N *
2641 GCT GGG ATT ACA CAT GGC ATG GAT GAA CTG TAC AAC TGA GTC GAC CTC GAG
CGA CCC TAA TGT GTA CCG TAC CTA CTT GAC ATG TTG ACT CAG CTG GAG CTC

Sall XhoI

```

5.3 DNA- und Aminosäuresequenz der bicistronischen SIN-Vektoren für GFP-IRES-Neo (#991) und mL-12-IRES-Neo (#1018)

Dargestellt ist die DNA-Sequenz der bicistronischen und Expressionsvektoren pQCXIN-eGFP (#991) und pQCXIN-mIL-12 (#1018). Oberhalb der DNA-Sequenz in Triplets ist die Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode angegeben. Das Stop-Codon ist mit [*] gekennzeichnet. Restriktionsschnittstellen, die der Klonierung oder Restriktionsanalyse dienen sind durch Fettdruck gekennzeichnet. Zusätzlich sind die kodierenden Domänen und IRES angegeben [~~].

5.3.1 #991: pQCXIN-eGFP

```

                                     eGFP
~~~~~

BamHI  NcoI
1      M  V  S  K  G  E  E  L  F  T  G  V  V  P  I  L  V  E  L  D
GGA TCC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC GGG GTG GTG CCC ATC CTG GTC GAG CTG GAC
CCT AGG TAC CAC TCG TTC CCG CTC CTC GAC AAG TGG CCC CAC CAC GGG TAG GAC CAG CTC GAC CTG
                                     eGFP
~~~~~
67     G  D  V  N  G  H  K  F  S  V  S  G  E  G  E  G  D  A  T  Y  G  K
GGC GAC GTA AAC GGC CAC AAG TTC AGC GTG TCC GGC GAG GGC GAG GGC GAT GCC ACC TAC GGC AAG
CCG CTG CAT TTG CCG GTG TTC AAG TCG CAC AGG CCG CTC CCG CTC CCG CTA CGG TGG ATG CCG TTC
                                     eGFP
~~~~~
133    L  T  L  K  F  I  C  T  T  G  K  L  P  V  P  W  P  T  L  V  T  T
CTG ACC CTG AAG TTC ATC TGC ACC ACC GGC AAG CTG CCC GTG CCC TGG CCC ACC CTC GTG ACC ACC
GAC TGG GAC TTC AAG TAG ACG TGG TGG CCG TTC GAC GGG CAC GGG ACC GGG TGG GAG CAC TGG TGG
                                     eGFP
~~~~~
199    L  T  Y  G  V  Q  C  F  S  R  Y  P  D  H  M  K  Q  H  D  F  F  K
CTG ACC TAC GGC GTG CAG TGC TTC AGC CGC TAC CCC GAC CAC ATG AAG CAG CAC GAC TTC TTC AAG
GAC TGG ATG CCG CAC GTC ACG AAG TCG GCG ATG GGG CTG GTG TAC TTC GTC GTG CTG AAG AAG TTC
                                     eGFP
~~~~~
265    S  A  M  P  E  G  Y  V  Q  E  R  T  I  F  F  K  D  D  G  N  Y  K
TCC GCC ATG CCC GAA GGC TAC GTC CAG GAG CGC ACC ATC TTC TTC AAG GAC GAC GGC AAC TAC AAG
AGG CCG TAC GGG CTT CCG ATG CAG GTC CTC GCG TGG TAG AAG AAG TTC CTG CTG CCG TTG ATG TTC
                                     eGFP
~~~~~
331    T  R  A  E  V  K  F  E  G  D  T  L  V  N  R  I  E  L  K  G  I  D
ACC CGC GCC GAG GTG AAG TTC GAG GGC GAC ACC CTG GTG AAC CGC ATC GAG CTG AAG GGC ATC GAC
TGG GCG CGG CTC CAC TTC AAG CTC CCG CTG TGG GAC CAC TTG GCG TAG CTC GAC TTC CCG TAG CTG
                                     eGFP
~~~~~
397    F  K  E  D  G  N  I  L  G  H  K  L  E  Y  N  Y  N  S  H  N  V  Y
TTC AAG GAG GAC GGC AAC ATC CTG GGG CAC AAG CTG GAG TAC AAC TAC AAC AGC CAC AAC GTC TAT
AAG TTC CTC CTG CCG TTG TAG GAC CCC GTG TTC GAC CTC ATG TTG ATG TTG TCG GTG TTG CAG ATA
                                     eGFP
~~~~~
463    I  M  A  D  K  Q  K  N  G  I  K  V  N  F  K  I  R  H  N  I  E  D
ATC ATG GCC GAC AAG CAG AAG AAC GGC ATC AAG GTG AAC TTC AAG ATC CGC CAC AAC ATC GAG GAC
TAG TAC CGG CTG TTC GTC TTC TTG CCG TAG TTC CAC TTG AAG TTC TAG GCG GTG TTG TAG CTC CTG
                                     eGFP
~~~~~
529    G  S  V  Q  L  A  D  H  Y  Q  Q  N  T  P  I  G  D  G  P  V  L  L
GGC AGC GTG CAG CTC GCC GAC CAC TAC CAG CAG AAC ACC CCC ATC GGC GAC GGC CCC GTG CTG CTG
CCG TCG CAC GTC GAG CCG CTG GTG ATG GTC GTC TTG TGG GGG TAG CCG CTG CCG GGG CAC GAC GAC
                                     eGFP
~~~~~
595    P  D  N  H  Y  L  S  T  Q  S  A  L  S  K  D  P  N  E  K  R  D  H
CCC GAC AAC CAC TAC CTG AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC AAA GAC CCC AAC GAG AAG CGC GAT CAC
GGG CTG TTG GTG ATG GAC TCG TGG GTC AGG CCG GAC TCG TTT CTG GGG TTG CTC TTC GCG CTA GTG
                                     eGFP
~~~~~
661    M  V  L  L  E  F  V  T  A  A  G  I  T  L  G  M  D  E  L  Y  K  *
ATG GTC CTG CTG GAG TTC GTG ACC GCC GCC GGG ATC ACT CTC GGC ATG GAC GAG CTG TAC AAG TAA
TAC CAG GAC GAC CTC AAG CAC TGG CCG CGG CCC TAG TGA GAG CCG TAC CTG CTC GAC ATG TTC ATT
                                     IRES
~~~~~

EcoRI
727    GAA TTC CGC CCC TCT CCC TCC CCC CCC CCT AAC GTT ACT GGC CGA AGC CGC TTG GAA TAA GGC CGG
CTT AAG GCG GGG AGA GGG AGG GGG GGG GGA TTG CAA TGA CCG GCT TCG GCG AAC CTT ATT CCG GCC
                                     IRES
~~~~~
793    TGT GCG TTT GTC TAT ATG TTA TTT TCC ACC ATA TTG CCG TCT TTT GGC AAT GTG AGG GCC CGG AAA
ACA CGC AAA CAG ATA TAC AAT AAA AGG TGG TAT AAC GGC AGA AAA CCG TTA CAC TCC CGG GCC TTT

```



```

IRES
~~~~~
859 CCT GGC CCT GTC TTC TTG ACG AGC ATT CCT AGG GGT CTT TCC CCT CTC GCC AAA GGA ATG CAA GGT
GGA CCG GGA CAG AAG AAC TGC TCG TAA GGA TCC CCA GAA AGG GGA GAG CGG TTT CCT TAC GTT CCA
IRES
~~~~~
HindIII
925 CTG TTG AAT GTC GTG AAG GAA GCA GTT CCT CTG GAA GCT TCT TGA AGA CAA ACA ACG TCT GTA GCG
GAC AAC TTA CAG CAC TTC CTT CGT CAA GGA GAC CTT CGA AGA ACT TCT GTT TGT TGC AGA CAT CGC
IRES
~~~~~
991 ACC CTT TGC AGG CAG CGG AAC CCC CCA CCT GGC GAC AGG TGC CTC TGC GGC CAA AAG CCA CGT GTA
TGG GAA ACG TCC GTC GCC TTG GGG GGT GGA CCG CTG TCC ACG GAG ACG CCG GTT TTC GGT GCA CAT
IRES
~~~~~
1057 TAA GAT ACA CCT GCA AAG GCG GCA CAA CCC CAG TGC CAC GTT GTG AGT TGG ATA GTT GTG GAA AGA
ATT CTA TGT GGA CGT TTC CGC CGT GTT GGG GTC ACG GTG CAA CAC TCA ACC TAT CAA CAC CTT TCT
IRES
~~~~~
1123 GTC AAA TGG CTC TCC TCA AGC GTA TTC AAC AAG GGG CTG AAG GAT GCC CAG AAG GTA CCC CAT TGT
CAG TTT ACC GAG AGG AGT TCG CAT AAG TTG TTC CCC GAC TTC CTA CGG GTC TTC CAT GGG GTA ACA
IRES
~~~~~
1189 ATG GGA TCT GAT CTG GGG CCT CGG TGC ACA TGC TTT ACA TGT GTT TAG TCG AGG TTA AAA AAC GTC
TAC CCT AGA CTA GAC CCC GGA GCC ACG TGT ACG AAA TGT ACA CAA ATC AGC TCC AAT TTT TTG CAG
IRES
~~~~~
HindIII
1255 TAG GCC CCC CGA ACC ACG GGG ACG TGG TTT TCC TTT GAA AAA CAC GAT GAT AAG CTT GCC ACA ACC
ATC CGG GGG GCT TGG TGC CCC TGC ACC AAA AGG AAA CTT TTT GTG CTA CTA TTC GAA CGG TGT TGG
Neo
~~~~~
NcoI
M A E Q D G L H A G S P A A W V E R L F G Y
1321 ATG GCT GAA CAA GAT GGA TTG CAC GCA GGT TCT CCG GCC GCT TGG GTG GAG AGG CTA TTC GGC TAT
TAC CGA CTT GTT CTA CCT AAC GTG CGT CCA AGA GGC CGG CGA ACC CAC CTC TCC GAT AAG CCG ATA
Neo
~~~~~
D W A Q Q T I G C S D A A V F R L S A Q G R
1387 GAC TGG GCA CAA CAG ACA ATC GGC TGC TCT GAT GCC GCC GTG TTC CGG CTG TCA GCG CAG GGG CGC
CTG ACC CGT GTT GTC TGT TAG CCG ACG AGA CTA CGG CGG CAC AAG GCC GAC AGT CGC GTC CCC GCG
Neo
~~~~~
P V L F V K T D L S G A L N E L Q D E A A R
1453 CCG GTT CTT TTT GTC AAG ACC GAC CTG TCC GGT GCC CTG AAT GAA CTG CAG GAC GAG GCA GCG CGG
GGC CAA GAA AAA CAG TTC TGG CTG GAC AGG CCA CGG GAC TTA CTT GAC GTC CTG CTC CGT CGC GCC
Neo
~~~~~
L S W L A T T G V P C A A V L D V V T E A G
1519 CTA TCG TGG CTG GCC ACG ACG GGC GTT CCT TGC GCA GCT GTG CTC GAC GTT GTC ACT GAA GCG GGA
GAT AGC ACC GAC CGG TGC TGC CCG CAA GGA ACG CGT CGA CAC GAG CTG CAA CAG TGA CTT CGC CCT
Neo
~~~~~
R D W L L L G E V P G Q D L L S S H L A P A
1585 AGG GAC TGG CTG CTA TTG GGC GAA GTG CCG GGG CAG GAT CTC CTG TCA TCT CAC CTT GCT CCT GCC
TCC CTG ACC GAC GAT AAC CCG CTT CAC GGC CCC GTC CTA GAG GAC AGT AGA GTG GAA CGA GGA CGG
Neo
~~~~~
E K V S I M A D A M R R L H T L D P A T C P
1651 GAG AAA GTA TCC ATC ATG GCT GAT GCA ATG CCG CGG CTG CAT ACG CTT GAT CCG GCT ACC TGC CCA
CTC TTT CAT AGG TAG TAC CGA CTA CGT TAC GCC GCC GAC GTA TGC GAA CTA GGC CGA TGG ACG GGT
Neo
~~~~~
F D H Q A K H R I E R A R T R M E A G L V D
1717 TTC GAC CAC CAA GCG AAA CAT CGC ATC GAG CGA GCA CGT ACT CGG ATG GAA GCC GGT CTT GTC GAT
AAG CTG GTG GTT CGC TTT GTA GCG TAG CTC GCT CGT GCA TGA GCC TAC CTT CGG CCA GAA CAG CTA
Neo
~~~~~
Q D D L D E E H Q G L A P A E L F A R L K A
1783 CAG GAT GAT CTG GAC GAA GAG CAT CAG GGG CTC GCG CCA GCC GAA CTG TTC GCC AGG CTC AAG GCG
GTC CTA CTA GAC CTG CTT CTC GTA GTC CCC GAG CGC GGT CGG CTT GAC AAG CGG TCC GAG TTC CGC

```

Neo

~~~~~

**NcoI**

1849 R M P D G E D L V V T H G D A C L P N I M V  
CGC ATG CCC GAC GGC GAG GAT CTC GTC GTG ACC **CAT GGC** GAT GCC TGC TTG CCG AAT ATC ATG GTG  
CGC TAC GGG CTG CCG CTC CTA GAG CAG CAC **TGG GTA CCG** CTA CGG ACG AAC GGC TTA TAG TAC CAC  
Neo

~~~~~

1915 E N G R F S G F I D C G R L G V A D R Y Q D
GAA AAT GGC CGC TTT TCT GGA TTC ATC GAC TGT GGC CGG CTG GGT GTG GCG GAC CGC TAT CAG GAC
CTT TTA CCG GCG AAA AGA CCT AAG TAG CTG ACA CCG GCC GAC CCA CAC CGC CTG GCG ATA GTC CTG
Neo

~~~~~

1981 I A L A T R D I A E E L G G E W A D R F L V  
ATA GCG TTG GCT ACC CGT GAT ATT GCT GAA GAG CTT GGC GGC GAA TGG GCT GAC CGC TTC CTC GTG  
TAT CGC AAC CGA TGG GCA CTA TAA CGA CTT CTC GAA CCG CCG CTT ACC CGA CTG GCG AAG GAG CAC  
Neo

~~~~~

2047 L Y G I A A P D S Q R I A F Y R L L D E F F
CTT TAC GGT ATC GCC GCT CCC GAT TCG CAG CGC ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC GAG TTC TTC
GAA ATG CCA TAG CGG CGA GGG CTA AGC GTC GCG TAG CGG AAG ATA GCG GAA GAA CTG CTC AAG AAG
Neo

~~~~~

2113 \*  
TGA  
ACT

### 5.3.2 #1018: pQCXIN-mIL-12

mIL-12

~~~~~

BamHI NcoI

1 M G P Q K L T I S W F A I V L L V S P L
GGA TCC ATG GGT CCT CAG AAG CTA ACC ATC TCC TGG TTT GCC ATC GTT TTG CTG GTG TCT CCA CTC
CCT AGG TAC CCA GGA GTC TTC GAT TGG TAG AGG ACC AAA CGG TAG CAA AAC GAC CAC AGA GGT GAG
mIL-12

~~~~~

67 M A M W E L E K D V Y V V E V D W T P D A P  
ATG GCC ATG TGG GAG CTG GAG AAA GAC GTT TAT GTT GTA GAG GTG GAC TGG ACT CCC GAT GCC CCT  
TAC CGG TAC ACC CTC GAC CTC TTT CTG CAA ATA CAA CAT CTC CAC CTG ACC TGA GGG CTA CGG GGA  
mIL-12

~~~~~

133 G E T V N L T C D T P E E D D I T W T S D Q
GGA GAA ACA GTG AAC CTC ACC TGT GAC ACG CCT GAA GAA GAT GAC ATC ACC TGG ACC TCA GAC CAG
CCT CTT TGT CAC TTG GAG TGG ACA CTG TGC GGA CTT CTT CTA CTG TAG TGG ACC TGG AGT CTG GTC
mIL-12

~~~~~

**XbaI**

199 R H G V I G S G K T L T I T V K E F L D A G  
AGA CAT GGA GTC ATA GGC TCT GGA AAG ACC CTG ACC ATC ACT GTC AAA GAG **TTT CTA GAT** GCT GGC  
TCT GTA CCT CAG TAT CCG AGA CCT TTC TGG GAC TGG TAG TGA CAG TTT CTC **AAA GAT CTA** CGA CCG  
mIL-12

~~~~~

265 Q Y T C H K G G E T L S H S H L L L H K K E
CAG TAC ACC TGC CAC AAA GGA GGC GAG ACT CTG AGC CAC TCA CAT CTG CTG CTC CAC AAG AAG GAA
GTC ATG TGG ACG GTG TTT CCT CCG CTC TGA GAC TCG GTG AGT GTA GAC GAC GAG GTG TTC TTC CTT
mIL-12

~~~~~

331 N G I W S T E I L K N F K N K T F L K C E A  
AAT GGA ATT TGG TCC ACT GAA ATT TTA AAA AAT TTC AAA AAC AAG ACT TTC CTG AAG TGT GAA GCA  
TTA CCT TAA ACC AGG TGA CTT TAA AAT TTT TTA AAG TTT TTG TTC TGA AAG GAC TTC ACA CTT CGT  
mIL-12

~~~~~

397 P N Y S G R F T C S W L V Q R N M D L K F N
CCA AAT TAC TCC GGA CGG TTC ACG TGC TCA TGG CTG GTG CAA AGA AAC ATG GAC TTG AAG TTC AAC
GGT TTA ATG AGG CCT GCC AAG TGC ACG AGT ACC GAC CAC GTT TCT TTG TAC CTG AAC TTC AAG TTG

mIL-12

~~~~~

463 I K S S S S P P D S R A V T C G M A S L S A  
 ATC AAG AGC AGT AGC AGT CCC CCC GAC TCT CGG GCA GTG ACA TGT GGA ATG GCG TCT CTG TCT GCA  
 TAG TTC TCG TCA TCG TCA GGG GGG CTG AGA GCC CGT CAC TGT ACA CCT TAC CGC AGA GAC AGA CGT

mIL-12

~~~~~

529 E K V T L D Q R D Y E K Y S V S C X E D V T
 GAG AAG GTC ACA CTG GAC CAA AGG GAC TAT GAG AAG TAT TCA GTG TCC TGC CNG GAG GAT GTC ACC
 CTC TTC CAG TGT GAC CTG GTT TCC CTG ATA CTC TTC ATA AGT CAC AGG ACG GNC CTC CTA CAG TGG

mIL-12

~~~~~

595 C P T A E E T L P I E L A L E A R Q Q N K Y  
 TGC CCA ACT GCC GAG GAG ACC CTG CCC ATT GAA CTG GCG TTG GAA GCA CGG CAG CAG AAT AAA TAT  
 ACG GGT TGA CGG CTC CTC TGG GAC GGG TAA CTT GAC CGC AAC CTT CGT GCC GTC GTC TTA TTT ATA

mIL-12

~~~~~

661 E N Y S T S F F I R D I I K P D P P K N L Q
 GAG AAC TAC AGC ACC AGC TTC TTC ATC AGG GAC ATC ATC AAA CCA GAC CCG CCC AAG AAC TTG CAG
 CTC TTG ATG TCG TGG TCG AAG AAG TAG TCC CTG TAG TAG TTT GGT CTG GGC GGG TTC TTG AAC GTC

mIL-12

~~~~~

727 M K P L K N S Q V E V S W E Y P D S W S T P  
 ATG AAG CCT TTG AAG AAC TCA CAG GTG GAG GTC AGC TGG GAG TAC CCT GAC TCC TGG AGC ACT CCC  
 TAC TTC GGA AAC TTC TTG AGT GTC CAC CTC CAG TCG ACC CTC ATG GGA CTG AGG ACC TCG TGA GGG

mIL-12

~~~~~

793 H S Y F S L K F F V R I Q R K K E K M K E T
 CAT TCC TAC TTC TCC CTC AAG TTC TTT GTT CGA ATC CAG CGC AAG AAA GAA AAG ATG AAG GAG ACA
 GTA AGG ATG AAG AGG GAG TTC AAG AAA CAA GCT TAG GTC GCG TTC TTT CTT TTC TAC TTC CTC TGT

mIL-12

~~~~~

859 E E G C N Q K G A F L V E K T S T E V Q C K  
 GAG GAG GGG TGT AAC CAG AAA GGT GCG TTC CTC GTA GAG AAG ACA TCT ACC GAA GTC CAA TGC AAA  
 CTC CTC CCC ACA TTG GTC TTT CCA CGC AAG GAG CAT CTC TTC TGT AGA TGG CTT CAG GTT ACG TTT

mIL-12

~~~~~

925 G G N V C V Q A Q D R Y Y N S S C S K W A C
 GGC GGG AAT GTC TGC GTG CAA GCT CAG GAT CGC TAT TAC AAT TCC TCA TGC AGC AAG TGG GCA TGT
 CCG CCC TTA CAG ACG CAC GTT CGA GTC CTA GCG ATA ATG TTA AGG AGT ACG TCG TTC ACC CGT ACA

mIL-12

~~~~~

991 V P C R V R S G G G G S G G G S G G G S  
 GTT CCC TGC AGG GTC CGA TCC GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT GGT GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCT  
 CAA GGG ACG TCC CAG GCT AGG CCA CCG CCA CCG AGC CCG CCA CCA CCC AGC CCA CCG CCG CCT AGA

mIL-12

~~~~~

1057 R V I P V S G P A R C L S Q S R N L L K T T
 AGG GTC ATT CCA GTC TCT GGA CCT GCC AGG TGT CTT AGC CAG TCC CGA AAC CTG CTG AAG ACC ACA
 TCC CAG TAA GGT CAG AGA CCT GGA CGG TCC ACA GAA TCG GTC AGG GCT TTG GAC GAC TTC TGG TGT

mIL-12

~~~~~

1123 D D M V K T A R E K L K H Y S C T A E D I D  
 GAT GAC ATG GTG AAG ACG GCC AGA GAA AAG CTG AAA CAT TAT TCC TGC ACT GCT GAA GAC ATC GAT  
 CTA CTG TAC CAC TTC TGC CGG TCT CTT TTC GAC TTT GTA ATA AGG ACG TGA CGA CTT CTG TAG CTA

mIL-12

~~~~~

1189 H E D I T R D Q T S T L K T C L P L E L H K
 CAT GAA GAC ATC ACA CGG GAC CAA ACC AGC ACA TTG AAG ACC TGT TTA CCA CTG GAA CTA CAC AAG
 GTA CTT CTG TAG TGT GCC CTG GTT TGG TCG TGT AAC TTC TGG ACA AAT GGT GAC CTT GAT GTG TTC

mIL-12

~~~~~

1255 N E S C L A T R E T S S T T R G S C L P P Q  
 AAC GAG AGT TGC CTG GCT ACT AGA GAG ACT TCT TCC ACA ACA AGA GGG AGC TGC CTG CCC CCA CAG  
 TTG CTC TCA ACG GAC CGA TGA TCT CTC TGA AGA AGG TGT TGT TCT CCC TCG ACG GAC GGG GGT GTC

mIL-12

~~~~~

1321 K T S L M M T L C L G S I Y E D L K M Y Q T
 AAG ACG TCT TTG ATG ATG ACC CTG TGC CTT GGT AGC ATC TAT GAG GAC TTG AAG ATG TAC CAG ACA
 TTC TGC AGA AAC TAC TAC TGG GAC ACG GAA CCA TCG TAG ATA CTC CTG AAC TTC TAC ATG GTC TGT

mIL-12

~~~~~

**XbaI**

1387 E F Q A I N A A L Q N H N H Q Q I L D K G  
GAG TTC CAG GCC ATC AAC GCA GCA CTT CAG AAT CAC AAC CAT CAG CAG ATC AT**T CTA GAC** AAG GGC  
CTC AAG GTC CGG TAG TTG CGT CGT GAA GTC TTA GTG TTG GTA GTC GTC TAG TAA **GAT CTG** TTC CCG

mIL-12

~~~~~

1453 M L V A I D E L M Q S L N H N G E T L R Q K
ATG CTG GTG GCC ATC GAT GAG CTG ATG CAG TCT CTG AAT CAT AAT GGC GAG ACT CTG CGC CAG AAA
TAC GAC CAC CGG TAG CTA CTC GAC TAC GTC AGA GAC TTA GTA TTA CCG CTC TGA GAC GCG GTC TTT

mIL-12

~~~~~

1519 P P V G E A D P Y R V K M K L C I L L H A F  
CCT CCT GTG GGA GAA GCA GAC CCT TAC AGA GTG AAA ATG AAG CTC TGC ATC CTG CTT CAC GCC TTC  
GGA GGA CAC CCT CTT CGT CTG GGA ATG TCT CAC TTT TAC TTC GAG ACG TAG GAC GAA GTG CGG AAG

mIL-12

IRES

~~~~~

EcoRI

1585 S T R V V T I N R V M G Y L S S A *
AGC ACC CGC GTC GTG ACC ATC AAC AGG GTG ATG GGC TAT CTG AGC TCC GCC TGA **GAA TTC** CGC CCC
TCG TGG GCG CAG CAC TGG TAG TTG TCC CAC TAC CCG ATA GAC TCG AGG CGG ACT **CTT AAG** GCG GGG

IRES

~~~~~

1651 TCT CCC TCC CCC CCC CCT AAC GTT ACT GGC CGA AGC CGC TTG GAA TAA GGC CGG TGT GCG TTT GTC  
AGA GGG AGG GGG GGG GGA TTG CAA TGA CCG GCT TCG GCG AAC CTT ATT CCG GCC ACA CGC AAA CAG

IRES

~~~~~

1717 TAT ATG TTA TTT TCC ACC ATA TTG CCG TCT TTT GGC AAT GTG AGG GCC CGG AAA CCT GGC CCT GTC
ATA TAC AAT AAA AGG TGG TAT AAC GGC AGA AAA CCG TTA CAC TCC CGG GCC TTT GGA CCG GGA CAG

IRES

~~~~~

1783 TTC TTG ACG AGC ATT CCT AGG GGT CTT TCC CCT CTC GCC AAA GGA ATG CAA GGT CTG TTG AAT GTC  
AAG AAC TGC TCG TAA GGA TCC CCA GAA AGG GGA GAG CGG TTT CCT TAC GTT CCA GAC AAC TTA CAG

IRES

~~~~~

HindIII

1849 GTG AAG GAA GCA GTT CCT CTG **GAA GCT TCT** TGA AGA CAA ACA ACG TCT GTA GCG ACC CTT TGC AGG
CAC TTC CTT CGT CAA GGA GAC **CTT CGA AGA** ACT TCT GTT TGT TGC AGA CAT CGC TGG GAA ACG TCC

IRES

~~~~~

1915 CAG CGG AAC CCC CCA CCT GGC GAC AGG TGC CTC TGC GGC CAA AAG CCA CGT GTA TAA GAT ACA CCT  
GTC GCC TTG GGG GGT GGA CCG CTG TCC ACG GAG ACG CCG GTT TTC GGT GCA CAT ATT CTA TGT GGA

IRES

~~~~~

1981 GCA AAG GCG GCA CAA CCC CAG TGC CAC GTT GTG AGT TGG ATA GTT GTG GAA AGA GTC AAA TGG CTC
CGT TTC CGC CGT GTT GGG GTC ACG GTG CAA CAC TCA ACC TAT CAA CAC CTT TCT CAG TTT ACC GAG

IRES

~~~~~

2047 TCC TCA AGC GTA TTC AAC AAG GGG CTG AAG GAT GCC CAG AAG GTA CCC CAT TGT ATG GGA TCT GAT  
AGG AGT TCG CAT AAG TTG TTC CCC GAC TTC CTA CGG GTC TTC CAT GGG GTA ACA TAC CCT AGA CTA

IRES

~~~~~

2113 CTG GGG CCT CGG TGC ACA TGC TTT ACA TGT GTT TAG TCG AGG TTA AAA AAC GTC TAG GCC CCC CGA
GAC CCC GGA GCC ACG TGT ACG AAA TGT ACA CAA ATC AGC TCC AAT TTT TTG CAG ATC CGG GGG GCT

IRES

Neo

~~~~~

**HindIII** **NcoI**

M A E Q

2179 ACC ACG GGG ACG TGG TTT TCC TTT GAA AAA CAC GAT GAT **AAG CTT** GCC ACA **ACC ATG GCT** GAA CAA  
TGG TGC CCC TGC ACC AAA AGG AAA CTT TTT GTG CTA CTA **TTC GAA** CGG TGT **TGG TAC CGA** CTT GTT

Neo

~~~~~

2245 D G L H A G S P A A W V E R L F G Y D W A Q
GAT GGA TTG CAC GCA GGT TCT CCG GCC GCT TGG GTG GAG AGG CTA TTC GGC TAT GAC TGG GCA CAA
CTA CCT AAC GTG CGT CCA AGA GGC CGG CGA ACC CAC CTC TCC GAT AAG CCG ATA CTG ACC CGT GTT

Neo

~~~~~

2311 Q T I G C S D A A V F R L S A Q G R P V L F  
CAG ACA ATC GGC TGC TCT GAT GCC GCC GTG TTC CGG CTG TCA GCG CAG GGG CGC CCG GTT CTT TTT  
GTC TGT TAG CCG ACG AGA CTA CGG CGG CAC AAG GCC GAC AGT CGC GTC CCC GCG GGC CAA GAA AAA

```

                                Neo
~~~~~
2377 V K T D L S G A L N E L Q D E A A R L S W L
 GTC AAG ACC GAC CTG TCC GGT GCC CTG AAT GAA CTG CAG GAC GAG GCA GCG CGG CTA TCG TGG CTG
 CAG TTC TGG CTG GAC AGG CCA CGG GAC TTA CTT GAC GTC CTG CTC CGT CGC GCC GAT AGC ACC GAC
 Neo
~~~~~
2443  A T T G V P C A A V L D V V T E A G R D W L
      GCC ACG ACG GGC GTT CCT TGC GCA GCT GTG CTC GAC GTT GTC ACT GAA GCG GGA AGG GAC TGG CTG
      CGG TGC TGC CCG CAA GGA ACG CGT CGA CAC GAG CTG CAA CAG TGA CTT CGC CCT TCC CTG ACC GAC
                                Neo
~~~~~
2509 L L G E V P G Q D L L S S H L A P A E K V S
 CTA TTG GGC GAA GTG CCG GGG CAG GAT CTC CTG TCA TCT CAC CTT GCT CCT GCC GAG AAA GTA TCC
 GAT AAC CCG CTT CAC GGC CCC GTC CTA GAG GAC AGT AGA GTG GAA CGA GGA CGG CTC TTT CAT AGG
 Neo
~~~~~
2575  I M A D A M R R L H T L D P A T C P F D H Q
      ATC ATG GCT GAT GCA ATG CGG CGG CTG CAT ACG CTT GAT CCG GCT ACC TGC CCA TTC GAC CAC CAA
      TAG TAC CGA CTA CGT TAC GCC GCC GAC GTA TGC GAA CTA GGC CGA TGG ACG GGT AAG CTG GTG GTT
                                Neo
~~~~~
2641 A K H R I E R A R T R M E A G L V D Q D D L
 GCG AAA CAT CGC ATC GAG CGA GCA CGT ACT CGG ATG GAA GCC GGT CTT GTC GAT CAG GAT GAT CTG
 CGC TTT GTA GCG TAG CTC GCT CGT GCA TGA GCC TAC CTT CGG CCA GAA CAG CTA GTC CTA CTA GAC
 Neo
~~~~~
2707  D E E H Q G L A P A E L F A R L K A R M P D
      GAC GAA GAG CAT CAG GGG CTC GCG CCA GCC GAA CTG TTC GCC AGG CTC AAG GCG CGC ATG CCC GAC
      CTG CTT CTC GTA GTC CCC GAG CGC GGT CGG CTT GAC AAG CGG TCC GAG TTC CGC GCG TAC GGG CTG
                                Neo
~~~~~
 NcoI
2773 G E D L V V T H G D A C L P N I M V E N G R
 GGC GAG GAT CTC GTC GTG ACC CAT GGC GAT GCC TGC TTG CCG AAT ATC ATG GTG GAA AAT GGC CGC
 CCG CTC CTA GAG CAG CAC TGG GTA CCG CTA CGG ACG AAC GGC TTA TAG TAC CAC CTT TTA CCG GCG
 Neo
~~~~~
2839  F S G F I D C G R L G V A D R Y Q D I A L A
      TTT TCT GGA TTC ATC GAC TGT GGC CGG CTG GGT GTG GCG GAC CGC TAT CAG GAC ATA GCG TTG GCT
      AAA AGA CCT AAG TAG CTG ACA CCG GCC GAC CCA CAC CGC CTG GCG ATA GTC CTG TAT CGC AAC CGA
                                Neo
~~~~~
2905 T R D I A E E L G G E W A D R F L V L Y G I
 ACC CGT GAT ATT GCT GAA GAG CTT GGC GGC GAA TGG GCT GAC CGC TTC CTC GTG CTT TAC GGT ATC
 TGG GCA CTA TAA CGA CTT CTC GAA CCG CCG CTT ACC CGA CTG GCG AAG GAG CAC GAA ATG CCA TAG
 Neo
~~~~~
2971  A A P D S Q R I A F Y R L L D E F F *
      GCC GCT CCC GAT TCG CAG CGC ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC GAG TTC TTC TGA
      CGG CGA GGG CTA AGC GTC GCG TAG CGG AAG ATA GCG GAA GAA CTG CTC AAG AAG ACT

```

#### 5.4 DNA-Sequenz der NFAT-Minimalpromotorregion NFAT6 und NFAT4 der bicistronischen mIL-12-IRES-Neo Vektoren #1027 und #1028

Dargestellt ist die DNA-Sequenz der induzierbaren NFAT-Promotorregion der bicistronischen Vektoren pSIN-NFAT6-mIL-12 (#1027) und pSIN-NFAT4-mIL-12 (#1028). Die Expressions-cassette mIL-12-IRES-Neo entspricht der des selbst-inaktivierenden Vektors pQCXIN-mIL-12 (#1018). Die DNA-Sequenz ist in Triplets dargestellt. Restriktionsschnittstellen, die der Klonierung oder Restriktionsanalyse dienen sind durch Fettdruck gekennzeichnet. Oberhalb der DNA-Sequenz sind die NFAT-Erkennungssequenzen und Minimalpromotorregionen aufgeführt [~~].

## 5.4.1 #1027: pSIN-NFAT6-mIL-12

```

NFATResponseElement #1
NFAT-
BgIII
1  AGA TCT AAG CTT GAT ATC GAA TTA GGA GGA AAA ACT GTT TCA TAC AGA AGG CGT CAA TTA GGA GGA
TCT AGA TTC GAA CTA TAG CTT AAT CCT CCT TTT TGA CAA AGT ATG TCT TCC GCA GTT AAT CCT CCT
NFATResponseElement #3
responseElement #2
67  AAA ACT GTT TCA TAC AGA AGG CGT CAA TTA GGA GGA AAA ACT GTT TCA TAC AGA AGG CGT CAA TTG
TTT TGA CAA AGT ATG TCT TCC GCA GTT AAT CCT CCT TTT TGA CAA AGT ATG TCT TCC GCA GTT AAC
NFATResponse-
NFATResponseElement #4
133  GTC CCA TCG AAT TAG GAG GAA AAA CTG TTT CAT ACA GAA GGC GTC AAT TAG GAG GAA AAA CTG TTT
CAG GGT AGC TTA ATC CTC CTT TTT GAC AAA GTA TGT CTT CCG CAG TTA ATC CTC CTT TTT GAC AAA
NFATResponseElement #6
Element #5
199  CAT ACA GAA GGC GTC AAT TAG GAG GAA AAA CTG TTT CAT ACA GAA GGC GTC AAT TGG TCC CGG GAC
GTA TGT CTT CCG CAG TTA ATC CTC CTT TTT GAC AAA GTA TGT CTT CCG CAG TTA ACC AGG GCC CTG
Promotor_minIL-2
265  ATT TTG ACA CCC CCA TAA TAT TTT TCC AGA ATT AAC AGT ATA AAT TGC ATC TCT TGT TCA AGA GTT
TAA AAC TGT GGG GGT ATT ATA AAA AGG TCT TAA TTG TCA TAT TTA ACG TAG AGA ACA AGT TCT CAA
Promotor_minIL-2
mIL-12
BamHI NcoI
M G P Q
331  CCC TAT CAC TCT CTT TAA TCA CTA CTC ACA GTA ACC TCA ACT CCT GGA TCC ATG GGT CCT CAG ...
GGG ATA GTG AGA GAA ATT AGT GAT GAG TGT CAT TGG AGT TGA GGA CCT AGG TAC CCA GGA GTC ...

```

## 5.4.2 #1028: pSIN-NFAT4-mIL-12

```

NFATResponseElement #1
NFATResponseElement #2
BgIII/BamHI- Fusion
1  AGA TCC AAG CTG GAG GAA AAA CTG TTT CAT ACA GAA GGC GTG GAG GAA AAA CTG TTT CAT ACA GAA
TCT AGG TTC GAC CTC CTT TTT GAC AAA GTA TGT CTT CCG CAC CTC CTT TTT GAC AAA GTA TGT CTT
NFATResponseElement #3
NFATResponseElement #4
67  GGC GTG GAG GAA AAA CTG TTT CAT ACA GAA GGC GTG GAG GAA AAA CTG TTT CAT ACA GAA GGC GTC
CCG CAC CTC CTT TTT GAC AAA GTA TGT CTT CCG CAC CTC CTT TTT GAC AAA GTA TGT CTT CCG CAG
mIL-12
TATA-Box
XbaI BamHI NcoI
M G P Q K L T I S W F
133  GCG GAG ACT CTA GAG GGT ATA TAA GGA TCC ATG GGT CCT CAG AAG CTA ACC ATC TCC TGG TTT ...
CGC CTC TGA GAT CTC CCA TAT ATT CCT AGG TAC CCA GGA GTC TTC GAT TGG TAG AGG ACC AAA ...

```

---

## Abkürzungsverzeichnis

Gebräuchliche Abkürzungen, sowie physikalische SI-Basiseinheiten werden nicht gesondert aufgeführt.

|                                   |                                                                |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| ABTS                              | 2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)             |
| AK                                | Antikörper                                                     |
| Amp                               | Ampicillin                                                     |
| APC                               | antigenpräsentierende Zelle                                    |
| AS                                | Aminosäure                                                     |
| bp                                | Basenpaare                                                     |
| BSA                               | Rinderserumalbumin                                             |
| BSM                               | engl. <i>bovine submaxillary mucin</i>                         |
| CCD-Kamera                        | engl. <i>charge coupled device</i> Kamera                      |
| CEA                               | karzinoembryonales Antigen                                     |
| CFU                               | engl. <i>colony forming unit</i>                               |
| CH2-CH3                           | konstante Domänen der schweren Kette (human IgG <sub>1</sub> ) |
| CRAC                              | engl. <i>calcium-release-activated calcium channel</i>         |
| c-SMAC                            | engl. <i>central supramolecular activation cluster</i>         |
| CTC                               | engl. <i>circulating tumor cell</i>                            |
| CTL                               | zytotoxischer T-Lymphozyt                                      |
| CTM                               | engl. <i>circulating tumor microembolus</i>                    |
| DAG                               | Diacylglycerin                                                 |
| DC                                | dentritische Zelle                                             |
| ddNTP                             | Didesoxynukleotid-Triphosphat                                  |
| DMEM                              | engl. <i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>                |
| DMSO                              | Dimethylsulfoxid                                               |
| DNA                               | Desoxyribonukleinsäure                                         |
| dNTP                              | Desoxynukleotid-Triphosphat                                    |
| EtOH                              | Ethanol                                                        |
| ER                                | Endoplasmatisches Retikulum                                    |
| FACS                              | fluoreszenzaktivierte Zellsortierung                           |
| FITC                              | Fluorescein-5-isocyanat                                        |
| FRET                              | engl. <i>Fluorescence resonance energy transfer</i>            |
| H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> | doppelt destilliertes Wasser                                   |
| HBSS                              | engl. <i>Hank's Buffered Salt Solution</i>                     |
| HRS                               | Hodgkin/Reed-Sternberg                                         |
| IFN- $\gamma$                     | Interferon- $\gamma$                                           |
| IL-2                              | Interleukin-2                                                  |
| IL-12                             | Interleukin-12                                                 |

|                  |                                                                                                        |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IP <sub>3</sub>  | Inositoltrisphosphat                                                                                   |
| IS               | immunologische Synapse                                                                                 |
| ITAM             | engl. <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>                                            |
| LB               | Luria-Broth- Vollmedium                                                                                |
| LSM              | engl. <i>laser scanning</i> Mikroskop                                                                  |
| MACS             | magnetisch-assozierte Zellsortierung                                                                   |
| mAK              | monoklonaler Antikörper                                                                                |
| MAPK             | mitogenaktivierte Proteinkinase                                                                        |
| MCS              | multiple Klonierungsstelle                                                                             |
| MHC              | engl. <i>major histocompatibility complex</i>                                                          |
| Neo              | Neomycin                                                                                               |
| NFκB             | engl. <i>nuclear factor κB</i>                                                                         |
| NFAT             | engl. <i>nuclear factor of activated T-cells</i>                                                       |
| OD               | Optische Dichte                                                                                        |
| PBL              | Periphere Blutlymphozyten                                                                              |
| PBS              | Phosphat gepufferte Saline                                                                             |
| PCR              | Polymerase-Kettenreaktion                                                                              |
| PE               | Phycoerythrin                                                                                          |
| PHA-L            | Phytohämagglutinin-L                                                                                   |
| PI               | Propidiumiodid                                                                                         |
| PIP <sub>2</sub> | Phosphatidylinositbisphosphat                                                                          |
| PKC              | Proteinkinase C                                                                                        |
| PLCγ1            | Phospholipase γ1                                                                                       |
| PMA              | Phorbol 12-myristat 13-acetat                                                                          |
| p-SMAC           | engl. <i>peripheral supramolecular activation cluster</i>                                              |
| RT               | Raumtemperatur                                                                                         |
| scFv             | Einzelkettenantikörperfragment (engl. <i>single chain fragment of the variable region</i> )            |
| SIN              | selbst-inaktivierend (in Verbindung mit Plasmid-Vektoren)                                              |
| TAA              | tumorassoziertes Antigen                                                                               |
| TAE              | Tris-HCl/Acetat/EDTA-Puffer                                                                            |
| TAG72            | tumorassoziertes Glykoprotein 72                                                                       |
| TCR              | T-Zellrezeptor                                                                                         |
| TIL              | tumorinfiltrierende Lymphozyten                                                                        |
| Tris-HCl         | Tris-(hydroxymethyl)-Amonomethan-Hydrochlorid                                                          |
| ÜN               | Über Nacht                                                                                             |
| VH               | variable Domäne der schweren Kette                                                                     |
| VL               | variable Domäne der leichten Kette                                                                     |
| XTT              | Natrium 3'-[1-(phenylamino-carbonyl)-3,4,tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)-benzen Sulfonsäure Hydrat |



---

## Literaturverzeichnis

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S.** *Cellular and Molecular Immunology*. Saunders, Philadelphia, USA, 6 ed., 2007.
- Adachi, T., Tsubata, T.** FRET-based Ca<sup>2+</sup> measurement in B lymphocyte by flow cytometry and confocal microscopy. *Biochem Biophys Res Commun*, 367(2):377–382, 2008.
- Al-Mehdi, A.B., Tozawa, K., Fisher, A.B., Shientag, L., Lee, A., Muschel, R.J.** Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat Med*, 6(1):100–102, 2000.
- Alvarez-Vallina, L.** Genetic approaches for antigen-selective cell therapy. *Curr Gene Ther*, 1(4):385–397, 2001.
- Arendt, C.W., Albrecht, B., Soos, T.J., Littman, D.R.** Protein kinase C- $\theta$ ;: signaling from the center of the T-cell synapse. *Curr Opin Immunol*, 14(3):323–330, 2002.
- Ashton-Rickardt, P.G., Bandeira, A., Delaney, J.R., Kaer, L.V., Pircher, H.P., Zinkernagel, R.M., Tonegawa, S.** Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell*, 76(4):651–663, 1994.
- Atkins, M.B., Robertson, M.J., Gordon, M., Lotze, M.T., DeCoste, M., DuBois, J.S., Ritz, J., Sandler, A.B., Edington, H.D., Garzone, P.D., Mier, J.W., Canning, C.M., Battiato, L., Tahara, H., Sherman, M.L.** Phase I evaluation of intravenous recombinant human interleukin 12 in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res*, 3(3):409–417, 1997.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.** *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley-Interscience, New York, 1995.
- Berinstein, N.L.** Carcinoembryonic antigen as a target for therapeutic anticancer vaccines: a review. *J Clin Oncol*, 20(8):2197–2207, 2002.
- Bhakta, N.R., Lewis, R.S.** Real-time measurement of signaling and motility during T cell development in the thymus. *Semin Immunol*, 17(6):411–420, 2005.
- Birnboim, H.** A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in Enzymology*, 100:243–255, 1983.
- Bold, R.J., Ota, D.M., Ajani, J.A., Mansfield, P.F.** Peritoneal and serum tumor markers predict recurrence and survival of patients with resectable gastric cancer. *Gastric Cancer*, 2(1):1–7, 1999.
- Bolhuis, R.L., Willemsen, R.A., Lamers, C.H., Stam, K., Gratama, J.W., Weijtens, M.E.** Preparation for a phase I/II study using autologous gene modified T lymphocytes for treatment of metastatic renal cancer patients. *Adv Exp Med Biol*, 451:547–555, 1998.

- Boon, T., Cerottini, J.C., den Eynde, B.V., van der Bruggen, P., Pel, A.V.** Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, 12:337–365, 1994.
- Bordignon, C., Carlo-Stella, C., Colombo, M.P., Vincentiis, A.D., Lanata, L., Lemoli, R.M., Locatelli, F., Olivieri, A., Rondelli, D., Zanon, P., Tura, S.** Cell therapy: achievements and perspectives. *Haematologica*, 84(12):1110–1149, 1999.
- Brentjens, R.J., Latouche, J.B., Santos, E., Marti, F., Gong, M.C., Lyddane, C., King, P.D., Larson, S., Weiss, M., Rivière, I., Sadelain, M.** Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med*, 9(3):279–286, 2003.
- Brunda, M.J., Luistro, L., Hendrzak, J.A., Fountoulakis, M., Garotta, G., Gately, M.K.** Role of interferon-gamma in mediating the antitumor efficacy of interleukin-12. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol*, 17(2):71–77, 1995.
- Bruyns, C., Gérard, C., Velu, T.** Cancer escape from immune surveillance: how can it be overcome by gene transfer? *Eur J Cancer*, 30A(8):1176–1181, 1994.
- Chambers, A.F., Groom, A.C., MacDonald, I.C.** Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, 2(8):563–572, 2002.
- Chang, Y.S., di Tomaso, E., McDonald, D.M., Jones, R., Jain, R.K., Munn, L.L.** Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(26):14608–14613, 2000.
- Chmielewski, M., Hombach, A., Heuser, C., Adams, G.P., Abken, H.** 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):7647–7653, 2004.
- Christiansen, J.J., Rajasekaran, A.K.** Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res*, 66(17):8319–8326, 2006.
- Chu, G., Hayakawa, H., Berg, P.** Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Res*, 15(3):1311–1326, 1987.
- Coligan, J., Kruisbeek, A., Margulies, D.** *Current Protocols in Immunology*. Wiley-Interscience, New York, 1995.
- Cristofanilli, M., Budd, G.T., Ellis, M.J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M.C., Reuben, J.M., Doyle, G.V., Allard, W.J., Terstappen, L.W.M.M., Hayes, D.F.** Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 351(8):781–791, 2004.
- Daufeldt, S., Lanz, R., Alléra, A.** Membrane-initiated steroid signaling (MISS): genomic steroid action starts at the plasma membrane. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 85(1):9–23, 2003.
- Donnadieu, E., Cefai, D., Tan, Y.P., Paresys, G., Bismuth, G., Trautmann, A.** Imaging early steps of human T cell activation by antigen-presenting cells. *J Immunol*, 148(9):2643–2653, 1992.

- Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W.** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, 16(13):6127–6145, 1988.
- Du, C., Sriram, S.** Mechanism of inhibition of LPS-induced IL-12p40 production by IL-10 and TGF-beta in ANA-1 cells. *J Leukoc Biol*, 64(1):92–97, 1998.
- Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Yang, J.C., Sherry, R.M., Topalian, S.L., Restifo, N.P., Royal, R.E., Kammula, U., White, D.E., Mavroukakis, S.A., Rogers, L.J., Gracia, G.J., Jones, S.A., Mangiameli, D.P., Pelletier, M.M., Gea-Banacloche, J., Robinson, M.R., Berman, D.M., Filie, A.C., Abati, A., Rosenberg, S.A.** Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol*, 23(10):2346–2357, 2005.
- Egan, M.L., Pritchard, D.G., Todd, C.W., Go, V.L.** Isolation and immunochemical and chemical characterization of carcinoembryonic antigen-like substances in colon lavages of healthy individuals. *Cancer Res*, 37(8 Pt 1):2638–2643, 1977.
- Ehrlich, L.I.R., Ebert, P.J.R., Krummel, M.F., Weiss, A., Davis, M.M.** Dynamics of p56lck translocation to the T cell immunological synapse following agonist and antagonist stimulation. *Immunity*, 17(6):809–822, 2002.
- Engvall, E., Perlman, P.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9):871–874, 1971.
- Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G., Schindler, D.G.** Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(2):720–724, 1993.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., Danielsen, M.** Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(21):7413–7417, 1987.
- Feske, S.** Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol*, 7(9):690–702, 2007.
- Fidler, I.J.** Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res*, 50(19):6130–6138, 1990.
- Fidler, I.J.** The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 3(6):453–458, 2003.
- Fletcher, R.H.** Carcinoembryonic antigen. *Ann Intern Med*, 104(1):66–73, 1986.
- Friedl, P., Gunzer, M.** Interaction of T cells with APCs: the serial encounter model. *Trends Immunol*, 22(4):187–191, 2001.
- Frängsmyr, L., Baranov, V., Hammarström, S.** Four carcinoembryonic antigen subfamily members, CEA, NCA, BGP and CGM2, selectively expressed in the normal human colonic epithelium, are integral components of the fuzzy coat. *Tumour Biol*, 20(5):277–292, 1999.

- Gade, T.P.F., Hassen, W., Santos, E., Gunset, G., Saudemont, A., Gong, M.C., Brentjens, R., Zhong, X.S., Stephan, M., Stefanski, J., Lyddane, C., Osborne, J.R., Buchanan, I.M., Hall, S.J., Heston, W.D., Rivière, I., Larson, S.M., Koutcher, J.A., Sadelain, M.** Targeted elimination of prostate cancer by genetically directed human T lymphocytes. *Cancer Res*, 65(19):9080–9088, 2005.
- Gardemann, T.** Steigerung der Immunrezeptor-vermittelten T-Zell Antwort mit Hilfe von IL-12. Ph.D. thesis, Universität Köln, 2007.
- Gata, S., Chen, A., Itzkowitz, S.H.** Use of model cell lines to study the biosynthesis and biological role of cancer-associated sialosyl-Tn antigen. *Cancer Res*, 54(15):4036–4044, 1994.
- Ginn-Pease, M.E., Whisler, R.L.** Redox signals and NF-kappaB activation in T cells. *Free Radic Biol Med*, 25(3):346–361, 1998.
- Goldstein, M.J., Mitchell, E.P.** Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. *Cancer Invest*, 23(4):338–351, 2005.
- Gollob, J.A., Mier, J.W., Veenstra, K., McDermott, D.F., Clancy, D., Clancy, M., Atkins, M.B.** Phase I trial of twice-weekly intravenous interleukin 12 in patients with metastatic renal cell cancer or malignant melanoma: ability to maintain IFN-gamma induction is associated with clinical response. *Clin Cancer Res*, 6(5):1678–1692, 2000.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., Dustin, M.L.** The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*, 285(5425):221–227, 1999.
- Greenfield, E.A., Nguyen, K.A., Kuchroo, V.K.** CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol*, 18(5):389–418, 1998.
- Guadagni, F., Roselli, M., Cosimelli, M., Ferroni, P., Spila, A., Cavaliere, F., Arcuri, R., Carlini, S., Mariotti, S., Gandolfo, G.M., Casciani, C.U., Greiner, J.W., Schlom, J.** TAG-72 expression and its role in the biological evaluation of human colorectal cancer. *Anticancer Res*, 16(4B):2141–2148, 1996.
- Gubler, U., Chua, A.O., Schoenhaut, D.S., Dwyer, C.M., McComas, W., Motyka, R., Nabavi, N., Wolitzky, A.G., Quinn, P.M., Familletti, P.C.** Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(10):4143–4147, 1991.
- Hahn, T., Tag, K., Riedel, K., Uhlig, S., Baronian, K., Gellissen, G., Kunze, G.** A novel estrogen sensor based on recombinant *Arxula adenivorans* cells. *Biosens Bioelectron*, 21(11):2078–2085, 2006.
- Hammarström, S., Engvall, E., Johansson, B.G., Svensson, S., Sundblad, G., Goldstein, I.J.** Nature of the tumor-associated determinant(s) of carcinoembryonic antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(4):1528–1532, 1975.
- Hanahan, D.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166(4):557–580, 1983.

- Hatada, M.H., Lu, X., Laird, E.R., Green, J., Morgenstern, J.P., Lou, M., Marr, C.S., Phillips, T.B., Ram, M.K., Theriault, K.** Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature*, 377(6544):32–38, 1995.
- Haynes, N.M., Snook, M.B., Trapani, J.A., Cerruti, L., Jane, S.M., Smyth, M.J., Darcy, P.K.** Redirecting mouse CTL against colon carcinoma: superior signaling efficacy of single-chain variable domain chimeras containing TCR-zeta vs Fc epsilon RI-gamma. *J Immunol*, 166(1):182–187, 2001.
- Henseling, U., Schmidt, W., Schöler, H.R., Gruss, P., Hatzopoulos, A.K.** A transcription factor interacting with the class I gene enhancer is inactive in tumorigenic cell lines which suppress major histocompatibility complex class I genes. *Mol Cell Biol*, 10(8):4100–4109, 1990.
- Heuser, C., Diehl, V., Abken, H., Hombach, A.** Anti-CD30-IL-12 antibody-cytokine fusion protein that induces IFN-gamma secretion of T cells and NK cell-mediated lysis of Hodgkin's lymphoma-derived tumor cells. *Int J Cancer*, 106(4):545–552, 2003.
- Hirata, S., Fukamachi, T., Sakano, H., Tarora, A., Saito, H., Kobayashi, H.** Extracellular acidic environments induce phosphorylation of ZAP-70 in Jurkat T cells. *Immunol Lett*, 115(2):105–109, 2008.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., Pease, L.R.** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77(1):51–59, 1989.
- Hogquist, K.A., Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J., Carbone, F.R.** T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell*, 76(1):17–27, 1994.
- Holmgren, L., O'Reilly, M.S., Folkman, J.** Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med*, 1(2):149–153, 1995.
- Hombach, A., Heuser, C., Sircar, R., Tillmann, T., Diehl, V., Pohl, C., Abken, H.** An anti-CD30 chimeric receptor that mediates CD3-zeta-independent T-cell activation against Hodgkin's lymphoma cells in the presence of soluble CD30. *Cancer Res*, 58(6):1116–1119, 1998a.
- Hombach, A., Koch, D., Sircar, R., Heuser, C., Diehl, V., Kruis, W., Pohl, C., Abken, H.** A chimeric receptor that selectively targets membrane-bound carcinoembryonic antigen (mCEA) in the presence of soluble CEA. *Gene Ther*, 6(2):300–304, 1999.
- Hombach, A., Schneider, C., Sent, D., Koch, D., Willemsen, R.A., Diehl, V., Kruis, W., Bolhuis, R.L., Pohl, C., Abken, H.** An entirely humanized CD3 zeta-chain signaling receptor that directs peripheral blood t cells to specific lysis of carcinoembryonic antigen-positive tumor cells. *Int J Cancer*, 88(1):115–120, 2000.
- Hombach, A., Sircar, R., Heuser, C., Tillmann, T., Diehl, V., Kruis, W., Pohl, C., Abken, H.** Chimeric anti-TAG72 receptors with immunoglobulin constant Fc domains and gamma or zeta signalling chains. *Int J Mol Med*, 2(1):99–103, 1998b.
- Hombach, A., Wiczarkowicz, A., Marquardt, T., Heuser, C., Usai, L., Pohl, C., Seliger, B., Abken, H.** Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 zeta

- signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 zeta signaling receptor molecule. *J Immunol*, 167(11):6123–6131, 2001.
- Hombach, A., Heuser, C., Abken, H.** The recombinant T cell receptor strategy: insights into structure and function of recombinant immunoreceptors on the way towards an optimal receptor design for cellular immunotherapy. *Curr Gene Ther*, 2(2):211–226, 2002.
- Hooijberg, E., Bakker, A.Q., Ruizendaal, J.J., Spits, H.** NFAT-controlled expression of GFP permits visualization and isolation of antigen-stimulated primary human T cells. *Blood*, 96(2):459–466, 2000.
- Hostetter, R.B., Augustus, L.B., Mankarious, R., Chi, K.F., Fan, D., Toth, C., Thomas, P., Jessup, J.M.** Carcinoembryonic antigen as a selective enhancer of colorectal cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst*, 82(5):380–385, 1990.
- Hurez, V., Saparov, A., Tousson, A., Fuller, M.J., Kubo, T., Oliver, J., Weaver, B.T., Weaver, C.T.** Restricted clonal expression of IL-2 by naive T cells reflects differential dynamic interactions with dendritic cells. *J Exp Med*, 198(1):123–132, 2003.
- Huston, J.S., George, A.J.** Engineered antibodies take center stage. *Hum Antibodies*, 10(3-4):127–142, 2001.
- Hwu, P., Yang, J.C., Cowherd, R., Treisman, J., Shafer, G.E., Eshhar, Z., Rosenberg, S.A.** In vivo antitumor activity of T cells redirected with chimeric antibody/T-cell receptor genes. *Cancer Res*, 55(15):3369–3373, 1995.
- Imai, C., Mihara, K., Andreansky, M., Nicholson, I.C., Pui, C.H., Geiger, T.L., Campana, D.** Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 18(4):676–684, 2004.
- Jacinto, E., Werlen, G., Karin, M.** Cooperation between Syk and Rac1 leads to synergistic JNK activation in T lymphocytes. *Immunity*, 8(1):31–41, 1998.
- Janeway, C.A.** A trip through my life with an immunological theme. *Annu Rev Immunol*, 20:1–28, 2002.
- Jesnowski, R., Naehring, J., Wolf, K.** A rapid and reliable method for PCR-based amplification of chromosomal and mitochondrial DNA from intact yeast cells. *Curr Genet*, 27(4):318–319, 1995.
- Jost, L.M., Kirkwood, J.M., Whiteside, T.L.** Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells. *J Immunol Methods*, 147(2):153–165, 1992.
- Kaulen, H., Seemann, G., Bosslet, K., Schwaeble, W., Dippold, W.** Humanized anti-carcinoembryonic antigen antibody: strategies to enhance human tumor cell killing. *Year Immunol*, 7:106–109, 1993.
- Kershaw, M.H., Westwood, J.A., Zhu, Z., Witte, L., Libutti, S.K., Hwu, P.** Generation of gene-modified T cells reactive against the angiogenic kinase insert domain-containing receptor (KDR) found on tumor vasculature. *Hum Gene Ther*, 11(18):2445–2452, 2000.

- Kershaw, M.H., Teng, M.W.L., Smyth, M.J., Darcy, P.K.** Supernatural T cells: genetic modification of T cells for cancer therapy. *Nat Rev Immunol*, 5(12):928–940, 2005.
- Kershaw, M.H., Westwood, J.A., Hwu, P.** Dual-specific T cells combine proliferation and antitumor activity. *Nat Biotechnol*, 20(12):1221–1227, 2002.
- Khong, H.T., Restifo, N.P.** Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol*, 3(11):999–1005, 2002.
- King, I.L., Segal, B.M.** Cutting edge: IL-12 induces CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cell activation in the presence of T regulatory cells. *J Immunol*, 175(2):641–645, 2005.
- Kohn, E.C., Liotta, L.A.** Molecular insights into cancer invasion: strategies for prevention and intervention. *Cancer Res*, 55(9):1856–1862, 1995.
- Kopfstein, L., Christofori, G.** Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment. *Cell Mol Life Sci*, 63(4):449–468, 2006.
- Kraeft, S.K., Ladanyi, A., Galiger, K., Herlitz, A., Sher, A.C., Bergsrud, D.E., Even, G., Brunelle, S., Harris, L., Salgia, R., Dahl, T., Kesterson, J., Chen, L.B.** Reliable and sensitive identification of occult tumor cells using the improved rare event imaging system. *Clin Cancer Res*, 10(9):3020–3028, 2004.
- Lamers, C.H.J., Willemsen, R.A., Luider, B.A., Debets, R., Bolhuis, R.L.H.** Protocol for gene transduction and expansion of human T lymphocytes for clinical immunogene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther*, 9(7):613–623, 2002.
- Levin, L.V., Griffin, T.W.** Specific adhesion of carcinoembryonic antigen-bearing colorectal cancer cells to immobilized carcinoembryonic antigen. *Cancer Lett*, 60(2):143–152, 1991.
- Lewis, R.S., Cahalan, M.D.** Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca<sup>2+</sup> and transmembrane Ca<sup>2+</sup> current in human leukemic T cells. *Cell Regul*, 1(1):99–112, 1989.
- Lewko, W.M., Hall, P.B., Oldham, R.K.** Growth of tumor-derived activated T cells for the treatment of advanced cancer. *Cancer Biother Radiopharm*, 15(4):357–366, 2000.
- Lieschke, G.J., Rao, P.K., Gately, M.K., Mulligan, R.C.** Bioactive murine and human interleukin-12 fusion proteins which retain antitumor activity in vivo. *Nat Biotechnol*, 15(1):35–40, 1997.
- Liu, X., Gong, H., Li, X., Zhou, W.** Monitoring calcium concentration in neurons withameleon. *J Biosci Bioeng*, 105(2):106–109, 2008.
- Luzzi, K.J., MacDonald, I.C., Schmidt, E.E., Kerkvliet, N., Morris, V.L., Chambers, A.F., Groom, A.C.** Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol*, 153(3):865–873, 1998.
- Ma, X., Chow, J.M., Gri, G., Carra, G., Gerosa, F., Wolf, S.F., Dzialo, R., Trinchieri, G.** The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J Exp Med*, 183(1):147–157, 1996.

- Macatonia, S.E., Hosken, N.A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C.S., Culpepper, J.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K.M., O'Garra, A.** Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol*, 154(10):5071–5079, 1995.
- Macian, F.** NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol*, 5(6):472–484, 2005.
- Maghni, K., Nicolescu, O.M., Martin, J.G.** Suitability of cell metabolic colorimetric assays for assessment of CD4+ T cell proliferation: comparison to 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) ELISA. *J Immunol Methods*, 223(2):185–194, 1999.
- Maher, J., Brentjens, R.J., Gunset, G., Rivière, I., Sadelain, M.** Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol*, 20(1):70–75, 2002.
- Matsumoto, B.** *Cell Biological Applications of Confocal Microscopy*. Academic Press, San Diego, California, 1993.
- McGuinness, R.P., Ge, Y., Patel, S.D., Kashmiri, S.V., Lee, H.S., Hand, P.H., Schlom, J., Finer, M.H., McArthur, J.G.** Anti-tumor activity of human T cells expressing the CC49-zeta chimeric immune receptor. *Hum Gene Ther*, 10(2):165–173, 1999.
- Minguet, S., Swamy, M., Alarcón, B., Luescher, I.F., Schamel, W.W.A.** Full activation of the T cell receptor requires both clustering and conformational changes at CD3. *Immunity*, 26(1):43–54, 2007.
- Moertel, C.G., O'Fallon, J.R., Go, V.L., O'Connell, M.J., Thynne, G.S.** The preoperative carcinoembryonic antigen test in the diagnosis, staging, and prognosis of colorectal cancer. *Cancer*, 58(3):603–610, 1986.
- Mor, F., Cohen, I.R.** IL-2 rescues antigen-specific T cells from radiation or dexamethasone-induced apoptosis. Correlation with induction of Bcl-2. *J Immunol*, 156(2):515–522, 1996.
- Morgan, R.A., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Hughes, M.S., Yang, J.C., Sherry, R.M., Royal, R.E., Topalian, S.L., Kammula, U.S., Restifo, N.P., Zheng, Z., Nahvi, A., de Vries, C.R., Rogers-Freezer, L.J., Mavroukakis, S.A., Rosenberg, S.A.** Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*, 314(5796):126–129, 2006.
- Moritz, D., Groner, B.** A spacer region between the single chain antibody- and the CD3 zeta-chain domain of chimeric T cell receptor components is required for efficient ligand binding and signaling activity. *Gene Ther*, 2(8):539–546, 1995.
- Mueller, D.L., Seiffert, S., Fang, W., Behrens, T.W.** Differential regulation of bcl-2 and bcl-x by CD3, CD28, and the IL-2 receptor in cloned CD4+ helper T cells. A model for the long-term survival of memory cells. *J Immunol*, 156(5):1764–1771, 1996.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155:335–350, 1987.



- Nagai, T., Yamada, S., Tominaga, T., Ichikawa, M., Miyawaki, A.** Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca(2+) by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(29):10554–10559, 2004.
- Nagrath, S., Sequist, L.V., Maheswaran, S., Bell, D.W., Irimia, D., Ulkus, L., Smith, M.R., Kwak, E.L., Digumarthy, S., Muzikansky, A., Ryan, P., Balis, U.J., Tompkins, R.G., Haber, D.A., Toner, M.** Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, 450(7173):1235–1239, 2007.
- Niswender, K.D., Blackman, S.M., Rohde, L., Magnuson, M.A., Piston, D.W.** Quantitative imaging of green fluorescent protein in cultured cells: comparison of microscopic techniques, use in fusion proteins and detection limits. *J Microsc*, 180(Pt 2):109–116, 1995.
- Nomura, T.** [CD25+ CD4+ regulatory T cells maintaining immunological tolerance]. *Nippon Rinsho*, 63 Suppl 4:647–652, 2005.
- Pace, C., Scholtz, J.** *Measuring the conformational stability of a protein.*, vol. Proofs for Protein Structure: A practical approach. chapter 12. Creighton TE, IRL Press, Oxford, 2 ed., 1995.
- Paul, S., Regulier, E., Poitevin, Y., Hormann, H., Acres, R.B.** The combination of a chemokine, cytokine and TCR-based T cell stimulus for effective gene therapy of cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 51(11-12):645–654, 2002.
- Pavoni, E., Flego, M., Dupuis, M.L., Barca, S., Petronzelli, F., Anastasi, A.M., D'Alessio, V., Pelliccia, A., Vaccaro, P., Monteriù, G., Ascione, A., Santis, R.D., Felici, F., Cianfriglia, M., Minenkova, O.** Selection, affinity maturation, and characterization of a human scFv antibody against CEA protein. *BMC Cancer*, 6:41, 2006.
- Pear, W.S., Nolan, G.P., Scott, M.L., Baltimore, D.** Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(18):8392–8396, 1993.
- Pizzolo, G., Vinante, F., Morosato, L., Nadali, G., Chilosi, M., Gandini, G., Sinicco, A., Raiteri, R., Semenzato, G., Stein, H.** High serum level of the soluble form of CD30 molecule in the early phase of HIV-1 infection as an independent predictor of progression to AIDS. *AIDS*, 8(6):741–745, 1994.
- Pohl, C., Renner, C., Schwonzen, M., Sieber, M., Lorenz, P., Pfreundschuh, M., Diehl, V.** Anti-idiotypic vaccine against Hodgkin's lymphoma: induction of B- and T-cell immunity across species barriers against CD30 antigen by murine monoclonal internal image antibodies. *Int J Cancer*, 50(6):958–967, 1992.
- Radvanyi, L.G., Shi, Y., Vaziri, H., Sharma, A., Dhala, R., Mills, G.B., Miller, R.G.** CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response. *J Immunol*, 156(5):1788–1798, 1996.
- Reinhold, U., Liu, L., Lüdtke-Handjery, H.C., Heuser, C., Hombach, A., Wang, X., Tilgen, W., Ferrone, S., Abken, H.** Specific lysis of melanoma cells by receptor grafted T cells is enhanced by anti-idiotypic monoclonal antibodies directed to the scFv domain of the receptor. *J Invest Dermatol*, 112(5):744–750, 1999.

- Ren-Heidenreich, L., Hayman, G.T., Trevor, K.T.** Specific targeting of EGP-2+ tumor cells by primary lymphocytes modified with chimeric T cell receptors. *Hum Gene Ther*, 11(1):9–19, 2000.
- Rider, T.H., Petrovick, M.S., Nargi, F.E., Harper, J.D., Schwoebel, E.D., Mathews, R.H., Blanchard, D.J., Bortolin, L.T., Young, A.M., Chen, J., Hollis, M.A.** A B cell-based sensor for rapid identification of pathogens. *Science*, 301(5630):213–215, 2003.
- Risueño, R.M., Schamel, W.W.A., Alarcón, B.** T Cell Receptor Engagement Triggers Its CD3epsilon and CD3zeta Subunits to Adopt a Compact, Locked Conformation. *PLoS ONE*, 3(3):e1747, 2008.
- Rosenberg, S.A.** Development of cancer immunotherapies based on identification of the genes encoding cancer regression antigens. *J Natl Cancer Inst*, 88(22):1635–1644, 1996.
- Rosenberg, S.A., Yannelli, J.R., Yang, J.C., Topalian, S.L., Schwartzentruber, D.J., Weber, J.S., Parkinson, D.R., Seipp, C.A., Einhorn, J.H., White, D.E.** Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst*, 86(15):1159–1166, 1994.
- Rossig, C., Bollard, C.M., Nuchtern, J.G., Merchant, D.A., Brenner, M.K.** Targeting of G(D2)-positive tumor cells by human T lymphocytes engineered to express chimeric T-cell receptor genes. *Int J Cancer*, 94(2):228–236, 2001.
- Rudolf, R., Mongillo, M., Magalhães, P.J., Pozzan, T.** In vivo monitoring of Ca(2+) uptake into mitochondria of mouse skeletal muscle during contraction. *J Cell Biol*, 166(4):527–536, 2004.
- Rutledge, T., Cosson, P., Manolios, N., Bonifacino, J.S., Klausner, R.D.** Transmembrane helical interactions: zeta chain dimerization and functional association with the T cell antigen receptor. *EMBO J*, 11(9):3245–3254, 1992.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T.** *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, 3 ed., 1996.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12):5463–5467, 1977.
- Sauter, S.L., Rutherford, S.M., Wagener, C., Shively, J.E., Hefta, S.A.** Identification of the specific oligosaccharide sites recognized by type 1 fimbriae from Escherichia coli on nonspecific cross-reacting antigen, a CD66 cluster granulocyte glycoprotein. *J Biol Chem*, 268(21):15510–15516, 1993.
- Schaft, N., Lankiewicz, B., Gratama, J.W., Bolhuis, R.L.H., Debets, R.** Flexible and sensitive method to functionally validate tumor-specific receptors via activation of NFAT. *J Immunol Methods*, 280(1-2):13–24, 2003.
- Schirmacher, V.** T-cell immunity in the induction and maintenance of a tumour dormant state. *Semin Cancer Biol*, 11(4):285–295, 2001.

- Schmidt-Kittler, O., Ragg, T., Daskalakis, A., Granzow, M., Ahr, A., Blankenstein, T.J.F., Kaufmann, M., Diebold, J., Arnholdt, H., Muller, P., Bischoff, J., Harich, D., Schlimok, G., Riethmuller, G., Eils, R., Klein, C.A.** From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(13):7737–7742, 2003.
- Schwab, U., Stein, H., Gerdes, J., Lemke, H., Kirchner, H., Schaadt, M., Diehl, V.** Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. *Nature*, 299(5878):65–67, 1982.
- Selinka, H.C., Zibert, A., Wimmer, E.** A chimeric poliovirus/CD4 receptor confers susceptibility to poliovirus on mouse cells. *J Virol*, 66(4):2523–2526, 1992.
- Siegel, M.S., Isacoff, E.Y.** A genetically encoded optical probe of membrane voltage. *Neuron*, 19(4):735–741, 1997.
- Sigalov, A., Aivazian, D., Stern, L.** Homooligomerization of the cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain and of other proteins containing the immunoreceptor tyrosine-based activation motif. *Biochemistry*, 43(7):2049–2061, 2004.
- Smirnov, D.A., Zweitzig, D.R., Foulk, B.W., Miller, M.C., Doyle, G.V., Pienta, K.J., Meropol, N.J., Weiner, L.M., Cohen, S.J., Moreno, J.G., Connelly, M.C., Terstappen, L.W.M.M., O'Hara, S.M.** Global gene expression profiling of circulating tumor cells. *Cancer Res*, 65(12):4993–4997, 2005.
- Speiser, D.E., Miranda, R., Zakarian, A., Bachmann, M.F., McKall-Faienza, K., Odermatt, B., Hanahan, D., Zinkernagel, R.M., Ohashi, P.S.** Self antigens expressed by solid tumors Do not efficiently stimulate naive or activated T cells: implications for immunotherapy. *J Exp Med*, 186(5):645–653, 1997.
- Stancovski, I., Schindler, D.G., Waks, T., Yarden, Y., Sela, M., Eshhar, Z.** Targeting of T lymphocytes to Neu/HER2-expressing cells using chimeric single chain Fv receptors. *J Immunol*, 151(11):6577–6582, 1993.
- Stein, H., Mason, D.Y., Gerdes, J., O'Connor, N., Wainscoat, J., Pallesen, G., Gatter, K., Falini, B., Delsol, G., Lemke, H.** The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood*, 66(4):848–858, 1985.
- Takahashi, K., Ono, K., Hirabayashi, Y., Taniguchi, M.** Escape mechanisms of melanoma from immune system by soluble melanoma antigen. *J Immunol*, 140(9):3244–3248, 1988.
- Tartour, E., Latour, S., Mathiot, C., Thiounn, N., Mosseri, V., Joyeux, I., D'Enghien, C.D., Lee, R., Debre, B., Fridman, W.H.** Variable expression of CD3-zeta chain in tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) derived from renal-cell carcinoma: relationship with TIL phenotype and function. *Int J Cancer*, 63(2):205–212, 1995.
- Teng, M.W.L., Kershaw, M.H., Moeller, M., Smyth, M.J., Darcy, P.K.** Immunotherapy of cancer using systemically delivered gene-modified human T lymphocytes. *Hum Gene Ther*, 15(7):699–708, 2004.

- Terstappen, L.W., Rao, C., Gross, S., Kotelnikov, V., Racilla, E., Uhr, J., Weiss, A.** Flow cytometry—principles and feasibility in transfusion medicine. Enumeration of epithelial derived tumor cells in peripheral blood. *Vox Sang*, 74 Suppl 2:269–274, 1998.
- Tomida, T., Hirose, K., Takizawa, A., Shibasaki, F., Iino, M.** NFAT functions as a working memory of Ca<sup>2+</sup> signals in decoding Ca<sup>2+</sup> oscillation. *EMBO J*, 22(15):3825–3832, 2003.
- Topalian, S.L., Solomon, D., Rosenberg, S.A.** Tumor-specific cytolysis by lymphocytes infiltrating human melanomas. *J Immunol*, 142(10):3714–3725, 1989.
- Tsien, R.Y.** The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 67:509–544, 1998.
- Tsuruwaka, Y., Konishi, T., Miyawaki, A., Takagi, M.** Real-time monitoring of dynamic intracellular Ca(2+) movement during early embryogenesis through expression of yellow cameleon. *Zebrafish*, 4(4):253–260, 2007.
- Underhill, D.M., Bassetti, M., Rudensky, A., Aderem, A.** Dynamic interactions of macrophages with T cells during antigen presentation. *J Exp Med*, 190(12):1909–1914, 1999.
- van Oers, N.S., Killeen, N., Weiss, A.** Lck regulates the tyrosine phosphorylation of the T cell receptor subunits and ZAP-70 in murine thymocytes. *J Exp Med*, 183(3):1053–1062, 1996.
- Viola, A.** The amplification of TCR signaling by dynamic membrane microdomains. *Trends Immunol*, 22(6):322–327, 2001.
- Watford, W.T., Moriguchi, M., Morinobu, A., O’Shea, J.J.** The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14(5):361–368, 2003.
- Weijtens, M.E., Willemsen, R.A., Hart, E.H., Bolhuis, R.L.** A retroviral vector system ‘STITCH’ in combination with an optimized single chain antibody chimeric receptor gene structure allows efficient gene transduction and expression in human T lymphocytes. *Gene Ther*, 5(9):1195–1203, 1998.
- Weijtens, M.E., Willemsen, R.A., Valerio, D., Stam, K., Bolhuis, R.L.** Single chain Ig/gamma gene-redirceted human T lymphocytes produce cytokines, specifically lyse tumor cells, and recycle lytic capacity. *J Immunol*, 157(2):836–843, 1996.
- Weiss, A., Littman, D.R.** Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*, 76(2):263–274, 1994.
- Wetzel, S.A., McKeithan, T.W., Parker, D.C.** Live-cell dynamics and the role of costimulation in immunological synapse formation. *J Immunol*, 169(11):6092–6101, 2002.
- Willemsen, R.A., Weijtens, M.E., Ronteltap, C., Eshhar, Z., Gratama, J.W., Chames, P., Bolhuis, R.L.** Grafting primary human T lymphocytes with cancer-specific chimeric single chain and two chain TCR. *Gene Ther*, 7(16):1369–1377, 2000.
- Wittekind, C., Neid, M.** Cancer invasion and metastasis. *Oncology*, 69 Suppl 1:14–16, 2005.
- Wu, D.Y., Ugozzoli, L., Pal, B.K., Qian, J., Wallace, R.B.** The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol*, 10(3):233–238, 1991.

- Yannelli, J.R., Hyatt, C., McConnell, S., Hines, K., Jacknin, L., Parker, L., Sanders, M., Rosenberg, S.A.** Growth of tumor-infiltrating lymphocytes from human solid cancers: summary of a 5-year experience. *Int J Cancer*, 65(4):413–421, 1996.
- Yano, O., Hirano, H., Karasaki, Y., Higashi, K., Nakamura, H., Akiya, S., Gotoh, S.** Cloning and sequencing of viral integration site in human fibroblasts immortalized by simian virus 40. *Cell Struct Funct*, 16(1):63–71, 1991.
- Yao, L., Sgadari, C., Furuke, K., Bloom, E.T., Teruya-Feldstein, J., Tosato, G.** Contribution of natural killer cells to inhibition of angiogenesis by interleukin-12. *Blood*, 93(5):1612–1621, 1999.
- Yazdi, A.S., Morstedt, K., Puchta, U., Ghoreschi, K., Flaig, M.J., Rocken, M., Sander, C.A.** Heterogeneity of T-cell clones infiltrating primary malignant melanomas. *J Invest Dermatol*, 126(2):393–398, 2006.
- Yu, R., Hinkle, P.M.** Rapid turnover of calcium in the endoplasmic reticulum during signaling. Studies withameleon calcium indicators. *J Biol Chem*, 275(31):23648–23653, 2000.
- Yun, C.O., Nolan, K.F., Beecham, E.J., Reisfeld, R.A., Junghans, R.P.** Targeting of T lymphocytes to melanoma cells through chimeric anti-GD3 immunoglobulin T-cell receptors. *Neoplasia*, 2(5):449–459, 2000.
- Zhang, S.L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J.A., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Stauderman, K.A., Cahalan, M.D.** STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane. *Nature*, 437(7060):902–905, 2005.
- Zhang, T., Barber, A., Sentman, C.L.** Generation of antitumor responses by genetic modification of primary human T cells with a chimeric NKG2D receptor. *Cancer Res*, 66(11):5927–5933, 2006.
- Zhao, Y., Zheng, Z., Robbins, P.F., Khong, H.T., Rosenberg, S.A., Morgan, R.A.** Primary human lymphocytes transduced with NY-ESO-1 antigen-specific TCR genes recognize and kill diverse human tumor cell lines. *J Immunol*, 174(7):4415–4423, 2005.
- Zieglschmid, V., Hollmann, C., Böcher, O.** Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 42(2):155–196, 2005.

---

## Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hinrich Abken für die Betreuung meiner Arbeit. Dank seiner konstruktiven Kritik, seinen Anregungen und seiner permanenten Bereitschaft, die erzielten Ergebnisse zu diskutieren und folglich neue Ideen zu entwickeln, wurde die Anfertigung dieser Arbeit erst ermöglicht. Desweiteren bedanke ich mich bei Ihm für die Begutachtung dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Jens Brüning danke ich für seine Bereitschaft die Betreuung dieser Arbeit in der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät zu übernehmen und für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Barth vom IMB, RWTH-Aachen und Prof. Dr. Andreas Offenhäuser ISG-2, Forschungszentrum Jülich danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit im Rahmen des virtuellen Instituts für Biohybridtechnologie (vIBHT) durchführen zu können.

Ferner danke ich Frau Dr. Annette Schmidt von der Sporthochschule Köln für ihre tatkräftige Hilfe am Laser Scan Mikroskop und Herrn Matthias Matzkies vom Institut für Neurophysiologie für die technische Unterstützung bei den  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen.

Herrn Dr. Andreas Hombach danke ich für die konstruktiven und hilfreichen Diskussionen. Ein riesiges Dankeschön schließlich an die gesamte AG Abken und auch Ehemaligen für die super Atmosphäre innerhalb und ausserhalb des Labors. Es hat immer Spaß gemacht zur Arbeit zu kommen.

Zum Schluss danke ich den wichtigsten Menschen: meinem Mann Frank, meinen Eltern und meiner Schwester für deren uneingeschränkte Unterstützung. Ohne sie wäre die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

---

## 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 - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - 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 22. April 2008

---

Caroline Kopecky

### **Teilpublikationen (submitted):**

**Recombinant immunoreceptors sensitizes Jurkat T-cells for selective detection of membrane-bound carcinoembryonic antigen (mCEA) in the presence of soluble CEA.**

Caroline Kopecky, Annette Schmidt, Matthias Matzkies, Andreas Hombach Hinrich Abken

**Antigen triggered linking of adoptive with innate immunity to improve a redirected anti-tumor response.**

Caroline Kopecky, Markus Chmielewski, Thomas Gardemann, Nadine Herrmann, Andreas Hombach, Hinrich Abken

**Targeted elimination of cancer stem cells eradicates melanoma.**

Patrick Schmidt, Caroline Kopecky, Corinna Lösch, Klaudia Manista, Andreas Hombach, Steffi Löffek, Cornelia Mauch, Hinrich Abken

**5'-aza-2'-deoxycytidine enhances antigen-specific T cell recognition of human renal cell carcinoma.**

Barbara Seliger, Diana Handke, Christiane Kellert, Caroline Kopecky, Andreas Hombach, Michael Hainz, Steffen Hauptmann, Jürgen Bukur, Soldano Ferrone, Xinhui Wang, Hinrich Abken

## Lebenslauf

Name: Caroline Kopecky  
Geburtsdatum und -ort 16.04.1978 in Köln  
Staatsangehörigkeit deutsch  
Familienstand verheiratet  
Adresse Alte Sandkaul 20, 50859 Köln  
E-mail ckopecky@uni-koeln.de  
Telefon 0221/690 48 55

### Schulische Ausbildung:

1984 Besuch der Richeza-Grundschule in Pulheim-Brauweiler  
1988–1997 Besuch des Abtei-Gymnasiums in Pulheim-Brauweiler, Abschluss: Abitur

### Akademische Ausbildung:

1997–2003 Biologiestudium an der RWTH-Aachen  
Fächer: Biotechnologie, Molekularbiologie, Mikrobiologie, Bioverfahrenstechnik  
2000 Forschungspraktikum am Institut für Biotechnologie: „Growth and Enzymes of Bifidobacteria on Glycomacropeptide (GMP)“  
2003 Diplomarbeit am Institut für Molekulare Biotechnologie der RWTH-Aachen im Bereich „Molecular Farming“  
Thema: „Entwicklung und Expression therapeutisch relevanter IgA Antikörper in Pflanzen“; Abschluss mit Note: „mit Auszeichnung bestanden“  
Seit 2004 Promotion am Institut für Genetik; Externe Doktorarbeit am Institut für Tumorgenetik, Klinik I für Innere Medizin, Uniklinik Köln, Prof. Dr. H. Abken gefördert durch das „virtuelle Institut für BioHybridTechnologie (vIBHT)“ des Forschungszentrums Jülich und der RWTH-Aachen

### Kongresse / Workshops:

2005 vIBHT-Workshop im Forschungszentrum Jülich: Vortrag  
2005 Kandidatenseminar der Biologie II in Aachen: Vortrag  
2006 Cellular therapy of cancer symposium in Manchester, UK  
2007 vIBHT-Workshop in Monschau: Vortrag

Köln, den 22. April 2008

---

Caroline Kopecky