

**CCR7⁻ T-Zellen
benötigen CD28-OX40 Kostimulation
für die Immunrezeptor-vermittelte Tumorlyse**

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

vorgelegt von
Claudia Ederer aus München
Köln, April 2009

Berichterstatter: Prof. Dr. Hinrich Abken
Prof. Dr. Thomas Langer
Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Ansgar Büschges
Tag der Disputation: 22. 06. 2009

Abstract

Adoptive administration of *ex vivo* activated and expanded autologous tumor-reactive T cells is currently one of the most powerful immuno-therapeutic strategies that can induce objective clinical responses in patients with metastatic tumors. However, the efficacy of adoptive immunotherapy is often limited by the failure of *ex vivo* expanded T cells to persist *in vivo*. While recombinant single chain T cell receptors to graft tumor-specificity to effector cells get more and more improved, little progress has been made in identifying the effector cell population that performs best in redirected tumor cell elimination.

Since CCR7 determines T cell exit from peripheral tissues, we have explored whether CCR7⁻ T cells display enhanced efficacy in redirected immunotherapy due to their maintenance at the tumor site. CCR7⁻ T cells in comparison to CCR7⁺ T cells exhibit a number of properties which make them favorable candidates for a cytolytic T cell attack. These include the expression of large numbers of cytolytic effector molecules, the secretion of high amounts of IFN- γ upon stimulation via the recombinant immunoreceptor, which may enhance anti-tumor immune response by attracting macrophages, and the secretion of reduced amounts of IL-2, which avoids stimulation of regulatory T cells. Redirected CCR7⁻ T cells are more efficiently activated *in vitro* to lyse tumor cells than CCR7⁺ T cells. However, CCR7⁻ T cells, which include late effector, effector memory and terminally differentiated T cells, are prone to activation-induced cell death (AICD). Receptor-triggered CD28-CD3 ζ -OX40 stimulation, but not CD28-CD3 ζ stimulation, prevents apoptosis of CCR7⁻ T cells by Bcl-2 upregulation. Consequently, CCR7⁻ T cells redirected by a combined CD28-CD3 ζ -OX40 immunoreceptor performed superior in specific lysis of established tumors *in vivo* compared to CCR7⁺ T cells.

These results suggest that, in contrast to current strategies, redirecting CCR7⁻ T cells for adoptive therapy provide superior anti-tumor activities *in vivo* if stimulated by combined CD28-CD3 ζ -OX40 cosignaling.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	iii
1 Einleitung	1
1.1 Adoptive Immuntherapie und die Struktur von rekombinanten Immunrezeptoren	2
1.2 Ansprüche an eine Effektorzellpopulation	5
1.3 T-Zell-Effektorfunktionen	6
1.4 T-Zell-Subpopulationen	7
1.5 Bedeutung von Kostimulation in der T-Zell-Aktivierung	10
1.6 CC-Chemokin Rezeptor 7 (CCR7)	13
1.7 Zielsetzung	15
2 Material	18
2.1 Enzyme und Reaktionskits	18
2.2 Lösungen und Medien	19
2.3 Bakterienstämme	20
2.4 Zelllinien und primäre Zellen	20
2.4.1 Humane periphere blutmononukleäre Zellen (PBMCs)	20
2.4.2 Tumorzelllinien	20
2.5 Plasmide	22
2.6 Antikörper	23
3 Methoden	31
3.1 Mikrobiologische Methoden	31
3.1.1 Kultivierung und Lagerung von <i>E.coli</i> DH5 α Bakterien	31
3.1.2 Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> DH5 α	31

Inhaltsverzeichnis

3.1.3	Einbringen von DNS in kompetente <i>E.coli</i> DH5 α (Transformation)	32
3.2	Molekularbiologische Methoden	32
3.2.1	Isolation von Plasmid-DNS aus <i>E.coli</i> DH5 α	32
3.2.2	Agarosegelelektrophorese	33
3.2.3	DNS Konzentrationsbestimmung	33
3.2.4	Restriktion von DNS	34
3.3	Eukaryontische Zellkultur	34
3.3.1	Kultivierung eukaryontischer Zellen	34
3.3.2	Kryokonservierung eukaryontischer Zellen	35
3.3.3	Passage adhärenter Zellen	35
3.3.4	Gewinnung von peripheren blutmononukleären Zellen	35
3.3.5	„Magnetic-Activated Cell Sorting“ (MACS)	36
3.3.6	Stimulation von Lymphozyten durch Zytokine und Antikörper	37
3.3.7	Transfektion von 293T-Zellen mittels Lipofektion	37
3.3.8	Retrovirale Transduktion humaner T-Lymphozyten	38
3.3.9	XTT-basierter Viabilitätstest	39
3.3.10	BrdU Proliferationstest	39
3.3.11	Detektion apoptotischer Zellen	40
3.4	Durchflusszytometrische Analysen	40
3.4.1	Detektion von Oberflächenmarkern	40
3.4.2	Detektion intrazellulärer Marker	40
3.5	„Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)	41
3.6	Tumorinduktion in der Maus	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Isolierung und Charakterisierung von CCR7 ⁺ und CCR7 ⁻ T-Zell-Subpopulationen	43
4.1.1	Isolierung von CCR7 ⁺ und CCR7 ⁻ T-Zellen aus dem peripheren Blut	43
4.1.2	Stimulation der Proliferation CCR7 ⁺ und CCR7 ⁻ T-Zellen	49
4.1.3	Expression von Immunrezeptoren auf CCR7 ⁺ und CCR7 ⁻ T-Zellen	52
4.1.4	Expression von <i>Homing</i> -Rezeptoren auf CCR7 ⁺ und CCR7 ⁻ T-Zellen	55
4.1.5	Differenzierungsstatus von CCR7 ⁻ und CCR7 ⁺ T-Zellen	57
4.1.6	Zytokin-Expression der CCR7 ⁻ und CCR7 ⁺ T-Zellen	57

Inhaltsverzeichnis

4.1.7	CCR7 ⁻ T-Zellen besitzen ein höheres zytolytisches Potenzial als CCR7 ⁺ T-Zellen	62
4.2	CCR7 ⁻ T-Zellen sind <i>in vitro</i> zytolytisch aktiver als CCR7 ⁺ T-Zellen	65
4.2.1	Aktivierung von CD3 ⁺ CCR7 ⁻ T-Zellen <i>in vitro</i>	65
4.2.2	Spezifität der durch CCR7 ⁻ T-Zellen vermittelten Zytotoxizität	65
4.2.3	Aktivierung von CD4 ⁺ CCR7 ⁻ T-Zellen <i>in vitro</i>	67
4.3	Die hohe Apoptosefrequenz der CCR7 ⁻ T-Zellen kann unterdrückt werden	69
4.3.1	IL-7 und IL-15 erhöhen die Viabilität CCR7 ⁻ T-Zellen	69
4.3.2	CD28-OX40 Kostimulation schützt CCR7 ⁻ T-Zellen vor Apoptose	72
4.4	<i>In vitro</i> Generierung von CCR7 ⁻ T-Zellen	75
4.4.1	Proliferation fördert die Entstehung von CCR7 ⁻ T-Zellen	77
4.4.2	CCR7 ⁺ T-Zellen verlieren CCR7 durch Proliferation	80
4.4.3	IL-2/anti-CD3 Stimulation induziert mehr CCR7 ⁻ T-Zellen als anti-CD3/anti-CD28 Stimulation	82
4.4.4	Durch Proliferation <i>in vitro</i> generierte CCR7 ⁻ T-Zellen entsprechen isolierten CCR7 ⁻ T-Zellen in Zytokin- und Effektormolekül-Expression	84
4.5	CD28-OX40 kostimierte CCR7 ⁻ T-Zellen sind bessere anti-Tumor Effektoren <i>in vivo</i>	85
4.5.1	<i>In vivo</i> weisen CCR7 ⁻ T-Zellen mit CD28-OX40 Kostimulation bessere anti-Tumor Aktivität auf als CCR7 ⁺ T-Zellen	85
4.5.2	CCR7 ⁻ T-Zellen benötigen die kombinierte CD28-CD3ζ-OX40 Stimulation für ihre anti-Tumor Effektivität <i>in vivo</i>	90
4.5.3	CD28-OX40 kostimierte CCR7 ⁻ T-Zellen wirken bei systemischer Applikation effektiver gegen einen etablierten Tumor als CCR7 ⁺ T-Zellen	93
5	Diskussion	96
	Zusammenfassung	105
	Abkürzungsverzeichnis	106
	Literaturverzeichnis	108

1 Einleitung

Neoplasien sind eine der häufigsten Todesursachen weltweit. Sie werden durch die unstimulierte Proliferation einer maligne transformierten somatischen Zelle verursacht. Ein weiteres Charakteristikum maligner Neoplasien ist deren Fähigkeit zu metastasieren. Unterschiedliche molekulare Mechanismen ermöglichen es einzelnen Zellen, sich aus dem Primärtumor zu lösen, in das umgebende Gewebe zu infiltrieren, von dort in Blutgefäße und Lymphe überzutreten, um dann das Blut an einer anderen Stelle im Körper zu verlassen und dort einen sekundären Tumor zu bilden.

Die Beseitigung einer Krebserkrankung erfordert die Eliminierung aller malignen Zellen. Zahlreiche Primärtumore können nach heutigen Standards durch chirurgische Entfernung, Bestrahlung, zytostatische Chemotherapie oder eine Kombination dieser Methoden erfolgreich therapiert werden. Die Haupttodesursache bei Krebserkrankungen sind jedoch Metastasen, die gegen diese konventionellen Therapien resistent sind (Fidler, 2002, 2003). Abgesehen von den genannten Standardtherapien werden auch Therapeutika verwendet, die Tumor-spezifische Proteine gezielt deaktivieren. Hierzu zählen beispielsweise die Tyrosin-Kinase-Inhibitoren, wie Imatinib und Gefitinib, oder monoklonale Antikörper, wie Trastuzumab oder Rituximab, Angiogenese-Inhibitoren sowie Hormone. Immuntherapien stellen einen weiteren Ansatz zur Bekämpfung maligner Tumor-erkrankungen dar. Sie umfassen ein Repertoire an therapeutischen Strategien, um das Immunsystem des Patienten zur Tumoreliminierung zu aktivieren.

1.1 Adoptive Immuntherapie und die Struktur von rekombinanten Immunrezeptoren

Immuntherapien gegen Krebserkrankungen zielen darauf ab, effektive Immunantworten zur Erkennung und Eliminierung von Tumoren zu erzeugen und zeichnen sich im Gegensatz zu den konventionellen Therapien durch eine Antigen-spezifische anti-Tumor Reaktion aus.

Die Wirksamkeit von Immuntherapien unter Verwendung monoklonaler Antikörper beruht auf deren physiologischer Eigenschaft eine zytotoxische Immunreaktion beispielsweise durch Komplement-Aktivierung zu erzeugen. Diese Aktivität kann durch die Kopplung der Antikörper an zytotoxische Substanzen verstärkt werden. Der Einsatz monoklonaler Antikörper *in vivo* ist allerdings durch eine geringe Halbwertszeit, unzureichende Gewebepenetration sowie Reaktivität mit gesundem Gewebe limitiert (Pavoni *et al.*, 2006).

T-Lymphozyten können im Gegensatz zu Antikörpern Gewebe aktiv penetrieren (Yazdi *et al.*, 2006) und sind daher zu einer effektiven und gezielten anti-Tumor Reaktion in der Lage (Rosenberg, 1996). In der physiologischen anti-Tumor Immunantwort sind zytotoxische T-Zellen in Form von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) an der Kontrolle des Tumorwachstums beteiligt. Adoptiver Transfer *ex vivo* expandierter TILs von Tumorpatienten wird erfolgreich zur Therapie von Tumoren eingesetzt. Allerdings ist die Anwendungsmöglichkeit dieses Ansatzes durch den großen Aufwand der Präparation von TILs sowie der mangelnden Anzahl dieser Zellen in Tumorbiopsien beschränkt (Topalian *et al.*, 1989; Lewko *et al.*, 2000).

Eine weitere immuntherapeutische Strategie unter Vermeidung der individuellen Präparation von TILs und der Nutzung der Vorteile gewebe penetrierender zytotoxischer T-Lymphozyten ist die genetische Modifikation von T-Zellen mit Tumor-spezifischen rekombinanten T-Zell-Rezeptoren definierter Spezifität. Dabei wird T-Zellen unter Erhaltung ihres Effektor- und *Homing*-Potenzials die Spezifität für ein Tumor-assoziiertes Antigen (TAA) verliehen.

TAA-s wurden bei zahlreichen Tumoren nachgewiesen. Das karzinoembryonale Antigen (CEA) ist beispielsweise mit gastrointestinalen Karzinomen assoziiert (Goldstein und Mitchell, 2005), während CD30 spezifisch auf Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS) Zellen des Hodgkin-Lymphoms hochexprimiert wird (Schwab *et al.*, 1982). Obwohl TAA-s nicht ausschließlich auf Tumorzellen zu finden sind, sondern physiologisch in geringer Konzentration auf normalem Gewebe exprimiert werden, gelten sie als viel versprechende Ziele für Immuntherapien.

Für die adoptive Immuntherapie mit genetisch veränderten T-Zellen werden diese mit rekombinanten T-Zell-Rezeptoren versehen, die es den T-Zellen ermöglichen, definierte Tumor-spezifische Antigene zu erkennen. Rekombinante TCRs können aus α und β Kette eines TCR oder alternativ aus einer Polypeptidkette mit Antigen-bindender Domäne und intrazellulärer Signaldomäne bestehen (Immunrezeptor). Solche Immunrezeptoren setzen sich aus einer Antikörper-basierten Binde-domäne im extrazellulären Bereich sowie einer aus dem TCR stammenden Signaldomäne im intrazellulären Bereich zusammen. Intra- und extrazelluläre Domänen sind durch ein Gelenkstück mit Transmembrandomäne miteinander verbunden (Abbildung 1.1).

Die bevorzugt verwendeten Bindedomänen sind TAA-spezifische Einzelkettenfragmente (scFv), welche die variablen Regionen von sowohl der schweren (VH) als auch der leichten Kette (VL) eines monoklonalen Antikörpers vereinigen. Die bevorzugt verwendete Signaldomäne ist die aus T-Zellen entnommene CD3 ζ Kette, die gegebenenfalls mit zusätzlichen kostimulatorischen Signalketten, beispielsweise aus CD28, OX40 oder 4-1BB, kombiniert werden kann (Eshhar, 2008). Durch die Ausstattung mit dieser Art von Rezeptor kann T-Zellen Spezifität für jedes beliebige Antigen verliehen werden, sofern ein Antikörper verfügbar ist. Im Gegensatz zum physiologischen TCR, der ausschließlich durch MHC präsentierte Antigene erkennt, ist die durch den Immunrezeptor vermittelte Spezifität unabhängig von der Erkennung von MHCs.

Chimäre Rezeptoren werden *ex vivo* mit Hilfe retroviraler Vektoren in die autologen T-Zellen eines Tumorpatienten eingebracht und die Zellen anschließend *ex vivo* expandiert. Die modifizierten T-Zellen werden dem gegebenenfalls durch Lymphode-

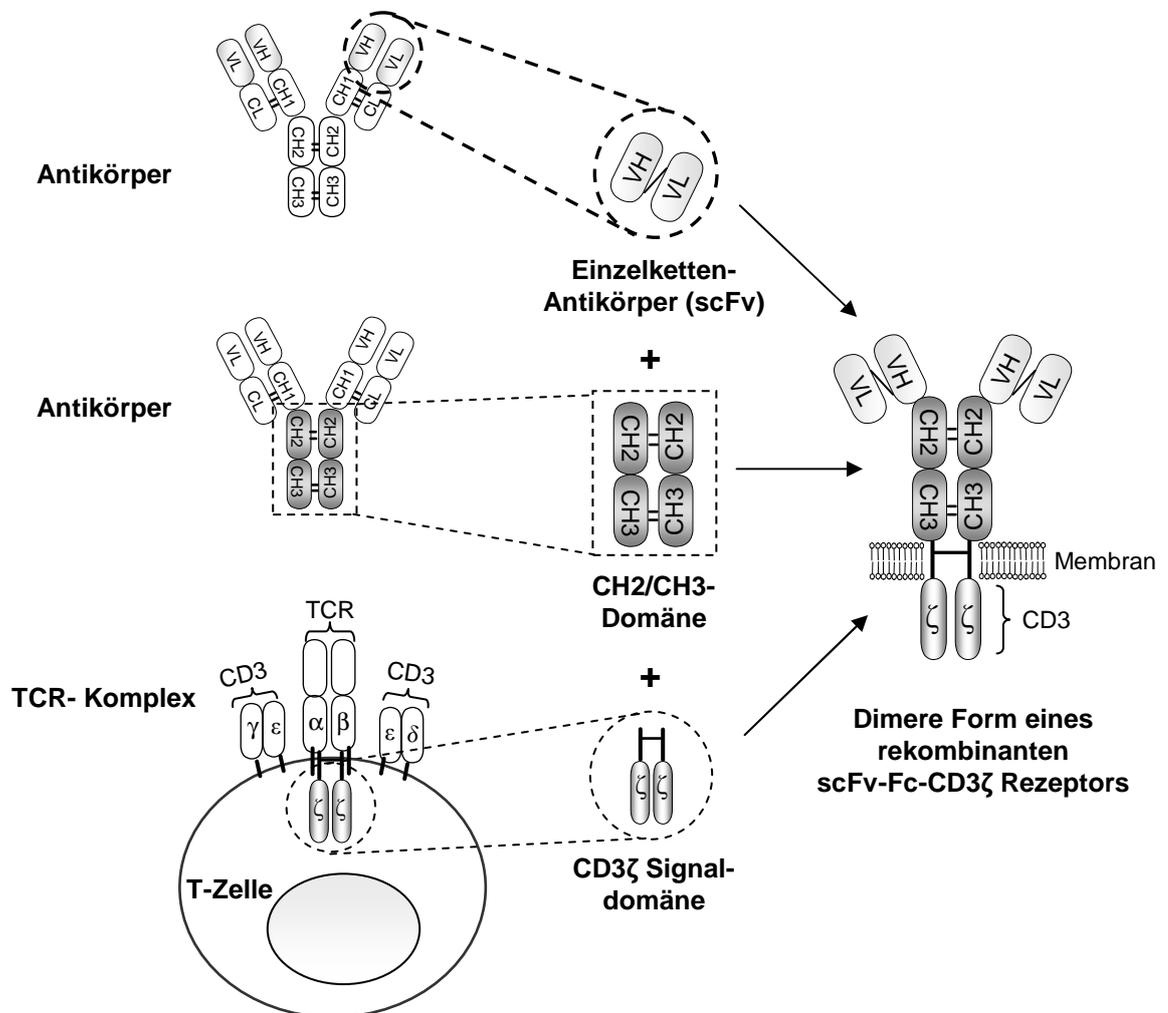


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines Antikörper-basierten rekombinanten Immunrezeptors. Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Immunrezeptoren bestehen aus einer Antikörper-basierten Bindedomäne (scFv) mit Spezifität für ein Tumor-assoziiertes Antigen, dem Fc-Teil eines humanen IgG₁ Antikörpers als stabilisierendes Bindeglied zwischen extra- und intrazellulärer Domäne sowie einer oder mehreren aus T-Zellen entnommenen intrazellulären Signaldomänen.

pletion vorkonditionierten Patienten transfundiert. Die durch Lymphodepletion vermittelte Beseitigung der verbliebenen Immunzellen im Körper führt zur Eliminierung von regulatorischen T-Zellen und zur Depletion endogener Zellen, die um aktivierende Zytokine konkurrieren (Gattinoni *et al.*, 2006). In klinischen Studien wurde als Folge der Immuntherapie mit T-Zellen mit rekombinanten Rezeptoren, wie zum Beispiel in Morgan *et al.*, 2006 beschrieben ist, ein Tumorrückgang bis hin zur totalen Remission erzielt.

1.2 Ansprüche an eine Effektorzellpopulation

Für eine effektive anti-Tumor Antwort müssen Effektorzellen zum Tumor migrieren, am Tumorort persistieren und inhibitorische Einflüsse des Tumormilieus überwinden. Weiterhin müssen sie anschließend noch in der Lage sein, ihre Effektorfunktion auszuführen, um den Tumor zu eliminieren.

Die Migration der T-Zellen zum Tumor erfordert spezifische *Homing*-Marker auf der Zelloberfläche, welche die Wanderung der T-Zellen in die Peripherie entlang eines Chemokin-Gradienten vermitteln. Um am Tumorort zu persistieren, wird neben migratorischen Eigenschaften auch die Resistenz der Effektorzellen gegenüber negativen Einflüssen der Tumorumgebung als Voraussetzung für eine erfolgreiche anti-Tumor Antwort benötigt. Tumore zeichnen sich unter anderem durch die Fähigkeit zur Vermeidung der Immunantwort aus. Die dabei angewandten Mechanismen beinhalten die Herabregulation von Tumor-spezifischen Oberflächenantigenen und kostimulatorischen Markern sowie die Expression von Fas Ligand und anderen pro-apoptotischen Molekülen auf der Oberfläche (Niehans *et al.*, 1997; Song *et al.*, 2001). Weiterhin sezernieren Tumore inhibitorische Zytokine wie IL-10 (Wang *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1995) und TGF- β (Newcom *et al.*, 1988; Newcom und Gu, 1995) und rekrutieren regulatorische T-Zellen (T_{reg}) zum Tumorort (Marshall *et al.*, 2004). All diese Faktoren müssen von adoptiv transferierten T-Zellen für eine effektive anti-Tumor Antwort überwunden werden.

1.3 T-Zell-Effektorfunktionen

Eine optimale anti-Tumor Immunreaktion ist abhängig vom Potenzial der applizierten Immunzellen, die bei Antigenkontakt durch den rekombinanten Immunrezeptor zur Ausführung von Effektorfunktionen stimuliert werden. Zytotoxische T-Zellen besitzen unterschiedliche Mechanismen, um Zielzellen zu eliminieren.

1. Die Ausschüttung zytotoxischer Granula spielt eine herausragende Rolle bei der Beseitigung von virusinfizierten oder Tumorzellen durch T-Zellen (Russell und Ley, 2002; Trapani und Smyth, 2002). Dabei polymerisiert Perforin in der Zellmembran der Zielzelle, was zur Bildung von Poren führt, durch die Granzyme eindringen können. Granzyme sind Serinproteasen die im Zytoplasma von Zielzellen die Aktivierung von Caspasen auslösen, was schließlich zum programmierten Zelltod der Zelle führt. Humane T-Zellen exprimieren 5 Subtypen, von denen die Subtypen Granzym A und B für diese Arbeit relevant sind. Granzym A ist eine Trypsinase, die Proteine an der Position eines Lysins oder Arginins spaltet. Granzym B ist das potenteste pro-apoptotische Mitglied der Granzymfamilie, da es Caspase-artige Eigenschaften besitzt und Substrate an zentralen Asparaginsäureresten spaltet. So ist Granzym B in der Lage, mehrere Procaspasen sowie iCAD (*Inhibitor of Caspase activated DNase*) durch proteolytische Spaltung zu aktivieren (Trapani, 2001).
2. Ein weiterer Mechanismus ist die Bindung des auf der T-Zell-Oberfläche exprimierten Fas Ligand (CD178) an den Fas Rezeptor (CD95) auf der Oberfläche einer Zielzelle. Die Bindung führt zur Trimerisierung des Fas Rezeptors und löst in der Zielzelle eine Kaskade von apoptotischen Molekülen aus, die den programmierten Zelltod einleitet. Fas-FasL Interaktion führt nicht nur zur Eliminierung von Zielzellen einer T-Zell-Antwort. Auch T- und B- Zellen werden im Rahmen der Lymphozyten-Homeostase auf diese Weise eliminiert (Russell und Ley, 2002).
3. Die Sekretion von IFN- γ verleiht T-Zellen neben der exekutiven Funktion anhand zytolytischer Effektormoleküle oder FasL zusätzlich ein indirektes Potenzial zur Einflussnahme auf Immunantworten. IFN- γ kann durch die Aktivierung

von Makrophagen in physiologischen Immunantworten antiviral, immunregulatorisch oder antitumoral wirken (Schroder *et al.*, 2004). Die Funktion von IFN- γ in endogenen anti-Tumor Mechanismen wird in IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen deutlich, da diese anfälliger für chemisch induzierte Sarkome (Kaplan *et al.*, 1998) sowie für spontane epitheliale Tumore sind (Shankaran *et al.*, 2001).

Die Expression von IFN- γ , Perforin und Granzymen nimmt im Lauf der T-Zell-Entwicklung zu, wie in Abbildung 1.2 für CD8⁺ T-Zellen dargestellt ist. Da unterschiedliche T-Zell-Subpopulationen unterschiedliches zytolytisches Potenzial besitzen, stellt sich die Frage, ob eine anti-Tumor Immuntherapie durch die Verwendung einer T-Zell-Subpopulation mit besonders hohem zytolytischen Potenzial optimiert werden kann. In diesem Zusammenhang müsste eine Vorgehensweise zur Identifizierung und Isolierung der betreffenden Population entwickelt werden. Dieses erfordert jedoch eine besondere Berücksichtigung spezifischer Eigenschaften der jeweiligen T-Zell-Subpopulationen.

1.4 T-Zell-Subpopulationen

T-Zell-vermittelte Immunantworten werden in den T-Zell-Regionen der sekundären lymphatischen Gewebe initiiert. Naive T-Zellen exprimieren unter anderem CD62L (L-Selektin), welches mit CD34 und GlyCAM auf Endothelzellen der Lymphknoten und der Milz interagiert und die Migration der Zellen in diese Gewebe fördert (Mebius *et al.*, 1993). Dort treffen naive T-Zellen, weiterhin auch gekennzeichnet durch die Expression von CCR7 (Campbell *et al.*, 1998) sowie des RA Isotyps von CD45 (Merkenschlager *et al.*, 1988), auf Antigen-beladene, professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APCs) und werden bei Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen unter geeigneter Kostimulation aktiviert. Die Antigen-vermittelte Aktivierung naiver T-Zellen führt zur ihrer klonalen Expansion sowie zur Differenzierung in Effektor T-Zellen (Butcher und Picker, 1996).

Die Funktion Antigen-erfahrener Effektor T-Zellen ist die Beseitigung infizierter Zellen und die Aktivierung von Makrophagen in Entzündungsläsionen. Die Migration in

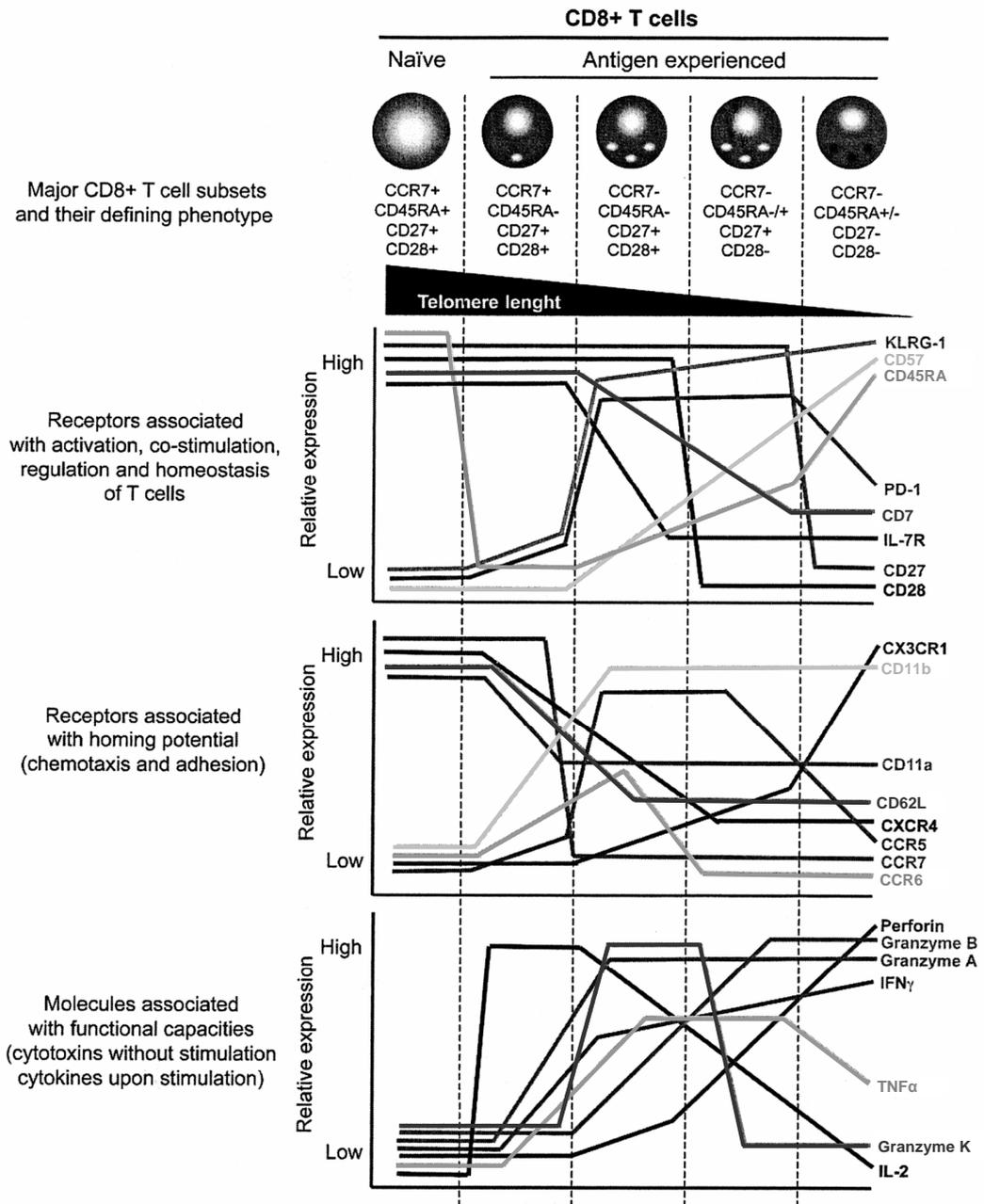


Abbildung 1.2: Phänotypische Zusammenhänge der CD8⁺ T-Zell-Subpopuolationen und deren funktionale Attribute. Entwicklung der CD8⁺ Zellen und ihre Expression von Oberflächenrezeptoren, Zytokinen und Effektormolekülen. Aus Appay *et al.*, 2008.

diese Läsionen wird durch *Homing*-Rezeptoren, deren Expression zur Wanderung der Zellen in periphere Gewebe führt, vermittelt. Zu diesen Rezeptoren zählen unter anderem CD103, dessen Expression zur Einwanderung in den Darm führt. CCR10 vermittelt Darm- und Haut-*Homing* und CCR4 und CLA die Migration der Zellen in die Haut (Sigmundsdottir und Butcher, 2008).

Nach Antigen-vermittelter klonaler Expansion und Differenzierung stirbt die Mehrzahl der an der primären Immunantwort beteiligten T-Zellen. Nur eine kleine Population bleibt in Form von Gedächtniszellen zurück (Callan *et al.*, 2000; Harari *et al.*, 2002). Die ausgesprochene Langlebigkeit dieser Zellen beruht auf der Expression überlebensfördernder Proteine wie beispielsweise Bcl-2 (Grayson *et al.*, 2000). Phänotypisch sind Gedächtnis T-Zellen zunächst durch die Expression des RO Isotyps von CD45 auf der Oberfläche gekennzeichnet (Merkenschlager *et al.*, 1988). Es gibt zwei Gruppen von Gedächtnis T-Zellen: eine protektive und eine reaktive Subpopulation, die anhand von *Homing*- und Effektoreigenschaften unterschieden werden können. Die reaktive Fraktion wird durch die zentralen Gedächtniszellen (T_{CM}) gebildet. Sie exprimieren die für das *Homing* in Lymphknoten notwendigen Rezeptoren CD62L sowie CCR7, haben eingeschränkte Effektorfunktion und die Fähigkeit, bei Antigenkontakt effektiv zu expandieren (Butcher und Picker, 1996). T_{CM} -Zellen wandern auf der Suche nach ihrem spezifischen Antigen bevorzugt durch die T-Zell-Zonen der sekundären lymphatischen Gewebe. Bei Antigenkontakt erfolgt Proliferation sowie die Differenzierung zu Effektorzellen. Die Effektor-Gedächtnis T-Zellen (T_{EM}) vermitteln unmittelbaren Schutz in peripheren Geweben. T_{EM} -Zellen exprimieren kein CCR7, sind heterogen bezüglich der Expression von CD62L und in der Lage, sofortige Effektorfunktion auszuführen. Im Gegensatz zu zentralen Gedächtniszellen besitzen sie eine Vielzahl migratorischer und zytolytischer Fähigkeiten, die bei ihrer Wanderung in entzündetes, peripheres Gewebe zum Einsatz kommen. Die Abbildung 1.3 zeigt das Expressionsprofil unterschiedlicher Oberflächenmarker der Gedächtnis T-Zell-Subpopulationen.

Ursprünglich wurde die Expression der CD45 Isotypen zur Differenzierung zwischen naiven $CD45RA^+ CD45RO^-$ und aktivierten $CD45RA^- CD45RO^+$ T-Zellen verwendet (Merkenschlager *et al.*, 1988; Young *et al.*, 1997). Nach heutigem Wissensstand können Antigen-erfahrene T-Zellen jedoch wieder zur CD45RA Isoform wechseln. Diese Zellen

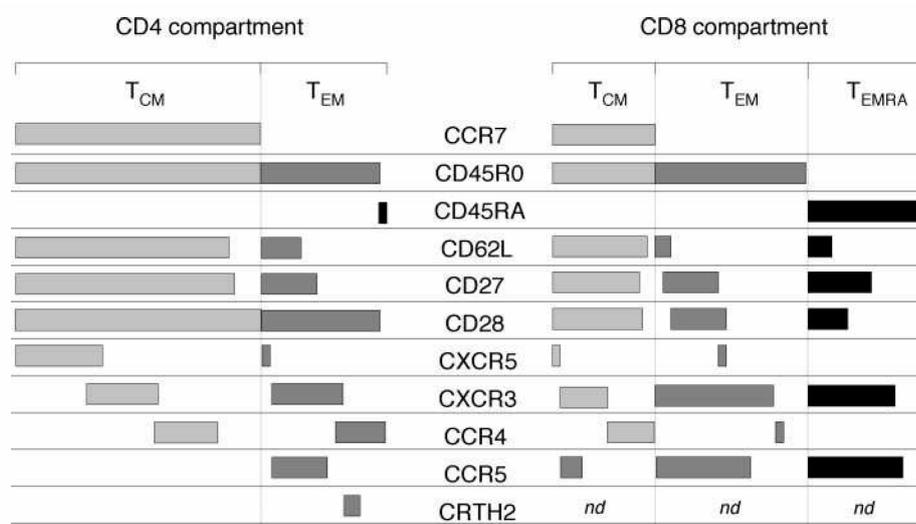


Abbildung 1.3: Phänotypische Heterogenität humaner Gedächtnis T-Zellen.

Aus Sallusto *et al.*, 2004; nd=not defined

sind weiterhin durch einen CCR7⁻ und weitgehend CD62L⁻ Phänotyp gekennzeichnet und werden als terminal differenzierte T-Zellen (T_{EMRA}) bezeichnet (Abbildung 1.3). Sie akkumulieren im normalen Alterungsprozess in der CD8⁺ T-Zell-Population (Hamann *et al.*, 1997; Sallusto *et al.*, 1999b).

1.5 Bedeutung von Kostimulation in der T-Zell-Aktivierung

Die Aktivierung von T-Zellen erfolgt durch die Übermittlung von Signalen durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APCs). Hierbei wird zwischen primären Signalen, die über die Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit einem durch MHC präsentierte Antigen induziert werden, und sekundären, so genannten kostimulatorischen Signalen, unterschieden. Kostimulatorische Signale werden unter anderem durch CD28, CD40L, PD-1, OX40 und 4-1BB und deren jeweilige Liganden vermittelt. Die Abwesenheit kostimulatorischer Signale führt zur Anergie und schließlich zur Apoptose von T-Zellen.

Für die Immuntherapie eingesetzte Immunrezeptoren können den T-Zellen, abhängig von den in den Rezeptor integrierten intrazellulären Signaldomänen, verschiedene Signale vermitteln. T-Zellen, die lediglich das primäre Signal in Form einer CD3 ζ Kette erhalten, sind in der Lage, effektiv Zytotoxizität zu vermitteln. Diese Zellen sind jedoch durch eine erhöhte Anfälligkeit für den Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) und geringe *in vivo* Persistenz gekennzeichnet (Wang *et al.*, 2007). Durch Integration intrazellulärer kostimulatorischer Signaldomänen in den chimären CD3 ζ Rezeptor bekommt die Rezeptor-tragende T-Zelle bei Kontakt mit dem spezifischen Antigen das CD3 ζ Signal und Kostimulation gleichzeitig. Dies ist vor allem dann notwendig, wenn Zielzellen die Liganden für kostimulatorische Moleküle nicht exprimieren, wie es bei vielen Tumoren der Fall ist. Die Verwendung von Kombinationen kostimulatorischer Signalketten führt zur Erhaltung und Optimierung der anti-Tumor Aktivität von T-Zellen (Abken *et al.*, 2002).

Kostimulation durch CD28 Interaktion mit seinen Liganden ist der wichtigste kostimulatorische Signalweg zur T-Zell-Aktivierung (Greenwald *et al.*, 2005). Das Einfügen der intrazellulären CD28 Domäne in den Immunrezeptor führt zu verstärkter Proliferation, gesteigerter Sekretion von IL-2 (Hombach *et al.*, 2006) und zu einer verminderten Anfälligkeit für AICD der Rezeptor-tragenden T-Zellen (Emtage *et al.*, 2008). Die TGF- β vermittelte Inhibition der Proliferation von T-Zellen am Tumorort, welche zur Unterdrückung der Immunantwort beiträgt, wird durch das kombinierte CD28-CD3 ζ Signal überwunden (Koehler *et al.*, 2007). Dies führt zu einer größeren Effektivität der durch Rezeptor kostimulierten T-Zellen *in vivo* (Emtage *et al.*, 2008). Allerdings ist CD28 Kostimulation allein zur Expansion von CD8⁺ CTLs nicht ausreichend (Laux *et al.*, 2000; Deeths *et al.*, 1999; Maus *et al.*, 2002). Für diese Aufgabe kommt weiteren kostimulatorischen Proteinen, wie beispielsweise OX40, eine bedeutende Rolle zu.

Während CD28 ein kostimulatorisches Signal in der frühen T-Zell-Aktivierung liefert, ist OX40 an der Kostimulation späterer T-Zell-Differenzierungsstadien beteiligt. Der OX40 Rezeptor, ein Mitglied der TNFR Superfamilie, vermittelt bei Bindung an den OX40 Liganden ein kostimulatorisches Signal, welches die Zytokin Produktion steigert (Baum *et al.*, 1994), das Überleben von Zellen durch Induktion der Expression von Bcl-2 und Bcl-xL fördert (Rogers *et al.*, 2001), die klonale Expansion naiver CD4⁺

T-Zellen induziert (Gramaglia *et al.*, 1998) und Gedächtniszellen durch die Förderung des Überlebens von Effektor T-Zellen generiert (Maxwell *et al.*, 2000). OX40 Signalgebung ist ebenfalls unerlässlich für die Expansion von Gedächtnis T-Zellen in sekundären Immunantworten und bei der Verlängerung ihres Überlebens (Jember *et al.*, 2001). Finney *et al.*, 2004 zeigten, dass im Vergleich verschiedener kostimulatorischer Signaldomänen in Kombination mit der CD3 ζ Signalkette in einem Immunrezeptor die CD28 Signaldomäne ruhende T-Zellen besser aktivierte als zum Beispiel OX40 oder 4-1BB. Um die zusätzlichen Vorteile der Stimulation durch Moleküle, die in späteren T-Zell-Entwicklungsstadien relevant sind, zu nutzen, besteht die Möglichkeit, Immunrezeptoren mit den drei intrazellulären Signalketten beispielsweise von CD28, CD3 ζ und OX40 zu verwenden.

Immunrezeptoren mit lediglich der CD3 ζ Kette als Signalgebender Domäne werden als Immunrezeptoren „erster Generation“ bezeichnet. Immunrezeptoren „zweiter Generation“ besitzen eine und Immunrezeptoren „dritter Generation“ besitzen zwei kostimulatorische Signalketten zusätzlich zur CD3 ζ Kette. Die Verwendung von Immunrezeptoren „erster Generation“ wurde in ersten klinischen Studien als sicher eingestuft. Allerdings wurde eine geringe Persistenz der Rezeptor-tragenden Zellen *in vivo* festgestellt. Korrelierend damit wurde bei nur wenigen Patienten ein objektiver Rückgang der Tumorlast beobachtet (Kershaw *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2007; Till *et al.*, 2008).

Um den Therapieerfolg zu steigern, werden unterschiedliche Strategien verfolgt. Derzeitig durchgeführte klinische Studien verwenden Rezeptoren „zweiter Generation“ mit den Signalketten von CD28 und CD3 ζ zur kombinierten Stimulation der adoptiv transferierten T-Zellen. Vorarbeiten demonstrieren die bessere Eignung dieser Rezeptoren in einem CEA⁺ Tumormodell (Emtage *et al.*, 2008). Darüber hinaus wird der Verwendung von Immunrezeptoren „dritter Generation“ hohes Potenzial beigemessen. In diesem Zusammenhang wurde in einem präklinischen Modell von der Eliminierung großer etablierter Tumore durch T-Zellen mit Rezeptor-vermittelten Signalen von CD28, 4-1BB und CD3 ζ berichtet (Carpenito *et al.*, 2009).

Weitere Strategien sehen den Einsatz besonders effektiver T-Zell-Subpopulationen vor. Berger *et al.*, 2008 beschreiben eine bessere *in vivo* Persistenz von aus zentralen Ge-

dächtnis T-Zellen (T_{CM}) gewonnenen Effektor-T-Zellen im Vergleich zu aus Effektor-Gedächtnis T-Zellen (T_{EM}) generierten Effektor T-Zellen. Da die *in vivo* Persistenz adoptiv transferierter T-Zellen unmittelbar mit dem Tumorrückgang korreliert (Robbins *et al.*, 2004), werden T_{CM} -Zellen als mögliche Effektorpopulation für die adoptive Immuntherapie favorisiert.

T-Zell-Subpopulationen werden durch die Expression von Oberflächenmarkern charakterisiert. Späte Effektor T-Zellen, Effektor-Gedächtnis T-Zellen sowie enddifferenzierte T-Zellen zeichnen sich durch die Abwesenheit des CC-Chemokinrezeptors 7 (CCR7) und eine Reihe weiterer Eigenschaften aus, die sie zu attraktiven Effektoren für eine adoptive Immuntherapie macht.

1.6 CC-Chemokin Rezeptor 7 (CCR7)

Chemokine sind chemotaktisch wirkende Cytokine und vermitteln Chemotaxis von Lymphozyten und phagozytischen Zellen. Durch Koordination der Lokalisation von Immunzellen im Körper übernehmen sie eine zentrale Rolle bei der Generierung von Immunantworten an Entzündungsorten (Viola und Luster, 2008; Rot und von Andrian, 2004; Allen *et al.*, 2007). Chemokine wirken durch ihre Bindung an spezifische Rezeptoren. Chemokinrezeptoren bestehen aus 7 die Zellmembran durchspannende α -Helices. Diese Rezeptoren interagieren mit G-Proteinen, wodurch ein Signal in die Zelle geleitet wird. CC- und CXC-Chemokine bilden die beiden Hauptgruppen innerhalb der Chemokin-Familie. Bei CC-Chemokinen liegen in der Nähe des Aminoterminus zwei Cysteine nebeneinander, während bei CXC-Chemokinen die entsprechenden zwei Cysteine durch eine einzelne andere Aminosäure getrennt sind. Bisher wurden über 50 Chemokine und 20 Chemokinrezeptoren identifiziert (Bromley *et al.*, 2008).

Nach der Selektion im Thymus differenzieren nur solche naiven T-Zellen zu Effektorzellen, die ihrem spezifischen Antigen in einem definierten molekularen Kontext begegnen. Chemokine sind in diesem Zusammenhang maßgeblich verantwortlich für die Rekrutierung von Lymphozyten und APCs aus dem peripheren Blut, deren

zielgerichtete Migration durch die unterschiedlichen Zonen der sekundären lymphatischen Gewebe und schließlich für die Auswanderung und Migration zu weiteren sekundären lymphatischen Geweben. Während naive T-Lymphozyten durch die sekundären lymphatischen Organe zirkulieren, exprimieren Antigen-erfahrene T-Zellen im Rahmen ihrer Differenzierung Chemokinrezeptoren, welche die T-Lymphozyten zur Immunüberwachung sowie zur Antwort auf Entzündungsfaktoren in spezifische Gewebe hineinführen und innerhalb dieser Gewebe leiten (Bromley *et al.*, 2008).

Die Abwesenheit des CC-Chemokin Rezeptors 7 (CCR7) auf der Oberfläche von T-Zellen geht mit besonderen migratorischen Eigenschaften einher. Bromley *et al.*, 2005 zeigten, dass sowohl CCR7⁺ als auch CCR7⁻ Effektor T-Zellen in die Lunge asthmatischer Mäuse übertreten. CCR7⁺ T-Zellen wandern in die afferente Lymphe weiter, während CCR7⁻ T-Zellen akkumulieren. In einem homologen Ansatz von Debes *et al.*, 2005 wurde nachgewiesen, dass beim Vergleich der Injektion von Splenozyten einer CCR7^{-/-} Maus oder einer Wildtyp Maus in die Peripherie von Empfänger-Mäusen lediglich Wildtyp Splenozyten, nicht aber die CCR7^{-/-} Splenozyten in die drainierenden Lymphknoten auswandern. CCR7⁻ T-Zellen sind offenbar nicht in der Lage, wieder in die Zirkulation einzutreten. CCR7 scheint daher die molekulare Basis für den Austritt von T-Lymphozyten aus peripheren Geweben in die afferente Lymphe und drainierende Lymphknoten darzustellen. Dieser Befund ist die Grundlage für die Annahme, dass die Verwendung CCR7⁻ T-Zellen in der adoptiven Immuntherapie zu einer Akkumulation dieser Zellen am Tumorort führt.

CCR7 wird von T-, B- und dendritischen Zellen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der zielgerichteten Wanderung dieser Zellen (Cyster, 1999; Moser und Loetscher, 2001). Die Liganden von CCR7, CCL19 (Synonyme: ELC, MIP-3 β) und CCL21 (Synonym: SLC) werden auf Endothel- und Stromazellen innerhalb der T-Zell-Zonen in Milz, Lymphknoten und „Peyers Patches“ konstitutiv exprimiert (Cyster, 1999). Die physiologische Funktion von CCR7 wird in CCR7^{-/-} Mäusen (Forster *et al.*, 1999) sowie Mäusen mit einem Defekt in der Expression der CCR7 Liganden CCL19 und CCL21 (*plt/plt*-Mutante: Nakano *et al.*, 1998) deutlich. Lymphknoten von CCR7^{-/-} Tieren beinhalten weit weniger Zellen als solche von Wildtyp Tieren, da das *Homing* in die T-Zell-Zonen der Lymphknoten gestört ist (Gunn *et al.*, 1999; Nakano *et al.*, 1998). Wei-

terhin weisen Lymphknoten von CCR7^{-/-} Tieren eine gestörte Gewebearchitektur auf, da ihnen die Kompartimentierung in B-Zell-Follikel und parakortikale T-Zell-Zonen fehlt (Forster *et al.*, 1999). CCR7 ist durch die Koordination migratorischer Ereignisse auch wesentlich an der Kompartimentierung des Thymus beteiligt (Ueno *et al.*, 2004; Misslitz *et al.*, 2006, 2004; Kurobe *et al.*, 2006). Beide Mutanten weisen eine veränderte Thymus-Morphologie, verminderte Thymozyten-Zahlen sowie eine abnorme T-Zell-Entwicklung auf (Misslitz *et al.*, 2004). Im Hinblick auf diese Phänotypen werden zwei Hauptfunktionen von CCR7 und seinen Liganden deutlich: Zum einen reguliert CCR7 das *Homing* Antigen-präsentierender Zellen und T-Zellen in die sekundären lymphatischen Organe (Forster *et al.*, 1999; Gunn *et al.*, 1999) und zum anderen hat es Einfluss auf deren funktionale Organisation und Struktur (Reif *et al.*, 2002; Ohl *et al.*, 2003).

Mit steigendem Alter und Differenzierungsgrad stellen Effektor T-Lymphozyten die CCR7 Expression ein, wodurch sie nicht mehr in sekundäre lymphatische Gewebe, sondern bevorzugt in die Körperperipherie wandern. Damit ist sowohl der Erwerb zytolytischen Potenzials als auch ein Alterungsprozess verbunden, der die Zellen zunehmend empfänglich für den Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) sein lässt. Allerdings ist der Verlust von CCR7 während der Entwicklung reversibel. So können sich beispielsweise murine CCR7⁻ T_{EM}-Zellen nach Eliminierung des spezifischen Antigens in CCR7⁺ T_{CM}-Zellen umwandeln (Wherry *et al.*, 2003) und die Stimulation von Virus-spezifischen CCR7⁻ T-Zellen mit Antigen *in vitro* induziert die Expression von CCR7 (Champagne *et al.*, 2001; van Leeuwen *et al.*, 2002; Sallusto *et al.*, 1999a).

1.7 Zielsetzung

Adoptive Immuntherapie mit genetisch modifizierten T-Zellen ist eine viel versprechende Methode zur Bekämpfung metastasierender Tumore. T-Zellen werden hierfür *ex vivo* mit chimären Immunrezeptoren spezifisch für Tumor-assoziierte Antigene versehen, expandiert und in den Patienten reinfundiert. In mehreren klinischen Studien unter Verwendung derartig genetisch modifizierter T-Zellen wurde die Sicher-

heit des therapeutischen Konzepts dokumentiert. Die Effektivität der Immuntherapie ist jedoch durch mangelnde Persistenz der infundierten T-Zellen eingeschränkt. Während die modulare Komposition chimärer Immunrezeptoren immer weiter optimiert wird, ist bisher nur wenig über die für die Immuntherapie am besten geeignete Effektorzellpopulation bekannt. Systemisch applizierte Effektorzellen müssen zum Tumorort migrieren und dort ihre Effektorfunktion ausführen, was die Persistenz von Effektorzellen mit möglichst großem zytolytischen Potenzial am Tumorort erfordert.

Diese Arbeit befasst sich mit der Hypothese, dass das Chemokin-gesteuerte, migratorische Verhalten von T-Zellen einen wesentlichen Einfluss auf die Effektivität einer anti-Tumor Antwort mit adoptiv transferierten T-Zellen nimmt. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob sich die mit der Abwesenheit des CC-Chemokin-Rezeptors 7 (CCR7) auf der Zelloberfläche einhergehenden Eigenschaften einer T-Zell-Subpopulation auf die anti-Tumor Effektivität auswirken.

Für die Verwendung von CCR7⁻ T-Zellen spricht, dass sie nicht aus dem Gewebe auswandern können, wodurch eine Akkumulation dieser Zellen am Tumorort begünstigt ist. Die Subpopulation der CCR7⁻ T-Zellen schließt späte Effektor T-Zellen, Effektor-Gedächtnis T-Zellen sowie enddifferenzierte T-Zellen (T_{EMRA}) ein. Diese Populationen verfügen über *Homing*-Rezeptoren für die Peripherie, wo der Tumor lokalisiert ist, sowie über verschiedene Effektormechanismen, die eine unmittelbare Immunantwort bewirken können. Dabei stellt sich das Problem, dass ältere und differenziertere T-Zellen zwar durch ein hohes zytolytisches Potenzial *in vitro*, jedoch auch durch replikative Seneszenz und erhöhte Anfälligkeit für AICD gekennzeichnet sind und daher als ungeeignet für *in vivo* Applikationen betrachtet werden.

Um CCR7⁻ T-Zellen auf ihre Eignung als Effektorpopulation für die adoptive Immuntherapie gegen Tumore zu prüfen, wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Schritte gewählt:

1. Humane CCR7⁻ vs. CCR7⁺ T-Zellen wurden hinsichtlich der Expression zytolytischer Effektormoleküle, Zytokine und *Homing*-Rezeptoren charakterisiert.

2. Es wurde ein Protokoll zur präparativen Isolierung von humanen CCR7⁻ T-Zellen der CD3⁺ Population mit Hilfe magnetischer Zellseparationstechnologie erarbeitet.
3. Die Antigen-spezifische Aktivierung und zytolytische Aktivität der CCR7⁻ vs. CCR7⁺ T-Zellen *in vitro* wurde nach Stimulation durch einen rekombinanten Immunrezeptor analysiert.
4. Die optimale Stimulation der CCR7⁻ T-Zellen wurde durch einen Vergleich von Rezeptoren mit unterschiedlichen kostimulatorischen Signalketten ermittelt.
5. Die Kinetik der Immunrezeptor-vermittelten Tumoreliminierung *in vivo* wurde nach lokaler oder systemischer Applikation von CCR7⁻ vs. CCR7⁺ T-Zellen analysiert.

Durch die Verwendung von CCR7⁻ T-Zellen sollte geprüft werden, ob sich diese Subpopulation, anhand der viel versprechenden Eigenschaften, als eine wirksame Effektorpopulation für die Immuntherapie erweist.

2 Material

2.1 Enzyme und Reaktionskits

Method	Enzyme/Kits	Hersteller
Apoptose-Detektion	Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Proliferationstest	Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
Zellfixierung und -permeabilisierung	BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/ Permeabilisation Kit	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
DNS-Amplifikation	Taq DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
DNS-Restriktion	Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland; Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
DNS-Sequenzierung	BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Warrington, England

Material

Plasmid- präparation	Plasmid Miniprep Kit I	PeqLab, Erlangen, Deutschland
	Qiagen Midiprep Kit, Qiagen Maxiprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Transfektion	PolyFect [®] , SuperFect [®]	Qiagen, Hilden, Deutschland
Viabilitätstest	Cell Proliferation Kit II (XTT), Cell Proliferation ELISA	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
Zellsortierung	Pan T Cell Isolation Kit II, CD3, CD4 und CD8 Isolation Kits, Rat anti-Maus IgM „MicroBeads”, anti-FITC, anti-APC und anti-PE „MicroBeads”	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland

2.2 Lösungen und Medien

Die Zusammensetzung der verwendeten Standardlösungen und -medien ist in Sambrook *et al.*, 1996, Ausubel *et al.*, 1995 und Coligan *et al.*, 1995 beschrieben und wird in den jeweiligen Methoden detailliert aufgeführt. Alle Lösungen und Medien wurden mit ddH₂O angesetzt und der pH-Wert gegebenenfalls mit 1 M HCl oder 1 M NaOH eingestellt. Zur Sterilisation wurden die Lösungen und Medien vor ihrer Verwendung bei 121 °C und 1 bar für 25 min autoklaviert. Thermolabile Substanzen wurden durch eine Membran mit 0,2 µm Porengröße sterilfiltriert.

2.3 Bakterienstämme

Zur Amplifikation von Plasmiden wurde der *E.coli*-Stamm DH5 α (F⁻, endA, hsdR17, supE44, thi-1, recA1, gyrA, relA1, Δ (lacZYA-argF), ϕ 80d lacZ Δ M15) verwendet (Ausubel *et al.*, 1995).

2.4 Zelllinien und primäre Zellen

2.4.1 Humane periphere blutmononukleäre Zellen (PBMCs)

Humane periphere blutmononukleäre Zellen wurden aus „Buffy Coats“, die bei der Erythrozyten- und Thrombozyten-Gewinnung erhalten werden, isoliert. Die „Buffy Coats“ wurden aus der Transfusionsmedizin der Uniklinik Köln bezogen und entstanden im Rahmen der Fraktionierung des Blutes gesunder Spender. In Kapitel 3.3.4 ist die Vorgehensweise zur Isolation von PBMCs aus „Buffy Coats“ beschrieben.

2.4.2 Tumorzelllinien

Name	Eigenschaften	Referenz
293T	Derivat der humanen Nierenkarzinom-Zelllinie 293, exprimiert das SV40 large T-Antigen; G418 resistent	Pear <i>et al.</i> , 1993; Bolhuis <i>et al.</i> , 1998
BW2064/ 36	Murine Hybridoma-Zelllinie; sezerniert monoklonalen mIgG ₁ Antikörper mit Spezifität für die Bindedomäne des CEA spezifischen BW431/26 Antikörpers	Kaulen <i>et al.</i> , 1993

Material

LS174T	CEA ⁺ und Tag72 ⁺ humane Kolonkarzinom-Zelllinie	ATCC: CL-188™
Colo320	CEA ⁻ und Tag72 ⁻ humane Kolonkarzinom-Zelllinie	ATCC: CLL-220.1™
L540	CD30 ⁺ humane Hodgkinlymphom-Zelllinie	Diehl <i>et al.</i> , 1982
L1236	CD30 ⁺ humane Hodgkinlymphom-Zelllinie	Wolf <i>et al.</i> , 1996; Kanzler <i>et al.</i> , 1996
C15A3	CEA ⁺ murine Kolonkarzinom-Zelllinie; Derivat von MC38;	J. Shively, Duarte, CA, USA
MC38	CEA ⁻ murine Kolomkarzinom-Zelllinie	Corbett <i>et al.</i> , 1975
OKT3	Murine Hybridoma-Zelllinie, sezerniert den momoklonalen Maus IgG _{2a} Antikörper OKT3 mit Spezifität für humanes CD3	ATCC:CRL-8001™
15E8	Murine Hybridoma-Zelllinie, sezerniert den monoklonalen Maus IgG ₁ Antikörper 15E8 mit Spezifität für humanes CD28	R. van Lier, NCB, Amsterdam, NL
Myla	CD30 ⁺ humane CTCL-Zelllinie	Kaltoft <i>et al.</i> , 1992

2.5 Plasmide

Nr. *	Vektor, Konstrukt	Referenz
392	pCOLT-GALV, retrovirales Helferplasmid, enthält die Expressionskassette für das GALV Gen <i>env</i>	Weijtens <i>et al.</i> , 1998
393	pHIT60, retrovirales Helferplasmid, enthält die Expressionskassette für die MoMLV Gene <i>gag</i> und <i>pol</i> Protein	Weijtens <i>et al.</i> , 1998
439	pSTITCH-BW431/26scFv-Fc-CD3 ζ	Hombach <i>et al.</i> , 2000
523	pBullet-HRS3scFv-Fc-CD3 ζ	unveröffentlicht
607	pBullet-BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 ζ	Hombach <i>et al.</i> , 2001
926	pBullet-HRS3scFv-Fc-CD28-CD3 ζ	unveröffentlicht
848	pBullet-BW431/26scFv-Fc-CD4-CD3 ζ -OX40	unveröffentlicht
975	pBullet-BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 ζ -OX40	unveröffentlicht

* interne Labor-Nummer

Die aufgeführten Rezeptoren mit den in Abbildung 2.1 schematisch dargestellten Konstrukten wurden verwendet, um T-Zellen Spezifität für Tumor-assoziierte Antigene zu verleihen. Die variablen Fragmente der Rezeptoren sind spezifisch für CEA (BW431/26) oder CD30 (HRS3). Die Antigen-spezifische Domäne der Rezeptoren ist durch einen „Spacer“ aus der konstanten Region eines human-IgG Antikörpers von der transmembranen und der intrazellulären Domäne des Rezeptors getrennt. Zur Signalgebung die-

nen die intrazelluläre CD3ζ Kette sowie zusätzliche kostimulatorische Signaldomänen wie CD28 und OX40. Die Rezeptoren wurden mit Hilfe retroviralen Gentransfers (Kapitel 3.3.8) unter Verwendung der Helferplasmide # 392 und # 393 in die T-Zellen eingebracht.

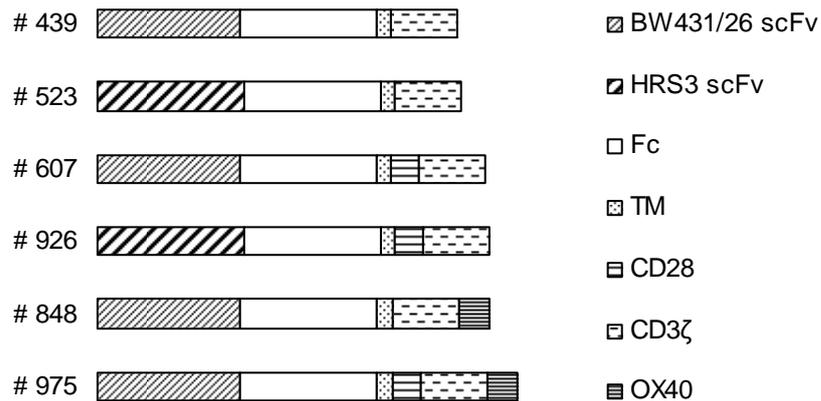


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Konstrukte in den verwendeten Rezeptoren. Die variablen Fragmente (scFv) BW431/26 und HRS3 sind spezifisch für die Antigene CEA und CD30. Es folgt als „Spacer“ die konstante Region eines humanen IgG Antikörpers (Fc), die Transmembrandomäne (TM) sowie bis zu drei intrazelluläre Domänen pro Konstrukt. Als intrazelluläre Domänen dienen CD3ζ, CD28 und OX40.

2.6 Antikörper

Primäre AK, unmarkiert	Eigenschaften/Klon	Hersteller/Referenz
Anti-human CD197	monoklonaler Maus IgM-Antikörper spezifisch für humanes CCR7 (Klon 2H4)	BD Biosciences*

Material

Anti-human IFN- γ	monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch für humanes Interferon- γ (Klon NIB42)	BD Biosciences*
Anti-human IL-2	monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch für humanes Interleukin-2 (Klon 5344-111)	BD Biosciences*
Anti-human IL10	monoklonaler Ratten-Antikörper spezifisch für humanes Interleukin-10 (Klon JES3-9D7)	BD Biosciences*
BW2064/36	monoklonaler Maus-Antikörper mit idiotypischer Spezifität für den anti-CEA Antikörper BW431/26, der spezifisch an CEA bindet	Kaulen <i>et al.</i> , 1993
OKT3	monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch für humanes CD3	ATCC: CRL-8001™
15E8	monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes CD28	R. van Lier, NCB, Amsterdam, NL
Primäre AK, Fluorochrom markiert	Eigenschaften/Klon	Hersteller

Anti-human Bcl-2	monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch für humanes Bcl-2 (Klon 100)	BD Biosciences*
------------------	--	-----------------

Material

Anti-human CCR4	monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch für humanes CCR4 (Klon 205410)	R&D Systems*
Anti-human CCR10	monoklonaler Ratten-Antikörper spezifisch für humanes CCR10 (Klon 314305)	Biolegend*
Anti-human CD3	monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch für humanes CD3 (Klon UCHT-1)	Dako*
Anti-human CD4	monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch für humanes CD4 (Klon MT310)	Dako*
Anti-human CD8	monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch für humanes CD8 (Klon DK25)	Dako*
Anti-human CD11a	monoklonaler Ratten-Antikörper spezifisch für die α -Kette des humanen LFA-1 (Klon 2D7)	BD Biosciences*
Anti-humann CD25	monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch für humanes CD25 (Klon 4E3)	Miltenyi Biotec*
Anti-human CD27	monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch für humanes CD27 (Klon 1A4CD27)	Immunotech*

Material

Anti-human CD28	monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch für humanes CD28 (Klon CD28.2)	BD Biosciences*
Anti-human CD45RA	monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch für humanes CD45RA (Klon ALB11)	Immunotech*
Anti-human CD45RO	monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch für humanes CD45RO (Klon UCHL1)	BD Biosciences*
Anti-human CD57	monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch für humanes CD57 (Klon 21330573)	Immunotools*
Anti-human CD62L	monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch für humanes L-Selektin (Klon DREG56)	Immunotech*
Anti-human CD95	monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch für humanes Fas (Klon DX2)	BD Biosciences*
Anti-human CD103	monoklonaler Ratten-Antikörper spezifisch für humanes CD103 (Klon Ber-ACT8)	BD Biosciences*
Anti-human CD127	monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch für die humane IL-7R α Kette (Klon IL-7R-M21)	BD Biosciences*

Material

Anti-human CD197	monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch für humanes CCR7 (Klon 150503)	R&D Systems*
Anti-human CD197	monoklonaler Ratten-Antikörper spezifisch für humanes CCR7 (Klon 3D12)	BD Biosciences*
Anti-human CEA	monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch für humanes Karzinoembryonales Antigen (Klon B1.1/CD66)	BD Biosciences*
Anti-human CLA	monoklonaler Ratten-Antikörper spezifisch für humanes kutanes Lymphozyten-Antigen (Klon HECA-452)	BD Biosciences*
Anti-human Granzym A	monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch für humanes Granzym A (Klon CB9)	BD Biosciences*
Anti-human Granzym B	monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch für humanes Granzym B (Klon GB11)	Serotec*
Anti-human IFN- γ	monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch für humanes Interferon- γ (Klon 4S.B3)	Biolegend*
Anti-human IgG ₁	F(ab') ₂ polyklonales Ziegen-Serum	Southern Biotech*

Material

Anti-human IL-2	monoklonaler Ratten-Antikörper spezifisch für humanes IL-2 (Klon MQ1-17H12)	Biolegend*
Anti-human IL-10	monoklonaler Ratten-Antikörper spezifisch für humanes IL-10 (Klon JES3-19F1)	Biolegend*
Anti-human Perforin	monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch für humanes Perforin (Klon δ G9)	Ancell*
Anti-human TNF- α	monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch für humanen Tumor-Nekrose-Faktor α (Klon MAb11)	Biolegend*
Primäre AK, Biotin markiert	Eigenschaften/Klon	Hersteller
Anti-human IFN- γ Biotin	monoklonaler Maus-Antikörper spezifisch für humanes Interferon- γ (Klon 4S.B3), Biotin-gekoppelt	BD Biosciences*
Anti-human IL-2 Biotin	monoklonaler Kaninchen-Antikörper spezifisch für humanes Interleukin-2 (Klon B33-2), Biotin-gekoppelt	Biosource*
Anti-human IL-10 Biotin	monoklonaler Ratten-Antikörper spezifisch für humanes Interleukin-10 (Klon JES3-12G8), Biotin-gekoppelt	BD Biosciences*

Material

Sekundäre AK, Fluorochrom gelabelt	Eigenschaften/Klon	Hersteller
FITC-konjugierter Anti-Maus IgM	polyklonaler Ziegen-Antikörper spezifisch für murines IgM	Beckmann Coulter Company*
APC-konjugierter Anti-Maus-IgM	polyklonaler Ziegen-Antikörper spezifisch für murines IgM	Southern Biotech*

Spezifität	Spezies/Isotyp	Klon	Hersteller
Anti-KLH	Maus IgG ₁ , κ	Klon MOPC-21	BD Biosciences*, Biolegend*
Anti-KLH	Maus IgG ₁	Klon 15H6	Southern Biotech*
Anti-KLH	Maus IgG _{2a} , κ	Klon X39	BD Biosciences*
Anti-KLH	Maus IgG _{2b}	Klon 133303	R&D Systems*
Anti-KLH	Maus IgM, κ	Klon G155-228	BD Biosciences*
Anti-KLH	Ratte IgG _{2a}	Klon RTK2758	Biolegend*
Anti-KLH	Ratte IgG _{2a}	Klon 54447	R&D Systems*

*Ansell, Bayport, Minnesota, USA; Beckmann Coulter Company, Marseille, Frankreich; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland; BioLegend, San Diego, USA; Biosource, Camarillo, USA; Dako, Glostrup, Dänemark; Immunotech, Marseille, Frankreich; Immunotools, Friesoythe, Deutschland; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland;

Material

R&D Systems, Minneapolis, USA; Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA; Serotec, Martinsried, Deutschland;

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung und Lagerung von *E.coli* DH5 α Bakterien

Die Kultivierung von Bakterienstämmen erfolgte in LB-Medium (1 % (w/v) Pepton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl) bei 37 °C und 200 Upm in einem Schüttelinkubator über Nacht. Zur Selektion rekombinanter Bakterien wurde Ampicillin (200 μ g/ml) verwendet. Zur langfristigen Lagerung wurden 700 μ l einer Bakterienübernachtkultur mit 300 μ l 87 % (v/v) Glycerin vermischt und bei –80 °C aufbewahrt. Für kurze Zeitspannen wurden die Bakterien auf Agarplatten (LB-Medium + 1,5 % (w/v) Agar) kultiviert.

3.1.2 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* DH5 α

Die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien erfolgte nach der Methode von Hanahan, 1983. Frisches LB-Medium (500 ml) wurde mit 5 ml einer Übernachtkultur des *E.coli* DH5 α -Stammes inokuliert. Die Zellen wurden bei 37 °C und 250 UpM bis zu einer OD_{600nm} von 0,7 bis 0,8 inkubiert, um Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zu erhalten. Die Kulturen wurden 5–10 min auf Eis abgekühlt und die Zellen anschließend durch Zentrifugation (10 min bei 2300 x g und 4 °C) sedimentiert. Alle weiteren Schritte wurden bei 4 °C im Kühlraum durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 30 ml Puffer Tfb I

(30 mM Kaliumacetat, 100 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin, 50 mM MnCl₂) pro 100 ml LB-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut sedimentiert (10 min bei 1000xg und 4 °C). Nach Verwerfen des Überstandes und Resuspension des Sediments in 4 ml TfbII (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 15 % (v/v) Glycerin) pro 30 ml TfbI wurde die Zellsuspension in Eppendorf Gefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80 °C.

3.1.3 Einbringen von DNS in kompetente *E.coli* DH5α (Transformation)

Kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe eines Ligationsansatzes oder 1 µg Plasmid DNA erfolgten 30 min Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Bakterien für 90 s im Wasserbad bei 42 °C inkubiert. Nach einem weiteren Inkubationsschritt für 1 min auf Eis wurden 900 µl antibiotikafreies LB-Medium zugegeben und der Ansatz 60 min bei 37 °C und 200 UpM inkubiert. Die Bakterien wurden sedimentiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf einer, ein Antibiotikum zur Selektion Plasmid-tragender Bakterien enthaltende LB-Agarplatte ausplattiert. Die Kultivierung Plasmid-tragender Klone erfolgte bei 37 °C über Nacht.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolation von Plasmid-DNS aus *E.coli* DH5α

Die Isolierung von Plasmid-DNS erfolgte mittels Anionenaustauschchromatographie nach Anleitung der Hersteller der verwendeten „Mini“- (PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland) oder „Midiprep-Kits“ (Quiagen, Hilden, Deutschland). Für „Minipreps“ wurden 5 ml, für „Midipreps“ 25 ml einer Übernachtskultur verwendet. Die gewonnenen Produkte der „Minipreps“ wurden in 30 µl, die der „Midipreps“

in 100 µl ddH₂O aufgenommen und die DNA-Konzentration photometrisch oder mittels Agarose Gelelektrophorese bestimmt (Kapitel 3.2.3). Die Plasmid-Lösungen wurden bei –20 °C gelagert.

3.2.2 Agarosegelelektrophorese

Agarosegelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1996) mit 1 %igen (w/v) Agarosegelen (1 % (w/v) UltraPure™ Agarose; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in 1 x TAE (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure, pH 8,3; 0,5 µg/ml EthBr) wurde zur Identifizierung und Quantifizierung von PCR-Produkten sowie zur Aufreinigung von DNS verwendet. Die Wahl der auf das Gel aufgetragenen Volumina der DNS-Proben geschah abhängig von der Beschaffenheit sowie dem Verwendungszweck der DNS. Als Standard wurden jeweils 5 µl des „GeneRuler™ 1kb DNA Ladder“ (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) eingesetzt. Die DNS in den mit Ethidium-Bromid gefärbten Gelen wurde mittels eines UV-Transilluminators bei 254 nm sichtbar gemacht und fotografiert.

3.2.3 DNS Konzentrationsbestimmung

Photometrische Konzentrationsbestimmung

DNS wurde in Wasser gelöst und die Konzentration im Photometer bei 260 nm gegen ddH₂O als Leerwert gemessen. Eine OD_{260 nm} = 1 entspricht bei einer Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke 50 µg/ml doppelsträngiger DNS.

Quantitative Konzentrationsbestimmung

Alternativ konnte die DNS Konzentration durch Gelelektrophorese abgeschätzt werden. Hierfür wurden unterschiedliche Volumina kommerziell erhältlicher Standards mit bekannten DNS Konzentrationen („MassRuler™ DNA Ladder, Low Range“ oder

„MassRuler™ DNA Ladder, High Range“, Fermentas, St. Leon-Rot) neben der zu testenden Probe auf ein 1 % (w/v) Agarosegel aufgetragen. Der quantitative Vergleich erfolgte nach Aufnahme der Signale mittels eines UV-Transilluminators bei 254 nm. Zirkuläre DNS Moleküle wurden vor der Gelelektrophorese mittels Restriktion linearisiert.

3.2.4 Restriktion von DNS

Die Identifizierung von Plasmiden geschah mittels Restriktionen. Es wurden die Angaben der Hersteller der verwendeten Restriktionsenzyme (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland; Roche Diagnostics, Basel, Schweiz) berücksichtigt. Die Inkubation erfolgte, falls vom Hersteller nicht anders vorgesehen, für 1 h bei 37 °C.

3.3 Eukaryontische Zellkultur

3.3.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Alle Arbeiten mit eukaryontischen Zellen wurden in S1 oder S2 Labors unter sterilen Werkbänken mit S2 Standard durchgeführt. Medien, Puffer und Zusätze wurden vor ihrer Verwendung gegebenenfalls autoklaviert oder sterilfiltriert und anschließend steril gehandhabt.

Zur Kultivierung eukaryontischer Zellen wurde das Vollmedium Gibco® RPMI 1640 (1x) mit GlutaMAX™ I oder das Minimalmedium Gibco® DMEM (1x) mit GlutaMAX™ I (beide GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland) eingesetzt. Vor Verwendung wurden sowohl RPMI 1640 als auch DMEM Medium mit 10 % (v/v) fetalem Kälber-Serum (Biochrom KG, Berlin, Deutschland), 100 IU/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin (Penicillin-Streptomycin Lösung, GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland) versetzt. Die

Kultivierung in RPMI 1640 Medium erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂, die in DMEM Medium bei 37 °C und 10 % CO₂.

3.3.2 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen

Zur längerfristigen Lagerung von Zelllinien und Primärzellen wurden 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen sedimentiert und in 900 µl des entsprechenden Kulturmediums resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in einem thermostabilen „Kryovial“ mit 100 µl DMSO versetzt. Das „Kryovial“ wurde dann mit Hilfe eines „5100 Cryo 1°C Freezing Container“, (Mr. Frosty, Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA) langsam von –20 °C auf –80 °C abgekühlt und bei dieser Temperatur maximal 6 Monate gelagert. Für dauerhafte Lagerung wurden die „Kryovials“ in flüssigen Stickstoff überführt.

3.3.3 Passage adhärenter Zellen

Zur Ablösung adhärenter Zellen von der Oberfläche eines Zellkulturgefäßes wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen wurden mit PBS (137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurde die gesamte Zellschicht mit 1 x Trypsin-EDTA Lösung (Sigma-Aldrich, München) leicht bedeckt. Die Zellen wurden bis zu ihrer Ablösung bei 37 °C inkubiert. Nach Ablösung aller Zellen wurde sofort serumhaltiges Medium zugegeben, um die Trypsin-Aktivität zu blockieren. Die Zellen wurden zu einer Einzelzellsuspension resuspendiert und konnten nun für Versuche verwendet oder zur weiteren Kultivierung ausgedünnt werden.

3.3.4 Gewinnung von peripheren blutmononukleären Zellen

Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) wurden nach der Methode von Böyum, 1968 durch Dichtegradientenzentrifugation mit Hilfe von Lymphoprep™ (AXIS-

SHIELD, Oslo, Norwegen) isoliert. Hierfür wurden je 15 ml des Inhalts eines „Buffy Coats“ zunächst mit 15 ml PBS verdünnt und anschließend auf 15 ml Lymphoprep™ geschichtet. Nach Zentrifugation bei 600 x g und 20 °C für 20 min wurden die Lymphozyten, die in der Interphase zwischen Serum und Lymphoprep™ sedimentieren, mit einer Pipette abgenommen. Die Zellen wurden daraufhin dreimal mit PBS gewaschen und danach entweder wie in Kapitel 3.3.6 beschrieben stimuliert oder mittels magnetischer Zellsortierung einzelne Zellpopulationen isoliert (Kapitel 3.3.5).

3.3.5 „Magnetic-Activated Cell Sorting“ (MACS)

Isolation humaner CD3⁺ Lymphozyten

CD3⁺ T-Zellen wurden auf zwei Arten mittels magnetischer Separation aus PBMCs isoliert. Zum einen wurde das „CD3⁺ Isolation Kit“ (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland) verwendet, bei dem die T-Zellen direkt markiert werden. Zum anderen wurde, falls die Kopplung der gewünschten Zellen an magnetische „Beads“ für nachfolgende Versuche unerwünscht war oder die Zellen erneut separiert werden sollten, das „Pan T Cell Isolation Kit II“ (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland) verwendet, das eine negative Selektion der CD3⁺ T-Zellen ermöglicht. Hierfür kommen „MicroBead“-gekoppelte Antikörper zum Einsatz, die gegen Oberflächenmoleküle von unerwünschten Zellen gerichtet sind. Die gewünschten Zellen werden somit isoliert, ohne an die Säule gebunden zu werden.

Übersicht über die Programme des autoMACS™ Gerätes

Für Trennungen am autoMACS™ Gerät wurden in Abhängigkeit von den jeweiligen Anforderungen unterschiedliche Programme gewählt. Eine Übersicht über die verschiedenen Separations-Programme ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Die Rationale für die Verwendung einzelner Programme ist an den gegebenen Stellen im Ergebnisteil erläutert.

Goal		Obtain a cell population expressing a particular cell surface antigen	Eliminate cell sub-population(s) from your cell sample to obtain
Strategy		Positive Selection Magnetically label the target cells	
		Normal to high frequency cells	Rare cells, or purity increase
Program	Normal to high antigen expression	Possel positive selection	Posseld double positive selection Posseld2 double positive selection for cord blood application
	Low antigen expression	Possel_s sensitive positive selection	Posselds sensitive double positive selection
			Deplete depletion Depletes sensitive depletion Depl05/Depl025 special program for very sensitive depletion

Abbildung 3.1: „autoMACS™ cell separation programs quick reference table“. Entnommen aus dem Benutzerhandbuch für den autoMACS™ Zellseparator.

3.3.6 Stimulation von Lymphozyten durch Zytokine und Antikörper

Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium aufgenommen und mit 400 U/ml IL-2 (Chiron GmbH, Ratingen) und 100 ng/ml OKT3 Antikörper stimuliert. Je nach Anforderungen wurden auch IL-7, IL-15, TNF- α , TGF- β , IFN- γ (alle von ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Deutschland) oder 15E8 Antikörper eingesetzt.

3.3.7 Transfektion von 293T-Zellen mittels Lipofektion

293T-Zellen wurden auf Zellkulturplatten mit 6 „Wells“ in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/„Well“ in 3 ml DMEM Medium ausplattiert. Am Folgetag wurden 100 μ l serumfreies DMEM Medium mit 2 μ g DNS und 20 μ l Polyfect® (Quiagen, Hilden, Deutschland) versetzt, gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zu dem Ansatz 600 μ l serumhaltiges DMEM Medium zugegeben, gemischt und der Ansatz gleichmäßig über die Zellen verteilt. Nach 48 h wurden

die Zellen abgelöst und die Transfektionsrate wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

3.3.8 Retrovirale Transduktion humaner T-Lymphozyten

Zur retroviralen Transduktion wurde die DNS eines retroviralen Vektors zusammen mit der DNS der Helferplasmide pColt-GALV (# 392) und pHit60 (# 393) mittels Lipofektion in Zellen der Linie 293T transfiziert. pColt kodiert für das GALV (*Gibbon Ape Leukemia Virus*) Gen *env* und pHit60 für die MoMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) Gene *gag* und *pol* (Weijtens *et al.*, 1998).

Auf Zellkulturplatten mit 6 „Wells“ wurden 1×10^5 293T-Zellen in 3 ml DMEM Medium/ „Well“ ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 h wurde jeweils 0,5 µg DNS der Helferplasmide # 392, # 392 und 1 µg DNS des gewünschten Plasmids mit dem Rezeptorkonstrukt mit 10 µl Polyfect® in 48,5 µl serumfreien DMEM Medium gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließender Zugabe von 350 µl DMEM Medium, 10 % FCS, Antibiotika und erneutem Mischen wurde der gesamte Ansatz auf die Zellen getropft. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Medium vorsichtig abgenommen. Pro „Well“ wurden $1,5 \times 10^6$ mit 400 U/ml IL-2 und 100 ng/ml OKT3 Antikörper vorstimulierte T-Zellen in 5 ml RPMI 1640 Medium mit 1000 U/ml IL-2 und 100 ng/ml OKT3 zugegeben. Die Zellen wurden erneut bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 48 h wurden die T-Zellen vorsichtig abgenommen und die Transduktionsrate wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierfür wurde der Antikörper spezifisch für den Fc-Teil des Rezeptors (F(ab')₂ anti-human IgG₁; Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA) und für CD3 (anti-human CD3; Dako, Glostrup, Dänemark) sowie Propidium-Iodid (20 µg/ml) (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zur Detektion lebender Zellen verwendet.

3.3.9 XTT-basierter Viabilitätstest

T-Zellen mit oder ohne rekombinante Immunrezeptoren wurden in einem Volumen von 100 µl/„Well“ in vier Verdünnungsstufen jeweils im Dreifachansatz auf eine Mikrotiterplatte mit 96 Rundboden-„Wells“ pipettiert. Anschließend wurden Zielzellen ebenfalls in einem Volumen von 100 µl/„Well“ dazugegeben. Das Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen wurde meist in den Schritten 1:2,5/1:5/1:10/1:20 gewählt. Die gemeinsame Inkubation von Effektor- und Zielzellen bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgte für 48 h. Es wurden dann 150 µl Überstand/„Well“ abgenommen und bei –20 °C für Folgeversuche gelagert. Zu den verbliebenen 50 µl der Ansätze wurde 100 µl XTT-Reagenz (Endkonzentration 0,3 mg/ml XTT-Salz, Roche Diagnostics, Basel, CH, gelöst in RPMI 1640 Medium) gegeben und nach 30, 60 und 90 min die Absorption bei OD_{450–650 nm} bestimmt. Lebende Zellen metabolisieren das in Lösung hellrote Tetrazolium-Salz XTT zu dunkelrotem Formazan.

Der Anteil lebender Zielzellen wurde durch Einsetzen der gemessenen optischen Dichten in folgende Formel errechnet:

$$\text{Viabilität[\%]} = \frac{(\text{Effektorzellen} + \text{Tumorzellen}) - (\text{Effektorzellen})}{(\text{Tumorzellen}) - (\text{Medium})} \times 100$$

3.3.10 BrdU Proliferationstest

Die Proliferation von Lymphozyten wurde mittels „Cell Proliferation ELISA, BrdU“ (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben getestet. Hierfür wurden Ansätze von 1 - 4 x 10⁴ Zellen auf einer 96-„Well“ Mikrotiterplatte unter Stimulations-Bedingungen kultiviert, die in Abhängigkeit von den Versuchsanforderungen variierten. Nach Inkubation mit BrdU wurden die Zellen getrocknet und fixiert. Abweichend vom Protokoll wurden nur 100 µl „FixDenat“-Lösung und 50 µl BrdU-POD verwendet. Als Substrat wurde schließlich ABTS zugegeben. Die Messung der Absorption erfolgte bei OD_{405–490 nm}.

3.3.11 Detektion apoptotischer Zellen

Apoptotische Zellen in frisch isolierten oder in Kultur vorliegenden Lymphozyten wurden durch Färbung mit Annexin V und 7-AAD oder Propidium-Iodid und anschließender Analyse mittels Durchflusszytometrie identifiziert. Annexin V bindet an Phosphatidylerin, das bei apoptotischen Zellen an die Zelloberfläche tritt. 7-AAD und PI dringen in apoptotische Zellen ein und binden an Nukleinsäuren.

3.4 Durchflusszytometrische Analysen

3.4.1 Detektion von Oberflächenmarkern

In einem Polystyrol „FACS-Röhrchen“ wurden $1 - 5 \times 10^5$ Zellen zunächst zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit einem Antikörper spezifisch für die zu detektierenden Oberflächenmarker nach Herstellerangaben versetzt und 30 min im Kühlschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Falls es sich bei dem bereits verwendeten Antikörper um einen Fluorochromgekoppelten Antikörper handelte, wurden die Zellen anschließend in 400 μ l PBS aufgenommen und Fluoreszenzen durchflusszytometrisch gemessen. Ansonsten wurden die Zellen mit einem sekundären Antikörper spezifisch für den verwendeten primären Antikörper versetzt und 30 min im Kühlschrank inkubiert. Es erfolgten zwei weitere Waschschrte mit eiskaltem PBS, Aufnahme der Zellen in 400 μ l PBS und die durchflusszytometrische Analyse der Fluoreszenzen.

3.4.2 Detektion intrazellulärer Marker

Vor intrazellulärer Färbung von Zytokinen wurden Lymphozyten zunächst mit 20 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) zur Stimulation der Zytokin-Produktion behandelt. Zur Blockierung von Transportprozessen während der T-Zell-Aktivierung und zur Akkumulation von Zytokinen wur-

den die Zellen für 4 – 24 h unter Einfluss von Brefeldin A (1:1000 verdünnt; BioLegend, San Diego, USA) kultiviert.

In einem Polystyrol „FACS-Röhrchen“ wurden $1 - 5 \times 10^5$ Zellen zunächst zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Falls zusätzlich zu den intrazellulären Markern auch Oberflächenmarker detektiert werden sollten, wurden diese zuerst gefärbt, wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben. Es wurde dann 250 μl „Cytotfix/Cytoperm Solution™“ (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) zu jedem FACS-Röhrchen gegeben. Nach 20 min Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen zweimal mit „BD Perm/Wash™ Buffer“ (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gewaschen. Anschließend wurde der für den gewünschten intrazellulären Marker spezifische Antikörper zugegeben und 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit „BD Perm/Wash™ Buffer“ erfolgte die Aufnahme der Zellen in PBS und deren Analyse mittels Durchflusszytometrie.

3.5 „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)

ELISAs, nach Engvall und Perlman, 1971, wurden zum Nachweis sekretierter Zytokine wie IL-2, IL-10 und IFN- γ beispielsweise im Überstand von XTT-Assays verwendet. Hierfür wurden zunächst 50 μl „Well“ eines Fangantikörpers in „Coating Buffer“ (1,7 ml 0,2 M Na_2CO_3 , 0,8 ml 0,2 M NaHCO_3 , ad 10 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$) auf 96-„Well“ Mikrotiterplatten mit Maxi- oder Polysorp-Eigenschaften (Nunc®, Wiesbaden, Deutschland) aufgetragen. Nach mindestens 2 h Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler wurde die Flüssigkeit in den Platten verworfen und durch 200 μl „Well“ Block-Reagenz (3 % (w/v) BSA in PBS) ersetzt. Der anschließende Inkubationsschritt erfolgte wahlweise für mindestens 2 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler oder bei 4 °C über Nacht im Kühlschrank. Anschließend wurde das Block-Reagenz in den Platten verworfen und diese wurden vier- bis fünfmal mit PBS-T (PBS, 0,1 % (v/v) Tween-20) gewaschen. Nach Entfernung von Flüssigkeitsresten auf den Platten durch Ausklopfen wurden dann 50 μl „Well“ der zu testenden Flüssigkeiten aufgetragen. Es erfolgte

das Auftragen des Standards durch Titration einer bekannten Menge des zu untersuchenden Zytokins. Die folgende Inkubation wurde für mindestens 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler durchgeführt. Nach Verwerfen der zu testenden Flüssigkeiten wurden die Platten erneut vier- bis fünfmal mit PBS-T gewaschen und anschließend mit 50 µl/„Well“ eines Biotin-konjugierten Detektionsantikörpers (0,5 µg/ml) versehen. Nach einer weiteren einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler und anschließendem Waschen mit PBS-T wurde die Platten unter Zugabe von 50 µl/„Well“ 1:10000 verdünntem Streptavidin-POD (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz) für 30 min inkubiert. Die Platten wurden danach gründlich mit PBS-T gewaschen und rückstandslos ausgeschlagen. Schließlich wurden 50 µl/„Well“ einer ABTS-Lösung (1 mg/ml ABTS in ABTS-Puffer[®], Roche Diagnostics) auf die Platten gegeben. Die darauf folgende Signalentwicklung wurde bei OD_{405–490 nm} gemessen.

3.6 Tumorinduktion in der Maus

Für *in vivo* Experimente wurden Mäuse des CD1^{-/-} Stammes CD-1TM oder T, B und NK Zell defiziente NIH-III Nude Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Alle Tierversuche wurden entsprechend der nationalen und regionalen Bestimmungen durchgeführt und durch die Bezirksregierung Köln (Genehmigungsnummer: K17,35/05) bewilligt.

Zur Tumorinduktion wurden 5 x 10⁵ C15A3 Tumorzellen mit 5 x 10⁴ Rezeptor tragenden T-Zellen subkutan in eine Flanke der Maus koinjiziert. T-Zellen ohne rekombinanten Rezeptor dienten als Kontrolle. Das Tumorwachstum wurde unter Zuhilfenahme einer Schieblehre täglich beobachtet.

Um die systemische Wirkung von T-Zellen zu untersuchen, wurden 8 x 10⁵ C15A3 Tumorzellen subkutan injiziert. Bei Erreichen eines Tumolvolumens von 20 – 40 mm³ wurde den Mäusen 1 x 10⁶ Rezeptor-tragende T-Zellen intravenös in die Schwanzvene verabreicht. Das Tumorwachstum wurde unter Zuhilfenahme einer Schieblehre täglich beobachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Isolierung und Charakterisierung von CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zell-Subpopulationen

4.1.1 Isolierung von CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen aus dem peripheren Blut

Die Frequenz CCR7⁻ T-Zellen im peripheren Blut wurde in einer Präparation mononukleärer Zellen gesunder Spender durch Färbung mit dem anti-human CCR7 IgM Antikörper, dem FITC-konjugierten anti-murin IgM Sekundärantikörper sowie dem PE-konjugiertem anti-human CD3 Antikörper und anschließender durchflusszytometrischer Analyse untersucht.

T-Zell-Populationen verschiedener Spender exprimierten CCR7 in unterschiedlicher Frequenz. Der Anteil der CCR7⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl von T-Zellen lag zwischen 82 % und 54 % (Abbildung 4.1). Es bestand keine Abhängigkeit der Anzahl CCR7⁻ T-Zellen vom Alter des Spenders (Abbildung 4.2).

Als Voraussetzung zur Untersuchung funktioneller Attribute von CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen musste ein Verfahren entwickelt werden, das beide T-Zell-Populationen mit möglichst großer Reinheit unter Erhalt ihrer Vitalität trennt. Es wurden hierfür drei Strategien auf ihre Eignung geprüft.

1. Zunächst wurden mittels negativer Selektion isolierte CD3⁺ T-Zellen mit dem

Ergebnisse

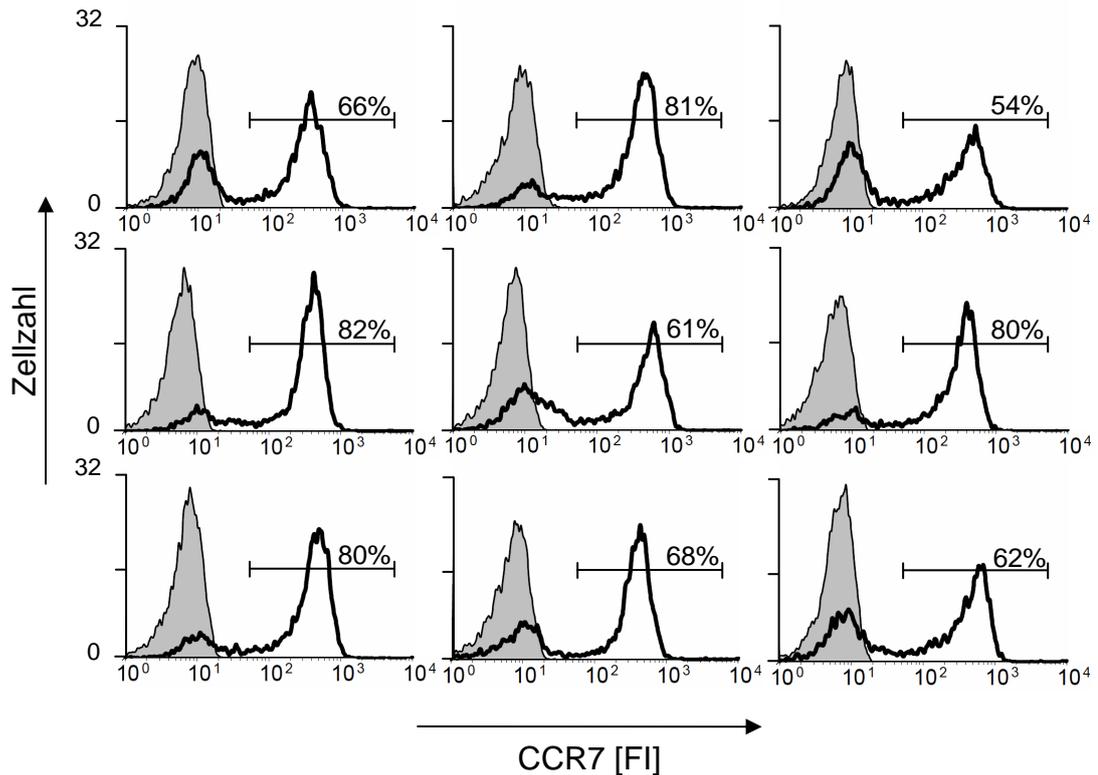


Abbildung 4.1: Physiologische CCR7 Expression. Je 2×10^5 PBMCs aus frischem Blut von 9 gesunden Spendern wurden mit dem anti-human CCR7 IgM Antikörper (Klon 2H4), dem FITC-konjugierten sekundären Antikörper anti-murin IgM sowie dem PE-konjugierten anti-human CD3 Antikörper (Klon UCHT-1) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrollen wurden die PBMCs mit einem FITC-konjugierten Antikörper irrelevanter Spezifität gleichen Isotyps gefärbt. Abgebildet ist die Expression von CCR7 auf $CD3^+$ T-Zellen. FI=Fluoreszenz-Intensität

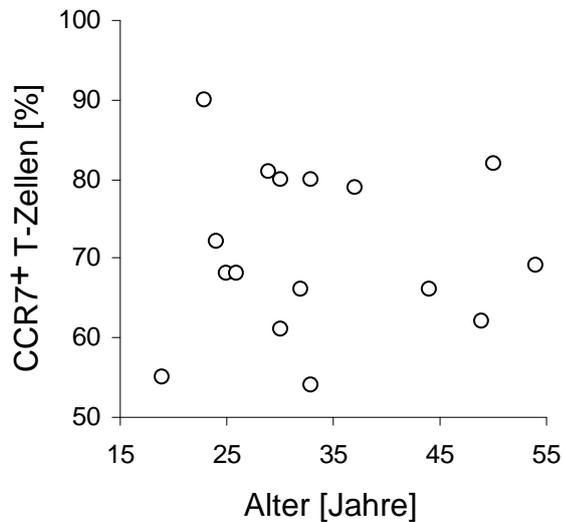


Abbildung 4.2: Die Anzahl der CCR7⁺ CD3⁺ ist unabhängig vom Alter des Spenders. Der Anteil CCR7⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der T-Zellen im peripheren Blut wurde durchflusszytometrisch bestimmt und in Abhängigkeit vom Alter des Blutspenders aufgetragen.

PE-gekoppelten anti-human CCR7 Antikörper (Klon 3D12) gefärbt und anschließend mit anti-PE „Beads“ durch magnetisch aktivierte Zell-Sortierung getrennt. Es wurden die Programme „Deplete S“, „Deplete 05“ und „Deplete 025“ verglichen. „Deplete“ Programme werden zur Selektion von nicht magnetisch markierten Zellen verwendet. Das Programm „Deplete S“ verwendet eine langsamere Rate, um die magnetisch markierten Zellen auf die Säule aufzutragen als das Standardprogramm „Deplete“, wodurch auch schwächer markierte Zellen durch die Säule gebunden werden. „Deplete 05“ trägt Zellen nur halb so schnell auf die Säule auf wie „Deplete s“ und „Deplete 025“ nur halb so schnell wie „Deplete 05“. Durch diese Programme können Zellen mit geringer Frequenz in der Gesamtpopulation angereichert werden. Mit diesen Versuchsansätzen wurden maximale Reinheiten bis 75 % in den jeweiligen Subpopulationen erreicht. Da die Reinheit der CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zell-Populationen für nachfolgende Analysen > 95 % betragen sollte, wurde das Trennverfahren optimiert.

2. T-Zellen wurden mit dem APC-gekoppelten anti-human CCR7 Antikörper (Klon 150503) und anschließend mit anti-APC „Beads“ markiert. Die auto-

MACS™ Trennung erfolgte zunächst mit dem Programm „Deplete 05“. Die durch die erste Trennung erhaltenen magnetisch markierten Zellen wurden einer weiteren Separation mit dem Programm „Possel“ unterzogen. „Possel“ wird zur positiven Selektion magnetisch markierter Zellen mit mittlerer bis hoher Frequenz innerhalb der Gesamtpopulation angewendet. Mit dieser Strategie wurden Reinheiten von etwa 85 % für die jeweiligen Subpopulationen erreicht.

3. Schließlich wurde der murine anti-human CCR7 IgM Antikörper (Klon 2H4) und „Beads“ gegen murines IgM zur magnetischen Markierung verwendet. Die Trennung der so markierten Zellen mit den autoMACS™ Programmen „Deplete 05“ sowie „Deplete 025“ erbrachten eine Reinheit der CCR7⁻ T-Zell-Population von > 90 %. Die CCR7⁺ Population wurde ohne weitere Markierung nochmals einer Trennung mit dem Programm „Possel“ unterzogen, um auch in dieser Fraktion eine Reinheit von > 90 % zu erzielen. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 4.3 schematisch dargestellt. Durch Austitrieren der eingesetzten Mengen an Antikörper (20 µl anti-human CCR7 IgM Antikörper pro 1×10^7 CD3⁺ Zellen) und „Beads“ (30 µl anti-murin IgM-„Beads“ pro 1×10^7 CD3⁺ Zellen) wurden schließlich Reinheiten von > 95 % in beiden Fraktionen erreicht (Abbildung 4.4).

Um den Einfluss des Chelatbildners EDTA sowie von Azid während der Zellseparation auf die Viabilität der Zellen zu untersuchen, wurden CD3⁺ T-Zellen hinsichtlich ihrer CCR7 Expression unter Verwendung des kommerziell erhältlichen Puffer-Systems für das autoMACS™ Gerät bestehend aus autoMACS™ Rinsing Solution (PBS, 2 mM EDTA, pH 7,2) und autoMACS™ Running Buffer (PBS, 2 mM EDTA, 0,5 % (w/v) BSA, 0,09 % (w/v) Azid, pH 7,2) getrennt. Zum Vergleich wurde eine Trennung durchgeführt, bei der Puffer ohne EDTA und ohne Azid eingesetzt wurden (Reinheiten jeweils > 95 %). Die Viabilität der getrennten Zellen wurde direkt nach der Trennung sowie nach 24, 48 und 96 h durch Färbung mit Annexin V und 7-AAD durchflusszytometrisch bestimmt.

Nach der Trennung in EDTA- und Azid-haltigen Puffern wiesen sowohl CCR7⁺ als auch CCR7⁻ T-Zell-Populationen im Vergleich zu der EDTA- und Azid-freien Trennung einen größeren Anteil apoptotischer Zellen auf (Abbildung 4.5). Als Konsequenz wur-

Ergebnisse

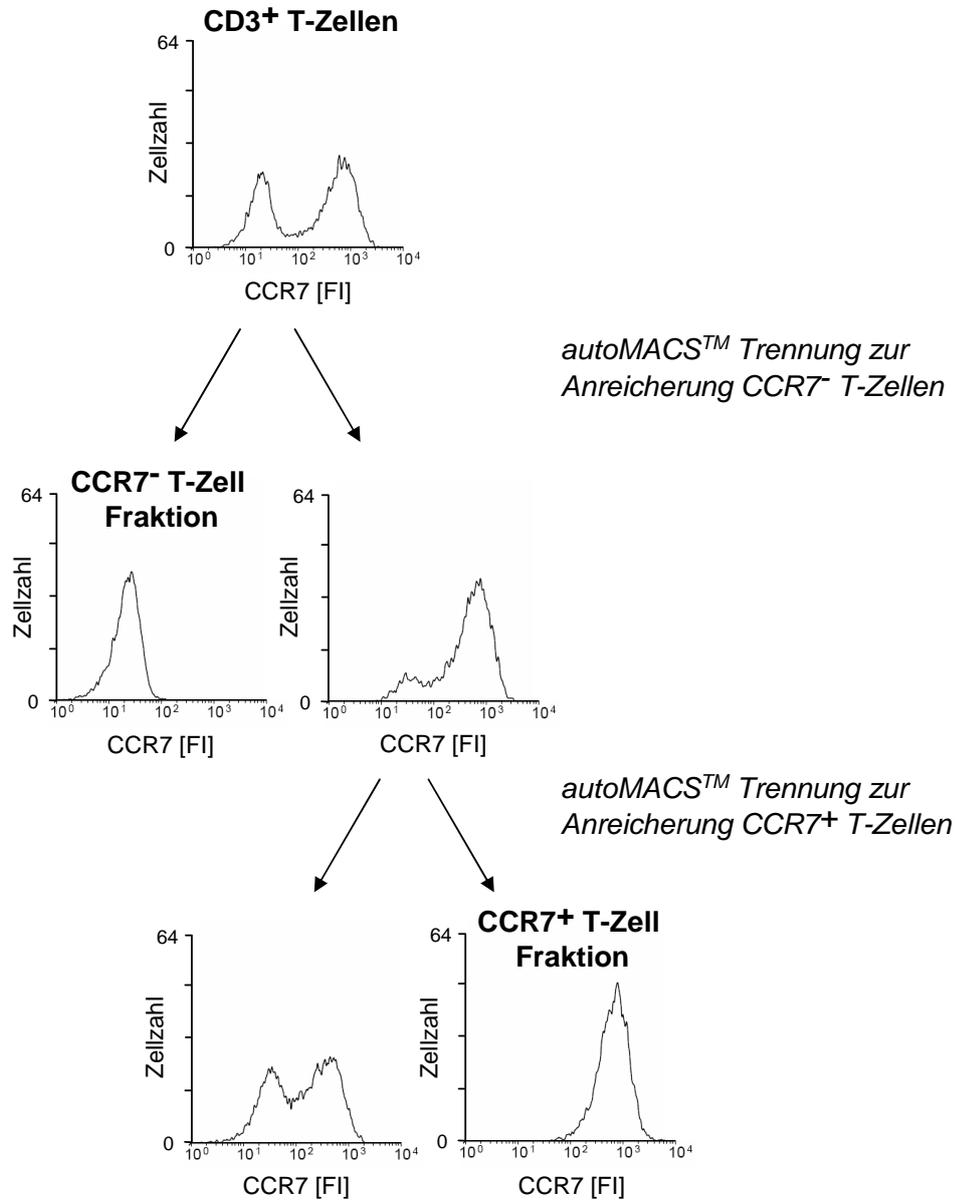


Abbildung 4.3: Schema der Trennung von T-Zellen hinsichtlich ihrer CCR7 Expression. Mittels negativer Selektion isolierte CD3⁺ T-Zellen wurden mit dem murinen anti-human CCR7 IgM Antikörper (Klon 2H4) (20 µl/ 1 x 10⁷ T-Zellen) gefärbt und anschließend mit anti-murine IgM „Beads“ (30 µl/ 1 x 10⁷ T-Zellen) magnetisch markiert. Die erste autoMACSTM Trennung erfolgte mit dem Programm „Deplete 025“. Die magnetisch markierte Fraktion wurde anschließend mit dem Programm „Poppel“ gereinigt. Dargestellt sind Histogramme der CCR7 Expression der jeweiligen Zellpopulationen. FI=Fluoreszenz-Intensität

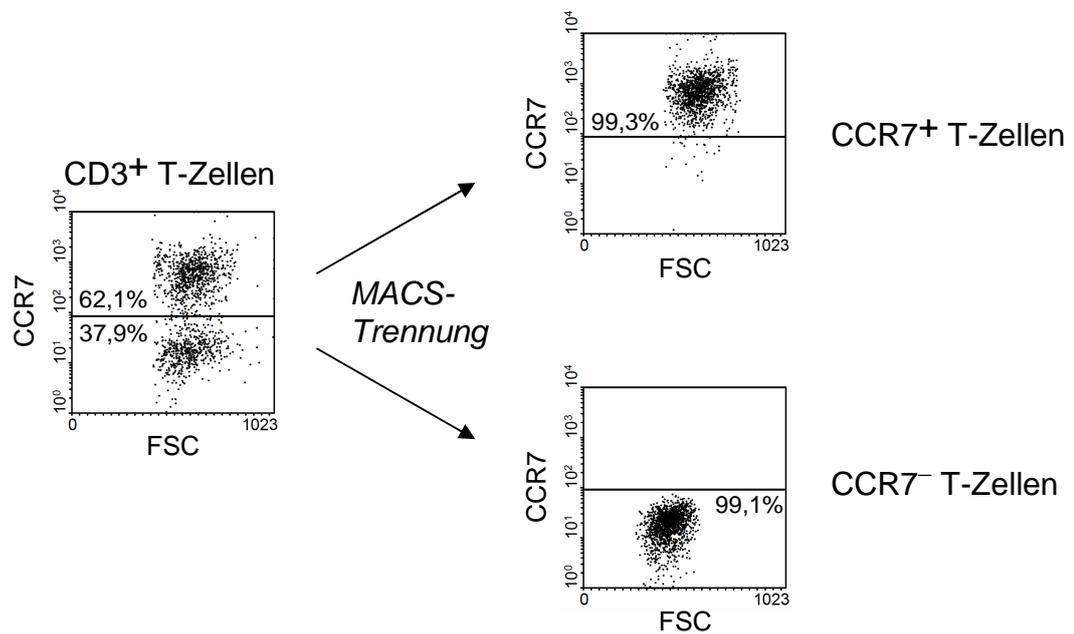


Abbildung 4.4: Reinheit der getrennten CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zell-Subpopulationen. Die Expression von CCR7 auf frisch getrennten T-Zellen wurde durch Färbung mit dem gegen murines IgM gerichteten, Fluorescein-gekoppelten Antikörper ermittelt. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch. FSC: *forward scatter*

den alle weiteren Zell-Trennungen mit Puffern ohne EDTA und ohne Azid durchgeführt.

4.1.2 Stimulation der Proliferation CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen

Um die optimalen Bedingungen zur Induktion der Proliferation CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen zu ermitteln, wurden die T-Zell-Subpopulationen zunächst aus frisch gewonnenen CD3⁺ T-Zellen isoliert. Die Zellen wurden auf einer 96-„Well“ Mikrotiterplatte in Gegenwart von IL-2 (0 – 500 U/ml) und dem anti-CD3 agonistischen Antikörper OKT3 (0 – 10 µg/ml) oder mit OKT3 und dem anti-CD28 agonistischen Antikörper 15E8 (jeweils 0 – 10 µg/ml) 4 Tage kultiviert. Anschließend wurde die Proliferation der Zellen durch den Einbau von BrdU während der Zellteilung gemessen.

Stimulation durch die anti-CD3 und anti-CD28 agonistischen Antikörper OKT3 und 15E8 induzierte einen stärkeren Einbau von BrdU und regte damit beide T-Zell-Subfraktionen effektiver zur Proliferation an als die Stimulation durch IL-2 und anti-CD3 Antikörper. IL-2 vermochte auch in einer Konzentration von 1000 U/ml nicht, die Proliferation zu verstärken (nicht abgebildet). CCR7⁺ T-Zellen wurden durch 500 U/ml IL-2 und 1 µg/ml OKT3 oder alternativ durch 100 ng/ml OKT3 und 10 µg/ml 15E8 maximal stimuliert. CCR7⁻ T-Zellen proliferierten am stärksten in Gegenwart von 500 U/ml IL-2 und 1 µg/ml OKT3 oder 10 ng/ml OKT3 und 10 µg/ml 15E8 (Abbildung 4.6).

Da CCR7⁻ T-Zellen unter Stimulation mit den oben genannten Bedingungen sehr schnell in den Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) eintreten, wurde im weiteren 400 U/ml IL-2 und 100 ng/ml OKT3 oder jeweils 10 – 100 ng/ml der beiden Antikörper OKT3 und 15E8 zur Stimulation von T-Zellen gewählt. Diese Stimulation führte zu einer größeren Lebensfähigkeit CCR7⁻ T-Zellen und wurde für die Induktion der für den retroviralen Gentransfer benötigten Proliferation als ausreichend befunden.

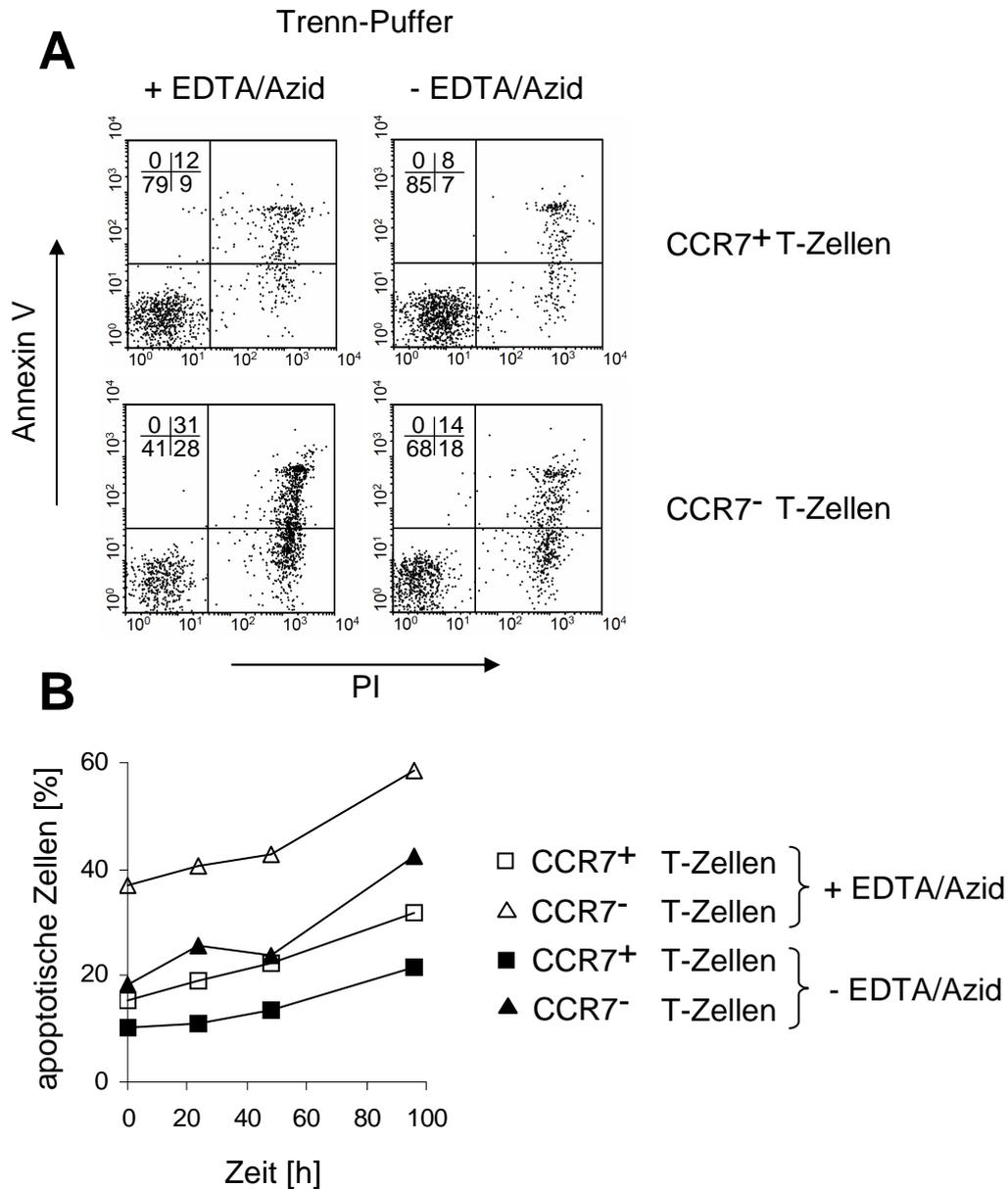


Abbildung 4.5: Magnetische Zellseparation mit Puffern ohne EDTA und ohne Azid senkt die Apoptoserate von CCR7⁻ und CCR7⁺ T-Zellen. Aus frisch isolierten PBMCs wurden zunächst CD3⁺ Zellen gewonnen und diese anschließend hinsichtlich ihrer CCR7 Expression getrennt. Beide Trennungen wurden jeweils mit den kommerziell erhältlichen Puffern (Rinsing Solution (PBS, 2 mM EDTA, pH 7,2), Running Buffer (PBS, 2 mM EDTA, 0,5 % BSA, 0,09 % Azid, pH 7,2)) und mit Puffern ohne EDTA sowie ohne Azid durchgeführt. Auf einer 96-„Well“ Mikrotiterplatte wurden je 1 x 10⁵ Zellen/„Well“ in RPMI 1640 Medium ohne weitere Zusätze kultiviert. Direkt nach der Trennung sowie nach 24, 48 und 96 h wurden Zellen mit Annexin V und 7-AAD gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Ansätze mit Zellen, die mit Antikörpern irrelevanter Spezifität gleichen Isotyps markiert wurden, dienten als Kontrolle. In **A** ist die Verteilung der Annexin V und PI gefärbten Zellen in den einzelnen Fraktionen direkt nach der Trennung als „Dot Plots“ abgebildet. **B** zeigt den Anteil der Annexin V und PI positiven Zellen in Abhängigkeit von der Zeit.

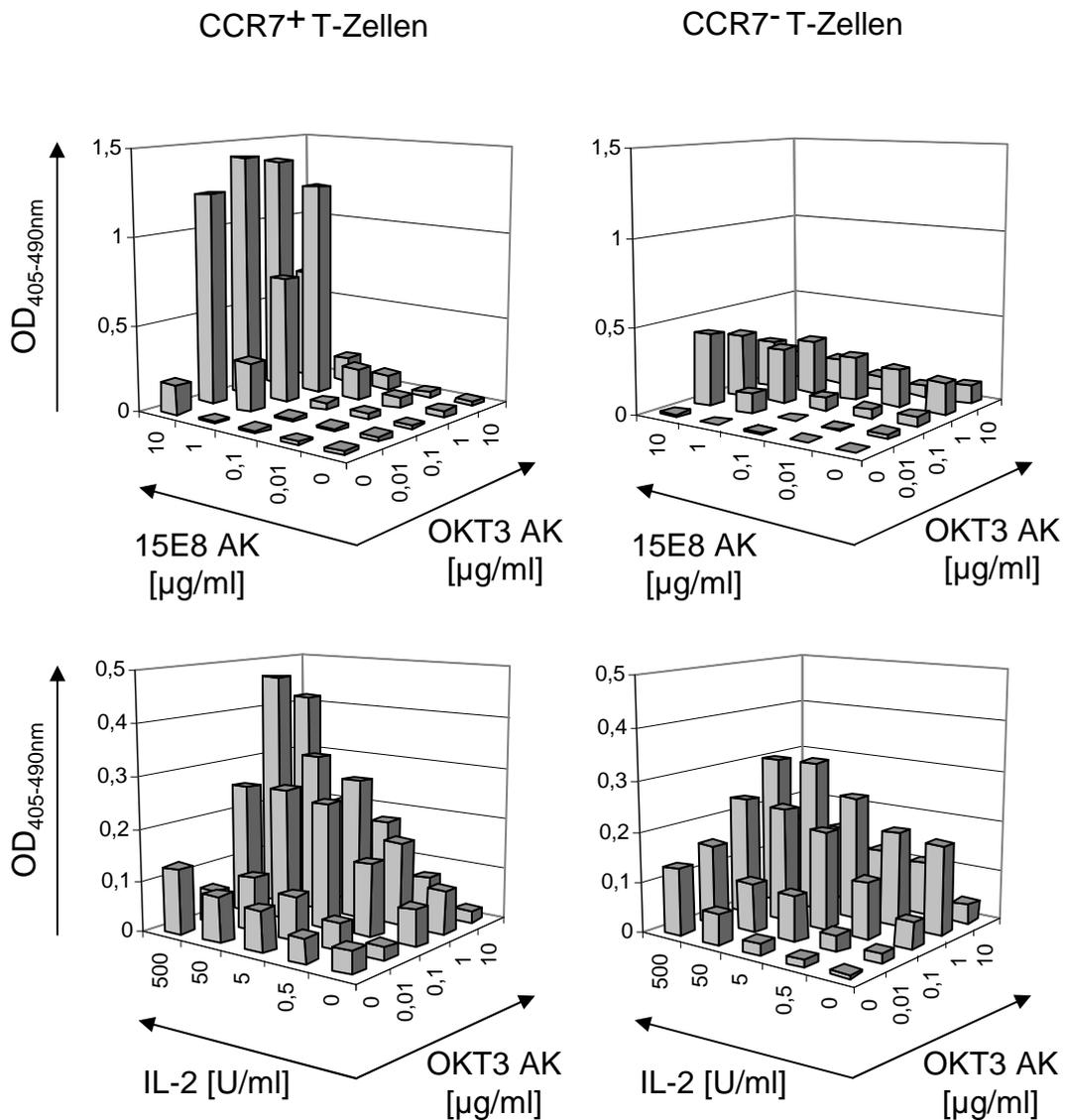


Abbildung 4.6: Ermittlung der optimalen Stimulation zur Induktion der Proliferation von CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen. CD3⁺ T-Zellen wurden zunächst in die CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zell-Subpopulationen getrennt, und je $2,5 \times 10^4$ Zellen/„Well“ auf eine 96-„Well“ Mikrotiterplatte aufgetragen. Nach Zugabe von IL-2 und OKT3 Antikörper oder den Antikörpern OKT3 und 15E8 (IL-2: 0 – 500 U/ml, OKT3 AK und 15E8 AK je 0 – 10 μg/ml) wurden die Ansätze für 4 Tage kultiviert. Die Zellen wurden 6 h unter Zugabe von BrdU inkubiert. Der Einbau von BrdU wurde anschließend mittels ELISA bestimmt. Die Messung der Absorption erfolgte bei OD_{405-490 nm}.

4.1.3 Expression von Immunrezeptoren auf CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen

CD3⁺ T-Zellen wurden zunächst retroviral zur Expression des rekombinanten Immunrezeptors BW431/26 scFv-Fc-CD3 ζ (# 439) transduziert und anschließend CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen durch magnetische Zellseparation isoliert. T-Zellen, die den Immunrezeptor exprimierten, wurden mit Hilfe der Färbung durch den F(ab')₂ anti-human IgG₁ Antikörper mittels Durchflusszytometrie identifiziert. Gleichzeitig wurde die CCR7 Expression durch Färbung mit dem anti-human CCR7 IgM Antikörper sowie dem Fluorochrom-konjugierten anti-murin IgM Sekundärantikörper nachgewiesen.

Etwa gleich viele CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen innerhalb der ungetrennten CD3⁺ T-Zell-Population exprimierten den Immunrezeptor. Auch nach der Trennung der CD3⁺ Gesamtpopulation hinsichtlich der CCR7 Expression wurden die Immunrezeptoren in T-Zellen der CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zell-Subpopulationen etwa gleich stark exprimiert (Abbildung 4.7).

Hier wurde gezeigt, dass CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen aufgrund der gleich starken Expression von Immunrezeptoren nach der Transduktion gleiche Voraussetzungen für die Tumorzell-Lyse besitzen.

Um die Anwesenheit der verschiedenen rekombinanten Immunrezeptoren auf der T-Zell-Oberfläche nachzuweisen, wurden CD3⁺ T-Zellen mit den unterschiedlichen Immunrezeptoren retroviral transduziert und die Expression der Rezeptoren unter Verwendung des F(ab')₂ anti-human IgG₁ Antikörpers und des anti-human CD3 Antikörpers mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abbildung 4.8).

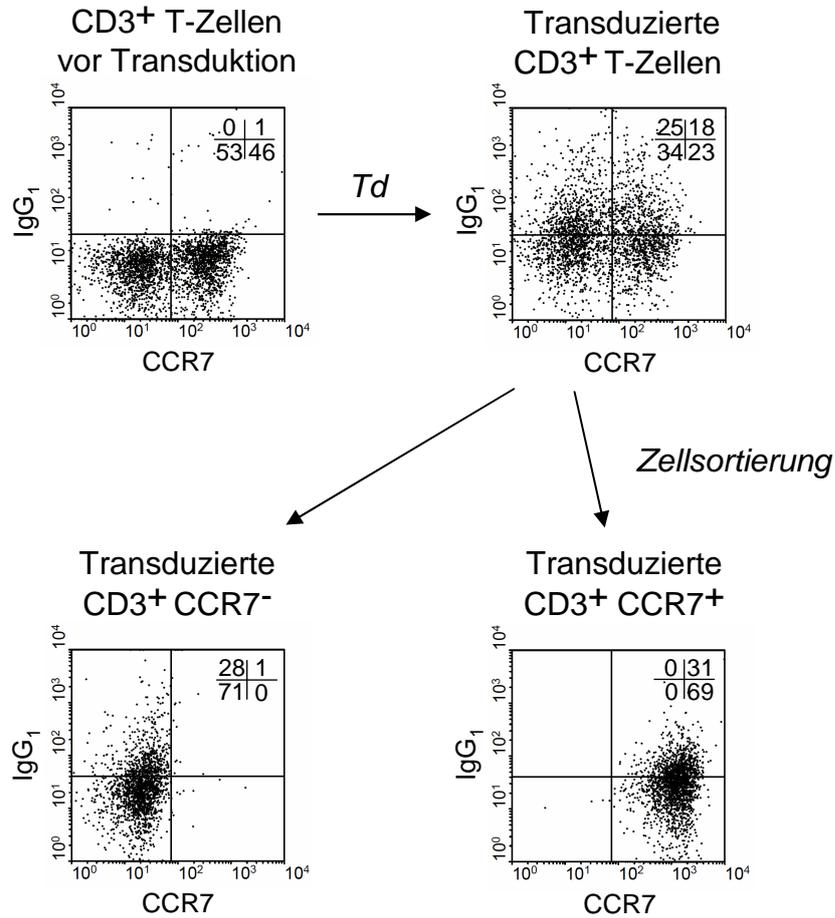


Abbildung 4.7: CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen werden mit gleicher Effizienz transduziert und exprimieren die rekombinanten Immunrezeptoren auch nach der Zell-Trennung. Isolierte CD3⁺ T-Zellen wurden zunächst zur Expression des Immunrezeptors BW431/26 scFv-Fc-CD3 ζ (# 439) transduziert und anschließend in die CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zell-Subpopulationen getrennt. Je 2×10^5 T-Zellen wurden mit dem PE-konjugierten F(ab')₂ anti-human IgG₁ Antikörper spezifisch für den Fc-Teil des Rezeptors sowie mit dem anti-human CCR7 IgM Antikörper (Klon 2H4) und dem FITC-konjugierten sekundären Antikörper anti-murin IgM gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Td=Transduktion

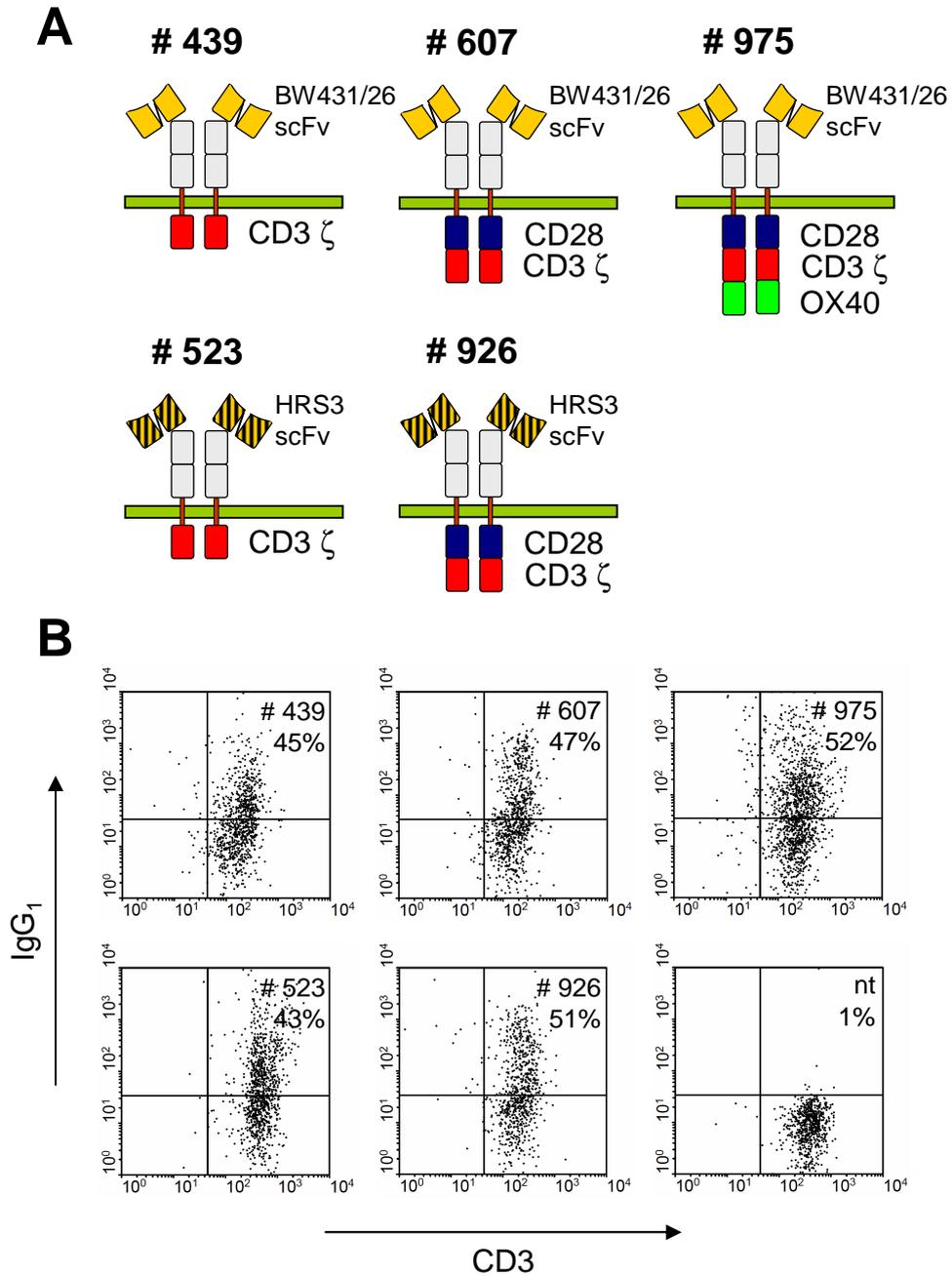


Abbildung 4.8: Expression von Immunrezeptoren auf T-Zellen nach retroviralem Gentransfer. Mit 400 U/ml IL-2 und 100 ng/ml OKT3 Antikörper vorstimulierte CD3⁺ T-Zellen wurden mittels retroviralem Gentransfer mit Immunrezeptoren unterschiedlicher modularer Komposition (in **A** schematisch dargestellt) ausgestattet. Die Expression dieser Rezeptoren wurde durch Färbung mit PE-konjugiertem F(ab')₂ anti-human IgG₁ Antikörper durchflusszytometrisch nachgewiesen. Zur Identifizierung der T-Zellen wurde ein FITC-konjugierter anti-human CD3 Antikörper (Klon UCHT-1) mitgeführt. Weiterhin wurde die Markierung mit PI zum Ausschluss toter Zellen herangezogen (nicht abgebildet). Schein-transduzierte T-Zellen (nt) dienen als Kontrolle.

4.1.4 Expression von *Homing*-Rezeptoren auf CCR7⁺ und CCR7⁻

T-Zellen

Um das *Homing*-Potenzial von CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen zu untersuchen, wurden T-Zellen aus frischem Blut von vier verschiedenen gesunden Spendern hinsichtlich der Expression verschiedener *Homing*-Rezeptoren auf der Zelloberfläche getestet. Hierfür wurden PBMCs mit den anti-human CD4 oder CD8 Antikörpern, dem anti-human CCR7 IgM Antikörper und dem anti-murin IgM Sekundärantikörper sowie mit jeweils einem der Antikörper anti-CD62L, anti-CCR10, anti-CD103, anti-CCR4, anti-CLA oder anti-CD11a (α Kette von LFA-1) gefärbt. Bei CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen wurde die Expression der entsprechenden *Homing*-Rezeptoren auf den CCR7⁺ und CCR7⁻ Subfraktionen gemessen.

L-Selektin wurde von einer größeren Anzahl von CCR7⁻ T-Zellen im Vergleich zu CCR7⁺ T-Zellen von sowohl der CD4⁺ als auch der CD8⁺ Populationen exprimiert. Zudem wurde L-Selektin in größeren Mengen auf der Oberfläche dieser Zellen detektiert. Bei CD8⁺ T-Zellen bestanden keine weiteren Unterschiede in der prozentualen Verteilung der *Homing*-Rezeptoren zwischen CCR7⁺ und CCR7⁻ Zellen. Jedoch exprimierten CD8⁺ CCR7⁺ T-Zellen größere Mengen CCR10 und CCR4 als CD8⁺ CCR7⁻ T-Zellen, während CD8⁺ CCR7⁻ T-Zellen signifikant mehr der LFA-1 α Kette (CD11a) exprimierten als CD8⁺ CCR7⁺ T-Zellen. CD4⁺ T-Zellen waren durch einen höheren Anteil an CCR10⁺, CCR4⁺ und CLA⁺ Zellen innerhalb der CCR7⁻ T-Zell-Subpopulation im Vergleich zur CD4⁺ CCR7⁺ T-Zell-Subpopulation gekennzeichnet. CD4⁺ CCR7⁻ T-Zellen zeichneten sich auch durch eine größere Expressionsstärke von CLA im Vergleich zu CD4⁺ CCR7⁺ T-Zellen aus. Weiterhin wurde mehr CD103 von CD4⁺ CCR7⁻ als von CD4⁺ CCR7⁺ T-Zellen exprimiert (Abbildung 4.9).

Hier wurde gezeigt, dass CD62L zum *Homing* in sekundäre lymphatische Gewebe vor allem auf CCR7⁺ T-Zellen exprimiert wird, während CCR7⁻ T-Zellen *Homing*-Rezeptoren für die Peripherie exprimieren.

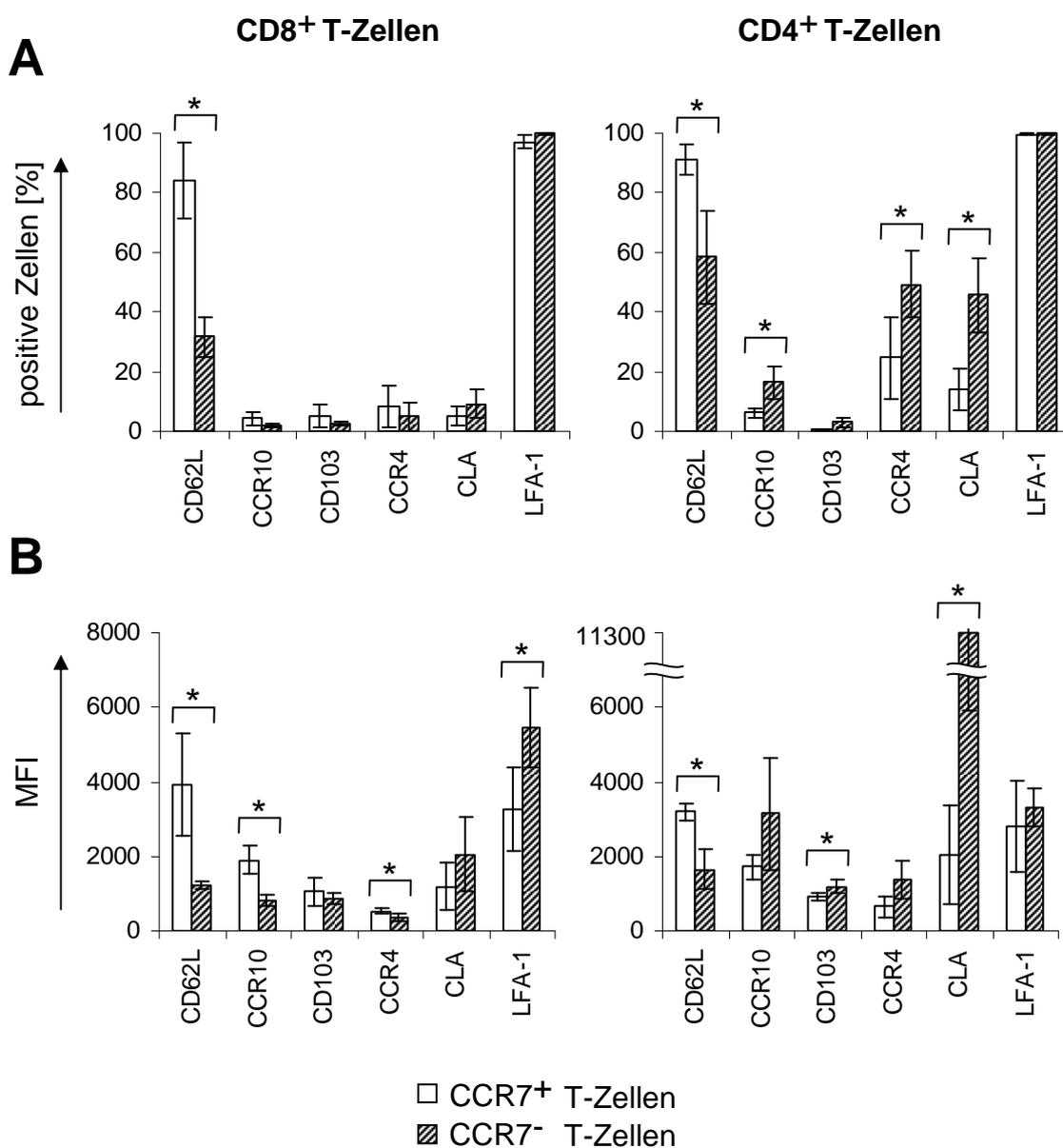


Abbildung 4.9: CCR7⁻ T-Zellen exprimieren *Homing*-Marker für die Peripherie, CCR7⁺ T-Zellen für die sekundären lymphatischen Gewebe. Je 5×10^5 PBMCs aus frischem Blut von 4 verschiedenen gesunden Spendern wurden mit anti-CD8 (Klon DK25) oder CD4 (Klon MT310) Antikörpern, mit dem anti-CCR7 IgM Antikörper (Klon 2H4) und dem anti-murin IgM Sekundärantikörper sowie mit je einem Antikörper spezifisch für die *Homing*-Marker CD62L (Klon DREG56), CCR10 (Klon 314305), CD103 (Klon Ber-ACT8), CCR4 (Klon 205410), CLA (Klon HECA-254) oder für die LFA-1 α -Kette (Klon 2D7) gefärbt. PBMCs, die mit Antikörpern irrelevanter Spezifität gleichen Isotyps gefärbt wurden, dienten als Kontrolle. Die Expression der *Homing*-Rezeptoren auf den CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zell-Subpopulationen innerhalb der CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zell-Populationen wurde durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der *Homing*-Marker Expression auf den T-Zellen der vier Spender \pm Standardabweichungen. * $p \leq 0,05$ (T-Test)

4.1.5 Differenzierungsstatus von CCR7⁻ und CCR7⁺ T-Zellen

Um den Grad der Differenzierung von CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen zu charakterisieren, wurde die CD45RO Expression der unstimulierten und stimulierten Subpopulationen untersucht. Hierfür wurden zunächst PBMCs aus frischem Blut isoliert und ein Teil der Zellen mit dem anti-human CD3 Antikörper, dem anti-human CCR7 IgM Antikörper und dem Fluorochrom-konjugierten anti-murin IgM Sekundärantikörper sowie dem anti-human CD45RO Antikörper gefärbt und die CD45RO Expression auf den CCR7⁺ und CCR7⁻ Subpopulationen der CD3⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. PBMCs aus dem selben „Buffy Coat“ wurden für 4 Tage unter Einfluss von immobilisierten OKT3 und 15E8 Antikörpern kultiviert und anschließend der gleichen Analyse der CD45RO Oberflächenexpression unterzogen.

Innerhalb der unstimulierten CCR7⁺ T-Zell-Population exprimierten 72 % der Zellen CD45RO. Damit wiesen in dieser Population 28 % der Zellen den Phänotyp naiver T-Zellen auf, während nach 4 Tagen Stimulation nur noch 2 % Zellen diesen Phänotyps in der CCR7⁺ T-Zell-Subpopulation beobachtet wurden. In der unstimulierten Subpopulation der CCR7⁻ T-Zellen wurde CD45RO Expression auf 43 % der Zellen detektiert. Nach 4-tägiger Stimulation exprimierten 94 % der CCR7⁻ T-Zellen CD45RO. Bei CCR7⁻ T-Zellen lässt die Abwesenheit von CD45RO auf den enddifferenzierten Phänotyp der T_{EMRA}-Zellen schließen.

Dieser Versuch zeigte, dass die in dieser Arbeit verwendeten aktivierten T-Zell-Populationen vernachlässigbare Zahlen naiver T-Zellen beinhalteten.

4.1.6 Zytokin-Expression der CCR7⁻ und CCR7⁺ T-Zellen

Zur weiteren Charakterisierung der Subpopulationen wurde die IFN- γ , IL-2 und IL-10 Sekretion der CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen nach Aktivierung untersucht. Hierfür wurden zwei Rezeptoren gleicher Bauart für zwei unterschiedliche Tumor-assoziierte Antigene durch retroviralen Gentransfer in den T-Zellen exprimiert. CD3⁺ T-Zellen wurden entweder zur Expression des anti-CD30 Rezeptors HRS3-scFv-Fc-CD28-CD3 ζ (# 926)

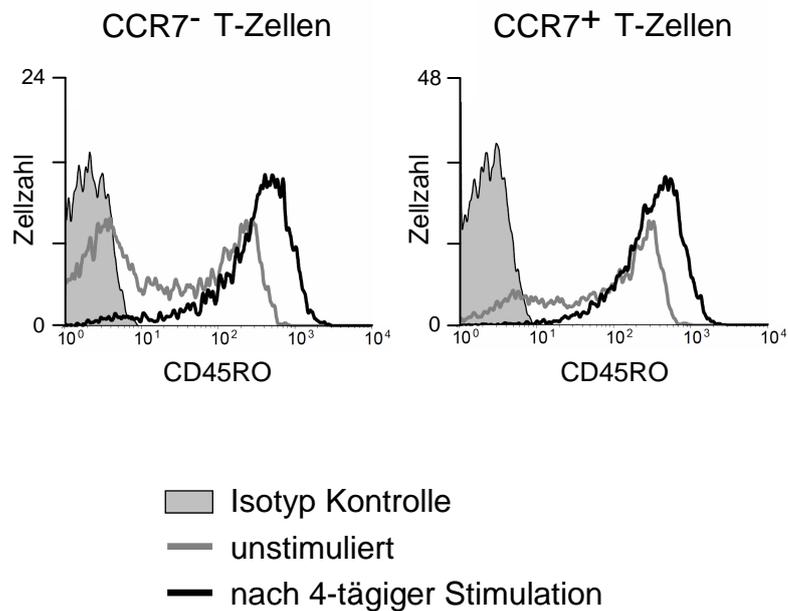


Abbildung 4.10: CD45RO Expression auf unstimulierten und stimulierten CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen. PBMCs wurden unstimuliert (graue Linie) oder nach 4-tägiger Stimulation durch die immobilisierten Antikörper OKT3 und 15E8 (je 5 µg/ml) (schwarze Linie) mit anti-human CD3 (Klon UCHT-1), anti-human CCR7 IgM (Klon 2H4) und anti-murin IgM sowie anti-human CD45RO (Klon UCHL1) Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. PBMCs, die mit Antikörpern irrelevanter Spezifität gleichen Isotyps gefärbt wurden, dienten als Kontrolle (graue Fläche).

oder des analogen Rezeptors mit Spezifität für CEA BW431/26 scFv-Fc-CD28-CD3 ζ (#607) transduziert. Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer CCR7 Expression getrennt (Reinheiten > 95 %) und mit CD30⁺ CEA⁻ L540 Zellen oder CD30⁻ CEA⁺ LS174T Zellen 48 h kokultiviert. Die Überstände wurden entnommen und mittels ELISA auf ihren Gehalt an IL-2, IL-10 und IFN- γ geprüft.

T-Zellen der CCR7⁻ Subpopulation produzierten nach Aktivierung weniger IL-2 als CCR7⁺ T-Zellen. Diese Beobachtung galt sowohl nach Aktivierung durch den CEA als auch durch den CD30 spezifischen Rezeptor (Abbildung 4.11 A). IL-10 wurde ausschließlich von mit LS174T Zellen kokultivierten, CEA spezifischen CCR7⁻ T-Zellen sekretiert. Da L540 Zellen große Mengen IL10 sezernieren, wird die mögliche Induktion einer IL-10 Sekretion durch T-Zellen überlagert (Abbildung 4.11 B). CCR7⁻ T-Zellen sezernieren nach Aktivierung mehr IFN- γ als Antigen-spezifische CCR7⁺ T-Zellen (Abbildung 4.11 C). T-Zellen ohne Immunrezeptor für das jeweilige Antigen sezernierten keine Zytokine (Abbildung 4.11).

Hier wurde gezeigt, dass CCR7⁻ T-Zellen durch Rezeptor-vermittelte Stimulation weniger IL-2, aber mehr IL-10 und IFN- γ sekretieren als CCR7⁺ T-Zellen.

Um die IL-2, IL-10 und IFN- γ Expression isolierter CCR7⁻ und CCR7⁺ T-Zellen zu untersuchen, wurden frisch isolierte CD3⁺ T-Zellen hinsichtlich ihrer CCR7 Expression getrennt (Reinheiten > 95 %) und in RPMI 1640-Medium für 2 h mit PMA/Ionomycin stimuliert. Anschließend wurden IL-2, IL-10 oder IFN- γ produzierende Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

Ein größerer Anteil der CCR7⁺ T-Zellen exprimierte IL-2 als bei Zellen der CCR7⁻ T-Zell-Subpopulation. Genau umgekehrt verhielt sich die Expression von intrazellulärem IFN- γ (Abbildung 4.12). Dieses Verhältnis spiegelte sich auch in der Expressionsstärke der Zytokine wider (nicht abgebildet).

Zur Analyse der Expression von IL-10 auf nicht aktivierten CCR7⁻ und CCR7⁺ T-Zellen wurden CD3⁺ T-Zellen isoliert, mittels magnetischer Zellsortierung in CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen getrennt (Reinheiten > 95 %) und die Zellen ohne weitere Zusätze kul-

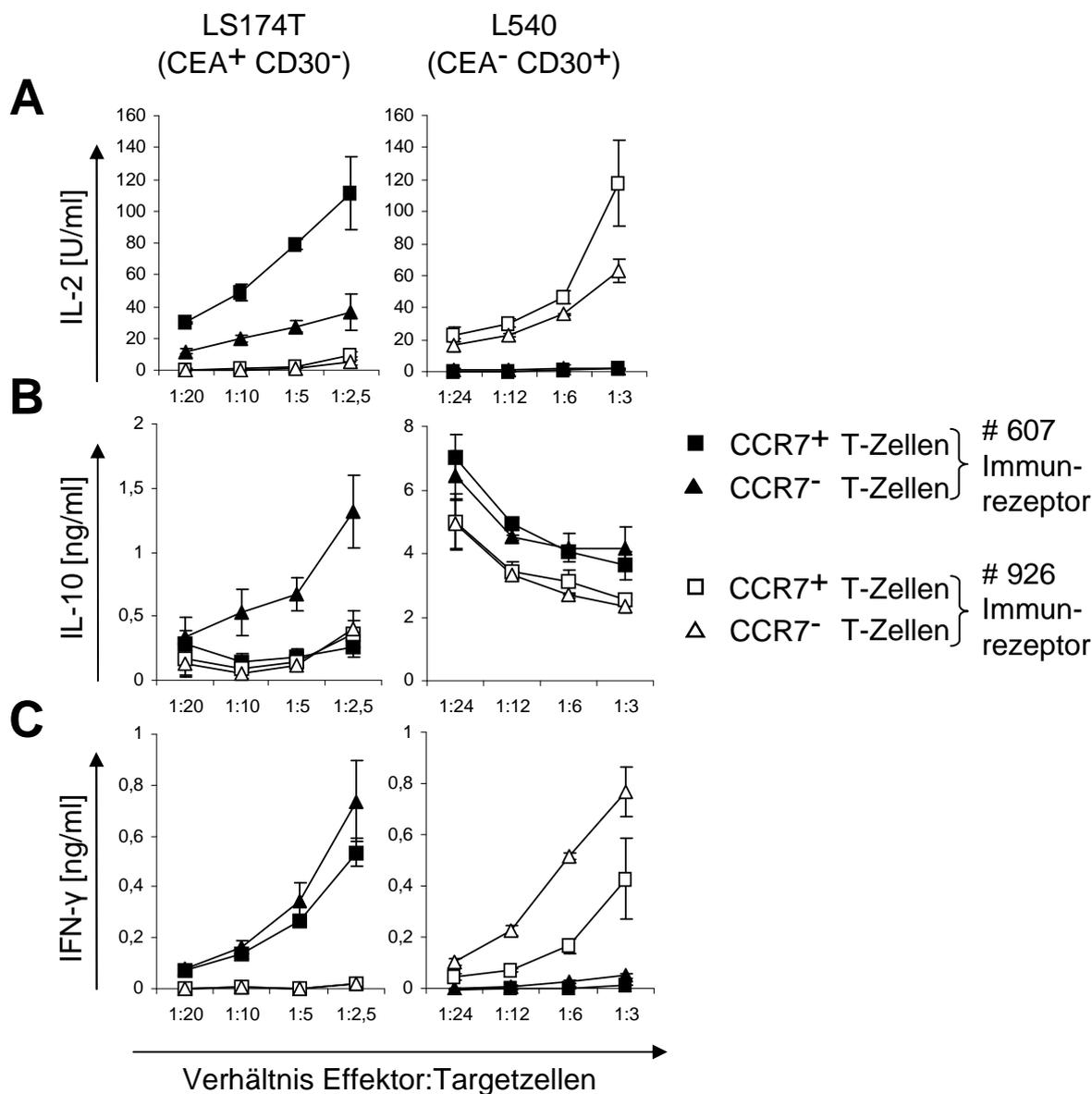


Abbildung 4.11: Antigen-spezifische CCR7⁻ T-Zellen sezernieren weniger IL-2, aber mehr IL-10 und IFN- γ als CCR7⁺ T-Zellen. CD3⁺ Zellen wurden zur Expression des CEA spezifischen Immunrezeptors BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 ζ (#607) (volle Symbole) oder des CD30 spezifischen Immunrezeptors HRS3-scFv-Fc-CD28-CD3 ζ (#926) (leere Symbole) transduziert und anschließend in die CCR7⁺ (Quadrate) und CCR7⁻ (Dreiecke) T-Zell-Subpopulationen getrennt. Die T-Zellen wurden für 48 h mit CEA⁺ CD30⁻ LS174T Zellen oder mit CEA⁻ CD30⁺ L540 Zellen kokultiviert. Mittels ELISA wurde die IL-2 (A), IL-10 (B) und IFN- γ (C) Konzentration in den Überständen gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Triplikaten \pm Standardabweichungen.

Ergebnisse

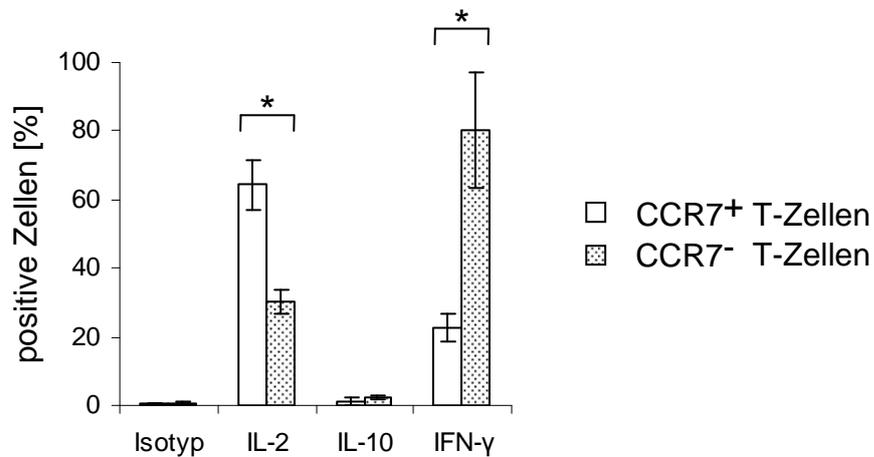


Abbildung 4.12: Isolierte CCR7⁻ T-Zellen sekretieren weniger IL-2 und mehr IFN-γ als CCR7⁺ T-Zellen. CD3⁺ T-Zellen wurden in die CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zell-Subpopulationen getrennt und 2 h mit PMA (20 ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml) stimuliert. Nach Zugabe von Brefeldin A (1:1000) wurden die Zellen erneut 16 h inkubiert. Die Zellen wurden unter Verwendung des „BD Cytfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilisation Kit“ permeabilisiert, mit einem der Antikörper anti-IL-2 (Klon MQ1-17H12), anti-IL-10 (Klon JES3-19F1) oder anti-IFN-γ (Klon 4S.B3) intrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Ansätze, die mit Antikörpern irrelevanter Spezifität gleichen Isotyps markiert wurden, dienen als Kontrolle. Der Versuch wurde dreimal mit T-Zellen unterschiedlicher Spender durchgeführt. Die Daten stellen Mittelwerte ± Standardabweichungen der Mittelwerte dar. * $p \leq 0,05$ (T-Test)

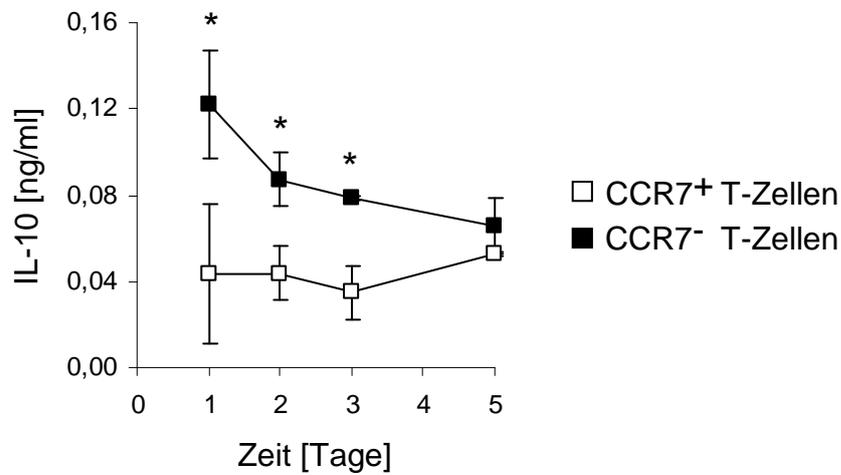


Abbildung 4.13: Isolierte CCR7⁻ T-Zellen sekretieren mehr IL-10 als CCR7⁺ T-Zellen. CD3⁺ T-Zellen wurden hinsichtlich ihrer CCR7 Expression getrennt und in RPMI 1640-Medium ohne weitere Zusätze kultiviert. An Tag 1, 2, 3 und 5 wurden Überstände entnommen und deren IL-10 Konzentration mittels ELISA gemessen. Abgebildet ist die von CCR7⁺ (□) und CCR7⁻ T-Zellen (■) sekretierte IL-10 Menge. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Triplikaten ± Standardabweichungen. * $p \leq 0,05$ (T-Test)

tiert. An Tag 1, 2, 3 und 5 wurden Überstände entnommen und deren IL-10 Konzentration mittels ELISA gemessen.

Wie schon zuvor beobachtet, sekretierten CCR7⁻ T-Zellen signifikant mehr IL-10 als CCR7⁺ Zellen (Abbildung 4.13).

Diese Ergebnisse bestätigen die bereits in vorhergegangenen Versuchen mit Rezeptor-aktivierten Subpopulationen beobachtete Expression der drei Zytokine auch für die entsprechenden Subpopulationen isolierter T-Zellen.

4.1.7 CCR7⁻ T-Zellen besitzen ein höheres zytolytisches Potenzial als CCR7⁺ T-Zellen

Zur Analyse des zytolytischen Potenzials von CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen wurden PBMCs aus frischem Blut von 6 gesunden Spendern isoliert und die Expression

von Perforin, Granzym A und Granzym B der Subpopulationen getestet. Zur Bestimmung der Expression der Effektormoleküle in CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen der CD4⁺ und CD8⁺ Subpopulationen wurden die PBMCs zunächst mit den entsprechenden Antikörpern gegen die Oberflächenmarker gefärbt. Anschließend erfolgte die Färbung mit dem intrazellulär bindenden Antikörper mit Spezifität für das jeweilige Effektormolekül, bevor die Zellen durchflusszytometrisch analysiert wurden.

Ein deutlich größerer Anteil der CCR7⁻ Zellen sowohl der CD4⁺ als auch der CD8⁺ Population exprimierte sehr viel größere Mengen zytolytischer Effektormoleküle im Vergleich zu CCR7⁺ Zellen des gleichen Spenders. Die prozentualen Verhältnisse von T-Zellen mit und ohne Effektormolekülen waren von Spender zu Spender zum Teil sehr unterschiedlich. Abgesehen von der Perforin und Granzym A Expression in der CD4⁺ Population bestanden signifikante Unterschiede zwischen dem Anteil der Effektormolekül-tragenden Zellen in den CCR7⁺ und CCR7⁻ Subpopulationen innerhalb der Spendergruppe (Abbildung 4.14). Die Expressionsstärke von Perforin und Granzym B war zudem signifikant größer in CD8⁺ CCR7⁻ Zellen als in CD8⁺ CCR7⁺ Zellen (nicht abgebildet).

Zur Ermittlung der Effektormolekül-Expression von aktivierten T-Zellen wurden frisch isolierte PBMCs für 4 Tage in Gegenwart von IL-2 (1000 U/ml), OKT3 Antikörper (100 ng/ml) und 15E8 Antikörper (10 ng/ml) kultiviert und anschließend der gleichen Färbeprozedur wie die unstimulierten Zellen unterzogen. Ein deutlich größerer Anteil der stimulierten CCR7⁻ T-Zellen beinhaltete deutlich mehr Perforin und Granzyme als stimulierte CCR7⁺ T-Zellen (nicht abgebildet).

Hier wurde gezeigt, dass CCR7⁻ T-Zellen größere Mengen der Effektormoleküle Perforin, Granzym A und Granzym B exprimieren als CCR7⁺ T-Zellen.

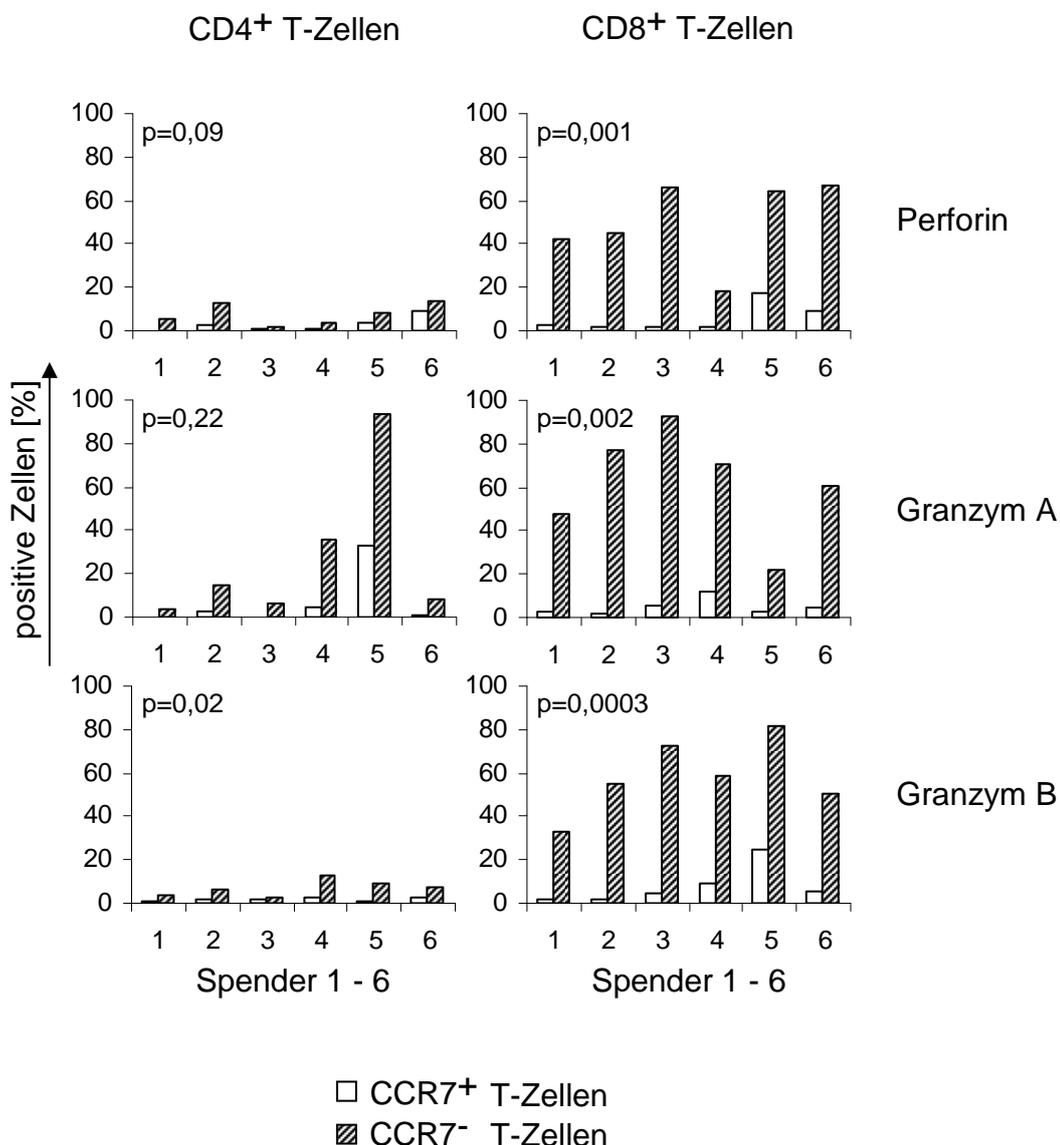


Abbildung 4.14: Mehr CCR7⁻ T-Zellen exprimieren Effektormoleküle als CCR7⁺ T-Zellen. PBMCs aus frischem Blut von 6 verschiedenen gesunden Spendern wurden isoliert und je 5×10^5 Zellen mit anti-CD4 (Klon MT310) oder CD8 (Klon DK25) Antikörpern und dem anti-human CCR7 IgM Antikörper (Klon 2H4) sowie dem anti-murin IgM Sekundärantikörper gefärbt. Die Zellen wurden unter Verwendung des „BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilisation Kit“ permeabilisiert und mit Antikörpern spezifisch für die Effektormoleküle Perforin (Klon δ G9), Granzym A (Klon CB9) oder Granzym B (Klon GB11) intrazellulär gefärbt. Die Markierung von PBMCs mit Antikörpern irrelevanter Spezifität gleichen Isotyps diente als Kontrolle. Die Analyse der Fluoreszenzen erfolgte durchflusszytometrisch. Abgebildet ist der Anteil der Effektormolekül exprimierenden CCR7⁺ und CCR7⁻ Zellen der CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zell-Subpopulationen der jeweiligen Spender. p-Werte wurden durch den T-Test ermittelt und beziehen sich auf den Unterschied der Expression des jeweils abgebildeten Markers auf CCR7⁺ im Vergleich zu CCR7⁻ T-Zellen innerhalb der Spendergruppe.

4.2 CCR7⁻ T-Zellen sind *in vitro* zytolytisch aktiver als CCR7⁺ T-Zellen

4.2.1 Aktivierung von CD3⁺ CCR7⁻ T-Zellen *in vitro*

Unter Verwendung rekombinanter Immunrezeptoren wurde untersucht, mit welcher Effizienz CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen ihre anti-Tumor Effektor Funktion ausführen. T-Zellen wurden hierfür zunächst zur Expression des CEA spezifischen Immunrezeptors BW431/26 scFv-Fc-CD3ζ (# 439) transduziert, mittels magnetischer Zellsortierung hinsichtlich der CCR7 Expression getrennt (Reinheiten >95 %) und 48 h mit CEA⁺ LS174T Zellen oder CEA⁻ Colo320 Zellen kokubiert.

CCR7⁻ T-Zellen mit CEA spezifischem Immunrezeptor lysierten CEA⁺ Tumorzellen mit höherer Effizienz als Rezeptor-tragende CCR7⁺ T-Zellen. Die stärkere Aktivierung der CCR7⁻ T-Zellen wurde durch erhöhte IFN-γ Sekretion bestätigt. Als Kontrolle dienten Schein-transduzierte CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen, die weder LS174T Zellen lysierten noch IFN-γ sezernierten (Abbildung 4.15).

Dieser Versuch zeigt die effektivere Immunrezeptor-vermittelte Aktivierung von CCR7⁻ T-Zellen im Vergleich zu CCR7⁺ T-Zellen.

4.2.2 Spezifität der durch CCR7⁻ T-Zellen vermittelten Zytotoxizität

Um die Spezifität der Effektorfunktion CCR7⁻ T-Zellen zu überprüfen, wurden T-Zellen mit Rezeptoren gleicher Bauart ausgestattet, die gegen zwei unterschiedliche Tumor-assoziierte Antigene gerichtet sind. CD3⁺ T-Zellen wurden zur Expression des anti-CD30 Rezeptors HRS3-scFv-Fc-CD3ζ (# 523) oder des analogen Rezeptors mit Spezifität für CEA BW431/26 scFv-Fc-CD3ζ (# 439) transduziert, mittels magnetischer Zellsortierung in die CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zell-Subpopulationen getrennt (Reinheiten

Ergebnisse

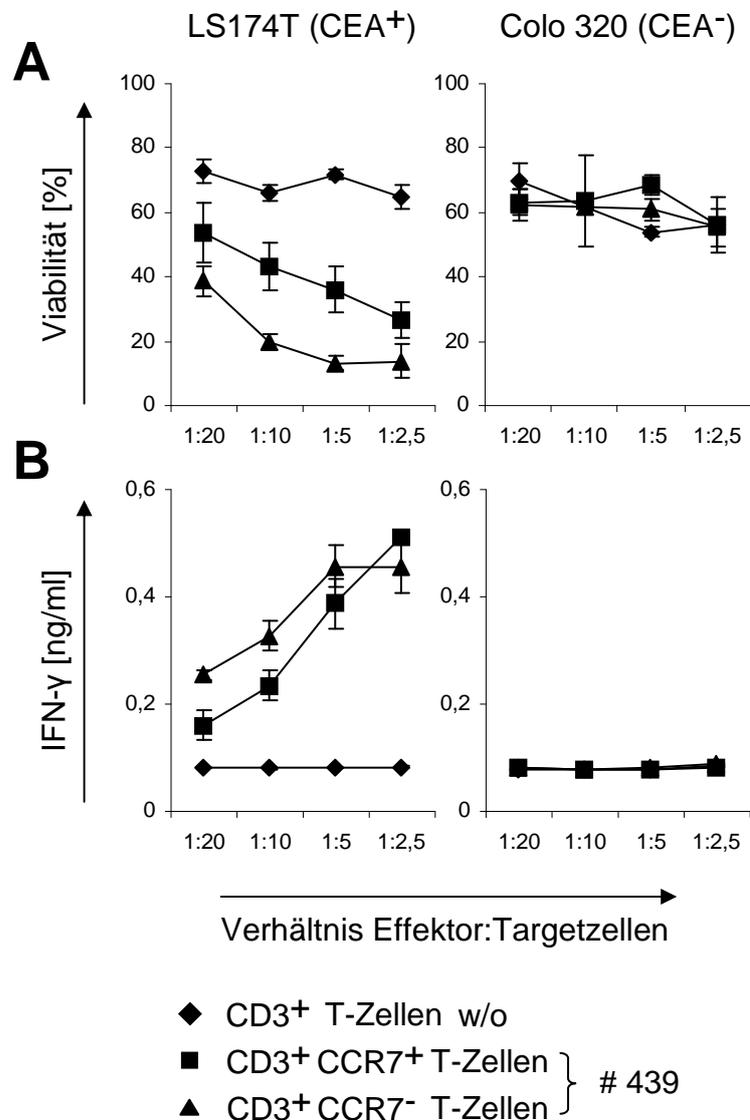


Abbildung 4.15: CEA spezifische CD3⁺ CCR7⁻ T-Zellen lysieren CEA⁺ Tumorzellen effektiver als CCR7⁺ T-Zellen. CD3⁺ T-Zellen wurden zur Expression des anti-CEA Rezeptors BW431/26 scFv-Fc-CD3 ζ (# 439) transduziert und in die CCR7⁺ (■) und CCR7⁻ (▲) T-Zell-Subpopulationen getrennt. Die Koinkubation mit CEA⁺ LS174T Zellen oder CEA⁻ Colo320 Zellen erfolgte für 48 h in 96-„Well“ Mikrotiterplatten. Schein-transduzierte CD3⁺ T-Zellen (◆) dienten als Kontrolle. Es wurden bei $1,25 \times 10^3$ bis 1×10^4 Effektorzellen/„Well“ konstant $2,5 \times 10^4$ Tumorzellen/„Well“ eingesetzt. Die Viabilität der Tumorzellen wurde aus den nach Zugabe von XTT-Reagenz gemessenen Absorptionen bei OD_{450–650 nm} errechnet (A). Die IFN- γ Konzentration der Kulturüberstände wurde mittels ELISA ermittelt (B). Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Triplikaten \pm Standardabweichungen. w/o=ohne (*without*) Immunrezeptor

>95 %) und anschließend mit CD30⁺ CEA⁻ MyLa Zellen oder CD30⁻ CEA⁺ LS174T Zellen koinkubiert.

CD30 spezifische CCR7⁻ T-Zellen lysierten CD30⁺ MyLa Tumorzellen effizienter als CCR7⁺ T-Zellen mit demselben Immunrezeptor. Auch CEA⁺ LS174T Tumorzellen wurden durch CCR7⁻ T-Zellen mit dem anti-CEA Immunrezeptor besser lysiert als durch CCR7⁺ T-Zellen gleicher Spezifität. Die T-Zell-Aktivierung wurde spezifisch durch den Immunrezeptor vermittelt, da T-Zellen mit dem anti-CEA Immunrezeptor # 439 ausschließlich durch Koinkubation mit CEA⁺ CD30⁻ LS174T Zellen aktiviert wurden, aber nicht durch CEA⁻ CD30⁺ MyLa Zellen, während T-Zellen mit anti-CD30 Rezeptor # 523 durch MyLa Zellen, aber nicht durch LS174T Zellen aktiviert wurden (Abbildung 4.16).

Hier wurde die Spezifität der Immunrezeptor-vermittelten Tumorzell-Lyse durch CCR7⁻ T-Zellen gezeigt.

4.2.3 Aktivierung von CD4⁺ CCR7⁻ T-Zellen *in vitro*

In der CD8⁺ Population ist der Anteil der CCR7⁻ Zellen größer als in der CD4⁺ Population. Um auszuschließen, dass die größere Effektivität CCR7⁻ T-Zellen durch den größeren Anteil der CD8⁺ T-Zellen in dieser Population begründet ist, wurde die Aktivierung von CD4⁺ CCR7⁺ im Vergleich zu CD4⁺ CCR7⁻ Zellen untersucht. Hierfür wurden CD4⁺ T-Zellen mittels negativer Selektion aus PBMCs isoliert. Diese T-Zellen wurden zur Expression des CEA spezifischen Immunrezeptors BW431/26 scFv-Fc-CD3ζ (# 439) transduziert, durch magnetische Zellsortierung in die CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zell-Subpopulationen getrennt (Reinheiten >95 %) und für 48 h mit CEA⁺ LS174T Tumorzellen koinkubiert.

CD4⁺ CCR7⁻ T-Zellen mit Immunrezeptor lysierten CEA⁺ Tumorzellen mit höherer Effizienz als Rezeptor-tragende CD4⁺ CCR7⁺ T-Zellen. CD4⁺ CCR7⁻ T-Zellen wurden stärker aktiviert, angezeigt durch erhöhte IFN- γ Sekretion dieser Population. Als Kontrolle dienten Schein-transduzierte CD4⁺ T-Zellen, bei denen

Ergebnisse

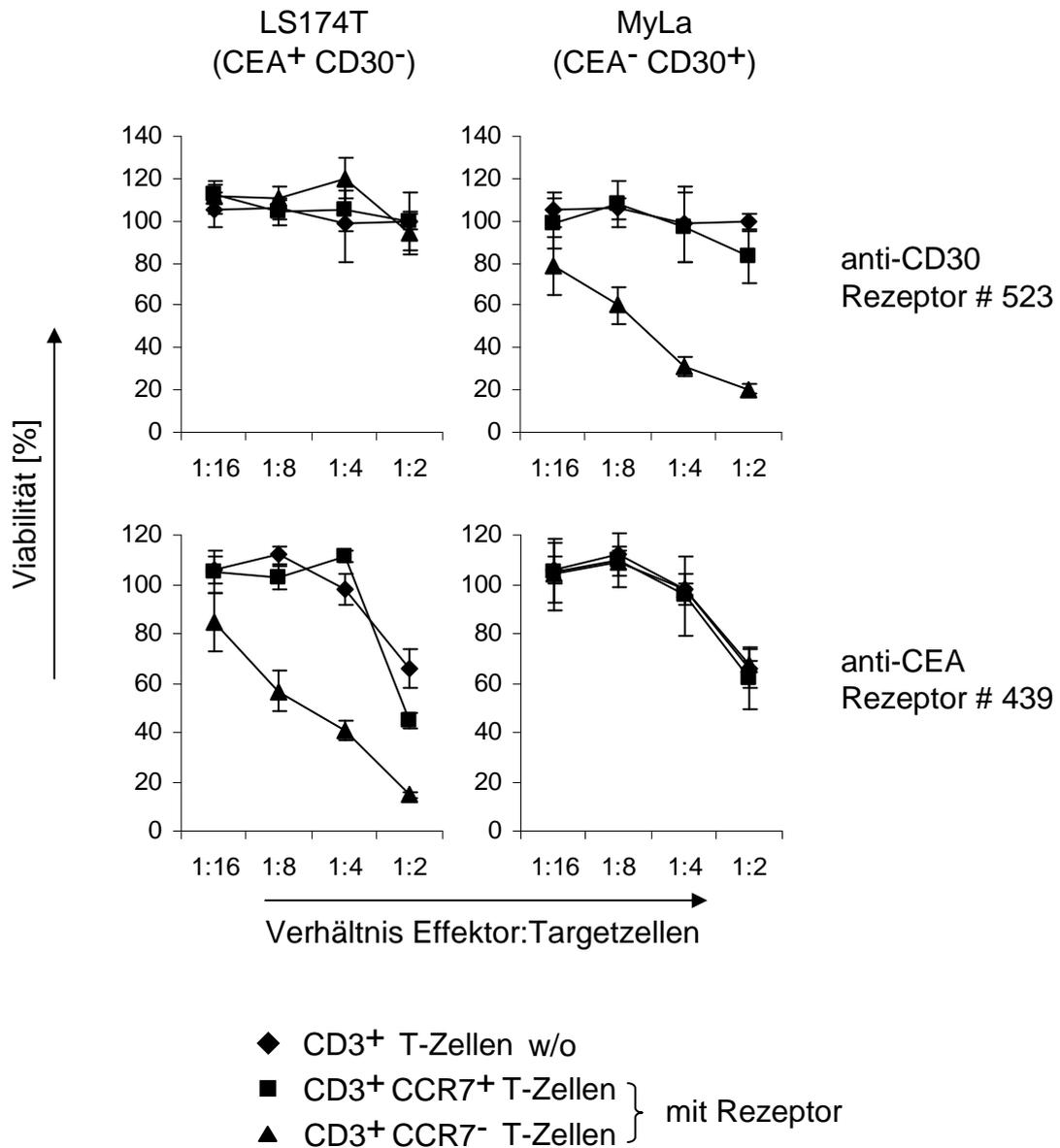


Abbildung 4.16: CCR7⁻ T-Zellen vermitteln spezifische Zytolyse von Tumorzellen *in vitro*. CD3⁺ T-Zellen wurden mit anti-CD30 HRS3-Fc-CD3ζ (# 523) oder anti-CEA BW431/26 scFv-Fc-CD3ζ (# 439) transduziert und in die CCR7⁺ (■) und CCR7⁻ (▲) T-Zell-Subpopulationen getrennt. Die Koinkubation mit CD3⁻CEA⁺ LS174T Zellen oder CD3⁺CEA⁻ MyLa Zellen erfolgte für 48 h in 96-„Well“ Mikrotiterplatten. Schein-transduzierte CD3⁺ T-Zellen (◆) dienten als Kontrolle. Es wurden bei $1,25 \times 10^3$ bis 1×10^4 Effektorzellen/„Well“ konstant 2×10^4 Tumorzellen/„Well“ eingesetzt. Die Viabilität der Tumorzellen wurde aus den nach Zugabe von XTT-Reagenz gemessenen Absorptionen bei OD_{450–650 nm} errechnet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Triplikaten ± Standardabweichungen. w/o=ohne (*without*) Immunrezeptor

weder Lyse der LS174T Zellen noch IFN- γ Sekretion festgestellt wurden (Abbildung 4.17).

Hier wurde gezeigt, dass Immunrezeptor-stimulierte CD4⁺ CCR7⁻ Zellen effektiver aktiviert werden als CD4⁺ CCR7⁺ Zellen.

4.3 Die hohe Apoptosefrequenz der CCR7⁻ T-Zellen kann unterdrückt werden

Isolierte CCR7⁻ T-Zellen zeigen *in vitro* ein stagnierendes Wachstum, welches durch eine zunehmende Frequenz apoptotischer Zellen begründet sein könnte. Zur Verifizierung dieser Hypothese wurden frisch isolierte CD3⁺ T-Zellen hinsichtlich ihrer CCR7 Expression getrennt (Reinheiten > 95 %) und in Gegenwart oder Abwesenheit der Antikörper OKT3 und 15E8 kultiviert. Nach 5 Tagen wurden die Anzahl apoptotischer Zellen durch Färbung mit Annexin V und 7-AAD und anschließender durchflusszytometrischer Analyse geprüft.

Sowohl unstimulierte als auch stimulierte CCR7⁻ T-Zellen wiesen eine stärkere Bindung von Annexin V sowie eine erhöhte Aufnahme von 7-AAD und somit eine geringere Viabilität als die jeweilige CCR7⁺ T-Zell-Population auf (Abbildung 4.18).

Hier wurde gezeigt, dass CCR7⁻ T-Zellen eine höhere Anfälligkeit für den Aktivierungsinduzierten Zelltod aufweisen als CCR7⁺ T-Zellen.

4.3.1 IL-7 und IL-15 erhöhen die Viabilität CCR7⁻ T-Zellen

Um der Apoptose von CCR7⁻ Zellen entgegenzuwirken, wurden die Zytokine IL-2, IL-7, IL-15, IFN- γ , TNF- α und TGF- β bezüglich ihrer anti-apoptotischen Aktivität geprüft. Hierfür wurden CD3⁺ T-Zellen hinsichtlich der Expression von CCR7 getrennt (Reinheiten > 95 %) und CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit der An-

Ergebnisse

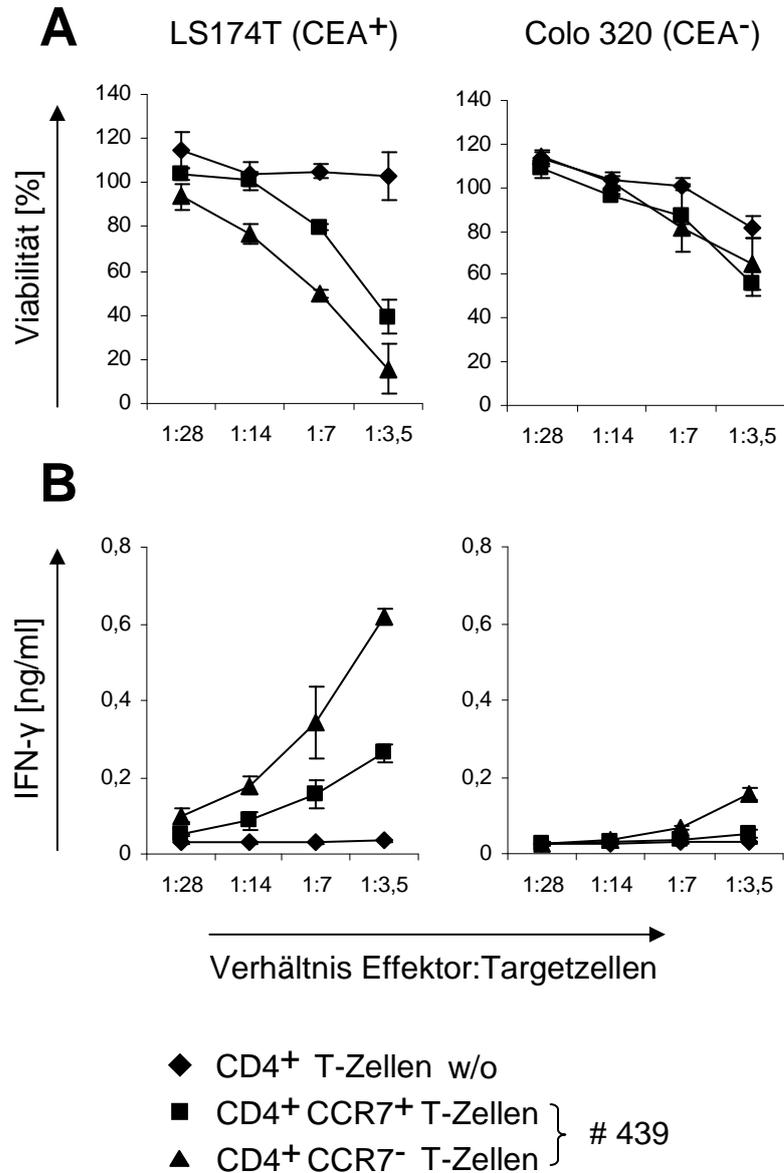


Abbildung 4.17: CEA spezifische CD4⁺ CCR7⁻ T-Zellen lysieren CEA⁺ Tumorzellen effektiver als CD4⁺ CCR7⁺ T-Zellen. CD4⁺ T-Zellen wurden zur Expression des anti-CEA Rezeptors BW431/26 scFv-Fc-CD3 ζ (# 439) transduziert und in die CCR7⁺ (■) und CCR7⁻ (▲) T-Zell-Subpopulationen getrennt. Die Koinkubation mit CEA⁺ LS174T Zellen oder CEA⁻ Colo320 Zellen erfolgte für 48 h in 96-„Well“ Mikrotiterplatten. Schein-transduzierte CD3⁺ T-Zellen (◆) dienten als Kontrolle. Es wurden bei $1,25 \times 10^3$ bis 1×10^4 Effektorzellen/„Well“ konstant $2,5 \times 10^4$ Tumorzellen/„Well“ eingesetzt. Die Viabilität der Tumorzellen wurde aus den nach Zugabe von XTT-Reagenz gemessenen Absorptionen bei OD_{450–650 nm} errechnet (A). Die IFN- γ Konzentration der Kulturüberstände wurde mittels ELISA ermittelt (B). Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Triplikaten \pm Standardabweichungen. w/o=ohne (*without*) Immunrezeptor

Ergebnisse

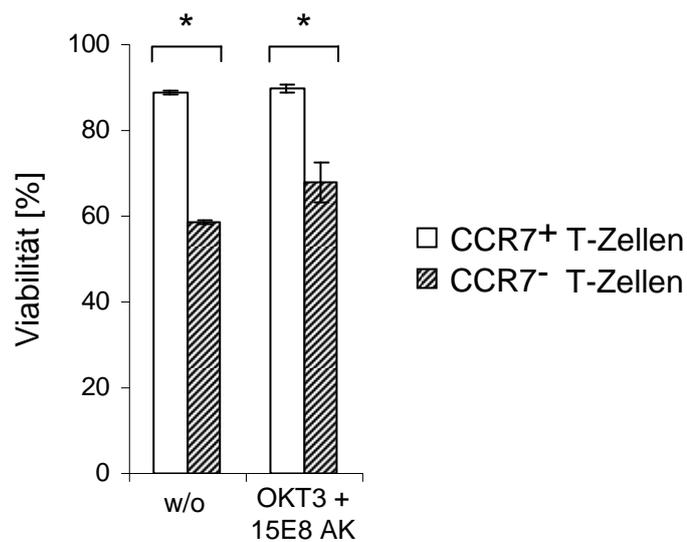


Abbildung 4.18: CCR7⁻ T-Zellen haben eine geringere Viabilität als CCR7⁺ T-Zellen. CD3⁺ T-Zellen wurden in die CCR7⁺ (leere Balken) und CCR7⁻ T-Zell-Subpopulationen (gestreifte Balken) getrennt und in RPMI 1640 Medium ohne weitere Zusätze oder unter Zugabe des anti-CD3 agonistischen Antikörpers OKT3 und des anti-CD28 agonistischen Antikörpers 15E8 (je 100 ng/ml) inkubiert. Nach 5 Tagen wurden die Zellen mit Annexin V und 7-AAD gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Zellen, die mit Antikörpern irrelevanter Spezifität gleichen Isotyps markiert wurden, dienten als Kontrolle. Abgebildet sind die Mittelwerte von Triplikaten \pm Standardabweichungen. * $p < 0,05$ (T-Test); w/o=ohne (*without*) Stimulation

antikörper OKT3 und 15E8 kultiviert. Zusätzlich wurde rekombinantes IL-2, IL-7, IL-15, IFN- γ , TNF- α oder TGF- β zugegeben. T-Zellen, die ohne Zugabe eines Zytokins kultiviert wurden, dienten als Kontrolle. Nach 5 Tagen wurden die Zellen mit Annexin V sowie 7-AAD gefärbt und die Verteilung der Marker mittels Durchflusszytometrie analysiert.

IL-7 und IL-15 erhöhten die Viabilität von sowohl CCR7⁺ als auch CCR7⁻ T-Zellen unabhängig von der Gegenwart oder Abwesenheit der Antikörper OKT3 und 15E8. Dagegen schränkte TGF- β die Lebensfähigkeit von sowohl unstimulierten als auch stimulierten CCR7⁻ Zellen signifikant ein. CCR7⁺ Zellen wurden durch keines der Zytokine supprimiert (Abbildung 4.19).

Hier wurde gezeigt, dass IL-7 und IL-15 die Viabilität von CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zell-Subpopulationen erhöhen.

4.3.2 CD28-OX40 Kostimulation schützt CCR7⁻ T-Zellen vor Apoptose

Um zu prüfen, ob die Frequenz apoptotischer CCR7⁻ T-Zellen durch Immunrezeptor-vermittelte Kostimulation beeinflusst werden kann, wurden CD3⁺ T-Zellen zur Expression des Rezeptors BW431/26 scFv-Fc-CD28-CD3 ζ (#607) oder BW431/26 scFv-Fc-CD28-CD3 ζ -OX40 (#975) transduziert. Die Zellen wurden durch den immobilisierten anti-idiotypischen Antikörper BW2064/36 mit Spezifität für das CEA scFv stimuliert. Rezeptor-tragende CD3⁺ T-Zellen, die unter Einfluss eines immobilisierten Antikörpers irrelevanter Spezifität gleichen Isotyps kultiviert wurden, dienten als Kontrolle. Nach zwei Tagen wurde mittels Färbung mit Annexin V der Anteil apoptotischer Zellen der Rezeptor-tragenden CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen bestimmt.

Die Viabilität von CCR7⁺ T-Zellen wurde durch Rezeptor-vermittelte Stimulation unabhängig von der Zusammensetzung der Signalkette nicht beeinflusst. Für CCR7⁻ T-Zellen wurde ein signifikant besseres Überleben mit Hilfe der kombinierten Kostimulation durch CD28 und OX40 beobachtet, während diese Zellen

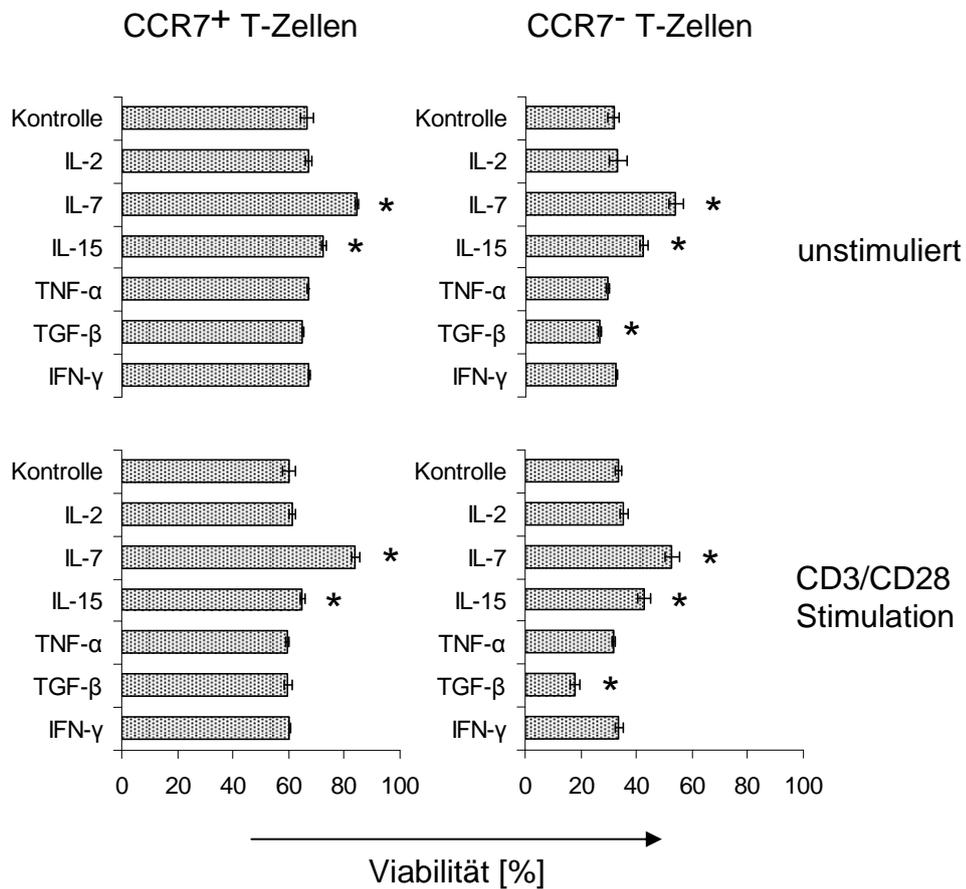


Abbildung 4.19: IL-7 und IL-15 senken die Apoptoserate von CCR7⁻ T-Zellen. CD3⁺ T-Zellen wurden zunächst hinsichtlich ihrer CCR7 Expression getrennt. Anschließend wurden je 5×10^4 Zellen/„Well“ auf einer 96-„Well“ Mikrotiterplatte in Gegenwart oder Abwesenheit der Antikörper anti-human CD3 (OKT3) und anti-human CD28 (15E8) (je 100 ng/ml) stimuliert und, unter Zugabe von jeweils einem der Zytokine IL-2 (400 U/ml), IL-7, IL-15, TNF-α, TGF-β oder IFN-γ (je 10 ng/ml) kultiviert. T-Zellen, die ohne Zugabe von Zytokinen kultiviert wurden, dienten als Kontrolle. Nach 5 Tagen Inkubation wurden die T-Zellen mit Annexin V sowie 7-AAD gefärbt und der Anteil apoptotischer Zellen durchflusszytometrisch ermittelt. Alle Ansätze wurden in dreifacher Ausföhrung angefertigt. * $p \leq 0,05$ (T-Test) im Vergleich zur Kontrolle ohne Zytokin

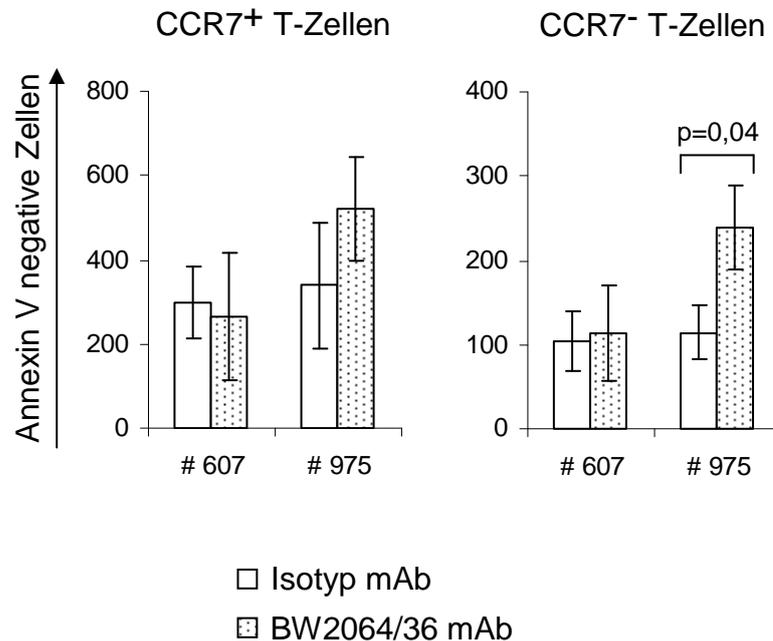


Abbildung 4.20: CD28-OX40 Kostimulation erhöht die Viabilität der CCR7⁻ T-Zellen. Frisch isolierte CD3⁺ T-Zellen wurden zur Expression der CEA spezifischen Immunrezeptoren BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3ζ (# 607) oder BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3ζ-OX40 (#975) transduziert und mit dem immobilisierten anti-idiotypischem Antikörper BW2064/36 spezifisch für das CEA scFv (gepunktete Balken) stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit einem immobilisierten Antikörper irrelevanter Spezifität gleichen Isotyps inkubiert wurden (leere Balken). Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit den Antikörpern F(ab')₂ anti-human IgG₁, anti-human CCR7 IgM (Klon 2H4), dem Sekundärantikörper anti-murin IgM sowie Annexin V gefärbt und die Verteilung der Marker durchflusszytometrisch analysiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Triplikaten ± Standardabweichungen.

durch CD28 Kostimulation allein keinen Überlebensvorteil erhielten (Abbildung 4.20).

Hier wurde gezeigt, dass die Viabilität CCR7⁻ T-Zellen durch die Rezeptor-vermittelte CD28-CD3ζ-OX40 Stimulation, nicht aber durch CD28-CD3ζ Stimulation erhöht werden kann.

Die Überleben-fördernde Wirkung der OX40 Kostimulation könnte durch die Induktion der Expression des anti-apoptischen Proteins Bcl-2 begründet sein. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden CD3⁺ T-Zellen zur Expression der Immunrezeptoren # 607 (BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3ζ) oder # 975 (BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3ζ-

OX40) transduziert. Es folgte die Isolation der Rezeptor-positiven T-Zellen mittels magnetischer Zellseparation am autoMACS™ Gerät. Die Reinheiten der erhaltenen Rezeptor-tragenden Fraktionen betragen >95 %. Die angereicherten Rezeptor-tragenden Zellen wurden mit dem immobilisiertem anti-idiotypischem Antikörper BW2064/36 spezifisch für das CEA scFv stimuliert. Zellen, die mit immobilisiertem Antikörper irrelevanter Spezifität gleichen Isotyps inkubiert wurden, dienten als Kontrolle. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit dem anti-CCR7 IgM Antikörper, dem anti-murin IgM Sekundärantikörper und mit dem anti-Bcl-2 Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen exprimierten nach Stimulation durch den CD28-CD3ζ-OX40 Rezeptor (#975) signifikant mehr Bcl-2 als ohne Stimulation. CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen, die den gleichen Immunrezeptor exprimierten, wiesen keinen Unterschied in der Bcl-2 Expression auf.

Insgesamt zeigten die Untersuchungen, dass die Apoptoserate CCR7⁻ T-Zellen durch die kombinierte CD28-OX40 Kostimulation vermindert werden kann, was unter anderem durch eine erhöhte Bcl-2 Expression begründet ist.

4.4 *In vitro* Generierung von CCR7⁻ T-Zellen

Rezeptor-tragende CCR7⁻ T-Zellen lysieren Antigen-positive Tumorzellen besser als CCR7⁺ Rezeptor-tragende T-Zellen. Allerdings ist die Rezeptor-vermittelte Zytotoxizität der beiden Subpopulationen schwächer als die der ungetrennte Gesamtpopulation. Um zu untersuchen, ob Zellen durch die Trennung hinsichtlich der CCR7 Expression in ihrer Aktivität beeinträchtigt werden, wurden CD3⁺ T-Zellen zunächst transduziert und anschließend magnetisch separiert. Die ungetrennte CD3⁺ Gesamtpopulation, CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zell-Subpopulationen sowie die in ihrer ursprünglichen Verteilung wiedervereinigten Subpopulationen wurden für 48 h mit CEA⁺ LS174T Zellen oder CEA⁻ Colo320 Zellen inkubiert. Die Reinheiten der CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zell-Subpopulationen betragen > 95 %. Die Überstände wurden nach 48 h entnommen und mittels ELISA auf die IFN- γ Konzentration überprüft.

Ergebnisse

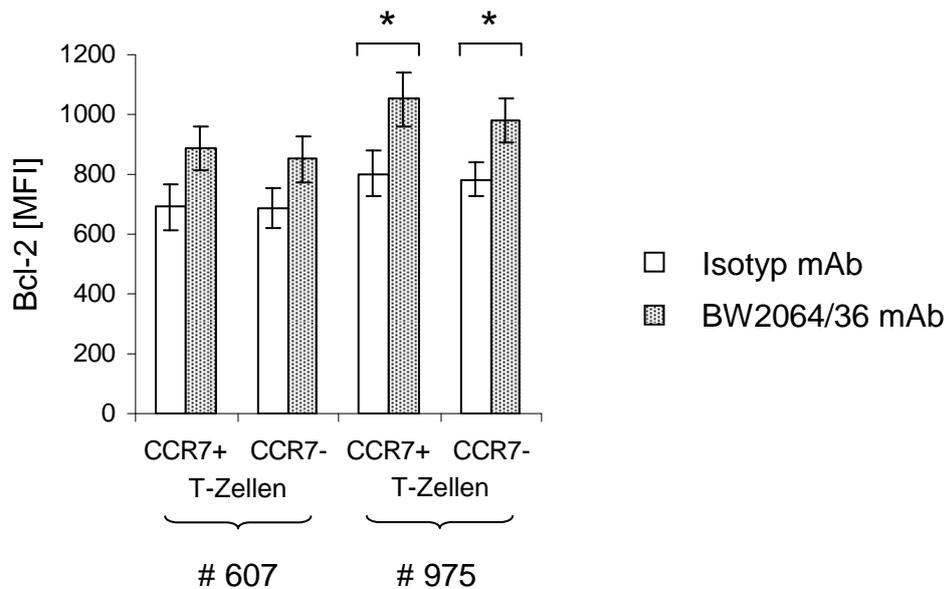


Abbildung 4.21: CD28-OX40 Kostimulation induziert die Expression von Bcl-2. CD3⁺ T-Zellen wurden zur Expression der Immunrezeptoren BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3ζ (#607) oder BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3ζ-OX40 (#975) transduziert und die Rezeptor-tragenden Zellen isoliert. Hierfür wurden die Zellen mit PE-konjugiertem F(ab')₂ anti-human IgG₁ Antikörper gefärbt und anschließend mit anti-PE „MicroBeads“ magnetisch markiert. Die autoMACS™ Trennung erfolgte unter Verwendung des Programmes „Possel d“ für die Anreicherung von Zellen mit geringer Frequenz mittels Positiv-Selektion. Auf einer 96-„Well“ Mikrotiterplatte wurden jeweils 5 × 10⁴ Zellen/„Well“ mit immobilisiertem anti-CEA scFv Antikörper (BW2064/36) stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit einem immobilisierten Antikörper irrelevanter Spezifität gleichen Isotyps inkubiert wurden. Nach zwei Tagen wurden die T-Zellen mit dem anti-human CCR7 IgM Antikörper (Klon 2H4), dem anti-murin IgM Sekundärintikörper und dem anti-human Bcl-2 Antikörper (Klon 100) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Abgebildet sind Mittelwerte der mittleren Fluoreszenz-Intensitäten (MFIs) von Triplikaten ± Standardabweichungen. * p ≤ 0,05 (T-Test)

CD3⁺ T-Zellen sezernierten am meisten IFN- γ , während im Überstand der getrennten und anschließend wiedervereinigten Zellen sehr viel weniger IFN- γ , auch weniger als in der CCR7⁻ T-Zell-Subpopulation, detektiert wurde. Noch schwächere IFN- γ Sekretion wurde bei CCR7⁺ T-Zellen beobachtet. Die zur Kontrolle mitgeführten, Scheintransduzierten T-Zellen produzierten kein IFN- γ ebenso wie alle T-Zell-Populationen, die zusammen mit Antigen-negativen Colo320 Zellen inkubiert wurden (Abbildung 4.22).

Dieser Versuch zeigte, dass die Aktivität von Zellpopulationen durch magnetische Separation beeinträchtigt wird.

4.4.1 Proliferation fördert die Entstehung von CCR7⁻ T-Zellen

Um festzustellen, ob die Generierung CCR7⁻ T-Zellen von den Stimulationsbedingungen abhängig ist, wurden CD3⁺ T-Zellen entweder mit dem anti-CD3 Antikörper OKT3 oder mit den anti-CD3 und anti-CD28 (15E8) Antikörpern in Gegenwart von IL-2 oder IL-7 stimuliert. Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen gezählt sowie ihre CCR7 Expression mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

In Gegenwart von IL-2 proliferierten Zellen weit stärker als unter Einfluss von IL-7. Gleiches galt für Zellen, die mit anti-CD3/anti-CD28 Stimulation und IL-2 kultiviert wurden, im Gegensatz zu den mit anti-CD3 und IL-2 stimulierten Zellen. Der Anteil an CCR7⁻ T-Zellen an der Gesamtpopulation verhielt sich in allen Ansätzen entsprechend zur Zellzahl. Starke Proliferation ging mit einer starken Zunahme an CCR7⁻ T-Zellen einher, während die Abwesenheit von Proliferation eine unveränderte CCR7 Expression zur Folge hatte. IL-7 wies kein Potenzial zur Induktion CCR7⁻ T-Zellen auf.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass Proliferation einer T-Zell-Population die Generierung CCR7⁻ T-Zellen bedingt.

Ergebnisse

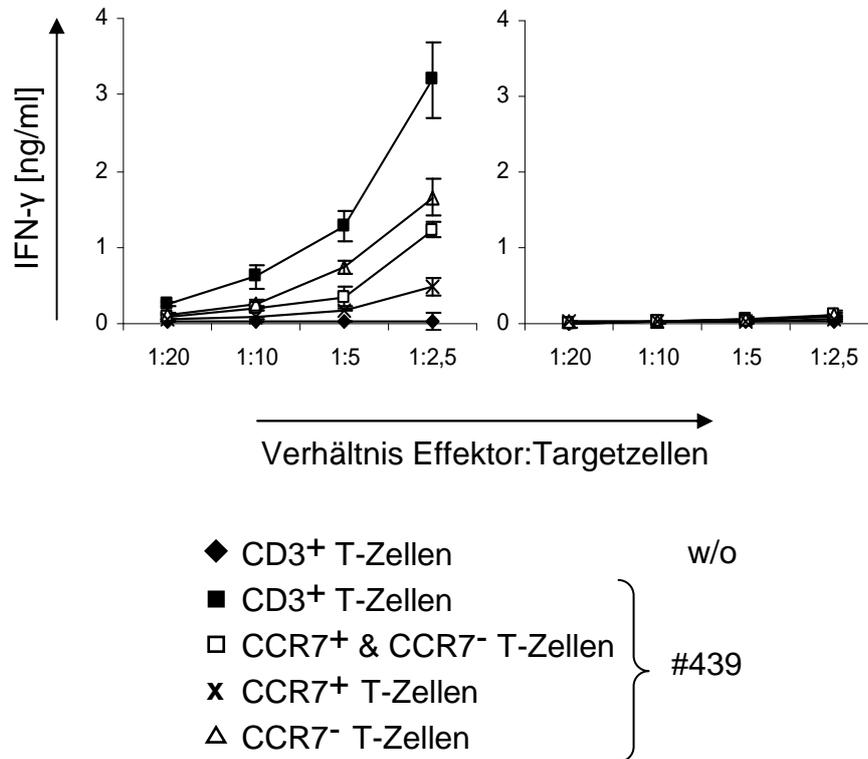


Abbildung 4.22: Trennung hinsichtlich der CCR7 Expression vermindert die Aktivierbarkeit von T-Zellen. Frisch isolierte CD3⁺ T-Zellen wurden zur Expression des CEA spezifischen Immunrezeptor BW431/26scFv-Fc-CD3 ζ (#439) transduziert und anschließend hinsichtlich ihrer CCR7 Expression getrennt. Es erfolgte eine Koinkubation von transduzierten, ungetrennten T-Zellen (■), von CCR7⁺ T-Zellen (×), von CCR7⁻ T-Zellen (△) und von in ursprünglichem Verhältnis wiedervereinigten CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen (□) jeweils mit CEA⁺ LS174T Zellen oder CEA⁻ Colo320 Zellen 48 h auf einer 96-„Well“ Mikrotiterplatte. Schein-transduzierte T-Zellen (◆) dienen als Kontrolle. Es wurden bei $1,25 \times 10^3$ bis 1×10^4 Effektorzellen/„Well“ konstant $2,5 \times 10^4$ Tumorzellen/„Well“ eingesetzt. Die IFN- γ Konzentration im Überstand wurde mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Triplikaten \pm Standardabweichungen. w/o=ohne (*without*) Immunrezeptor

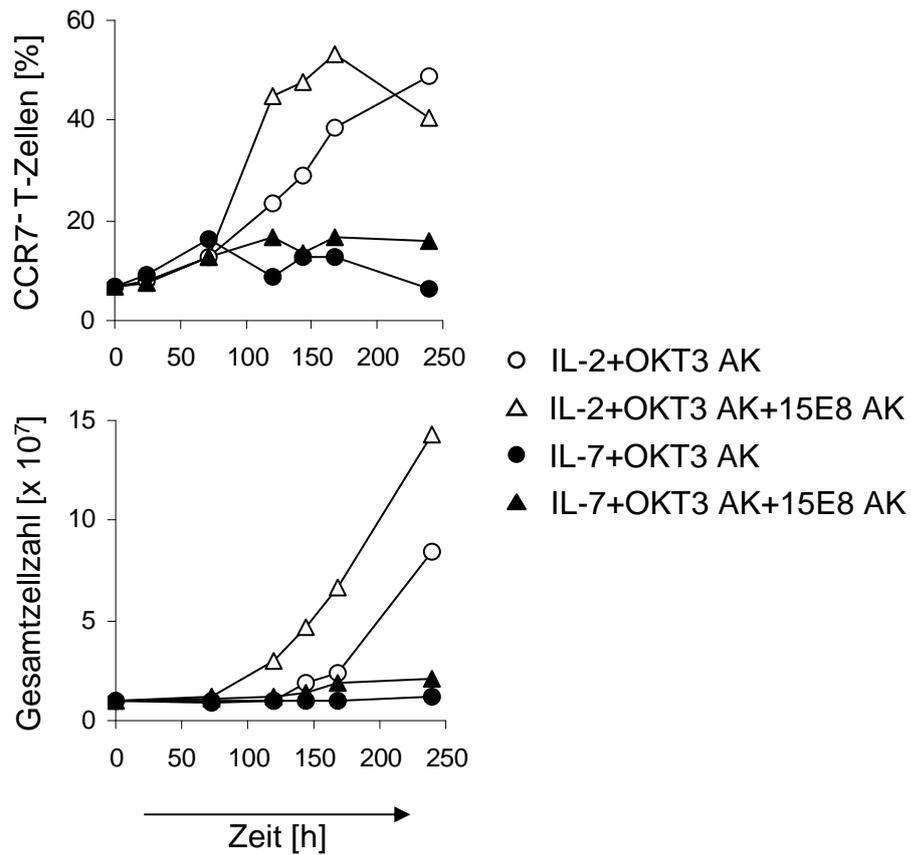


Abbildung 4.23: Das CCR7 Expressionsprofil ändert sich in einer Population proliferierender T-Zellen. Je 1×10^7 CD3⁺ T-Zellen wurden in 20 ml RPMI 1640-Medium unter Zugabe von entweder IL-2 (400 U/ml)/OKT3 AK (100 ng/ml)/15E8 AK (10 ng/ml) (Δ) oder IL-2/OKT3 AK (\circ) oder IL-7 (10 ng/ml)/OKT3 AK/15E8 AK (\blacktriangle) oder IL-7/OKT3 AK (\bullet) 10 Tage inkubiert. Die Zellen wurden gezählt sowie die CCR7 Expression mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

4.4.2 CCR7⁺ T-Zellen verlieren CCR7 Oberflächenexpression durch Proliferation

Der Anteil CCR7⁻ T-Zellen innerhalb einer proliferierenden T-Zell-Population nimmt über die Zeit zu. Es stellt sich die Frage, ob diese Zunahme durch Proliferation der CCR7⁻ T-Zellen bedingt ist oder ob CCR7⁺ T-Zellen unter Proliferation die Expression des CCR7 Markers auf der Zelloberfläche einstellen. Zur Lösung dieser Fragestellung wurden CD3⁺ T-Zellen zunächst hinsichtlich ihrer CCR7 Expression getrennt (Reinheit $\geq 95\%$) und mit CFSE gefärbt. Jeweils die Hälfte der Zellen der beiden Subpopulationen wurde durch Mitomycin C in ihrer Proliferation gehemmt. Alle Ansätze wurden unter Zugabe von IL-2, IL-7 und den agonistischen Antikörpern OKT3 und 15E8 für 7 Tage inkubiert. An Tag 0, 2, 5 und 7 wurden Proben entnommen und die CCR7 Expression der Zellen sowie deren CFSE Markierung durchflusszytometrisch gemessen.

CCR7⁺ T-Zellen proliferierten weit stärker als CCR7⁻ T-Zellen. Mit Mitomycin C behandelte Populationen zeigten erwartungsgemäß keine Proliferation. Der Anteil CCR7⁺ T-Zellen stieg in den CCR7⁻ T-Zell-Subpopulationen unabhängig von der Behandlung mit Mitomycin C auf etwa 20 % an. Bei nicht mit Mitomycin C behandelten CCR7⁺ T-Zellen wurde eine Abnahme der CCR7 exprimierenden T-Zellen korrelierend mit zunehmender Anzahl proliferierter Zellen beobachtet. Dahingegen blieb der Anteil CCR7 exprimierender T-Zellen in der gleichen Population unter Mitomycin C Einfluss konstant. Die Hemmung der Proliferation durch Mitomycin C hemmte auch die Generierung von CCR7⁻ T-Zellen (Abbildung 4.24). Die Expressionstärke von CCR7 auf den Subpopulationen korrelierte mit dem prozentualen Anteil CCR7 exprimierender Zellen. Bei mit Mitomycin C behandelten CCR7⁺ T-Zellen wurde ein Anstieg in der mittleren Fluoreszenz-Intensität über die Zeit beobachtet (nicht abgebildet).

Hier wurde gezeigt, dass T-Zellen unter Proliferation die Expression von CCR7 einstellen. CCR7⁻ T-Zellen können also durch die Induktion der Proliferation CCR7⁺ T-Zellen generiert werden.

Ergebnisse

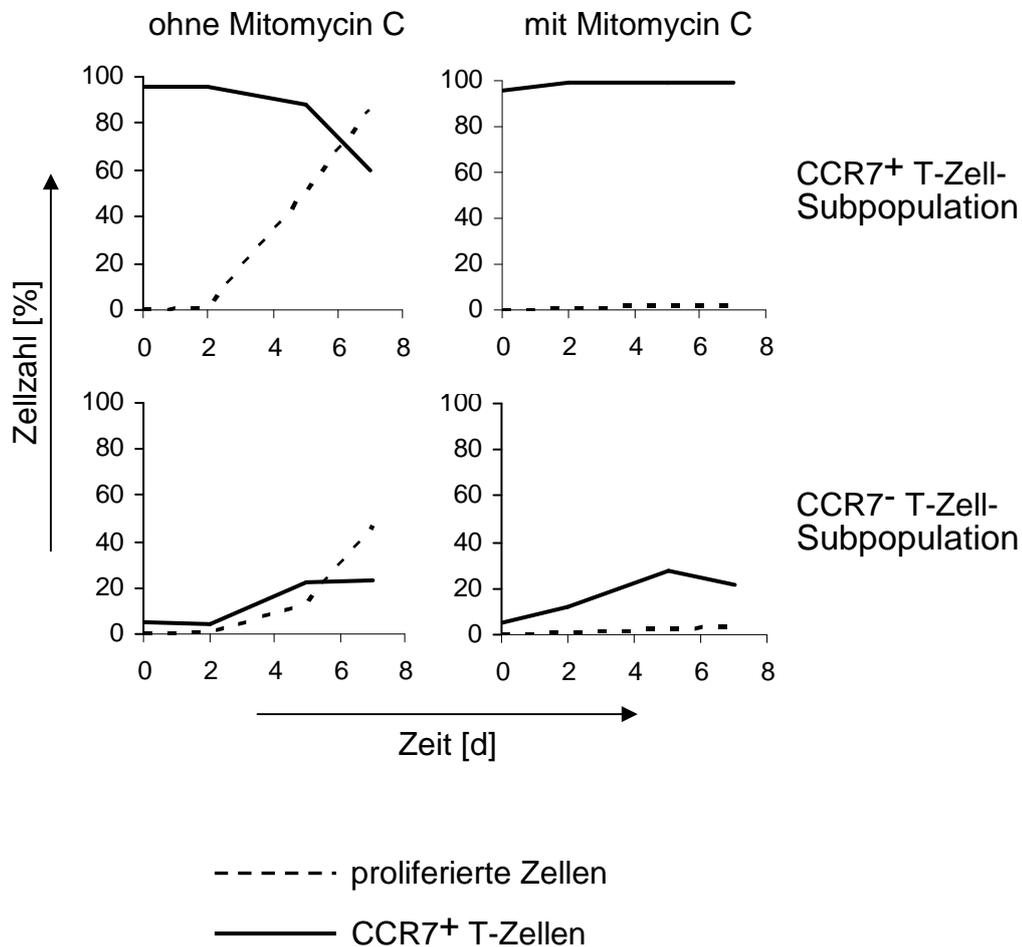


Abbildung 4.24: Proliferierende CCR7⁺ T-Zellen stellen die Oberflächenexpression von CCR7 ein. CD3⁺ T-Zellen wurden zunächst hinsichtlich der Expression von CCR7 mittels magnetischer Zellseparation getrennt. Jeweils die Hälfte der erhaltenen Subpopulationen wurde mit Mitomycin C (20 µg/ml) behandelt. Sowohl die behandelten als auch die unbehandelten Populationen wurden mit CFSE (1,25 µM) gefärbt und anschließend in Gegenwart von IL-2 (400 U/ml), IL-7 (10 ng/ml), OKT3 Antikörper (100 ng/ml) und 15E8 Antikörper (10 ng/ml) kultiviert. Nach der Färbung mit CFSE sowie nach 2, 5 und 7 Tagen Inkubation wurde die CCR7 Expression durch Färbung mit dem anti-human CCR7 IgM Antikörper (Klon 2H4) und dem FITC-konjugierten sekundären Antikörper anti-murin IgM sowie die Proliferation der Zellen anhand des CFSE Gehalts der Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Abgebildet sind der Anteil proliferierter Zellen (durchgezogene Linie) und der Anteil CCR7⁺ T-Zellen (gestrichelte Linie) in den jeweiligen Subpopulationen.

4.4.3 IL-2/anti-CD3 Stimulation induziert bevorzugt CCR7⁻ T-Zellen im Vergleich zu anti-CD3/anti-CD28 Stimulation

Um festzustellen, ob die Art der Stimulation Einfluss auf die Expression von CCR7 auf der Zelloberfläche hat, wurden CD3⁺ CCR7⁺ T-Zellen (Reinheit 97 %) isoliert. Die Hälfte der Zellen wurde mit Mitomycin C behandelt. Anschließend wurden behandelte und unbehandelte CCR7⁺ T-Zellen mit CFSE gefärbt. Die Zellen wurden entweder nur mit anti-CD3 Antikörper (OKT3) oder mit IL-2 und anti-CD3 AK oder mit den Antikörpern anti-CD3 und anti-CD28 (15E8) stimuliert. Nach der Färbung mit CFSE sowie anschließend alle zwei Tage wurden Zellen entnommen und deren CCR7 Expression sowie deren Gehalt an CFSE durchflusszytometrisch analysiert.

IL-2/anti-CD3 stimulierte T-Zellen proliferierten zunächst verzögert im Vergleich zu anti-CD3/anti-CD28 stimulierten T-Zellen. Nach 8 Tagen hatten sich nahezu alle Zellen in diesen beiden Populationen mindestens einmal geteilt. Die Proliferation nach Stimulation durch ausschließlich anti-CD3 erfolgte langsamer und stagnierte nach etwa 6 Tagen. Die mit Mitomycin C behandelten Zellen zeigten keine Proliferation. Mit anti-CD3/anti-CD28 stimulierte T-Zellen proliferierten genauso gut wie IL-2/OKT3 AK stimulierte Zellen, zeichneten sich jedoch durch einen deutlich geringeren Anstieg des Anteils an CCR7⁻ T-Zellen aus. Nach 8 Tagen hatten etwa 40 % der anti-CD3/anti-CD28 stimulierten Zellen die CCR7 Expression eingestellt, wohingegen in der mit IL-2/anti-CD3 stimulierten Fraktion mehr als 70 % CCR7⁻ T-Zellen detektiert wurden.

Dieser Versuch demonstrierte, dass IL-2/anti-CD3 Stimulation die Entstehung von CCR7⁻ T-Zellen effektiver induziert als anti-CD3/anti-CD28 Stimulation, obwohl beide Arten der Stimulation zu gleich starker Proliferation führen (Abbildung 4.25).

Ergebnisse

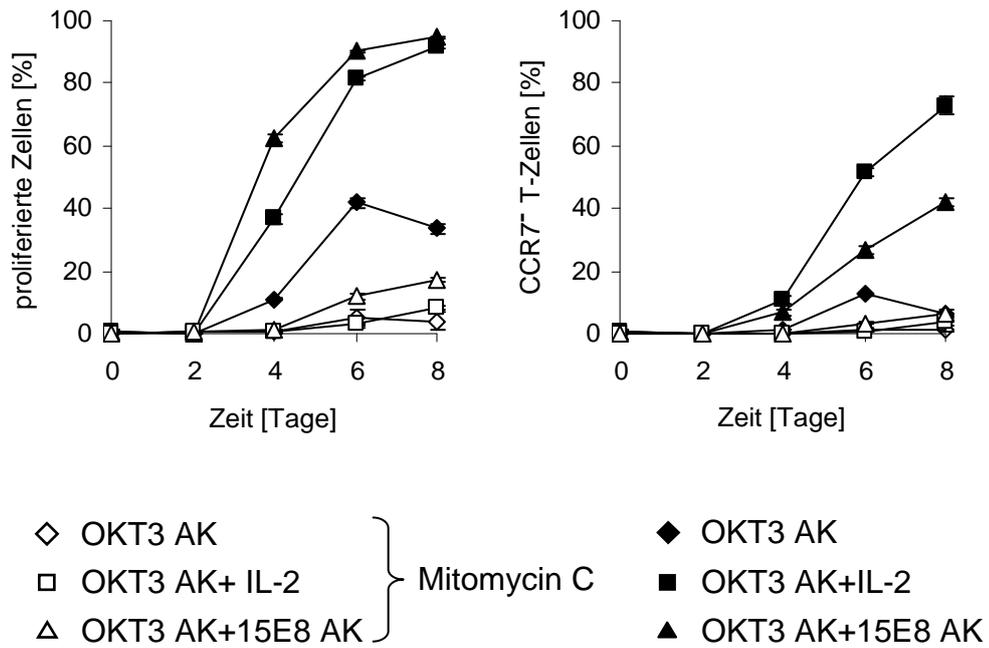


Abbildung 4.25: IL-2/anti-CD3 Stimulation induziert die Entstehung CCR7⁻ T-Zellen aus CCR7⁺ T-Zellen stärker als anti-CD3/anti-CD28 Stimulation. CD3⁺ CCR7⁺ T-Zellen wurden aus frischen PBMCs isoliert. Die Hälfte der Zellen wurde mit Mitomycin C (20 µg/ml) behandelt und behandelte sowie unbehandelte CCR7⁺ T-Zellen wurden mit CFSE (1,25 µM) gefärbt. Je 2,6 x 10⁶ Zellen wurden mit anti-CD3 (100 ng/ml) oder mit IL-2 (400 U/ml) und anti-CD3 (OKT3) (100 ng/ml) oder mit anti-CD3 (100 ng/ml) und anti-CD28 (15E8) (100 ng/ml) stimuliert. Nach der Färbung sowie alle zwei Tage wurde die CCR7 Expression sowie der CFSE Gehalt der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Abgebildet sind die Mittelwerte von Triplikaten ± Standardabweichungen.

4.4.4 Durch Proliferation *in vitro* generierte CCR7⁻ T-Zellen entsprechen isolierten CCR7⁻ T-Zellen in Zytokin- und Effektormolekül-Expression

Um zu überprüfen, ob T-Zellen, die CCR7 nach Proliferation verloren haben, den isolierten CCR7⁻ T-Zellen in wichtigen Eigenschaften entsprechen, wurden isolierte und über einen längeren Zeitraum stimulierte T-Zellen anhand ihres Zytokin- und Effektormolekül-Musters charakterisiert. Hierfür wurden CD3⁺ T-Zellen zunächst hinsichtlich der Expression von CCR7 getrennt (Reinheiten 98 %) und der intrazelluläre IL-2, IFN- γ , TNF- α , Perforin, Granzym A und Granzym B Gehalt der Subpopulationen untersucht. CCR7⁺ T-Zellen aus derselben Trennung sowie ungetrennte CD3⁺ wurden in Gegenwart von IL-2 und anti-CD3 Antikörper (OKT3) 10 Tage stimuliert. Anschließend wurde die Expression der oben genannten Zytokine und Effektormoleküle der Zellen untersucht. Der Anteil CCR7⁻ T-Zellen in der ursprünglich zu 98 % CCR7⁺ Fraktion betrug nach 10 Tagen 84 %. In der CD3⁺ T-Zell-Fraktion hatten nach 10 Tagen 92 % der Zellen die CCR7 Expression eingestellt.

Der Anteil der IL-2 exprimierenden Zellen war in isolierten CCR7⁺ T-Zellen deutlich größer als in isolierten CCR7⁻ T-Zellen. Die isolierte CCR7⁺ T-Zell-Subpopulation wies zudem eine höhere Expressionsstärke des Zytokins auf. Die Anteile der IL-2 exprimierenden Zellen in den proliferierten Populationen waren niedriger als in der ursprünglichen CCR7⁺ Population. Die stärkere Expression von IL-2 in den kultivierten im Vergleich zu den durch Isolation gewonnenen CCR7⁻ T-Zellen ist möglicherweise zum Teil auf die verbliebenen CCR7⁺ T-Zellen innerhalb dieser Populationen zurückzuführen.

Ein größerer Anteil isolierter CCR7⁻ T-Zellen exprimierte mehr IFN- γ , Perforin und Granzyme als isolierte CCR7⁺ T-Zellen. Die über 10 Tage stimulierten Populationen exprimierten IFN- γ und Effektormolekül Konzentrationen auf dem Niveau isolierter CCR7⁻ T-Zellen. In den kultivierten Zellen wurde eine Zunahme an Effektormolekül-positiven Zellen, bei Perforin und Granzym A bis hin zum 10-fachen der ursprünglich detektierten Menge, festgestellt.

TNF- α Expression wurde in weniger als 70 % der isolierten CCR7⁺ T-Zellen und auf mehr als 90 % der isolierten CCR7⁻ T-Zellen nachgewiesen. Die Anteile der TNF- α positiven Zellen in den proliferierten Populationen betragen jeweils um die 90 % (Abbildung 4.26).

Hier wurde gezeigt, dass sich isolierte und durch Proliferation generierte CCR7⁻ T-Zellen in der Expression von Zytokinen und Effektormolekülen gleichen.

4.5 CD28-OX40 kostimierte CCR7⁻ T-Zellen sind bessere anti-Tumor Effektoren *in vivo*

In Tierversuchen wurde die Wirksamkeit von T-Zellen mit anti-CEA Immunrezeptoren gegenüber Tumoren der murinen CEA⁺ Kolonkarzinom-Zelllinie C15A3 geprüft. Eine CEA exprimierende Population von C15A3 Tumorzellen stellt mit zunehmenden Proliferationszyklen die Oberflächenexpression von CEA ein. Da eine möglichst homogene Expression von CEA auf der Targetzellpopulation erwünscht war, wurde eine Subklonierung durch Einzelzellaussaat von C15A3 Zellen durchgeführt. Die Kolonien wurden mittels Durchflusszytometrie auf CEA Expression überprüft (Abbildung 4.27). Klone mit hoher CEA Expression wurden expandiert und für nachfolgende Versuche verwendet.

4.5.1 *In vivo* weisen CCR7⁻ T-Zellen mit CD28-OX40 Kostimulation bessere anti-Tumor Aktivität auf als CCR7⁺ T-Zellen

Um die *in vivo* Relevanz der *in vitro* erhöhten zytolytischen Aktivität der CCR7⁻ T-Zellen zu überprüfen, wurden BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 ζ -OX40 (#975) exprimierende CCR7⁺ oder CCR7⁻ T-Zellen (Reinheit der Subpopulationen $\geq 97\%$) zusammen mit CEA⁺ C15A3 oder CEA⁻ MC38 Tumorzellen subkutan in CD1^{-/-} Nacktmäuse (7 Tiere/Gruppe) koinjiziert. Als Kontrolle dienten Mäuse, denen Schein-

Ergebnisse

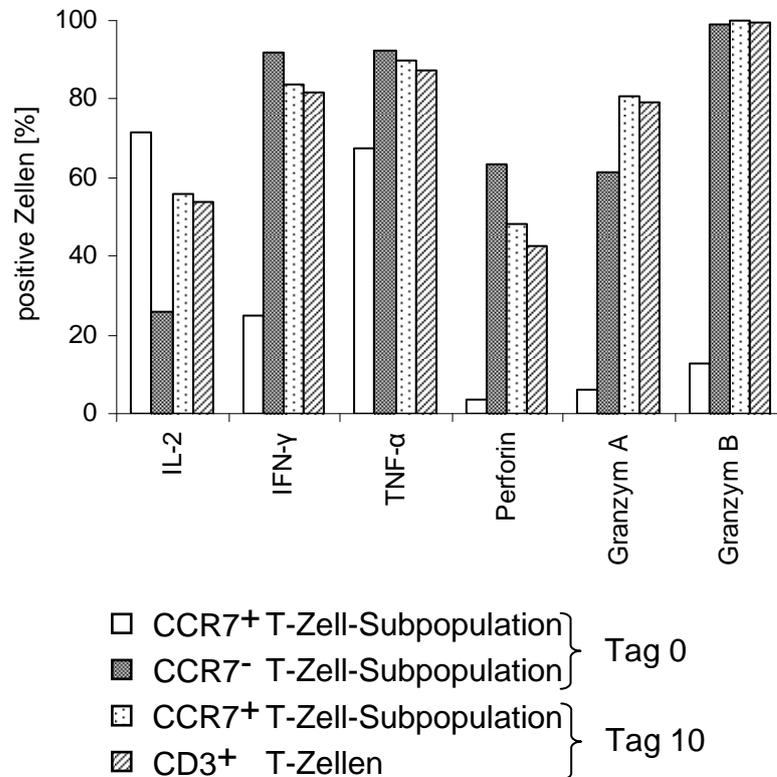


Abbildung 4.26: Durch Proliferation entstandene CCR7⁻ T-Zellen entsprechen isolierten CCR7⁻ T-Zellen in der IFN-γ und Effektormolekül Expression. CD3⁺ T-Zellen wurden hinsichtlich ihrer CCR7 Expression getrennt (Reinheiten 98 %) und die Zellen 2 h mit PMA (20 ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml) inkubiert. Nach Zugabe von Brefeldin A (1:1000) wurden die Zellen 6 h inkubiert. Die Zellen wurden mit dem anti-CCR7 IgM Antikörper (Klon 2H4) und dem Fluorochrom-konjugierten Sekundärintikörper anti-murin IgM gefärbt, unter Verwendung des „BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilisation Kit“ permeabilisiert und intrazellulär mit Antikörpern spezifisch für IL-2 (Klon MQ1-17H12), IFN-γ (Klon JES3-19F1), TNF-α (Klon MAb11), Perforin (Klon δG9), Granzym A (Klon CB9) oder Granzym B (Klon GB11) gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Ansätze mit Zellen, die mit Antikörpern irrelevanter Spezifität gleichen Isotyps markiert wurden, dienten als Kontrolle. CCR7⁺ T-Zellen aus derselben Trennung sowie ungetrennte CD3⁺ T-Zellen wurden in Gegenwart von IL-2 (400 U/ml) und dem anti-CD3 Antikörper OKT3 (100 ng/ml) kultiviert. Der Anteil CCR7⁻ T-Zellen in der CCR7⁺ T-Zell-Subpopulation betrug nach 10-tägiger Stimulation 84 %, der in der CD3⁺ T-Zell-Population 92 %. Die Expression der oben genannten Zytokine und Effektormoleküle durch die kultivierten Zellen wurden untersucht. Die Daten repräsentieren eines von drei Experimenten.

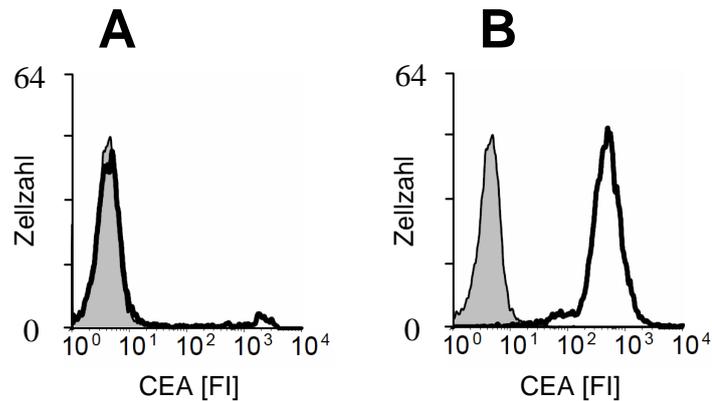


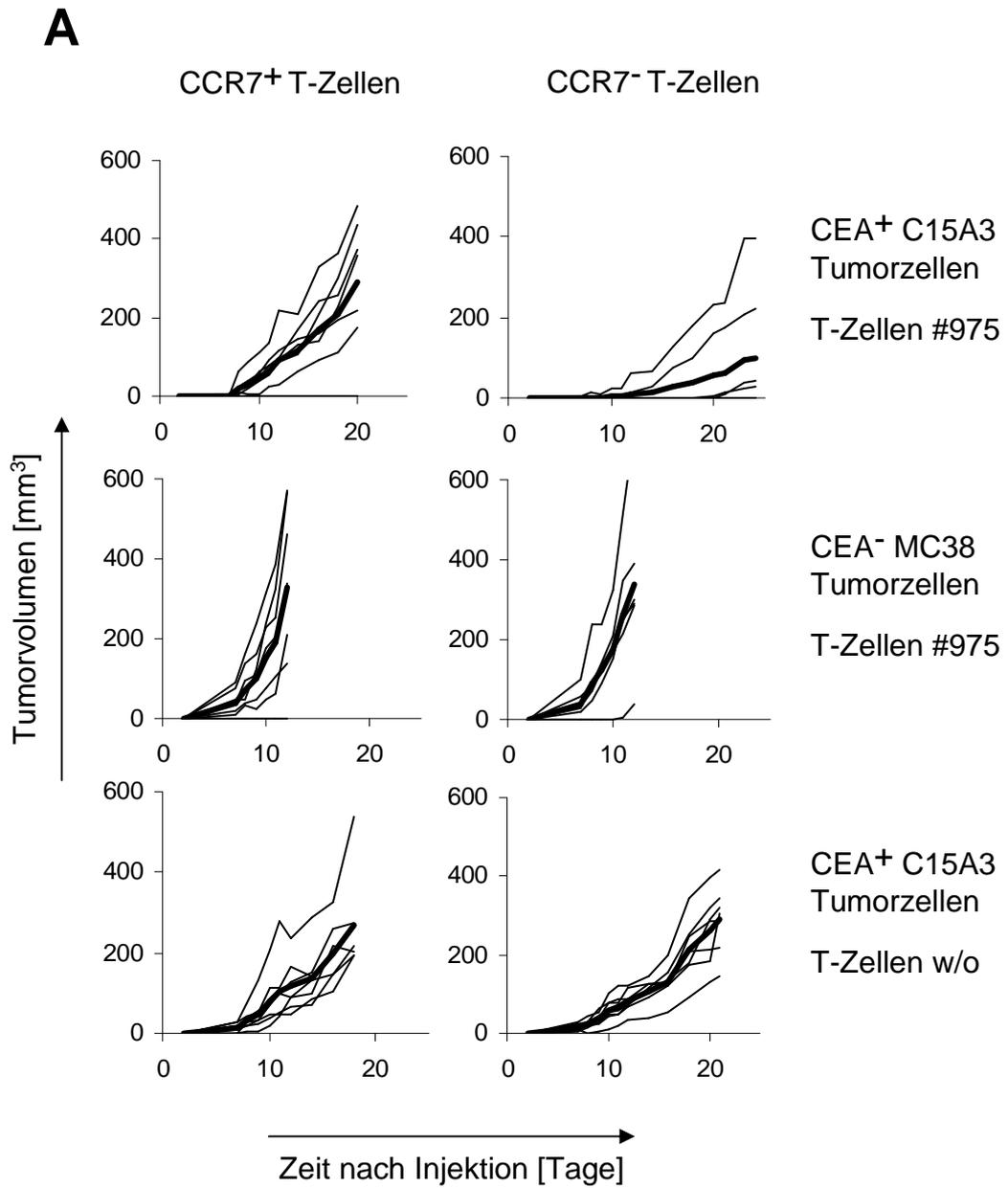
Abbildung 4.27: Subklonierung von C15A3 Tumorzellen. C15A3 Zellen wurden durch *limiting dilution* in Einzelklone getrennt und die CEA Expression mittels Durchflusszytometrie überprüft. Als dicke schwarze Linie ist die Analyse von Zellen mittels des PE-konjugierten anti-CEA Antikörpers (Klon B1.1/CD66) dargestellt. Die grau hinterlegte Fläche stellt Zellen dar, die mit einem Antikörper irrelevanter Spezifität gleichen Isotyps markiert wurden. In **A** ist ein Beispiel für einen Klon mit einem geringen Anteil Zellen mit hoher CEA Expression abgebildet. Klone mit hoher CEA Expression (**B**) wurden expandiert und für nachfolgende Versuche verwendet. FI=Fluoreszenz-Intensität

transduzierte CCR7⁺ oder CCR7⁻ T-Zellen zusammen mit CEA⁺ C15A3 Tumorzellen subkutan koinjiziert wurden. Das Tumorstadium wurde 21 Tage beobachtet.

Mäuse, die Antigen-spezifische CCR7⁺ T-Zellen erhalten hatten, entwickelten schneller und mit einer höheren Frequenz Tumore als Mäuse, denen Antigen-spezifische CCR7⁻ T-Zellen injiziert wurden. Dies bestätigt die *in vitro* beobachtete, potentere anti-Tumor Aktivität der CCR7⁻ T-Zellen im Vergleich zu CCR7⁺ T-Zellen. Die Zytolyse der Tumore war spezifisch, da CEA⁻ MC38 Tumorzellen weder durch anti-CEA Rezeptor-tragende CCR7⁺ noch durch anti-CEA Rezeptor-tragende CCR7⁻ T-Zellen eliminiert wurden. Die Schein-transduzierten CCR7⁻ und CCR7⁺ T-Zellen führten nicht zur Inhibition der Tumorbildung durch koinjizierte CEA⁺ Tumorzellen (Abbildung 4.28).

Diese Beobachtungen demonstrieren die größere zytolytische Aktivität von CCR7⁻ T-Zellen im Vergleich zu CCR7⁺ T-Zellen *in vivo*.

Das zytolytische Potenzial der im Tierversuch verwendeten T-Zell-Subpopulationen



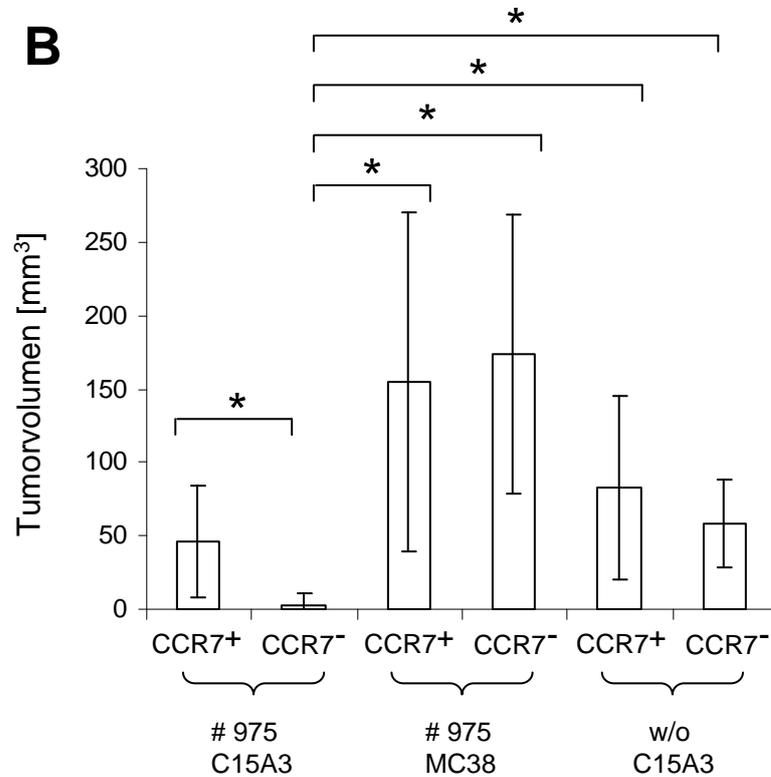


Abbildung 4.28: CCR7⁻ T-Zellen mit CD28-CD3 ζ -OX40 aktivierendem Immunrezeptor zeigen *in vivo* eine effektivere anti-Tumor Antwort als CCR7⁺ T-Zellen. CD1^{-/-} Nacktmäusen (7 Tiere/Gruppe) wurden subkutan CEA⁺ C15A3 oder CEA⁻ MC38 Tumorzellen (je 5 x 10⁵ Zellen) zusammen mit CCR7⁺ oder CCR7⁻ T-Zellen mit BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 ζ -OX40 (#975) Rezeptor (je 5 x 10⁴ Zellen) koinjiziert. Koinjektion von Schein-transduzierten CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen mit CEA⁺ C15A3 Tumorzellen dienten als weitere Kontrolle. Das Tumorstadium wurde 21 Tage beobachtet und Tiere mit Tumoren > 500 mm³ euthanasiert. In **A** ist die Größe der Tumore der einzelnen Mäuse abgebildet. Die dicke Linie zeigt den Mittelwert. Das mittlere Tumorstadium der Gruppe von Mäusen, denen CCR7⁻, Rezeptor-tragenden T-Zellen und CEA⁺ Tumorzellen koinjiziert wurde, war ab Tag 8 signifikant geringer als die Tumorstadien in allen anderen Gruppen. Die mittleren Tumorstadien der Gruppen sowie individuelle Tumorstadien an Tag 10 sind in **B** dargestellt. * p<0,05 (T-Test), w/o=ohne (*without*) Immunrezeptor

wurde auch *in vitro* analysiert. Dazu wurden die T-Zellen mit dem BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 ζ -OX40 (#975) Rezeptor 48 h mit den CEA⁺ C15A3 oder CEA⁻ MC38 Tumorzellen koinkubiert.

CCR7⁻ T-Zellen mit dem CEA spezifischen Immunrezeptor BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 ζ -OX40 (#975) lysierten CEA⁺ C15A3 Tumorzellen mit höherer Effizienz als Rezeptor-tragende CCR7⁺ T-Zellen. Die stärkere Aktivierung der CCR7⁻ T-Zellen wurde durch erhöhte IFN- γ Sekretion von dieser Population bestätigt. CEA⁻ Tumorzellen wurden nicht lysiert, was die Spezifität des T-Zell-Angriffs demonstriert. Als Kontrolle dienten Schein-transduzierte CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen, bei denen weder Lyse der LS174T Zellen noch IFN- γ Sekretion festgestellt wurden (Abbildung 4.29).

4.5.2 CCR7⁻ T-Zellen benötigen die kombinierte CD28-CD3 ζ -OX40 Stimulation für ihre anti-Tumor Effektivität *in vivo*

In einem weiteren Tierversuch wurde untersucht, ob CCR7⁻ T-Zellen auch ohne die kombinierte CD28 und OX40 Stimulation effektiv gegen Tumorzellen wirken können. Hierfür wurden T-Zellen zunächst zur Expression des Immunrezeptors #607 (BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 ζ) oder des Immunrezeptors #975 (BW431/26 scFv-Fc-CD28-CD3 ζ -OX40) transduziert und CCR7⁻ T-Zellen anhand magnetischer Zellseparation isoliert (Reinheiten >98 %). CD1^{-/-} Nacktmäusen (6 Tiere/Gruppe) wurden jeweils #975 oder #607 Rezeptor-tragende CCR7⁻ T-Zellen zusammen mit CEA⁺ C15A3 Tumorzellen subkutan koinjiziert. Das Tumorwachstum wurde über 18 Tage beobachtet.

Tumore von Mäusen, die mit CCR7⁻ T-Zellen mit dem #607 Immunrezeptor behandelt wurden waren größer als in mit CCR7⁻ T-Zellen mit dem #975 Immunrezeptor behandelten Mäusen (Abbildung 4.30).

Hier wurde gezeigt, dass CCR7⁻ T-Zellen die kombinierte Kostimulation durch CD28-CD3 ζ -OX40 für ihre anti-Tumor Effektivität *in vivo* benötigen.

Ergebnisse

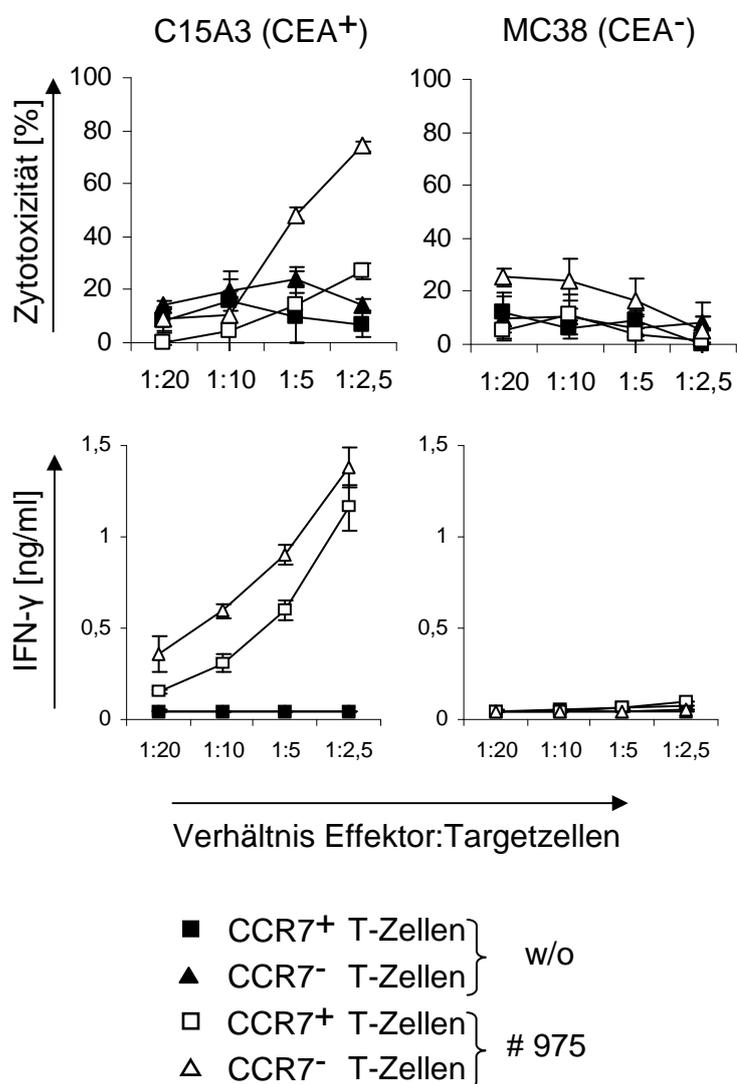


Abbildung 4.29: Zytolytisches Potenzial der im Mausversuch eingesetzten #975 Rezeptor-tragenden CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen *in vitro*. Die CD3⁺ CCR7⁺ (□) und CCR7⁻ (△) T-Zellen mit BW431/26 scFv-Fc-CD28-CD3ζ-OX40 (#975) wurden zur Analyse ihres zytolytischen Potenzials mit den CEA⁺ C15A3 oder CEA⁻ MC38 48 h auf Mikrotiterplatten mit 96 „Wells“ inkubiert. Scheintransduzierte CCR7⁺ (■) und CCR7⁻ (▲) T-Zellen dienen als Kontrolle. Es wurden bei 1,25 x 10³ bis 1 x 10⁴ Effektorzellen/„Well“ konstant 2,5 x 10⁴ Tumorzellen/„Well“ eingesetzt. Die Zytotoxizität der T-Zellen wurde mit Hilfe des XTT-basierten Viabilitätstests bestimmt. Die Überstände wurden mittels ELISA auf ihre IFN-γ Konzentration überprüft. Alle Ansätze wurden in Triplikaten angefertigt. Abgebildet sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen der Mittelwerte. w/o=ohne (*without*) Immunrezeptor

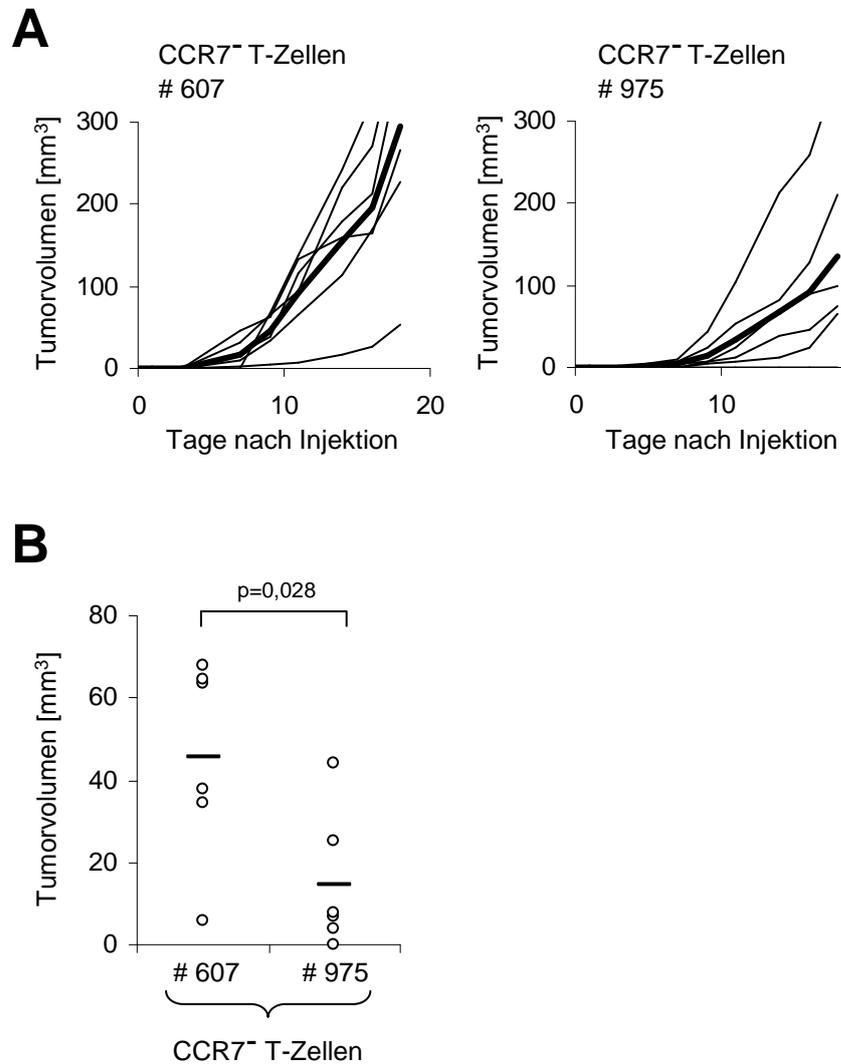


Abbildung 4.30: CCR7^{-/-} T-Zellen benötigen CD28-OX40 Kostimulation für eine effektive anti-Tumor Antwort *in vivo*. CD1^{-/-} Nacktmäusen (6 Tiere/Gruppe) wurden 5×10^5 CEA⁺ C15A3 Tumorzellen zusammen mit 5×10^4 CCR7^{-/-} T-Zellen mit BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3ζ (#607) oder BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3ζ-OX40 (#975) Rezeptor subkutan koinjiziert. Das Tumorstadium wurde 18 Tage beobachtet und die Tumorgöße gemessen. In **A** ist die Größe der Tumore der einzelnen Mäuse sowie der Mittelwert (dicke Linie) abgebildet. Die Tumorgöße der einzelnen Mäuse in den beiden Gruppen an Tag 9 ist in **B** dargestellt.

4.5.3 CD28-OX40 kostimierte CCR7⁻ T-Zellen wirken bei systemischer Applikation effektiver gegen einen etablierten Tumor als CCR7⁺ T-Zellen

Subkutan koinjizierte Tumor- und T-Zellen spiegeln im Wesentlichen die *in vitro* Situation wider. Deshalb wurden in einem weiteren Ansatz T-Zellen mit Immunrezeptor in Mäuse mit etabliertem Tumor intravenös appliziert, um das therapeutische Potenzial der beiden T-Zell-Subpopulationen zu untersuchen. Da CCR7⁻ T-Zellen von der kombinierten OX40/CD28 Stimulation abhängig sind, wurde in diesem Versuch wieder der Rezeptor #975 eingesetzt, der die entsprechenden Signalketten in seinem intrazellulären Bereich bereithält. NIH-III Mäusen (7 Tiere/Gruppe) wurden subkutan CEA⁺ C15A3 Tumorzellen injiziert. Bei Erreichen eines Tumolvolumens von 20 – 40 mm³ wurden CCR7⁻ oder CCR7⁺ T-Zellen mit dem CEA spezifischen Immunrezeptor BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3ζ-OX40 (#975) intravenös injiziert. Als Kontrolle dienten Mäuse, denen Schein-transduzierte CCR7⁻ oder CCR7⁺ T-Zellen injiziert wurden. Das Tumolvolumen wurde täglich gemessen.

Tumore von Mäusen die mit Rezeptor-tragenden CCR7⁺ T-Zellen behandelt wurden, wuchsen schneller als Tumore von Mäusen, denen Rezeptor-tragende CCR7⁻ T-Zellen injiziert wurden (Abbildung 4.31). Dies bestätigt die in Kapitel 4.5.1 bei subkutaner Koinjektion beobachtete, potentere anti-Tumor Aktivität der CCR7⁻ T-Zellen im Vergleich zu CCR7⁺ T-Zellen auch für die systemische Gabe der T-Zellen. Tiere, die mit Schein-transduzierten CCR7⁻ oder CCR7⁺ T-Zellen behandelt wurden, zeigten stärkeres Tumorstadium als Tiere die Rezeptor-tragenden CCR7⁻ oder CCR7⁺ T-Zellen erhalten hatten.

Diese Beobachtungen demonstrieren, dass CCR7⁻ T-Zellen unter CD28-OX40 Kostimulation auch zur Zytolyse etablierter Tumore besser geeignet sind als CCR7⁺ T-Zellen.

Als Nebenwirkung der intravenösen Behandlung mit T-Zellen traten Nekrosen bei vier von sieben Mäusen aus der mit Schein-transduzierten CCR7⁻ T-Zellen behandelten Gruppe sowie bei drei von sieben Mäusen aus der mit #975 transduzierten CCR7⁻

Ergebnisse

T-Zellen behandelten Gruppe auf. Die Nekrosen entwickelten bis zu 1 cm² große Läsionen am hinteren Rücken, die bei allen Mäusen nach einigen Tagen abheilten. Weiterhin wiesen je zwei von sieben Mäusen aus den eben genannten Gruppen, sowie eine Maus aus der mit CCR7⁺ T-Zellen mit #975 Rezeptor behandelten Gruppe, nekrotisches Gewebe an der Schwanzspitze auf.

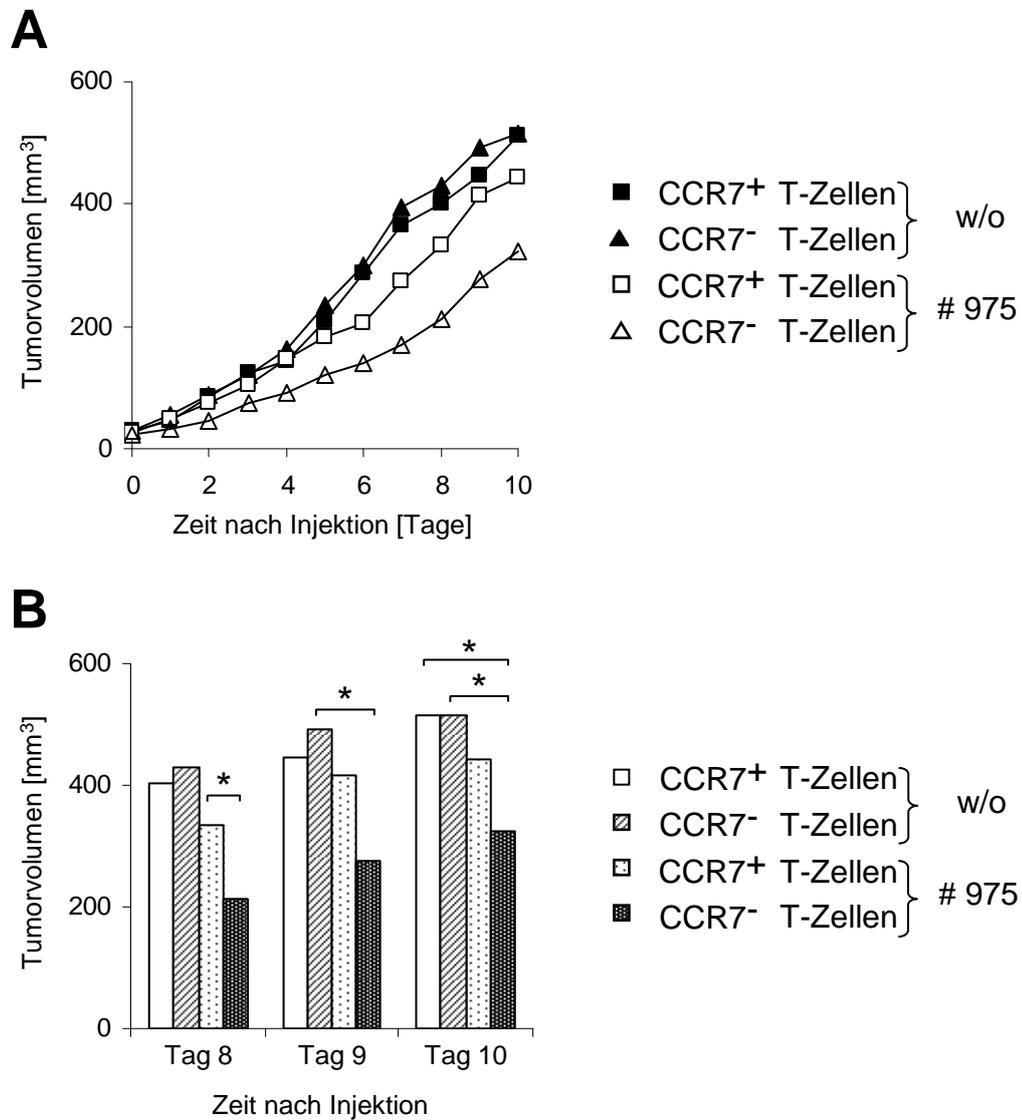


Abbildung 4.31: CCR7⁻ T-Zellen mit CD28-OX40 Kostimulation sind bei systemischer Applikation effektiver in der anti-Tumor Antwort als CCR7⁺ T-Zellen. NIH-III Mäusen (7 Tiere/Gruppe) wurden 8×10^5 CEA⁺ C15A3 Tumorzellen subkutan injiziert. Bei Erreichen eines Tumorvolumens von 20 – 40 mm³ wurden 1×10^6 CCR7⁺ oder CCR7⁻ T-Zellen mit BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 ζ -OX40 Rezeptor (#975) intravenös injiziert. Schein-transduzierte CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen dienten als Kontrolle. Das Tumorwachstum wurde täglich gemessen. Abgebildet sind die Mittelwerte der Tumorgößen der verschiedenen Gruppen über 10 Tage (A) und an Tag 8-10 (B). * $p < 0,05$ (T-Test); w/o=ohne (*without*) Immunrezeptor

5 Diskussion

Therapeutische Erfolge mit adoptiv transferierten Zellen bleiben häufig aufgrund geringer Persistenz und damit einhergehender mangelnder Effizienz der Effektorzellen *in vivo* aus. Es besteht daher Bedarf, eine Effektorzellpopulation zu definieren, die den Anforderungen gewachsen ist, möglichst effektiv und anhaltend Zielzellen zu eliminieren.

Um die mögliche Eignung einzelner T-Zell-Subpopulationen für die adoptive Immuntherapie zu untersuchen, isolierten Berger *et al.*, 2008, CMV spezifische T-Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Affen mit einer latenten CMV Infektion. Die Zellen wurden *ex vivo* expandiert und anschließend reinjiziert. Hierbei wurde gezeigt, dass Effektor T-Zellen, die aus zentralen Gedächtnis T-Zellen (T_{CM}) generiert wurden, weitaus länger *in vivo* persistierten als Effektor T-Zellen, die einer Effektor-Gedächtnis T-Zell-Population (T_{EM}) entstammten. Die aus T_{CM} -Zellen gewonnenen Effektor T-Zellen waren im Gegensatz zu aus T_{EM} -Zellen gewonnenen Effektor T-Zellen darüber hinaus in der Lage, phänotypische und funktionale Eigenschaften von Gedächtniszellen zurückzuerlangen. Da die Persistenz der T-Zellen *in vivo* mit der anti-Tumor Effektivität korreliert (Robbins *et al.*, 2004), legen diese Beobachtungen eine größere Effizienz von T_{CM} -Zellen aufgrund ihrer gesteigerten Kapazität zur *in vivo* Persistenz nach adoptivem Transfer nahe. Im Rahmen der Untersuchungen des *in vivo* Effektor-Potenzials einzelner T-Zell-Subpopulationen wurde auch berichtet, dass die Applikation naiver und früher Effektor T-Zellen die Beseitigung großer etablierter Tumore zur Folge hatte, während weiter differenzierte T-Zellen eine weniger effektive anti-Tumor Antwort vermittelten (Gattinoni *et al.*, 2005).

Auf Grund der genannten Befunde bevorzugt man die Verwendung früher Effektor

T-Zellen, zentraler Gedächtnis T-Zellen oder sogar naiver T-Zellen, alle mit CCR7⁺ Phänotyp, für die adoptive Immuntherapie, da man sich von diesen Zellen eine effizientere Tumorlyse verspricht. Späte T-Zellen, Effektor-Gedächtnis T-Zellen sowie enddifferenzierte T-Zellen CCR7⁻ Phänotyps werden aufgrund einer gesteigerten Apoptoserate dieser Zellen sowie replikativer Seneszenz und damit einhergehend geringerer *in vivo* Persistenz nicht in Erwägung gezogen. Gerade diese Zellen jedoch zeichnen sich durch ein sehr hohes zytolytisches Potenzial *in vitro* aus. Unterschiedliche T-Zell-Stadien sind auf verschiedene stimulatorische Signale angewiesen. In den genannten Studien wurde die verwendete Stimulation nicht an die Erfordernisse von T-Zell-Stadien mit fortgeschrittener Differenzierung angepasst. Wir stellen uns daher die Frage, ob späte T-Zellen, Effektor-Gedächtnis T-Zellen sowie enddifferenzierte T-Zellen durch gezielte Stimulation nicht ebenfalls oder sogar besser zur Rezeptor-vermittelten Tumorlyse geeignet sind als die aktuell bevorzugt verwendeten naiven T-Zellen, frühen Effektor T-Zellen und zentralen Gedächtnis T-Zellen.

Für die Verwendung von in ihrer Differenzierung fortgeschrittenen CCR7⁻ T-Zellen spricht weiterhin das spezielle Migrationsverhalten dieser Zellen. In zwei parallel veröffentlichten Publikationen mit unterschiedlicher methodischer Vorgehensweise wurde befunden, dass CCR7 ein kritischer Faktor für die Auswanderung von T-Zellen aus der Peripherie ist (Bromley *et al.*, 2005; Debes *et al.*, 2005). Die Konsequenz aus diesen Daten ist, dass adoptiv transferierte CCR7⁻ T-Zellen, einmal in der Peripherie angekommen, nur eine begrenzte Möglichkeit besitzen, das periphere Gewebe wieder zu verlassen. Aufgrund dieser speziellen Eigenschaft nehmen wir an, dass adoptiv transferierte CCR7⁻ T-Zellen bessere Voraussetzungen zur Kolo-kalisation mit dem Tumor erfüllen als CCR7⁺ T-Zellen. Zielsetzung dieser Arbeit war daher die Untersuchung des anti-Tumor Effektorpotenzials CCR7⁻ T-Zellen im Vergleich zu CCR7⁺ T-Zellen unter Verwendung chimärer Immunrezeptoren.

Als Voraussetzung für den Vergleich der Subpopulationen mussten diese mit möglichst großer Reinheit isoliert werden. In diesem Rahmen wurde ein Verfahren zur magnetischen Separation humaner CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen etabliert und in Übereinstimmung mit publizierten Daten (Miranda-Carus *et al.*, 2005) unter Zuhilfenahme eines anti-human CCR7 IgM Antikörpers optimiert.

Die Trennung von T-Zellen hinsichtlich ihrer CCR7 Expression beeinträchtigt die Zellen in ihren Effektorfunktionen und fördert ihre Apoptosefrequenz, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde. Getrennte T-Zell-Populationen eignen sich daher zur Untersuchung der Eigenschaften der Subpopulationen, sind jedoch benachteiligt im Vergleich zur ungetrennten CD3⁺ Gesamtpopulation. Ein Vergleich der Funktionalität der T-Zell-Gesamtpopulation mit den CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zell-Subpopulationen ließe sich experimentell mit Hilfe eines Mausmodells untersuchen. Hierfür müssten T-Lymphozyten konstitutiv CCR7 exprimierender (CCR7^{+/+}) und CCR7 defizienter (CCR7^{-/-}) Mausstämme mit Splenozyten aus Wildtyp Mäusen bezüglich ihrer anti-Tumor Effektivität in einer Wildtyp Maus verglichen werden. In diesem Zusammenhang müsste zunächst untersucht werden, ob die Splenozyten dieser hinsichtlich der CCR7 Expression auf T-Zellen veränderten Mäuse den in dieser Arbeit beschriebenen CCR7⁺ und CCR7⁻ Subpopulationen auch in weiteren Eigenschaften entsprechen. In diesem Zusammenhang müssten insbesondere die *Homing*- sowie zytolytischen Eigenschaften dieser Zellen geprüft werden. Ein weiterer Vorteil des reinen Mausmodells wäre zudem ein authentischeres *Homing*-Verhalten von systemisch injizierten T-Zellen in muriner Umgebung.

Da die Trennung von T-Zellen hinsichtlich ihrer CCR7 Expression mittels magnetischer Zellseparation die Zellen schädigt, wurde untersucht, auf welche Art CCR7⁻ T-Zellen generiert werden können. Lang anhaltende Proliferation CCR7⁺ T-Zellen führt zur Entstehung von CCR7⁻ T-Zellen. Da die durch Proliferation entstandenen CCR7⁻ den isolierten CCR7⁻ T-Zellen in wichtigen Effektoreigenschaften entsprechen, kann die Separation zur Gewinnung der Zellen für therapeutische Anwendungen vermieden werden.

In unseren Untersuchungen zur Effektivität getrennter CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen wurden ausschließlich aktivierte T-Zellen verglichen. Die Anwesenheit von naiven T-Zellen innerhalb der stimulierten CCR7⁺ T-Zell-Subpopulation wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse der CD45RO Expression ausgeschlossen (CD45RO⁺ >98 %). Dieses Vorgehen wurde gewählt, da naive T-Zellen sich durch einen CD45RA⁺ CD45RO⁻ Phänotyp auszeichnen, während Antigen-erfahrene T-Zellen einen CD45RA⁻ CD45RO⁺ Phänotyp aufweisen (Merkenschlager *et al.*, 1988; Young *et al.*, 1997). Eine Ausnahme besteht für Antigen-erfahrene enddifferenzier-

te T-Zellen, die wieder zum CD45RA Isotyp wechseln, jedoch außerdem durch die Abwesenheit von CCR7 gekennzeichnet sind (Hamann *et al.*, 1997; Sallusto *et al.*, 1999b).

Die CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zell-Subpopulationen exprimieren verschiedene *Homing*-Rezeptoren. Während mehr CCR7⁻ T-Zellen Moleküle wie CLA, CCR10, CCR4 und CD103 auf der Oberfläche exprimieren, die an der Migration in peripheres Gewebe beteiligt sind, exprimieren mehr CCR7⁺ T-Zellen größere Mengen an CD62L, wodurch Migration in die sekundären lymphatischen Gewebe vermittelt wird. Da genetisch modifizierte T-Zellen mit rekombinantem Immunrezeptor kein *Priming* durch APCs in den sekundären lymphatischen Geweben benötigen, ist bei Tumoren in der Peripherie die unmittelbare Migration mittels CLA und CCR10 in die Haut oder mittels CD103 in den Darm erwünscht. Die beobachtete Verteilung der *Homing*-Marker steht in Übereinstimmung mit verschiedenen Publikationen (Mora und von Andrian, 2006; Kunkel und Butcher, 2002; Ward und Marelli-Berg, 2009; Sallusto *et al.*, 1999b), in denen das *Homing*-Potenzial naiver und früher *vs.* später T-Zellen beschrieben ist.

Im Hinblick auf das zytolytische Potenzial der beiden Subpopulationen wurde gezeigt, dass mehr CCR7⁻ T-Zellen sowohl der CD4⁺ als auch der CD8⁺ T-Zell-Population größere Mengen der Effektormoleküle Perforin, Granzym A und Granzym B exprimierten als CCR7⁺ T-Zellen. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung damit, dass späte Effektor T-Zellen sowie Effektor-Gedächtnis T-Zellen, die durch die Abwesenheit von CCR7 auf der Oberfläche charakterisiert sind, über ein breiteres Spektrum sowie größere Mengen zytolytischer Effektormoleküle verfügen als CCR7⁺ naive T-Zellen und junge Effektor T-Zellen sowie zentrale Gedächtnis T-Zellen (Appay *et al.*, 2008; Gattinoni *et al.*, 2005; Sallusto *et al.*, 1999b). Das größere zytolytische Potenzial der CCR7⁻ T-Zellen wird durch die größere Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen *in vitro* widerspiegelt. Antigen-spezifische CCR7⁻ T-Zellen lysierten Antigen-positive Tumorzellen mit sehr viel größerer Effizienz als CCR7⁺ T-Zellen. Die durch den Immunrezeptor vermittelte Tumorzelllyse durch CCR7⁻ T-Zellen ist Antigen-spezifisch, da Rezeptor-tragende CCR7⁻ T-Zellen Antigen-negative Tumorzellen nicht lysierten und Scheintransduzierte CCR7⁻ T-Zellen ohne Rezeptor keinerlei zytotoxische Funktion ausübten.

Neben der lytischen Funktion zeichnen sich CCR7⁻ T-Zellen im Vergleich zu CCR7⁺ T-Zellen durch eine erhöhte IFN- γ Sekretion aus. Dies stimmt mit Beobachtungen von Sallusto *et al.*, 1999b und Appay *et al.*, 2008 überein, die von einer erhöhten IFN- γ Produktion durch T-Zellen in späteren Differenzierungsstadien berichteten. IFN- γ wirkt durch die Aktivierung von Makrophagen in physiologischen Immunantworten antiviral, immunregulatorisch oder antitumoral (Schroder *et al.*, 2004). Da IFN- γ eine essentielle Rolle in endogenen anti-Tumor Mechanismen spielt (Kaplan *et al.*, 1998; Shankaran *et al.*, 2001), erwarten wir, dass die erhöhte IFN- γ Sekretion von adoptiv transferierten CCR7⁻ T-Zellen am Tumor, unter anderem durch die Aktivierung von Mechanismen der angeborenen Immunantwort, zur anti-Tumor Antwort beiträgt.

Eine weitere Anforderung an Effektorzellen in der adoptiven Immuntherapie mit rekombinanten Immunrezeptoren ist die Fähigkeit der Zellen, den inhibitorischen Einflüssen der Tumorumgebung zu widerstehen. Immunantworten am Tumor werden unter anderem durch regulatorische T-Zellen (T_{reg}) (Shimizu *et al.*, 1999) oder inhibitorische Zytokine wie IL-10 (Mocellin *et al.*, 2005) und TGF- β (Siegel und Massagué, 2003) unterdrückt, welche ihre suppressive Wirkung durch unterschiedliche Mechanismen ausüben. Die Hemmung der T-Zell-Proliferation durch TGF- β kann durch die Rezeptor-vermittelte Kostimulation mit CD3 ζ und CD28 vermieden werden (Koehler *et al.*, 2007). Dahingegen kann die supprimierende Funktion von T_{reg}-Zellen durch die Abwesenheit von IL-2 überwunden werden, da das Überleben dieser Zellen von IL-2 abhängig ist (Shevach, 2002). Hier wurde gezeigt, dass CCR7⁻ T-Zellen geringere IL-2 Mengen sezernieren als CCR7⁺ T-Zellen und somit geringere Unterstützung für das Überleben der T_{reg}-Zellen liefern. Ein ähnlicher Effekt zur Unterdrückung der Funktion von T_{reg}-Zellen kann auch durch einen chimären Immunrezeptor mit der intrazellulären CD3 ζ Domäne sowie der CD28 Signalkette mit mutierter Ick-Bindestelle vermittelt werden. Dieser Rezeptor gewährleistet zwar die kombinierte Kostimulation durch CD28-CD3 ζ , unterdrückt jedoch die Sekretion von IL-2.

CCR7⁻ T-Zellen sind durch die Expression von *Homing*-Rezeptoren für die Peripherie gekennzeichnet und können sich aufgrund der Abwesenheit von CCR7 nicht aus peripherem Gewebe entfernen. Diese Kriterien machen, zusammen mit der Tatsache, dass CCR7⁻ T-Zellen großes direktes und indirektes zytolytisches Potenzial besitzen, diese

Subpopulation zu einer viel versprechenden Effektorpopulation für *in vivo* Applikationen mit adoptiv transferierten T-Zellen.

CCR7⁻ T-Zellen repräsentieren vor allem späte Effektorzellen, Effektor-Gedächtnis T-Zellen sowie enddifferenzierte T-Zellen. Gegen die Verwendung dieser in einem fortgeschrittenen Entwicklungsstadium befindlichen T-Zellen für die adoptive Immuntherapie spricht, dass T-Zellen mit steigendem Alter und zunehmenden Proliferationszyklen zwar an Effektorfunktionen gewinnen, deren Aktivierungs-induzierte Apoptosefrequenz aber ansteigt, wodurch die *in vivo* Effektivität dieser T-Zellen eingeschränkt ist (Gattinoni *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005). Dies steht in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erworbenen Erkenntnissen, da CCR7⁻ T-Zellen im Vergleich zu CCR7⁺ T-Zellen zwar eine größere *in vitro* Effektivität aufwiesen, diese Zellen jedoch weniger stark proliferierten und durch eine höhere Anfälligkeit für Apoptose gekennzeichnet waren als CCR7⁺ T-Zellen. CD8⁺ CD7⁻ T-Zellen, die eine Subpopulation der CCR7⁻ T-Zellen bilden, werden ebenfalls mit einem größeren zytolytischen Potenzial (Aandahl *et al.*, 2003) und einer höheren Sensitivität gegenüber Aktivierungs-induziertem Zelltod im Vergleich zu CD8⁺ CD7⁻ T-Zellen (Rappl *et al.*, 2008) assoziiert. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich, dass die Nutzung des großen Potenzials dieser T-Zellen in fortgeschrittenen Differenzierungsstadien für einen erfolgreichen Einsatz in der adoptiven Immuntherapie Maßnahmen zur Unterdrückung der erhöhten Apoptoserate erfordert.

In diesem Zusammenhang wurden unterschiedliche Strategien verfolgt, um das Überleben von CCR7⁻ T-Zellen zu fördern. Unter Verwendung der Zytokine IL-7 sowie IL-15 konnte eine geringere Apoptosefrequenz der CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zell-Subpopulation induziert werden. Der durch IL-7 vermittelte anti-apoptotische Effekt beruht auf der Steigerung der Bcl-2 Expression (Schluns *et al.*, 2000) und führt sowohl in naiven wie auch Gedächtnis T-Zellen zur Expression des Überlebensfaktors „lung kruppel-like factor“ (Schober *et al.*, 1999). Der positive Einfluss von IL-15 bewirkt das Überleben CD8⁺ T-Zellen und spielt eine Rolle bei der Antigen-unabhängigen Expansion von naiven und Gedächtniszellen (Berard *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2003). Die Verwendung von T-Zellen und, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, die Generierung von CCR7⁻ T-Zellen für die adoptive Immuntherapie erfordert eine starke Expansion der Zellen. Diese sollte als Konsequenz der beschriebenen Beobachtun-

gen unter Einfluss von IL-7 und IL-15 erfolgen. In Übereinkunft damit stehen Erkenntnisse von Chen *et al.*, 2006, die eine geringere Sensitivität für den Entzug von Zytokinen, für TGF- β und für Aktivierungs-induzierten Zelltod von unter IL-7 und IL-15 Stimulation expandierten T-Zellen beschreiben. In Tiermodellen, unter adoptiv transferierter T-Zellen, führte die Gabe von IL-7 (Murphy *et al.*, 1993) oder IL-15 (Klebanoff *et al.*, 2004) zu verstärkter anti-Tumor Reaktivität. Dies ist möglicherweise auf die Förderung des Überlebens weit differenzierter T-Zellen zurückzuführen, da diese das größte zytolytische Potenzial innerhalb einer T-Zell-Population besitzen. Wir erwarten daher, dass die therapeutische Verabreichung von IL-7 oder IL-15 zusammen mit adoptiv transferierten CCR7⁻ T-Zellen zu einem gesteigerten Therapieerfolg führt.

Kombinierte Kostimulation der T-Zellen durch rekombinante Immunrezeptoren stellt, wie in dieser Arbeit ermittelt wurde, eine weitere Möglichkeit dar, um der Apoptose CCR7⁻ T-Zellen entgegenzuwirken. Die Signalgebung durch einen Immunrezeptor mit den intrazellulären Domänen von CD28, CD3 ζ und OX40 bewirkte in CCR7⁻ T-Zellen *in vitro* eine geringere Apoptosefrequenz sowie eine erhöhte Bcl-2 Expression im Vergleich zur Stimulation durch CD28 und CD3 ζ . Immunrezeptoren mit zwei kostimulatorischen Domänen zusätzlich zur CD3 ζ Domäne stellen die „dritte Generation“ rekombinanter Immunrezeptoren dar. Bisher wurden nur Vergleiche von Immunrezeptoren der „zweiten Generation“, also mit einer kostimulatorischen Signaldomäne zusätzlich zur CD3 ζ Domäne, beschrieben. Dabei zeigte sich, dass die kombinierte Signalkette aus CD3 ζ und CD28 T-Zellen effizienter stimuliert als die Kombination von CD3 ζ mit einer OX40, CD40L, 4-1BB oder PD-1 Signaldomäne (Finney *et al.*, 1998, 2004). Lediglich Carpenito *et al.*, 2009 beschreiben die Verwendung eines Rezeptors mit den drei intrazellulären Signalketten von CD28, 4-1BB und CD3 ζ zur erfolgreichen Eliminierung großer etablierter Tumore. In Übereinstimmung mit dieser Publikation wurde beobachtet, dass die anti-Tumor Aktivität von T-Zellen mit Rezeptor-vermittelter Stimulation durch CD3 ζ und zwei kostimulatorischen Signalketten *in vitro* unverändert ist gegenüber T-Zellen mit Immunrezeptoren der „zweiten Generation“ mit der kombinierten CD28-CD3 ζ Signaldomäne.

CCR7⁻ T-Zellen weisen *in vivo* sowohl bei lokaler als auch bei systemischer Applikation eine höhere anti-Tumor Aktivität auf als CCR7⁺ T-Zellen. Allerdings war die Effekti-

Diskussion

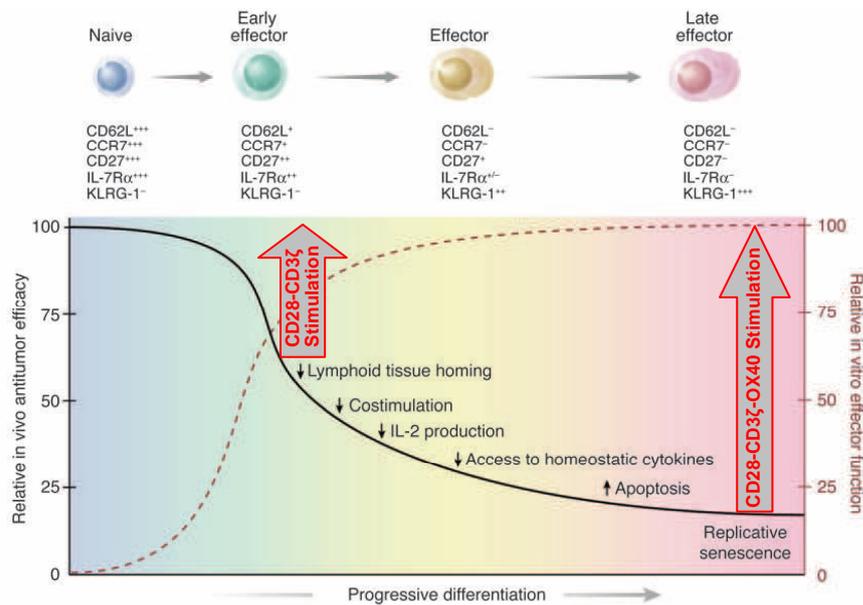


Abbildung 5.1: Inverse Beziehung von *in vitro* und *in vivo* Effektorfunktion adoptiv transferierter T-Zell-Subpopulationen. Aus Gattinoni *et al.*, 2005 entnommen und nach Erkenntnissen aus dieser Arbeit modifiziert.

vität der CCR7⁻ T-Zellen abhängig von der kombinierten Kostimulation durch CD28-CD3ζ-OX40. Mit CD28-CD3ζ stimulierte CCR7⁻ T-Zellen unterdrückten dahingegen das Tumorwachstum weniger stark als CCR7⁺ T-Zellen mit dem gleichen Rezeptor. Dies mag durch die geringere Viabilität der CCR7⁻ T-Zellen nach CD28-CD3ζ Stimulation bedingt sein. Die Viabilität der Zellen kann jedoch durch das zusätzliche OX40 Signal erhöht werden, was eine effektivere Tumorlyse durch CCR7⁻ T-Zellen ermöglicht.

Im Gegensatz zu Beobachtungen von Gattinoni *et al.*, 2005, die reifere und späte T-Zellen mit CCR7⁻ Phänotyp mit einer schlechten *in vivo* Aktivität assoziieren, wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass CCR7⁻ T-Zellen Tumore *in vivo* dann effektiver zytolytieren als CCR7⁺ T-Zellen, wenn sie die kombinierte CD28-CD3ζ-OX40 Stimulation erhalten (Abbildung 5.1).

Naive sowie junge T-Zell-Subpopulationen, die als bevorzugte Effektorpopulationen für eine adoptive Immuntherapie gelten, exprimieren CCR7. Diese Zellpopulationen

erlangen, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, durch Proliferation einen CCR7⁻ Phänotyp, was darauf schließen lässt, dass die am Tumorort akkumulierenden T-Zellen CCR7⁻ Phänotyp aufweisen. Da sich gezeigt hat, dass CCR7⁻ T-Zellen *in vivo* nur unter CD28-OX40 Kostimulation effektiv sind, gibt es einen guten Grund, diesen Rezeptor auch bei naiven und jungen T-Zellen einzusetzen.

Durch CD28-CD3ζ-OX40 stimulierte CCR7⁻ T-Zellen sind hochpotente Effektorzellen zur Tumoreliminierung *in vivo*. Die Zellen sind gezwungen am Tumorort zu persistieren und ihre erhöhte Anfälligkeit für Aktivierungs-induzierten Zelltod wird durch die kombinierte Rezeptor-vermittelte CD28-CD3ζ-OX40 Stimulation unterdrückt. Offen bleibt jedoch, wie anhaltend die anti-Tumor Reaktivität der auf diese Weise stimulierten CCR7⁻ T-Zellen ist.

Weiterhin stellt sich die Frage nach den zu erwartenden Nebenwirkungen im Zusammenhang mit der Verwendung von CCR7⁻ T-Zellen. CCR7⁻ T-Zellen vermitteln starke zytolytische Aktivität, die nicht nur am Tumorort greift. In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass bei intravenöser Injektion der T-Zellen nekrotische Läsionen an der Injektionsstelle sowie an der Schwanzspitze der Versuchstiere auftraten. Möglicherweise ist die systemische Applikation CCR7⁻ T-Zellen daher mit starken autoimmunen Nebenwirkungen verbunden. Dies müsste jedoch zunächst durch Verwendung von CCR7⁻ T-Zellen mit Immunrezeptoren anderer Spezifität, aber gleicher Signalkette bestätigt werden. Auf Grund der limitierten Fähigkeit von CCR7⁻ T-Zellen aus peripherem Gewebe auszuwandern, bietet sich jedoch eine intratumorale Applikation dieser Zellen an.

Zusammenfassung

Adoptiver Transfer *ex vivo* aktivierter und expandierter autologer Tumor-reaktiver T-Zellen ist gegenwärtig eine der Strategien, mit der objektive Therapieerfolge in Patienten mit metastasierenden Tumoren erzielt werden können. Allerdings ist die Effektivität der adoptiven Immuntherapie häufig eingeschränkt durch das Unvermögen der *ex vivo* expandierten Zellen *in vivo* zu persistieren. Während die modulare Komposition chimärer Immunrezeptoren, die verwendet werden um Effektorzellen Spezifität für den Tumor zu verleihen, immer weiter optimiert wird, ist bisher nur wenig über die für die Immuntherapie am besten geeignete Effektorzellpopulation bekannt.

Da der CC-Chemokinrezeptor 7 (CCR7) die molekulare Basis für die Auswanderung von T-Zellen aus peripheren Geweben bildet, haben wir untersucht, ob durch die Verwendung CCR7⁻ T-Zellen aufgrund ihrer gesteigerten Persistenz in peripheren Tumoraläsionen eine höhere Effektivität adoptiv transferierter T-Zellen erzielt werden kann. CCR7⁻ T-Zellen verfügen über zahlreiche Eigenschaften, die sie als viel versprechende Kandidaten für einen zytolytischen T-Zell-Angriff auszeichnen. Dazu zählt die Expression großer Mengen zytolytischer Effektormoleküle, erhöhte IFN- γ Sekretion in Folge der Stimulation durch Immunrezeptoren, wodurch eine anti-Tumor Immunantwort durch Rekrutierung von Makrophagen verstärkt werden kann, sowie schwache IL-2 Sekretion, welche das Überleben der Effektorzellen durch die Abwesenheit stimulativer Bedingungen für regulatorische T-Zellen begünstigt. Genetisch modifizierte, Antigen-spezifische CCR7⁻ T-Zellen werden *in vitro* besser durch Immunrezeptorvermittelte Signalgebung zur Lyse von Tumorzellen aktiviert als CCR7⁺ T-Zellen. Allerdings zeichnen sich CCR7⁻ T-Zellen, wie beispielsweise späte Effektor T-Zellen, Effektor-Gedächtnis T-Zellen und terminal differenzierte T-Zellen durch eine erhöhte Apoptosefrequenz aus. Rezeptor-vermittelte Kostimulation mit CD28-CD3 ζ -OX40, nicht jedoch mit nur CD28-CD3 ζ verhindert die Apoptose von CCR7⁻ T-Zellen durch erhöhte Expression von Bcl-2. Infolgedessen lysierten CD28-OX40 kostimierte CCR7⁻ T-Zellen etablierte Tumore *in vivo* effektiver als CCR7⁺ T-Zellen.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass, im Gegensatz zu aktuellen Strategien, der Einsatz CCR7⁻ T-Zellen für die adoptive Immuntherapie zu besserer anti-Tumor Aktivität *in vivo* führt, vorausgesetzt, dass die Effektorzellen durch CD28-CD3 ζ -OX40 stimuliert werden.

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)
AK	Antikörper
AICD	engl.: <i>Activation Induced Cell Death</i>
Amp	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
Bcl-2	engl.: <i>B cell lymphoma 2</i>
bp	Basenpaare
BrdU	5-Brom-2'-Desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CEA	engl.: <i>Carcino Embryonic Antigen</i>
CH2-CH3	konstante Domänen der schweren Kette (human IgG ₁)
CLA	engl.: <i>Cutaneous Lymphocyte Antigen</i>
CTL	engl.: <i>Cytotoxic T-Lymphocyte</i>
DC	engl.: <i>Dendritic Cell</i>
ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleotid-Triphosphat
DMEM	engl.: <i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	Durchflusszytometrie, eigentlich engl.: <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	engl.: <i>Fetal Calf Serum</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
HRS	Hodgkin/ Reed-Sternberg
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kD	Kilo-Dalton
LB	Luria Bertani
MACS	engl.: <i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MFI	engl.: <i>Mean Fluorescence Intensity</i>
MHC	engl.: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MOPS	20 mM -(N-Morpholino)-Propansulfonsäure, 5 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7
OD	optische Dichte
PBMC	engl.: <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	engl.: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Phycoerythrin (Fluoreszenzfarbstoff)
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
POD	Peroxidase
RT	Raumtemperatur

scFv	engl.: <i>Single Chain Fragment Variable Region</i>
SLC	engl.: <i>Secondary Lymphoid Tissue Chemokine</i>
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAE	Tris-HCl/ Acetat/ EDTA Puffer
TCR	engl.: <i>T-Cell Receptor</i>
TGF	engl.: <i>Transforming Growth Factor</i>
TIL	Tumor-infiltrierender Lymphozyt
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
Tris-HCl	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan- Hydrochlorid
ÜN	über Nacht
XTT	Natrium 3'-[1-[(Phenylamino)Karbonyl]-3,4- Tetrazolium]-bis(4-Methoxy-6- Nitro) Benzensulfonsäurehydrat

Literaturverzeichnis

- Aandahl, E.M., Sandberg, J.K., Beckerman, K.P., Tasken, K., Moretto, W.J., Nixon, D.F.** CD7 is a differentiation marker that identifies multiple CD8 T cell effector subsets. *J Immunol*, 170(5):2349–55, 2003.
- Abken, H., Hombach, A., Heuser, C., Kronfeld, K., Seliger, B.** Tuning tumor-specific T-cell activation: a matter of costimulation? *Trends Immunol*, 23(5):240–5, 2002.
- Allen, S.J., Crown, S.E., Handel, T.M.** Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol*, 25:787–820, 2007.
- Alves, N.L., Hooibrink, B., Arosa, F.A., van Lier, R.A.W.** IL-15 induces antigen-independent expansion and differentiation of human naive CD8+ T cells in vitro. *Blood*, 102(7):2541–2546, 2003.
- Appay, V., van Lier, R.A.W., Sallusto, F., Roederer, M.** Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A*, 73(11):975–983, 2008.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.** *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley-Interscience, New York, 1995.
- Baum, P.R., Gayle, R.B., Ramsdell, F., Srinivasan, S., Sorensen, R.A., Watson, M.L., Seldin, M.F., Baker, E., Sutherland, G.R., Clifford, K.N.** Molecular characterization of murine and human OX40/OX40 ligand systems: identification of a human OX40 ligand as the HTLV-1-regulated protein gp34. *EMBO J*, 13(17):3992–4001, 1994.
- Berard, M., Brandt, K., Bulfone-Paus, S., Tough, D.F.** IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8+ T cells. *J Immunol*, 170(10):5018–5026, 2003.
- Berger, C., Jensen, M.C., Lansdorp, P.M., Gough, M., Elliott, C., Riddell, S.R.** Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J Clin Invest*, 118(1):294–305, 2008.

- 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.
- Bromley, S.K., Mempel, T.R., Luster, A.D.** Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat Immunol*, 9(9):970–80, 2008.
- Bromley, S.K., Thomas, S.Y., Luster, A.D.** Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nat Immunol*, 6(9):895–901, 2005.
- Butcher, E.C., Picker, L.J.** Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*, 272(5258):60–66, 1996.
- Böyum, A.** Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 97:7, 1968.
- Callan, M.F., Fazou, C., Yang, H., Rostron, T., Poon, K., Hatton, C., McMichael, A.J.** CD8(+) T-cell selection, function, and death in the primary immune response in vivo. *J Clin Invest*, 106(10):1251–1261, 2000.
- Campbell, J.J., Bowman, E.P., Murphy, K., Youngman, K.R., Siani, M.A., Thompson, D.A., Wu, L., Zlotnik, A., Butcher, E.C.** 6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3beta receptor CCR7. *J Cell Biol*, 141(4):1053–1059, 1998.
- Carpenito, C., Milone, M.C., Hassan, R., Simonet, J.C., Lakhali, M., Suhoski, M.M., Varela-Rohena, A., Haines, K.M., Heitjan, D.F., Albelda, S.M., Carroll, R.G., Riley, J.L., Pastan, I., June, C.H.** Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(9):3360–3365, 2009.
- Champagne, P., Ogg, G.S., King, A.S., Knabenhans, C., Ellefsen, K., Nobile, M., Appay, V., Rizzardi, G.P., Fleury, S., Lipp, M., Förster, R., Rowland-Jones, S., Sékaly, R.P., McMichael, A.J., Pantaleo, G.** Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature*, 410(6824):106–111, 2001.
- Chen, H.W., Liao, C.H., Ying, C., Chang, C.J., Lin, C.M.** Ex vivo expansion of dendritic-cell-activated antigen-specific CD4+ T cells with anti-CD3/CD28, interleukin-7, and interleukin-15: potential for adoptive T cell immunotherapy. *Clin Immunol*, 119(1):21–31, 2006.

- Coligan, J., Kruisbeek, A., Margulies, D.** *Current Protocols in Immunology*. Wiley-Interscience, New York, 1995.
- Corbett, T.H., Griswold, D.P., Roberts, B.J., Peckham, J.C., Schabel, F.M.** Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays, with a note on carcinogen structure. *Cancer Res*, 35(9):2434–2439, 1975.
- Cyster, J.G.** Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science*, 286(5447):2098–2102, 1999.
- Debes, G.F., Arnold, C.N., Young, A.J., Krautwald, S., Lipp, M., Hay, J.B., Butcher, E.C.** Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues. *Nat Immunol*, 6(9):889–94, 2005.
- Deeths, M.J., Kiedl, R.M., Mescher, M.F.** CD8+ T cells become nonresponsive (anergic) following activation in the presence of costimulation. *J Immunol*, 163(1):102–110, 1999.
- Diehl, V., Kirchner, H.H., Burrichter, H., Stein, H., Fonatsch, C., Gerdes, J., Schaadt, M., Heit, W., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A., Heintz, F., Sueno, K.** Characteristics of Hodgkin's disease-derived cell lines. *Cancer Treat Rep*, 66(4):615–632, 1982.
- Emtage, P.C.R., Lo, A.S.Y., Gomes, E.M., Liu, D.L., Gonzalo-Daganzo, R.M., Jung-hans, R.P.** Second-generation anti-carcinoembryonic antigen designer T cells resist activation-induced cell death, proliferate on tumor contact, secrete cytokines, and exhibit superior antitumor activity in vivo: a preclinical evaluation. *Clin Cancer Res*, 14(24):8112–8122, 2008.
- Engvall, E., Perlman, P.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9):871–874, 1971.
- Eshhar, Z.** The T-body approach: redirecting T cells with antibody specificity. *Handb Exp Pharmacol*, (181):329–42, 2008.
- Fidler, I.J.** The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation*, 70(9-10):498–505, 2002.
- Fidler, I.J.** The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 3(6):453–458, 2003.
- Finney, H.M., Lawson, A.D., Bebbington, C.R., Weir, A.N.** Chimeric receptors provi-

ding both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *J Immunol*, 161(6):2791–2797, 1998.

Finney, H.M., Akbar, A.N., Lawson, A.D.G. Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain. *J Immunol*, 172(1):104–113, 2004.

Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E., Lipp, M. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*, 99(1):23–33, 1999.

Gattinoni, L., Powell, D. J., J., Rosenberg, S.A., Restifo, N.P. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat Rev Immunol*, 6(5):383–93, 2006.

Gattinoni, L., Klebanoff, C.A., Palmer, D.C., Wrzesinski, C., Kerstann, K., Yu, Z., Finkelstein, S.E., Theoret, M.R., Rosenberg, S.A., Restifo, N.P. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. *J Clin Invest*, 115(6):1616–1626, 2005.

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.

Gramaglia, I., Weinberg, A.D., Lemon, M., Croft, M. Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. *J Immunol*, 161(12):6510–6517, 1998.

Grayson, J.M., Zajac, A.J., Altman, J.D., Ahmed, R. Cutting edge: increased expression of Bcl-2 in antigen-specific memory CD8+ T cells. *J Immunol*, 164(8):3950–3954, 2000.

Greenwald, R.J., Freeman, G.J., Sharpe, A.H. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*, 23:515–548, 2005.

Gunn, M.D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L.T., Nakano, H. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med*, 189(3):451–460, 1999.

Hamann, D., Baars, P.A., Rep, M.H., Hooibrink, B., Kerkhof-Garde, S.R., Klein, M.R., van Lier, R.A. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med*, 186(9):1407–1418, 1997.

- Hanahan, D.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166(4):557–580, 1983.
- Harari, A., Rizzardi, G.P., Ellefsen, K., Ciuffreda, D., Champagne, P., Bart, P.A., Kaufmann, D., Telenti, A., Sahli, R., Tambussi, G., Kaiser, L., Lazzarin, A., Perrin, L., Pantaleo, G.** Analysis of HIV-1- and CMV-specific memory CD4 T-cell responses during primary and chronic infection. *Blood*, 100(4):1381–1387, 2002.
- Hombach, A., Schlimper, C., Sievers, E., Frank, S., Schild, H.H., Sauerbruch, T., Schmidt-Wolf, I.G., Abken, H.** A recombinant anti-carcinoembryonic antigen immunoreceptor with combined CD3zeta-CD28 signalling targets T cells from colorectal cancer patients against their tumour cells. *Gut*, 55(8):1156–64, 2006.
- 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):115–20, 2000.
- Hombach, A., Wieczarkowicz, 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):6123–31, 2001.
- Jember, A.G., Zuberi, R., Liu, F.T., Croft, M.** Development of allergic inflammation in a murine model of asthma is dependent on the costimulatory receptor OX40. *J Exp Med*, 193(3):387–392, 2001.
- Kaltoft, K., Bisballe, S., Dyrberg, T., Boel, E., Rasmussen, P.B., Thestrup-Pedersen, K.** Establishment of two continuous T-cell strains from a single plaque of a patient with mycosis fungoides. *In Vitro Cell Dev Biol*, 28A(3 Pt 1):161–167, 1992.
- Kanzler, H., Hansmann, M.L., Kapp, U., Wolf, J., Diehl, V., Rajewsky, K., Küppers, R.** Molecular single cell analysis demonstrates the derivation of a peripheral blood-derived cell line (L1236) from the Hodgkin/Reed-Sternberg cells of a Hodgkin's lymphoma patient. *Blood*, 87(8):3429–3436, 1996.
- Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J., Schreiber, R.D.** Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(13):7556–7561, 1998.
- 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., Parker, L.L., Wang, G., Eshhar, Z., Mavroukakis, S.A., White, D.E., Wunderlich, J.R., Canevari, S., Rogers-Freezer, L., Chen, C.C., Yang, J.C., Rosenberg, S.A., Hwu, P. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 12(20 Pt 1):6106–15, 2006.

Klebanoff, C.A., Finkelstein, S.E., Surman, D.R., Lichtman, M.K., Gattinoni, L., Theoret, M.R., Grewal, N., Spiess, P.J., Antony, P.A., Palmer, D.C., Tagaya, Y., Rosenberg, S.A., Waldmann, T.A., Restifo, N.P. IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(7):1969–1974, 2004.

Koehler, H., Kofler, D., Hombach, A., Abken, H. CD28 costimulation overcomes transforming growth factor-beta-mediated repression of proliferation of redirected human CD4+ and CD8+ T cells in an antitumor cell attack. *Cancer Res*, 67(5):2265–73, 2007.

Kunkel, E.J., Butcher, E.C. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity*, 16(1):1–4, 2002.

Kurobe, H., Liu, C., Ueno, T., Saito, F., Ohigashi, I., Seach, N., Arakaki, R., Hayashi, Y., Kitagawa, T., Lipp, M., Boyd, R.L., Takahama, Y. CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance. *Immunity*, 24(2):165–177, 2006.

Laux, I., Khoshnan, A., Tindell, C., Bae, D., Zhu, X., June, C.H., Effros, R.B., Nel, A. Response differences between human CD4(+) and CD8(+) T-cells during CD28 costimulation: implications for immune cell-based therapies and studies related to the expansion of double-positive T-cells during aging. *Clin Immunol*, 96(3):187–197, 2000.

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.

Marshall, N.A., Christie, L.E., Munro, L.R., Culligan, D.J., Johnston, P.W., Barker, R.N., Vickers, M.A. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood*, 103(5):1755–1762, 2004.

Maus, M.V., Thomas, A.K., Leonard, D.G.B., Allman, D., Addya, K., Schlienger, K., Riley, J.L., June, C.H. Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T

- lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB. *Nat Biotechnol*, 20(2):143–148, 2002.
- Maxwell, J.R., Weinberg, A., Prell, R.A., Vella, A.T.** Danger and OX40 receptor signaling synergize to enhance memory T cell survival by inhibiting peripheral deletion. *J Immunol*, 164(1):107–112, 2000.
- Mebius, R.E., Dowbenko, D., Williams, A., Fennie, C., Lasky, L.A., Watson, S.R.** Expression of GlyCAM-1, an endothelial ligand for L-selectin, is affected by afferent lymphatic flow. *J Immunol*, 151(12):6769–6776, 1993.
- Merkenschlager, M., Terry, L., Edwards, R., Beverley, P.C.** Limiting dilution analysis of proliferative responses in human lymphocyte populations defined by the monoclonal antibody UCHL1: implications for differential CD45 expression in T cell memory formation. *Eur J Immunol*, 18(11):1653–1661, 1988.
- Miranda-Carus, M.E., Benito-Miguel, M., Llamas, M.A., Balsa, A., Martin-Mola, E.** Human T cells constitutively express IL-15 that promotes ex vivo T cell homeostatic proliferation through autocrine/juxtacrine loops. *J Immunol*, 175(6):3656–62, 2005.
- Misslitz, A., Bernhardt, G., Förster, R.** Trafficking on serpentines: molecular insight on how maturing T cells find their winding paths in the thymus. *Immunol Rev*, 209:115–128, 2006.
- Misslitz, A., Pabst, O., Hintzen, G., Ohl, L., Kremmer, E., Petrie, H.T., Förster, R.** Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *J Exp Med*, 200(4):481–491, 2004.
- Mocellin, S., Marincola, F.M., Young, H.A.** Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J Leukoc Biol*, 78(5):1043–1051, 2005.
- Mora, J.R., von Andrian, U.H.** T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *Trends Immunol*, 27(5):235–243, 2006.
- 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):126–9, 2006.
- Moser, B., Loetscher, P.** Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol*, 2(2):123–128, 2001.

- Murphy, W.J., Back, T.C., Conlon, K.C., Komschlies, K.L., Ortaldo, J.R., Sayers, T.J., Wiltrout, R.H., Longo, D.L.** Antitumor effects of interleukin-7 and adoptive immunotherapy on human colon carcinoma xenografts. *J Clin Invest*, 92(4):1918–1924, 1993.
- Nakano, H., Mori, S., Yonekawa, H., Nariuchi, H., Matsuzawa, A., Kakiuchi, T.** A novel mutant gene involved in T-lymphocyte-specific homing into peripheral lymphoid organs on mouse chromosome 4. *Blood*, 91(8):2886–2895, 1998.
- Newcom, S.R., Gu, L.** Transforming growth factor beta 1 messenger RNA in Reed-Sternberg cells in nodular sclerosing Hodgkin's disease. *J Clin Pathol*, 48(2):160–163, 1995.
- Newcom, S.R., Kadin, M.E., Ansari, A.A., Diehl, V.** L-428 nodular sclerosing Hodgkin's cell secretes a unique transforming growth factor-beta active at physiologic pH. *J Clin Invest*, 82(6):1915–1921, 1988.
- Niehans, G.A., Brunner, T., Frizelle, S.P., Liston, J.C., Salerno, C.T., Knapp, D.J., Green, D.R., Kratzke, R.A.** Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res*, 57(6):1007–1012, 1997.
- Ohl, L., Henning, G., Krautwald, S., Lipp, M., Hardtke, S., Bernhardt, G., Pabst, O., Förster, R.** Cooperating mechanisms of CXCR5 and CCR7 in development and organization of secondary lymphoid organs. *J Exp Med*, 197(9):1199–1204, 2003.
- Park, J.R., Digiusto, D.L., Slovak, M., Wright, C., Naranjo, A., Wagner, J., Meechoovet, H.B., Bautista, C., Chang, W.C., Ostberg, J.R., Jensen, M.C.** Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. *Mol Ther*, 15(4):825–833, 2007.
- 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.
- Rappl, G., Schrama, D., Hombach, A., Meuer, E.K., Schmidt, A., Becker, J.C., Abken, H.** CD7(-) T cells are late memory cells generated from CD7(+) T cells. *Rejuvenation Res*, 11(3):543–56, 2008.

- Reif, K., Ekland, E.H., Ohl, L., Nakano, H., Lipp, M., Förster, R., Cyster, J.G.** Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature*, 416(6876):94–99, 2002.
- Robbins, P.F., Dudley, M.E., Wunderlich, J., El-Gamil, M., Li, Y.F., Zhou, J., Huang, J., Powell, D.J., Rosenberg, S.A.** Cutting edge: persistence of transferred lymphocyte clonotypes correlates with cancer regression in patients receiving cell transfer therapy. *J Immunol*, 173(12):7125–7130, 2004.
- Rogers, P.R., Song, J., Gramaglia, I., Killeen, N., Croft, M.** OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity*, 15(3):445–455, 2001.
- 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.
- Rot, A., von Andrian, U.H.** Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol*, 22:891–928, 2004.
- Russell, J.H., Ley, T.J.** Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*, 20:323–370, 2002.
- Sallusto, F., Geginat, J., Lanzavecchia, A.** Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*, 22:745–63, 2004.
- Sallusto, F., Kremmer, E., Palermo, B., Hoy, A., Ponath, P., Qin, S., Forster, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A.** Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. *Eur J Immunol*, 29(6):2037–45, 1999a.
- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A.** Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401(6754):708–12, 1999b.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T.** *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, 3 ed., 1996.
- Schluns, K.S., Kieper, W.C., Jameson, S.C., Lefrançois, L.** Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol*, 1(5):426–432, 2000.

- Schober, S.L., Kuo, C.T., Schluns, K.S., Lefrancois, L., Leiden, J.M., Jameson, S.C.** Expression of the transcription factor lung Krüppel-like factor is regulated by cytokines and correlates with survival of memory T cells in vitro and in vivo. *J Immunol*, 163(7):3662–3667, 1999.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A.** Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, 75(2):163–189, 2004.
- 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.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., Schreiber, R.D.** IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410(6832):1107–1111, 2001.
- Shevach, E.M.** CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol*, 2(6):389–400, 2002.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakaguchi, S.** Induction of tumor immunity by removing CD25⁺CD4⁺ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol*, 163(10):5211–5218, 1999.
- Siegel, P.M., Massagué, J.** Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer*, 3(11):807–821, 2003.
- Sigmundsdottir, H., Butcher, E.C.** Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking. *Nat Immunol*, 9(9):981–987, 2008.
- Song, E., Chen, J., Ouyang, N., Su, F., Wang, M., Heemann, U.** Soluble Fas ligand released by colon adenocarcinoma cells induces host lymphocyte apoptosis: an active mode of immune evasion in colon cancer. *Br J Cancer*, 85(7):1047–1054, 2001.
- Suzuki, T., Tahara, H., Narula, S., Moore, K.W., Robbins, P.D., Lotze, M.T.** Viral interleukin 10 (IL-10), the human herpes virus 4 cellular IL-10 homologue, induces local anergy to allogeneic and syngeneic tumors. *J Exp Med*, 182(2):477–486, 1995.
- Till, B.G., Jensen, M.C., Wang, J., Chen, E.Y., Wood, B.L., Greisman, H.A., Qian, X., James, S.E., Raubitschek, A., Forman, S.J., Gopal, A.K., Pagel, J.M., Lindgren, C.G., Greenberg, P.D., Riddell, S.R., Press, O.W.** Adoptive immunotherapy for indolent

non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood*, 112(6):2261–2271, 2008.

Topalian, S.L., Solomon, D., Rosenberg, S.A. Tumor-specific cytolysis by lymphocytes infiltrating human melanomas. *J Immunol*, 142(10):3714–3725, 1989.

Trapani, J.A. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biol*, 2(12):REVIEWS3014, 2001.

Trapani, J.A., Smyth, M.J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*, 2(10):735–747, 2002.

Ueno, T., Saito, F., Gray, D.H.D., Kuse, S., Hieshima, K., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Boyd, R.L., Takahama, Y. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med*, 200(4):493–505, 2004.

van Leeuwen, E.M., Gamadia, L.E., Baars, P.A., Remmerswaal, E.B., ten Berge, I.J., van Lier, R.A. Proliferation requirements of cytomegalovirus-specific, effector-type human CD8+ T cells. *J Immunol*, 169(10):5838–43, 2002.

Viola, A., Luster, A.D. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 48:171–197, 2008.

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

Wang, L., Goillot, E., Tepper, R.I. IL-10 inhibits alloreactive cytotoxic T lymphocyte generation in vivo. *Cell Immunol*, 159(2):152–169, 1994.

Ward, S.G., Marelli-Berg, F.M. Mechanisms of chemokine and antigen-dependent T-lymphocyte navigation. *Biochem J*, 418(1):13–27, 2009.

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):1195–203, 1998.

Wherry, E.J., Teichgräber, V., Becker, T.C., Masopust, D., Kaech, S.M., Antia, R., von

- Andrian, U.H., Ahmed, R.** Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol*, 4(3):225–234, 2003.
- Wolf, J., Kapp, U., Bohlen, H., Kornacker, M., Schoch, C., Stahl, B., Mücke, S., von Kalle, C., Fonatsch, C., Schaefer, H.E., Hansmann, M.L., Diehl, V.** Peripheral blood mononuclear cells of a patient with advanced Hodgkin's lymphoma give rise to permanently growing Hodgkin-Reed Sternberg cells. *Blood*, 87(8):3418–3428, 1996.
- 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.
- Young, J.L., Ramage, J.M., Gaston, J.S., Beverley, P.C.** In vitro responses of human CD45R0brightRA- and CD45R0-RAbright T cell subsets and their relationship to memory and naive T cells. *Eur J Immunol*, 27(9):2383–2390, 1997.
- Zhou, J., Shen, X., Huang, J., Hodes, R.J., Rosenberg, S.A., Robbins, P.F.** Telomere length of transferred lymphocytes correlates with in vivo persistence and tumor regression in melanoma patients receiving cell transfer therapy. *J Immunol*, 175(10):7046–7052, 2005.

Danksagung

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

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

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

Besonders danken möchte ich auch Samir Tawadros, auf den ich mich in „Maus-Fragen“ jederzeit verlassen konnte. Unterstützung durch zahlreiche Anregungen und technischen Support erhielt ich von Ulrike Hohmann und Martin Zuther. Vielen Dank dafür!

Bei den Mitgliedern der AG Tumorgenetik möchte ich mich für das freundschaftliche Arbeitsklima und die schöne Zeit bedanken. Es war mir ein großes Vergnügen mit Euch zusammenzuarbeiten – ich werde Euch vermissen!

Meiner Familie und Martin danke ich für motivierenden Zuspruch und dafür, dass sie immer für mich da sind.

Erklärung

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

Köln, den 27. April 2009

Claudia Ederer