

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg**

Direktor:
Professor Dr. med. Hermann Einsele

**Untersuchungen zur aktivierungsabhängigen Phosphorylierung
der MAP Kinasen von T Zellen, die durch chimärische
T Zellrezeptormoleküle aktiviert werden.**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

**Medizinischen Fakultät der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von: Johannes Düll

aus Steinsfeld

Würzburg, Dezember 2012

Referent/Referentin: Prof. Dr. med. Max Topp

Koreferent/Koreferentin: Prof. Dr. med. Matthias Eyrich

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 17. September 2013

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	T Zell Therapie	1
1.1.1	T Zell Therapie gegen virale Pathogene	1
1.1.1.1	EBV spezifische T Zell Therapie	2
1.1.1.2	CMV spezifische T Zell Therapie	3
1.1.2	T Zell Therapie gegen Tumorantigene	4
1.1.2.1	Tumor infiltrierende Lymphozyten	
	– Tumor reaktive T Zellen	6
1.1.2.2	Transgene T Zellen	6
1.1.2.2.1	TCR transgene T Zellen	7
1.1.2.2.2	Chimärische Rezeptoren	8
1.2	T Zell Aktivierung und Signaltransduktion	10
1.2.1	Frühe TCR Signaltransduktion	11
1.2.2	MAP Kinase Signalweg	12
1.2.3	Calcium Signalweg	13
1.2.4	DAG und PKC Signalweg	13
1.3	Kostimulation	14
1.4	Ziel der Arbeit	15
1.5	Zellsystem	17
2	Material	
2.1	Geräte	20
2.2.1	Chemikalien	20
2.3	Biochemikalien	21
2.4	Verbrauchsmaterial	22
2.5	Kits	22
2.6	Zellkulturmedien und Zusätze	23
2.7	Zytokine	23
2.8	Antikörper	23
2.9	Peptide	25

2.10	Pentamere	25
2.11	Retrovirale Vektoren	25
2.12	Zelllinien	25

3 Methoden

3.1	Zellbiologische Arbeitstechniken	27
3.1.1	Kultivierung von Zelllinien	27
3.1.1.1	Allgemeine Kultivierung und Passage	27
3.1.1.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	27
3.1.2	Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC)	28
3.1.3	Gewinnung von Humanserum	28
3.1.4	Immunselektion mittels MACS MicroBeads	28
3.1.5	Kultivierung humaner T Zellen	29
3.1.5.1	Isolierung von virus-spezifischen T Zellen	29
3.1.5.2	Kultivierung von virus-spezifischen T Zellen	29
3.1.5.3	Expansion von T Zellen mit dem „Rapid Expansion Protocol“ (REP)	30
3.1.6	Zellanalyse	30
3.1.6.1	Durchflusszytometrie (FACS)	30
3.1.6.2	Tetramer FACS-Analyse	31
3.1.6.3	Intrazelluläre IFN- γ Färbung (ICC)	31
3.1.6.4	Zytotoxizitätstest (Chromium-release-assay)	32
3.1.6.5	JD Flow Kill Assay	32
3.1.6.6	CFSE Proliferations Assay	33
3.1.6.7	CBA Signaling Technik	33
3.1.6.8	Quantibrite	34
3.1.7	Produktion von retroviralem Überstand	34
3.1.7.1	Virusproduktion mit FLYRD Zellen	34
3.1.7.2	Virusproduktion mit transient transfizierten 293T Zellen	35
3.1.8	Retrovirale Transduktion	35
3.1.8.1	Retrovirale Transduktion mit Retronectin	35

3.1.8.2	Retrovirale Transduktion- „spin infection“	36
3.1.9	Aufreinigung der transduzierten Zellen	36
3.2	Mathematische Analysen	37
4	Ergebnisse	
4.1	Generierung von CMV spezifischen T Zellen	38
4.2	Herstellung der T Zelllinien mit chimärischen Rezeptoren	38
4.2.1	CARs der ersten Generation	38
4.2.2	CARs der zweiten Generation	40
4.3	Analyse der Rezeptordichte	41
4.4	Funktionelle Analysen	42
4.4.1	Vergleich der Lysierungseffektivität zwischen CMV spezifischen CD8 T Zellen, den CD19z und den CD19/28z T Zellen	42
4.4.1.1	Lysierungseffektivität der CMV spezifischen T Zellen transduziert mit den Erstgenerationrezeptoren CD19z	42
4.4.1.2	Lysierungseffektivitätsvergleich der CMV spezifischen T Zellen transduziert mit dem Erstgenerationrezeptor CD19z im Vergleich zum Zweitgenerationrezeptor CD19/28z	44
4.4.2	Vergleich der Proliferationskapazität	45
4.4.3	Expression des Aktivierungsmarkers CD25 nach Restimulation	46
4.4.4	Zytokinproduktion von IFN γ bei antigenspezifischen T Zellen und CAR T Zellen	47
4.5	Signaltransduktionsanalyse von Phosphoproteinen in aktivierten T Zellen –Dynamisches Phosphoprotein monitoring	49
4.5.1	Signifikant quantifizierbarer Unterschied der Phosphorylierung in den MAP Kinasen zwischen physiologischer TCR Aktivierung und Aktivierung über einen CAR der ersten Generation	51

4.5.2	Kein Signifikanter Unterschied in der Phosphorylierung zwischen erst und Zweitgeneration Rezeptoren in CMV spezifischen T Zellen	52
5.	Diskussion	
5.1	Rezeptordichte	54
5.2	Verbesserung der CAR Technologie	55
5.2.1	Dritt Generation Rezeptoren	55
5.2.2	Auswahl der Effektor Zellpopulation	56
5.3	Verwendung der CBA Technologie als Präklinisches screening auf neue CARs	57
5.4	Patientensicherheit	58
6.	Zusammenfassung	60
7.	Literaturverzeichnis	63

1 Einleitung

1.1 T Zell Therapie

Die adoptive T Zell Therapie ist ein noch relativ neues Feld in der Medizin und wurde nach den Anfängen von Walter et al. 1995 zu einer möglichen Alternative in der Virus- und Tumorbekämpfung proklamiert. Durch das immer bessere Verständnis des menschlichen Immunsystems wurden die T Zellen als zentraler Punkt in der Immunantwort sowohl auf pathogene Erreger als auch in der Bekämpfung von Tumoren entdeckt [Dunn et al. 2004]. Neue Techniken im Umgang mit antigenspezifischen Zellen wie die Selektion über Pentamere und MACS Beads ermöglichten den Schritt, T Zellen mehr denn je als Therapeutikum einzusetzen. Das Einsatzspektrum des adoptiven T Zell Transfers von der Virusbekämpfung bis hin zur Tumorthherapie möchte ich im Folgenden beschreiben.

1.1.1 T Zell Therapie gegen virale Pathogene

Unser Immunsystem ist ständig einer Vielzahl von Viren ausgesetzt. Für immunkompetente Personen ist es in der Regel kein Problem, sich mit den alltäglich weit verbreiteten Typen wie Adenoviren, Respiratorische Synzytial Viren, dem Epstein Barr Virus oder dem Zytomegalievirus auseinanderzusetzen und diese zu bekämpfen. Hier spielen vor allem die CD8 T Zellen eine bedeutende Rolle, die bei einer akuten Virusinfektion antigenspezifisch expandieren [Callan, M.F. et al. 1998]. Bei nicht immunkompetenten Patienten, die allogene Stammzelltransplantiert werden, sind vor allem für solche opportunistischen Infektionen oder Reaktivierungen anfällig. Hier erzeugen Infektion und oder Reaktivierung lebensbedrohliche Komplikationen mit einer hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrate [Ljungmann et al. 1992]. Antivirale Medikamente konnten in den letzten Jahren die Mortalität signifikant senken. Dies zeigte sich aber vor allem bei der frühen Infektion in den ersten 100 Tagen nach Transplantation. Somit verlagert sich das Problem auf die so genannten „late onset“ Infektionen. [Einsele et al. 2002].

Studien an Nagetieren haben gezeigt, dass der Transfer von antigenspezifischen T Zellen möglich ist, und dass diese eine Immunität im Empfängertier erzeugen. Walter et al. verfolgte diese Strategie und konnte bei 14, Patienten die eine Stammzelltransplantation erhielten, CMV spezifische CD8 T Zellklone ohne Toxizität infundieren und somit die zelluläre Immunität gegen das Zytomegalievirus herstellen. [Walter et al. 1995].

1.1.1.1 EBV spezifische T Zell Therapie

Das doppelsträngige Epstein Barr Virus (kurz EBV) aus der Gruppe der Herpesviridae wurde in Burkitt Lymphom Zellen zum ersten Mal beschrieben. Der Zusammenhang mit diesen Tumorzellen ließ schnell eine EBV assoziierte Tumorgenese vermuten. EBV wird für einige maligne Erkrankungen verantwortlich gemacht wie z.B. das Burkitt Lymphom, das Hodgkin Lymphom oder aber auch die so genannten Post-Transplantations-Lymphoproliferativen Erkrankungen [Gottschalk et al. 2005]. Bei EBV transformierten B Zellen werden die gleichen Antigene exprimiert wie bei einer latenten Infektion mit dem Virus. Somit sind diese Zellen für das Immunsystem zugänglich und werden beim Gesunden von EBV spezifischen Zytotoxischen T Zellen (CTLs) eliminiert [Leen et al. 2008]. Rooney, Heslop, Gustafson und einige andere Gruppen konnten EBV CTLs generieren und diese bei lymphoproliferativen B Zell Krankheiten erfolgreich einsetzen. Die polyklonalen EBV spezifischen T Zelllinien wurden über EBV positive lymphoblastoide Zelllinien (LCLs) generiert. Hierbei werden die antigenspezifischen T Zellen des Donors, durch Antigenrestimulation über die LCLs, expandiert und dem Patienten infundiert. Diese T Zellen konnten bis zu neun Jahren nach der Transfusion noch in den Patienten nachgewiesen werden. Dies spricht für eine lang anhaltende Immunität gegen das Epstein Barr Virus [Heslop et al 1996]. Somit konnte gezeigt werden, dass diese Form der Therapie effektiv, lang anhaltend und sicher ist. Der Nachteil dabei ist aber die lange Zeit und der Kostenaufwand, den man anwenden muss, um T Zelllinien über LCLs zu generieren.

1.1.1.2 CMV spezifische T Zell Therapie

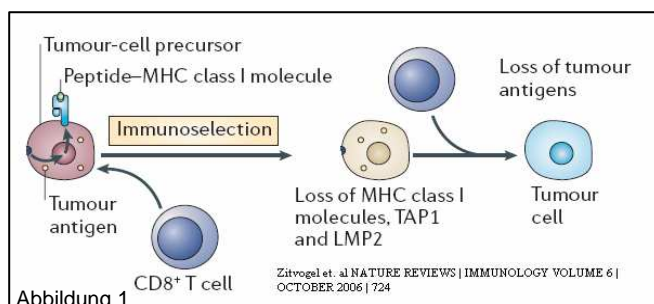
Das Zytomegalievirus ist ebenfalls ein doppelstrangiges DNA Virus aus der Familie der Herpesviridae. Die Infektion verläuft beim Immunkompetenten in den meisten Fällen ohne klinische Symptome und endet in einer latenten Infektion. Anders zeigt sich die Auswirkung als opportunistische Neuinfektion oder Reaktivierung bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation. Vor allem in der Posttransplantationsphase sind und werden die Patienten immunsupprimiert. Dies kann zum Auftreten von z. B. CMV Pneumonien oder CMV Colitiden führen. Die CMV Pneumonie hat bei Reaktivierung eine Morbidität und Mortalität von 30-60% [Reed et al. 1988, Emanuel et al 1988]. Antivirale Medikamente wie Ganciclovir konnten in den letzten Jahren die Mortalität hinsichtlich der CMV Infektion signifikant senken. Der Einsatz von antiviralen Medikamenten begünstigt allerdings die Möglichkeit von Resistenzentwicklungen und bietet ein großes Nebenwirkungsspektrum wie Myelotoxizität und Nephrotoxizität. [Boeckh et al.; 1999, Einsele et al. 2000]. Eine Alternative, die Reaktivierung und Neuinfektion prophylaktisch wie therapeutisch zu verhindern, ist der adoptive T Zell Transfer mit CMV spezifischen T Zellen. Voraussetzung dafür ist ein CMV seropositiver Donor. Bei einem gesunden seropositiven Spender gibt es eine relativ hohe Frequenz an CMV spezifischen memory T Zellen, die das Virus kontrollieren, so dass dieser klinisch unauffällig bleibt. Rauser et al. hat ein klinisches Protokoll entwickelt, mit dem es möglich ist, unter GMP Bedingungen CMV spezifische Zelllinien herzustellen, zu testen und dem Patienten zu infundieren. Die Arbeitsgruppe um Rauser erzeugte die Zelllinien, indem Sie die aus dem Patientenblut gewonnenen Leukozyten mit Peptid und Antigen stimulierte und am nächsten Tag die CMV spezifischen Zellen über einen IFN γ Secretion Assay isolierte. Walter, Einsele, Peggs, Cobbold und Micklethwaite zeigten, dass die Transfusion CMV spezifischer Zellen ohne Nebenwirkungen möglich ist. Prophylaktische virale Immunrestitution für CMV konnte bei 14 von 14 Patienten hergestellt werden [Walter et al. 1995]. Auch die Behandlung von CMV Infektionen nach allogener Stammzelltransplantation war erfolgreich,

selbst wenn diese Patienten zuvor nicht auf antivirale Medikamente ansprechen [Einsele et al. 2002].

1.1.2 T Zell Therapie gegen Tumorantigene

In den Industriestaaten ist Krebs die zweithäufigste Todesursache. Das Immunsystem spielt eine entscheidende Rolle für die Tumorbekämpfung, aber auch für den Tumorprogress. Der Tumor und die Tumorentstehung werden unter anderem durch unser angeborenes und adaptives Immunsystem in Schach gehalten. Vor allem sind intakte und funktionelle T Zellen die Grundlage für eine effektive Immunität gegen sehr viele Pathogene und spielen eine große Rolle bei der Tumorbekämpfung [Dunn et. al 2004]. Dies zeigte sich bei Mäusen, denen die alpha, beta T Zellen oder gamma, delta T Zellen fehlen (TCR b -/- mice). Diese sind anfälliger gegen MCA induzierte Tumore als die wildtyp Mäuse [Girardi et al., 2001].

Fakt ist aber auch, dass viele Menschen, obwohl sie nicht immunsupprimiert sind oder Immundefekte haben, an Krebs erkranken. Dies liegt einerseits an den Tumorzellen mit ihren genetischen Diversitäten und Mutationen selbst, andererseits am sogenannten Immunoediting, dem Wechselspiel zwischen Tumor und Immunsystem. Durch das Immunoediting, bei dem das Immunsystem selbst den Tumor „formt“, kann es dann später zum „Immunescape“ kommen. Krebszellen können dem angeborenen und adaptiven Immunsystem durch verschiedene Mechanismen entgehen (siehe Abbildung 1).



Einer davon ist die sogenannte Immunselektion, die Teil des Immunoeditings ist. Solche Tumorzellen, die durch die Immunantwort nicht zugrunde gehen, können sich vermehren.

Da nur diese sich vermehren, entsteht eine Selektion der Tumorzellen. Hierbei proliferieren nur solche Tumorzellen, die sich vor dem Immunsystem verstecken. Hier kommen verschiedene Mechanismen zum Einsatz. Eine Strategie ist die Verringerung der Expression von MHC-I Molekülen auf der

Tumoroberfläche. Somit bietet diese Zelle weniger Angriffsfläche gegenüber CD8 positiven Killerzellen, die die entarteten Antigene, die die Tumorzelle über MHC-I präsentiert, erkennen würden. Nach dieser Identifizierung der Zelle über den TCR und den MHC-I Komplex wäre die T Zelle imstande, die Tumorzelle zu lysieren. In die gleiche Richtung geht die Expressionsverminderung von solchen Molekülen, die die Antigen Prozessierung und Präsentation in der Tumorzelle ermöglichen wie z.B. TAP1, LMP2, LMP7 und Tapasin. Um dem Immunsystem keine Angriffsfläche zu bieten, können Tumorzellen das PI9 überexprimieren. Dies ist ein Serin-Protease Inhibitor, der den Granzym B-Perforin Signalweg blockiert und somit eine Ausschüttung von Granzymen durch T Zellen erfolgreich verhindert. Der andere Mechanismus, den Schreiber et. al beschreibt, ist der der so genannten „immunsabversion“. Hierbei geht es um die aktive Suppression der Immunantwort durch die Tumorzellen. Eine mögliche Suppression ist bei den „tumor infiltrating T lymphocytes“ (TILs) zu sehen. Sie infiltrieren den Tumor, werden aber durch Botenstoffe in der Mikroumwelt des Tumors in ihrer Funktion gehemmt. Die durch die Tumorzellen ausgeschütteten Wachstumsstoffe IL4 und IL10 dienen nicht nur der autokrinen Stimulation, sondern haben auch den Effekt, dass sie die Immunantwort der T Zellen von TH1 in Richtung TH2 schieben. Somit wird die Antitumorantwort des Immunsystems geschwächt, da diese hauptsächlich über die TH1 Immunantwort läuft. IL10 hat unter anderem die Eigenschaft, die Entwicklung und Aktivität von Dendritischen Zellen herabzusetzen und somit eine Aktivierung der T Zellen über diesen Weg zu vermindern. Eine weitere Suppressionsmöglichkeit ist das Ausschütten von TGFbeta. Dieser Botenstoff unterdrückt die inflammatorische Reaktion vor allem auch die der T Zellen [Zitvogel et al. 2006, Dunn et al. 2004, Smyth et al. 2006].

Es gibt verschiedene Ansätze das „blind“ gewordenen Immunsystem zu unterstützen. Es besteht die Möglichkeit den Tumor mit T Zellen zu bekämpfen. Hierbei gibt es verschiedene Ansätze, die im Folgenden erläutert werden.

1.1.2.1 Tumor infiltrierende Lymphozyten – Tumor reaktive T Zellen

Die T Zellen, die den Tumor bekämpfen sollen, müssen diesen auch spezifisch erkennen. Dies ist auch eines der großen Probleme der Immuntherapie. Wie oben beschrieben, kann der Tumor dem Immunsystem entkommen, indem er MHC Moleküle herunterreguliert und somit die Präsentation tumorspezifischer Antigene vermieden wird. Damit der Tumor als solcher vom Immunsystem erkannt wird, sucht man nach sogenannten Tumor assoziierten Antigenen. Dies sind Antigene, die nur durch den Tumor exprimiert werden, oder aber im schlechteren Falle im Gegensatz zu anderen Geweben/Organen überexprimiert werden. Eines dieser Targets ist das bekannte HER2 Antigen beim Brustkrebs oder aber auch das MelanA beim Malignen Melanom. Eine Möglichkeit, diese spezifischen T Zellen zu generieren, um diese dem Patienten wieder zu infundieren, ist die T Zellen aus Tumormaterial selbst zu isolieren. Diese sogenannten Tumor infiltrierenden Zellen werden aus kutanem Probenmaterial über einen Tumorverdau isoliert und anschließend expandiert [Dudley et al; 2003]. Mackensen et al. 2006 verfolgten einen anderen Ansatz, TILs zu gewinnen, indem sie Leukapharesematerial von Patienten über DCs stimulierten, die mit dem Antigen MelA gefüttert wurden. Rosenberg und Dudley behandelten über 90 Patienten mit dem adoptiven T Zell Transfer, die an einem malignen Melanom im fortgeschrittenen Stadium litten [Rosenberg, Dudley et al 2009]. Die Ansprechraten bewegten sich zwischen 49-72%. Die Persistenz der Zellen im Patienten nach einem Monat korrelierte mit der Anti-Tumor Antwort. So ist dies die beste Therapie, die beim Malignen Melanom zurzeit angeboten werden kann.

1.1.2.2 Transgene T Zellen

Tumor infiltrierende T Zellen sind eine gute Möglichkeit vorzugsweise das Maligne Melanom zu therapieren. Bei anderen Tumorentitäten gibt es keine so guten Daten wie zuvor beschrieben. Ein Problem ist es, die T Zellen aus dem Tumorgewebe zu isolieren und zu expandieren. Durch diese Methode können nur sehr wenige TILs gewonnen werden. Des Weiteren reicht es nicht, tumorspezifische T Zellen in den Patienten zu infundieren. Sie müssen den

Tumor erreichen, in das Tumorbett emigrieren, das immunsuppressive Mileau überwinden, die Tumorzellen erkennen und diese abtöten. Um diese Probleme zu lösen und die therapeutischen Optionen zu erweitern, gibt es die Möglichkeit T Zellen transgen zu verändern.

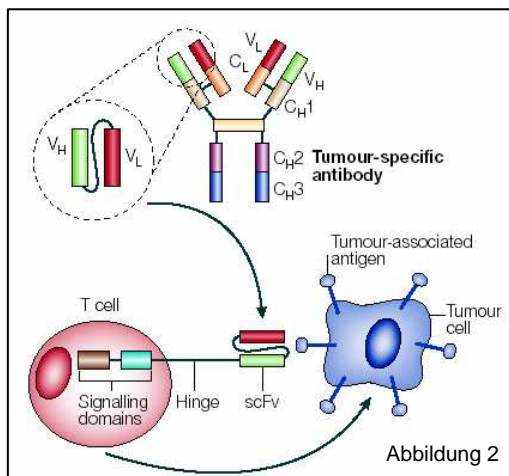
1.1.2.2.1 TCR transgene T Zellen

Verschiedene Arbeitsgruppen isolierten die Gene des T Zell Rezeptors von antigen spezifischen Tumor reaktiven T Zellen. Diese können über retrovirale Vektoren in jegliche T Zellen transduziert werden und verleihen den vorher unspezifischen T Zellen die Eigenschaft von Tumor reaktiven T Zellen. Morgan [Morgan et al. 2006] entwickelte mit seinem Team T Zellen mit dem T Zell Rezeptor unter anderem für MART-1. Dies ist ein tumorassoziiertes Antigen für das Maligne Melanom. Bei 15 Patienten mit fortgeschrittenen Malignen Melanom wurden die genetisch veränderten autologen T Zellen infundiert. Ein Ansprechen auf diese Therapie konnte bei zwei von 15 Patienten beobachtet werden. Bei diesen persistierten die T Zellen und konnten auch nach Monaten noch im peripheren Blut nachgewiesen werden. Die Persistenz der T Zellen geht auch mit einem Tumorregress nach Standard Kriterien (response evaluation criteria in solid tumors –RECIST-) einher. Dies zeigt sich in einem kompletten klinischen Regress nach 21 bzw. 20 Monaten. Nebenwirkungen und Nebeneffekte waren nur sehr gering ausgeprägt und gut tolerierbar. Somit ist die Therapie mit T Zellen, die durch retroviralen Gentransfers eines T Zell Rezeptors spezifisch gemacht wurden, möglich. Interessant ist dies vor allem für Tumorentitäten, bei denen es kaum möglich ist, die sogenannten TILS (siehe oben) zu generieren. Ein großer Nachteil ist, dass die T Zellrezeptoren MHC restringiert sind und man somit T Zell Rezeptoren für sämtliche Haplotypen herstellen muss, um die Therapie einem größeren Patientengut zugänglich zu machen. Ein weiterer Minuspunkt für diese Therapie ist, dass Kohlenhydratstrukturen und Glykolipide nicht über den MHC-TCR Komplex immunogen wirken und somit der T Zell Therapie mit transduzierten anti Tumor T Zellrezeptoren nicht zugänglich sind. Dies sind zwei einschränkende Punkte,

die mit einer anderen Strategie, T Zellen genetisch zu verändern, aufgehoben werden kann.

1.1.2.2 Chimärische Rezeptoren

In den letzten Jahren wurden viele Chimärische Antigen Rezeptoren (CARs) entwickelt und in Phase I und II Studien am Patienten erprobt. Bei dieser Technologie werden die Vorzüge der T Zellen mit denen eines monoklonalen Antikörpers, der Tumor assoziierte Antigene erkennt, kombiniert. Bei diesen sogenannten „T-bodies“ oder auch chimärischen Antigen Rezeptoren (CAR) werden die Gene der VH und VL Region eines monoklonalen Antikörpers als single chain variable Fragments (scFvs) verwendet. Sie dienen der Erkennung von Tumor- Antigenstrukturen. Diese Erkennungsregion ist gekoppelt mit einer oligopeptiden Hinge Region. Dieser Hinge Region folgt eine Transmembrandomäne, die mit einer intrazellulären Signaldomäne verbunden ist [Gross et al.; 1989]. Mit dieser werden bei Erkennen der Antigenstruktur die T Zellen über die Zeta Kette der Signaldomäne aktiviert und das intrazelluläre Signalling in Gang gesetzt. Durch diese Aktivierung wird die genetisch veränderte T Zelle in die Lage versetzt, Tumorzellen zu erkennen und diese zu



töten (siehe Abbildung 2; Sadelain et al. 2003). Zur Herstellung der CAR T Zellen werden den Patienten *mononukleäre Zellen des peripheren Blutes* (PBMCs) entnommen und die T Zellen mit ihren Subpopulationen isoliert. Diese können mit dem chimärischen Rezeptor bestückt werden. Dies geschieht durch Transduktion der T Zellen mit einem

retroviralen Vektor, in den das Genom des T-bodies integriert ist. Nach Transduktion exprimieren diese T Zellen den Rezeptor und sind so antigenspezifisch gegenüber dem Tumor. Vorteil dieser Rezeptoren ist, dass viele monoklonale Antikörper gegen Tumorantigene vorhanden sind, so z.B. CD19, CEA und Her2neu. Ein weiterer Nutzen ist die Erkennung über die scFv

Region. Dies ist unabhängig von der MHC Präsentation und somit sind diese Rezeptoren bei den verschiedensten Haplotypen einzusetzen. Auch Glykolipide und Kohlenhydratantigene als Tumorantigene können nun über chimärische Rezeptoren von T Zellen erkannt und die Tumorzellen somit bekämpft werden [Mezzanzanica et al.; 1998].

Das System bringt aber auch einige Limitierungen mit sich, die Sadelain et al. 2003 beschreibt. Das Antigen muss dem Rezeptor zugänglich sein. Somit kommen nur Tumor Antigene in Frage, die auf der Oberfläche der Tumorzellen exprimiert werden. Es gibt verschiedene Signaldomänen, die bei den CARs verwendet werden. Die gängigste ist die Zeta Kette des T Zell Rezeptors. Experimente haben aber gezeigt, dass die Signalkapazität der Zeta Kette alleine wahrscheinlich nicht ausreicht, da man nach der „Zwei Signal“ Hypothese ein zweites Kostimulatorisches Signal braucht [Hombach et al; 2001]. Die Signalkapazität hängt allerdings nicht nur von der „*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*“ (kurz ITAM) Konfiguration der Signaldomäne ab sondern auch von der Affinität des Antigens zum Rezeptor, dessen Konformation aber auch von der Zelloberflächenstruktur mit den kostimulatorischen Molekülen wie z. B. das B7- CD28. Ein drittes Problem folgt aus der Tatsache, dass die ScFvs Region der chimärischen Rezeptoren aus Mausantikörpern stammt. Diese enthalten konservierte Mausregionen. Somit könnte eine Immunantwort auf diese Regionen in den Rezeptoren ausgelöst werden, die diese Zellen zerstört.

Kowolik et al. und Cooper et al. zeigten, dass die CAR T Zellen in Mäusen in vivo einen Tumorprogress verhindern und sogar zu einem Tumorregress führen können. Dies zeigte sich vor allem bei der zweiten Generation von Chimärischen Rezeptoren, die neben der Zeta Kette als Signalingdomäne ein zweites signalgebendes Element enthalten. Dies ist unter anderem CD28, CD134, ICOS, OX40 und 4.1-BB. Durch diese Elemente konnten eine verlängerte Persistenz der Zellen in vivo, eine erhöhte Zytokinproduktion und letztendlich ein verbessertes Tumoransprechen erreicht werden.

Bis jetzt gab es verschiedene Phase 1 Studien mit chimärischen Rezeptoren mit unterschiedlichen Targets bei soliden und hämatologischen Tumoren.

Verwendet wurden genetisch veränderte T Zellen gegen den Folat Rezeptor beim Ovarialkarzinom [Kershaw et al. 2006], CD20 beim Mantelzellymphom und indolentem NHL [Till et al. 2008], Carboanhydrase IX beim Nierenzellkarzinom [Lamers et al. 2006] sowie GD2, ein Tumortarget für das Neuroblastom [Pule et al. 2008]. In allen Studien gab es keinen großen klinischen Effekt bis auf eine partielle Remission in der Neuroblastom Studie. Das Problem der Maus-Antigenerkennung des Humanen Systems auf die Rezeptoren trat bei den beiden Studien gegen das Ovarialkarzinom und das Nierenzellkarzinom auf. Bei der letztgenannten kam es auch zu Leberkomplikationen mit ansteigenden Cholestaseparametern. Grund hierfür ist das Oberflächenmuster der Hepatozyten, die ebenfalls die Carboanhydrase IX exprimieren. Dies zeigte erneut wie wichtig es ist, das Tumor Target genau zu charakterisieren, um eventuelle Risiken zu minimieren.

Um einen Einstieg in die Welt des Signalings von T Zellen und den chimärischen Rezeptoren zu ermöglichen, möchte ich nun einen kurzen Abschnitt über die T Zell Aktivierung und Signaltransduktion eines Prototyps einer T Zelle geben.

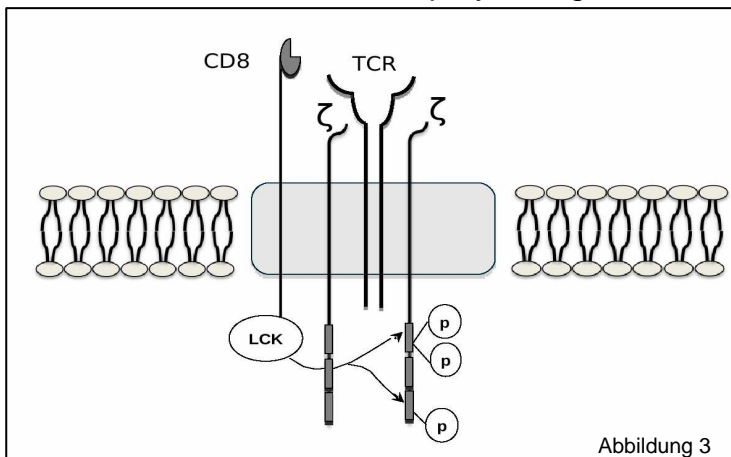
1.2 T Zell Aktivierung und Signaltransduktion

T Zellen werden in der Immunantwort über Antigen beladene MHC Moleküle auf Antigen präsentierenden Zellen aktiviert. Dieser Komplex wird über den T Zellrezeptor erkannt. Der T Zellrezeptor ist ein heterodimeres Molekül aus einer alpha und einer beta Kette (selten aus einer gamma oder delta-Kette). Der variable Teil des Rezeptors erkennt das Antigen, das ihm präsentiert wird. Über den Korezeptor CD4 oder CD8 erkennen CD4 spezifische T Helfer Zellen MHC II Moleküle und CD8 spezifische Zellen Antigene über die MHC I Moleküle. Der zytoplasmatische Teil des T Zell Rezeptors ist die sogenannte Zeta Kette. Sie ist membranständig an das alpha-beta Heterodimer assoziiert und leitet das aktivierende Signal über seine ITAMs weiter an Proteine, die für die Signaltransduktion zuständig sind. Somit ist die Zeta Kette ein sehr wichtiges Bindeglied zwischen dem extrazellulären „Erkennen“ der Zelle und dem intrazellulärem Aktivitätszustand [Janeway, 2002].

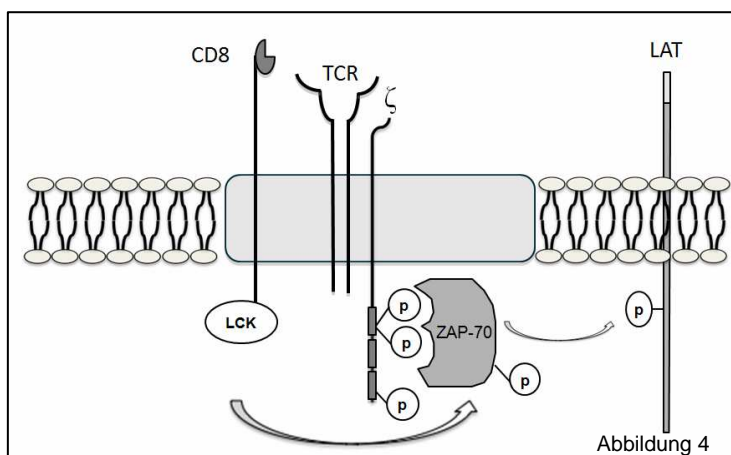
Die intrazellulären Ereignisse einer T Zelle, nach dem Erkennen eines Antigens, kann man in einen Prozess der T Zelle Signaltransduktion und in den Prozess der T Zelle Aktivierung gliedern.

1.2.1 Frühe TCR Signaltransduktion

Die frühe T-Zelle Aktivität als Folge der Antigenerkennung führt zur Ausbildung der sogenannten Immunologischen Synapse zwischen der T Zelle und der Antigen-präsentierenden Zelle. Hierbei werden der TCR mit Korezeptoren und Adhäsionsmolekülen durch das Clustering in der GEM Region (glycosphingolipid-enriched microdomains) in eine bestimmte Region und eine bestimmte Konstellation gebracht, die eine optimale Signalübertragung ermöglichen. Das Clustering führt über den CD3/TCR/Zeta Komplex zu einer Aktivierung intrazellulärer Tyrosinkinasen der Src-Familie. Zu diesen gehören Fyn und Lck. Das letztere ist bei Phosphorylierung des Tyrosins an der Stelle 394 aktiviert und bei Phosphorylierung an der Stelle 505 deaktiviert. Die



Tyrosinkinase phosphorylieren die Tyrosinreste in den ITAMs der zytosolischen Rezeptorketten (siehe Abbildung 3). Hier ist die ITAM Region der Zeta Ketten des TCRs



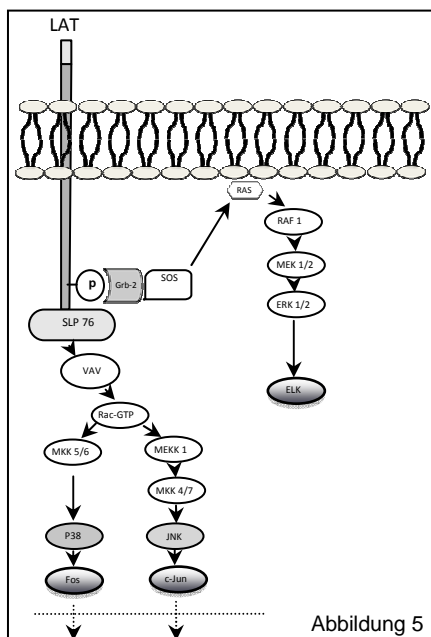
besonders wichtig. An die doppel phosphorylierte Zeta Kette kann sich das Zap-70 anlagern und wird über die Lck phosphoryliert und somit aktiviert. Das aktivierte Zap-70 phosphoryliert nach Rekrutierung von

verschiedenen Adapterproteinen das LAT (linker for the activation of t cells) (siehe Abbildung 4). Dies dient als Bindestelle für SH-2 und SH-3 Domänen über die die Signaltransduktionskaskade initiiert wird. Somit ist LAT ein Bindeglied zwischen der Immunologischen Synapse, den Adapterproteinen und den „Downstream“ Komponenten der Signaltransduktion.

Der Endpunkt der Signaltransduktionskaskade ist die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche in den Zellkern translozieren und verantwortlich sind für die quantitative Transkription verschiedenster Moleküle. Diese führen ab einer gewissen Integrität der Signale zu einer vollen Aktivierung der T Zelle und somit je nach Stadium zu einer Differenzierung, Proliferation und Effektorfunktion.

Nachdem das Signal über den TCR in die Zelle übertragen wurde, wird es über die Signalkaskade geleitet und dabei amplifiziert. Hierbei gibt es verschiedene Wege, die ein Signal gehen kann. Diese Wege sind allerdings nicht als stringent anzusehen. Sie sind die Hauptstraßen der Signaltransduktion. Zwischen ihnen gibt es aber immer wieder Verbindungen und gegenseitige Beeinflussung sowohl in aktivierender als auch in supprimierender Weise. Es werden im Wesentlichen drei Signaltransduktionswege beschrieben.

1.2.2 MAP Kinase Signalweg



Ras und Rac gehören zur Gruppe der kleinen G-Proteine. Diese sind in inaktiver Form an GDP gebunden, werden aber nach dem Austausch mit GTP durch eine Konformationsänderung aktiviert. Dies geschieht bei Ras durch die beiden Moleküle Grb2 und SOS die an LAT binden. Die aktivierte Form Ras-GTP bindet an Raf und führt über Mek-1/2 zur Phosphorylierung und Aktivierung von ERK-1/2.

Ein paralleler MAP Kinase Signalweg führt über das Rac. Hierbei bindet SLP-76 an das

LAT und aktiviert Vav. Dies führt zum Austausch von Rac-GDP zum Rac-GTP. Rac-GTP kann nun wiederum zwei Wege einschlagen. Der eine führt über die MEK Kinase 1 und später die MKK4/7 zur Phosphorylierung und Aktivierung von JNK. Der andere Weg führt ebenfalls über die MEK Kinase 1 nimmt dann aber den Pfad über die MKK 5/6 zur Aktivierung von p38. (Abbildung 5) Über den MAP Kinase Weg kommt es zur Aktivierung von c-Jun und Fos, die wiederum den heterodimeren Transkriptionsfaktorkomplex AP-1 bilden (siehe unten).

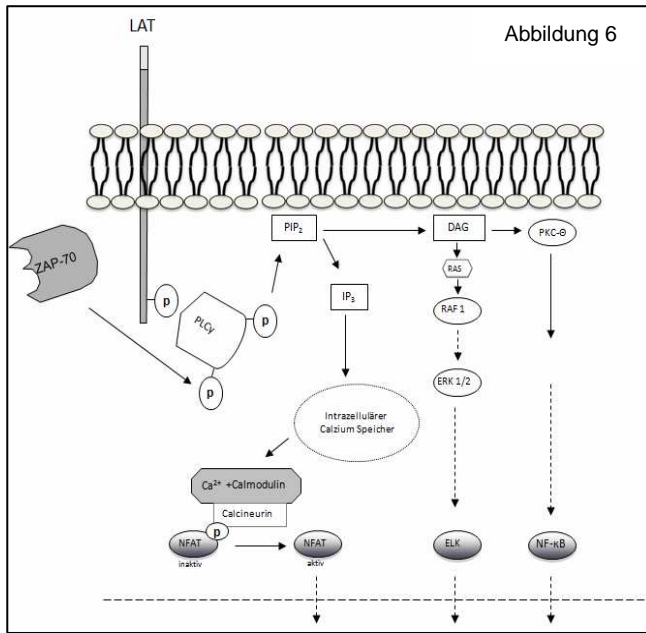
1.2.3 Calcium Signalweg

Neben dem MAP Kinase Signalweg gibt es den Calcium Signalweg. Dieser führt über das PLC γ 1 Molekül, das am LAT bindet. Dort gebunden wird es über das aktivierte ZAP-70 phosphoryliert. PLC γ -1 katalysiert die Hydrolyse von PIP2 in IP3 (Inositol 1,4,5 Trisphosphat) und DAG (Diacylglycerol). IP3 und DAG aktivieren nun verschiedene Wege. Das IP3 führt zur Freisetzung von zytosolischem Calcium, was wiederum auch den Einfluss von extrazellulärem Calcium verstärkt und somit ein Calcium Signal generiert. Das freie Calcium bildet mit dem Calmodulin einen Komplex, der wiederum eine Phosphatase namens Calcineurin aktiviert. Dieser ist wichtig für die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie das NFAT.

1.2.4 DAG und PKC Signalweg

DAG aktiviert mit freiem Calcium die membranassoziierte Proteinkinase C (PKC). In ihrer Isoform PKC θ dient sie zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B über einen trimärischen Proteinkomplex aus MALT1, BCL-10 und CARMA1.

Vereinfacht dargestellt, wird das T-Zellrezeptorsignal über diese Wege Richtung Zellkern geleitet und dabei in komplexen Prozessen der gegenseitigen Beeinflussung moduliert (siehe Abbildung 6). Um nun eine Auswirkung auf die Zelle zu haben, müssen diese Signale in den Zellkern gelangen. Dies geschieht über die Transkriptionsfaktoren, die aktiviert in den Zellkern gelangen.



Der AP1- Komplex ist ein solcher, der aus den MAP Kinase Signalwegen aktiviert wird und vor allem mit NFAT aus dem Calcium Signalweg agiert. Zusammen mit dem NF-κB aus dem PKC Signalweg sind diese Transkriptionsfaktoren z. B. in der Lage, die Genexpression von Zytokinen wie IL-2 zu steuern.

1.3 Kostimulation

Wie in 1.1 beschrieben, sind Tumorantigenspezifische T-Zellen oft nicht in der Lage, Tumorzellen zu eliminieren. Dies liegt nicht nur an der geringen Immunität der Antigene, sondern auch vor allem daran, dass die spezifischen T Zellen in den Status der Anergie übergehen. Anergie beschreibt die Unfähigkeit einer antigenspezifischen T Zelle auf ihr Zielantigen zu reagieren. Dies ist der Fall, wenn der T Zellrezeptor das Antigen in Abwesenheit von kostimulatorischen Molekülen bindet [Appleman et al. 2003]. Eines der wichtigsten und bekanntesten kostimulatorischen Moleküle ist das Homodimer CD28. Als Folge der Bindung des CD28 an seinen Liganden B7.1 und B7.2 erfolgt in Kombination mit dem TCR Signal eine dichtere Formierung der immunologischen Synapse. Das BCL-XI, ein antiapoptotisches Molekül, wird hochreguliert und verhindert den eigens induzierten Zelltod. Es reguliert die Transkription und Stabilität der IL2 mRNA. Dies führt zu einer vermehrten Produktion von IL2. Außerdem ist die Proliferationsrate höher als bei Zellen, die nicht zusätzlich über kostimulatorische Moleküle aktiviert werden [Life et al. 1995; Boise et al. 1995; Ragheb et al. 1999; Lenschow et al. 1996; Topp et al. 2003].

Somit sind die kostimulatorischen Moleküle wie OX-40, 4.1BB etc. mit dem wichtigsten Vertreter, dem CD28, elementar in der T Zelle Aktivierung (siehe „Zwei Signal“ Hypothese oben). Dies hat unter anderem auch Auswirkungen auf die T Zelle Therapien. Hierbei werden T Zellen eingesetzt, die vollständig ausdifferenziert und somit oft CD28 negativ sind. Zu beobachten ist dies einerseits bei der Virustherapie mit T Zellen (CMV Therapie 1.1.1.2) andererseits bei der Tumorthherapie mit CAR T Zellen. Beide Zelltypen haben das Problem, dass sie von vornherein kein CD28 mehr exprimieren oder aber das kostimulatorische Signal nicht erkennen. Somit erlangen diese Zellen nach anfänglicher Aktivierung den Status der Anergie und können somit nicht im Patienten über längere Zeit persistieren. Dies ist aber notwendig für eine Etablierung der Zellen in das vorhandene Immunsystem, um den Tumor zu bekämpfen und ein mögliches Rezidiv zu verhindern.

CAR T Zellen, die mit Rezeptoren der Zeta Kette alleine ausgestattet sind (erste Generation), zeigen eine geringere Effektorfunktion, eine geringere Proliferationsrate und gehen in Anergie (siehe oben). Zweitgeneration Rezeptoren mit kostimulatorischer Komponente können diesen Effekt in vitro ausgleichen. Allerdings zeigt sich kein größerer Benefit in vivo.

Diese Arbeit zeigt, dass sich die Defizienz der CAR T Zellen wie oft vermutet tatsächlich in der unterschiedlichen Signaltransduktion quantifizieren lässt.

1.4 Ziel der Arbeit

Aufgrund der hämatoonkologischen Ausrichtung unseres Labores, sind Tumortargets für B Zelle Erkrankungen leukämischer oder auch lymphatischer Art von besonderem Interesse. Ein solches Target ist das CD19. Dieser Cluster of Differentiation ist sowohl auf allen differenzierten B Zellen, follikular dendritischen Zellen als auch auf allen Vorläuferzellen der B Zelle Linie zu finden. Andere Zellen und Gewebe und im Besonderen die hämatopoetischen Stammzellen der Vorläuferzellen der B Zelle Linie weisen keine CD19, Expression auf [Knapp et. al. 1989]. Auch gibt es keine lösliche Form des CD19 was eine unkontrollierte Reaktion im Körper auslösen könnte. Somit ist dies ein relativ spezifisches Target für das follikuläre Lymphom, die Chronisch

lymphatische Leukämie und die Akute lymphatische Leukämie. Viele Arbeitsgruppen haben chimärische antiCD19 Rezeptoren konstruiert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zellen spezifisch B Zellen und speziell die CD19 positive Tumorzelllinie Raji lysieren. In vivo konnte im Mausmodell ein 50% längeres Überleben bei SCID-Beige Mäusen, die mit Raji Tumorzellen infiziert wurden gezeigt werden [Brentjens et al. 2003]. In den folgenden klinischen Studien konnten die verheißungsvollen Ergebnisse der Tierexperimente allerdings nicht bestätigt werden. Grund hierfür ist unter anderem die fehlende Persistenz dieser Zellen im Patienten. Eine Erklärung hierfür ist die unzureichende Aktivierung der T Zellen über die chimärischen Rezeptoren. Es gibt viele Hinweise in vitro und vivo für die Defizienz von T Zellen, die über chimärische Rezeptoren der ersten Generation aktiviert werden [Hombach et al. 2001, Kowolik et al. 2006]. Es zeigten sich Unterschiede in der Expression von NFκB, dem Transduktionsfaktor, der maßgeblich über den CD28-Proteinkinase C Signalweg aktiviert wird. Chimärische Rezeptoren, die nur über die Zeta Kette verfügen (erste Generation), exprimieren weniger NFκB als die der zweiten Generation mit integriertem CD28 Signal [Loskog et al. 2006]. Auch ist eine verringerte IL2 Produktion bei den T Zellen zu beobachten die mit CARs der ersten Generation transduziert sind [Hombach et al. 2001]. Der Marker CD107a wird transient auf die Zelloberflächen der CD8 T Zellen exprimiert nachdem sie antigenspezifisch aktiviert wurden. Er ist ein Hinweis auf die Degranulation und das Ausschütten von Perforinen und Granzymen, die in der Lage sind, Tumorzellen zu lysieren. Dieser Marker ist bei antigenspezifischer Aktivierung von EBV T Zelllinien durch autologe LCLs höher als bei T Zellen, die über den chimärischen Rezeptor aktiviert werden. Des Weiteren zeigt sich eine wesentlich höhere Proliferations- und Expansionsrate bei der Aktivierung der virusspezifischen T Zellen im Vergleich zu T Zellen die über den chimärischen Rezeptor aktiviert wurden [Altvater et al. 2006]. Dies alles zeigt, dass die Aktivierung über den chimärischen Rezeptor nicht ausreicht um T Zellen in vollem Umfang in Ihre Effektorfunktion zu überführen. Somit sind CAR T Zellen auch nicht in der Lage im Patienten zu persistieren und sich in das Immunsystem zu integrieren.

In dieser Arbeit soll der Unterschied zwischen einer antigenspezifisch aktivierten T Zelle und der Aktivierung über einen chimärischen Rezeptor der ersten und zweiten Generation auf verschiedenen Ebenen dargestellt werden. Eine Grundvoraussetzung für die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Zelltypen ist die Anzahl der chimärischen Rezeptoren auf den Zellen nachdem diese transduziert wurden. Dies soll mit der Quantibrite Technologie quantifiziert werden. Den Einzelzellaktivierungsstatus wird anhand der Interferon Gamma Produktion mit einer Intrazellulären Zytokinfärbung überprüft. Die Effektorfunktion der T Zellen wird über einen Standard Chrom freisetzung-Assay (Zytotoxassay) gemessen. Auf Grundlage dieses Assays wird ein FACS basierter Zytotoxassay etabliert, der es erlaubt, eine Aussage über die Zeitkinetik zu treffen. Die unterschiedliche Proliferationskapazität der verschiedenen T Zelllinien wird über einen CFSE Versuch ermittelt. Um den Aktivierungsstatus der T Zellen abzuschätzen, wird die CD25 Expression durch FACS analysiert. Nach den Analysen auf Effektorebene erfolgt die intrazelluläre Analyse des Phosphorylierungsstatus der T Zellen und wird korreliert mit der Effektorfunktion. Dieses System wird mit der CBA Technik erstmals mit primär humanen T Zellen etabliert und durchgeführt. Somit soll ein Einblick in die unterschiedliche Aktivierungsweise und deren Auswirkung auf die jeweiligen Zellen gegeben werden. Verglichen werden in dieser Arbeit die physiologische Aktivierung einer T Zelle über ihren T Zellrezeptor mit der Aktivierung von T Zellen über einen chimärischen Rezeptor. Ziel dieser Arbeit ist diese Unterschiede auf oben beschriebener Weise herauszuarbeiten.

1.5 Zellsystem

Um einen Überblick über die verschiedenen verwendeten T Zell Linien und ihre Targetzellen zu bekommen, möchte ich diese hier in einem Schaubild schematisch darstellen, und im Text genauer charakterisieren (Abbildung 7) .

Targetzellen:

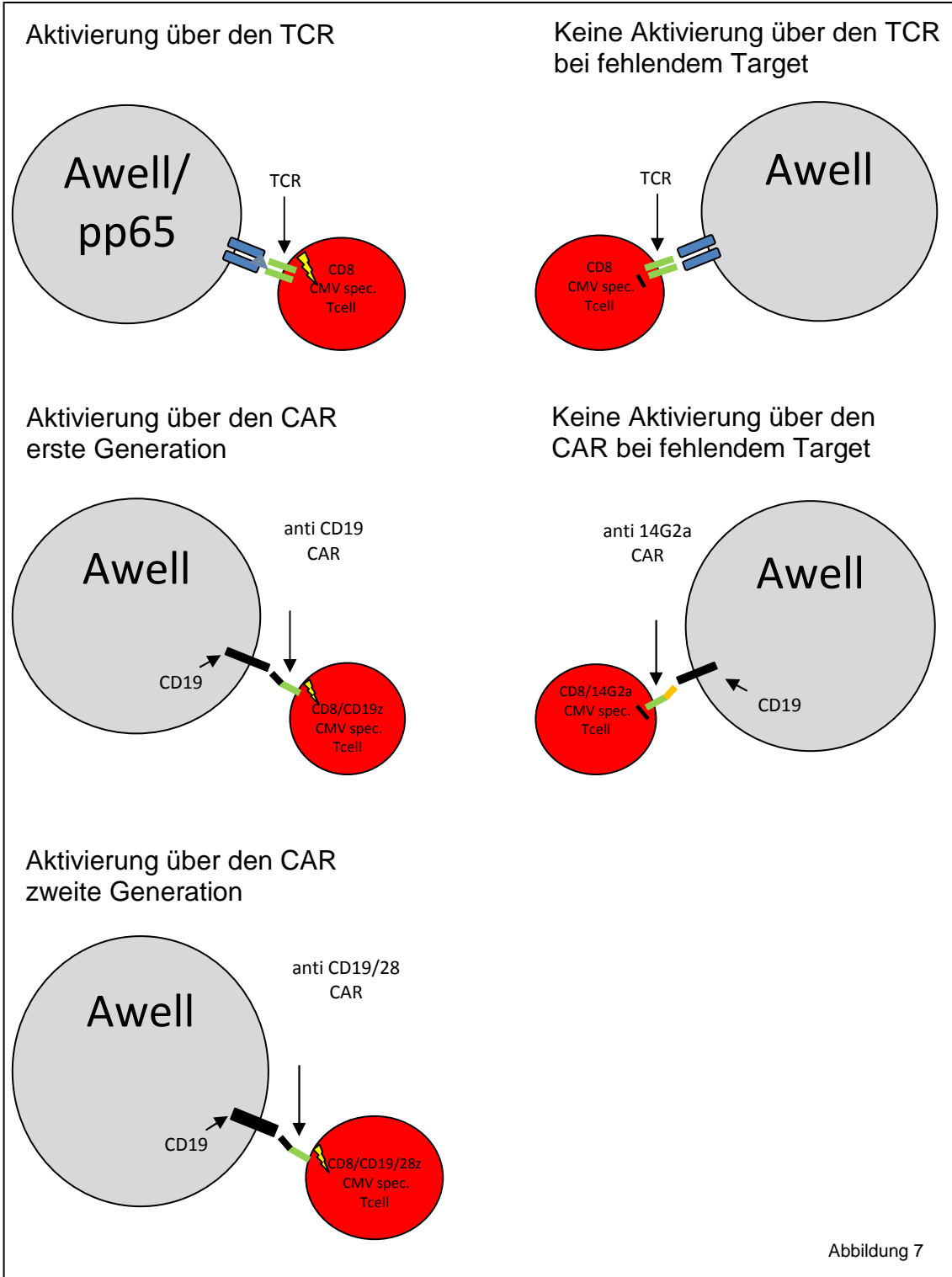
Als Target Zellen verwenden wir die LCL Linie Awell –grau- (siehe 1.12). Diese eignet sich aufgrund ihrer stabilen Expression des Oberflächenmarkers CD19

als Targetzelle für die Zellen, die mit chimärischen Rezeptoren antiCD19z und antiCD19/28z transduziert wurden. Als Targetzelle für die CMV spezifischen T Zellen dient die von unserem Labor hergestellte Zelllinie Awellpp65, die aufgrund einer retroviralen Transduktion mit dem Vektor 95.1 das Epitop des CMV Virus pp65 stabil auf ihren MHC I Molekülen exprimiert (grau links oben).

Effektorzellen:

Als Effektorzellen dienen CMV spezifische T Zellen, die aus gesunden Spendern via Interferon Gamma Secretion Assay isoliert wurden. Diese polyklonale Population von CMV spezifischen T Zellen mit dem Target pp65 stellt die Ausgangszellen für die genetische Transduktion mit den chimärischen Rezeptoren. Somit sind diese transduzierten Zellen Tochterzellen der ursprünglich isolierten CMV spezifischen T Zellen. Diese CMV spezifischen T Zellen werden aktiviert über die Targetzellen Awellpp65. Werden Awells ohne das Antigen pp65 verwendet werden, die CMV Zellen nicht aktiviert.

Transduziert wurden chimärische Rezeptoren der ersten Generation. Als Kontrolle dient der Rezeptor 14.G2a mit dem Target GD2 (2. Reihe rechts). Diese Zelllinie wird durch die LCL Linie Awell bei fehlendem Antigen nicht aktiviert. T Zellen, die mit dem chimärischen Rezeptor der ersten Generation CD19z transduziert wurden (2. Reihe links), werden durch die Targetzellen Awell aktiviert. Ebenso werden die Zelllinien die mit der zweiten Generation der CARs transduziert wurden (3. Reihe links) durch die gleiche Targetzelllinie Awell aktiviert. Somit haben wir ein Zellsystem, das von T Zell Seite von der gleichen Anfangspopulation ausgeht und somit absolut vergleichbar ist. Die Targetzellen sind ebenfalls als im Labor etablierte Zelllinie vergleichbar.



2 Material

Folgende Materialien wurden im Rahmen meiner Doktorarbeit verwendet und hier in alphabetischer Reihenfolge dokumentiert. Die ursprüngliche Auflistung wurde von Diekmann J. zusammengestellt. Diese wurde überarbeitet und erweitert.

2.1 Geräte

Betastrahlungszähler <i>MicroBeta</i>	Perkin Elmer, Rodgau Jügesheim
Bestrahlungsgerät Faxitron Modell: CP-160	Faxitron, USA
<i>FACSCalibur</i> inklusive <i>CellQuestPro</i> Software	BD Biosciences, Heidelberg
<i>FACSCANTO II</i> inklusive <i>DIVA</i> Software	BD Biosciences, Heidelberg
Mikroskop <i>Axiovert 4 OCFL</i>	Carl Zeiss, Göttingen
Sterilwerkbank <i>HERASafe KS12/18</i>	Kendro, Osterode
Zellinkubator <i>HERACell 240</i>	Kendro, Osterode
Zellkulturzentrifuge <i>Multifuge 3 S-R</i>	Kendro, Osterode

Desweiteren wurden verwendet: Magnetrührer, Präzisionswagen, Magneten zur Zellseparation (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach), Pipetierhilfe, Vortexer, Wasserbad, diverse Zentrifugen.

2.2 Chemikalien

Standardchemikalien wurden von Sigma (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe), Applichem (Darmstadt) und Merck (Darmstadt) bezogen. Lösungen die mit Wasser angesetzt werden müssen wurden mit voll entsalztem Wasser, gefiltert durch eine Milipore-Anlage angesetzt.

2.3 Biochemikalien

Brefeldin	Sigma, Taufkirchen
BSA	Sigma, Taufkirchen
Calcium Chlorid	Sigma, Taufkirchen
[⁵¹ Cr] Na ₂ CrO ₄	HartmannAnalytic, Braunschweig
DMSO	Sigma, Taufkirchen
FACS-Permabilization. Solution	BD-Biosciences, Heidelberg
Ficoll/Paque	Biochrome, Berlin
Formalin Solution 10%	Sigma, Taufkirchen
Ionomycin	Sigma, Taufkirchen
Natrium-Heparin	Braun, Melsungen
PMA	Roche, Mannheim
Polybrene (Hexadimethrin Bromid)	Sigma, Taufkirchen
Phosphatase Inhibitorcocktail 1 und 2	Sigma, Taufkirchen
Puromycin	Applichem, Darmstadt
Triton X100	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Sigma, Taufkirchen

2.4 Verbrauchsmaterial

Plastikwaren für die Zellkultur wurden von Greiner BIO-ONE (Frickenhausen), Eppendorf (Hamburg), Nunc (Wiesbaden,) und Corning (Bodenheim) bezogen.

Acrylküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
ELISA Platten	Corning, Bodenheim
Magnetische Säulen (LS-columns)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Qiaschredder	Qiagen, Hilden
Sterilfilter (0,2 µm, 0,45 µm)	Sarstedt, Nümbrecht
Szintillator-Platten (LumaPlate 96)	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim

2.5 Kits

CBA Master Buffer Signaling Kit	BD Biosciences, Heidelberg
CBA Flex Sets	BD Biosciences, Heidelberg
OptiEIA Reagent Set B	BD Biosciences, Heidelberg
IL2 ELISA Set	BD Biosciences, Heidelberg
IFN- γ Secretion Assay	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit	Invitrogen, Carlsbad (USA)

2.6 Zellkulturmedien und Zusätze

D-PBS (w/o Ca, Mg)	PAA, Pasching
DMEM (high glucose +GlutaMAX+Sodium Pyruvat)	PAA, Pasching
EDTA-Lösung (0,5 M)	BioWhittaker, Rockland, USA
FCS	Biochrome, Berlin
IMDM (+Glutamin+HEPES)	Cambrex, Verviers, Belgien
Penicillin/Streptomycin (100X)	Gibco, Karlsruhe
RPMI 1640 (+GlutaMAX)	Gibco, Karlsruhe
Trypanblau	Gibco, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (0,05%)	Gibco, Karlsruhe

2.7 Zytokine

rhIL-2 (Proleukin)	Chiron, Ratingen
--------------------	------------------

2.8 Antikörper

Typ	Markierung	Anwendung	Hersteller
mouse anti-human CD3	PE, PerCP	FACS	BD Biosciences, Heidelberg
mouse anti-human CD3 Orthoclone OKT 3		Zellkultur	Janssen-Cilag, Neuss
mouse anti-human CD4	FITC, PE, PerCP	FACS	BD Biosciences, Heidelberg
mouse anti-human CD8	FITC, PE, PerCP, Horizon	FACS	BD Biosciences, Heidelberg
mouse anti-human CD19	FITC, PE	FACS	BD Biosciences, Heidelberg

Typ	Markierung	Anwendung	Hersteller
mouse anti-human CD25	FITC,PE,APC, PerCP Cy5	FACS	Pharmingen, Heidelberg
mouse anti-human CD28		Zellkultur	BD Biosciences, Heidelberg
mouse anti-human CD28	PE	FACS	BD Biosciences, Heidelberg
mouse anti-human CD49d		Zellkultur	Immunotech, Marseilles, France
mouse anti-human CD56	PE	FACS	BD Biosciences, Heidelberg
mouse anti-human IFN- γ	FITC,PE	FACS	BD Biosciences, Heidelberg
mouse anti-human IFN- γ (capture)		ELISA	Perbio, Bonn
mouse anti-human IFN- γ (detection)	Biotin	ELISA	Perbio, Bonn
mouse anti-human IgG1	FITC, PE, PerCP	FACS	BD Biosciences, Heidelberg
Goat anti-mouse IgG, (Fab`2)	Biotin –SP conjugated	FACS	Jackson, West Baltimore Pike
Streptavidin -PE	PE	FACS	BD Biosciences, Heidelberg
mouse anti-human NGFR	PE	FACS	Pharmingen, Heidelberg
mouse anti-PE MicroBeads	Magnetpartikel	Zellkultur	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
CD3/CD28 Dynabeads	Magnetpartikel	Zellkultur	Invitrogen, Karlsruhe

2.9 Peptide

PepMix (15/11) HCMV pp65 495-504	JPT, Berlin
NLVPMVATV HLA-A*0201	Bereitgestellt von Dr. Stevanovic - Tübingen

2.10 Pentamere

HLA-A*0201 NLVPMVATV	Proimmune Ltd., Oxford, UK
----------------------	----------------------------

2.11 Retrovirale Vektoren

Der Retrovirale Vektor pLZNGFR-PGK (95.1) wurde von Stanley Ridell (FHCRG, Seattle, WA, USA) zur Verfügung gestellt. Der ursprünglichen pLZ Vektor wurde mit der Sequenz des nerve growth factor receptor (NGFR) erweitert. Dieser wird durch den 5´LTR exprimiert. Hierdurch ist es möglich die mit dem Vektor transduzierte Zellen anhand des Markers NGFR zu detektieren und über magnetische Beads zu selektionieren.

2.12 Zelllinien

Für diese Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

- B-Lymphoblastoide Zelllinie (Awell)
EBV-transformiert, positiv für MHC-Typus HLA-A*0201, bereitgestellt durch Prof. Dr. Stefan Stevanovic, Institute for Cell Biology, Department of Immunology, Tuebingen, Germany
Verwendetes Medium: RPMI + 10% FCS + 100 U/ml Pen/Strep
- B-Lymphoblastoide Zelllinie (Awellpp65)

EBV transformierte Ziellinie transduziert mit dem retroviralen Vektor 95.1. Aufgrund dessen präsentiert diese Zelllinie das Antigen pp65 auf dem MHC Komplexen. Sie dient als APC für unsere CMV spezifischen T-Zellen.

Verwendetes Medium: RPMI + 10% FCS + 100 U/ml Pen/Strep

- Phoenix-GALV

Verpackungszelllinie zur Herstellung von retroviralem Überstand. Ursprünglich stammen diese von 293T-Zellen (human embryonic kidney) ab, wurden stabil transfiziert, mit den *gag*- und *pol*-Genen des Moloney Murine Leukemia Virus (MMULV) und dem *env*-Gen des Gibbon Ape Leukemia Virus (GALV) ausgestattet.

Verwendetes Medium: DMEM + 10% FCS + 100 U/ml Pen/Strep

- 293T- Zellen (human embryonic kidney) (ATCC Nr: 635)

Verpackungszelllinie zur Generierung von retroviralem Überstand.

- T2-Zellen (174 x CEM.T2) (ATCC Nr.: CRL-1992)

MHC-I defiziente B-, T-LCL Hybridzelllinie

Verwendetes Medium: RPMI + 10% FCS + 100 U/ml Pen/Strep

- K562 lymphoblast cell line (ATCC Nr.: CCL-243)

CD 19 negativ. Kontrollzelllinie für den FACS Kill Assay

3 Methoden

Im Folgende möchte ich die Methoden beschreiben die von mir während der Doktorarbeit angewandt wurden. Die Standard Zellkulturtechniken sind u.a. auch bei Diekmann et. al 2008 beschrieben. Alle erweiterten Methoden und neu etablierte Methoden werden hier zum ersten Mal beschrieben (Flow Kill, CFSE Proliferationsassay, CBA Signaling Technik, Quantibrite).

3.1 Zellbiologische Arbeitstechniken

3.1.1 Kultivierung von Zelllinien

3.1.1.1 Allgemeine Kultivierung und Passage

Die verwendeten Zelllinien wurden regelmäßig mittels eines PCR-ELISA Tests (Mycoplasma PCR ELISA, Roche, Mannheim) auf Mycoplasmenkontamination geprüft. Sämtliche Arbeiten in der Zellkultur wurden unter Sterilsicherheitswerkbänken (Heraeus) ausgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit.

Zum Passagieren von Kulturen wurden adhärent wachsende Zellen mit D-PBS überschichtet, anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde mit Vollmedium verdünnt und abzentrifugiert (200 g, 7 min, RT) und anschließend mit PBS gewaschen. Zum zählen wurden die Zellen in Vollmedium aufgenommen. Die Lebendzellzahlen wurden mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.1.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Einfriermedium: Medium + 10%FCS + 20% DMSO

Zum Konservieren von Zellen wurden diese, wie oben beschrieben geerntet, gezählt und in 500 µl Vollmedium aufgenommen. Im Kryoröhrchen wurde der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 das Einfriermedium zugegeben und in eine 5°C, mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox (Nalgene) gegeben und bei -80°C weggefroren. Die Röhrchen wurden für eine Langzeitlagerung in den Flüssigstickstofftank überführt.

Zur in Kulturnahme wurden die Zellen nach der Entnahme aus dem Stickstofftank im Wasserbad auf 37°C erwärmt, in Vollmedium gegeben und zentrifugiert.

3.1.2 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC)

Mit der Methode des Ficoll-Dichtegradienten konnte aus heparinisierem Vollblut humane PBMC gewonnen werden. Das Blut von HLA-typisierten und HCMV-getesteten gesunden Spendern wurde 1:1 mit PBS verdünnt. 15ml Ficoll wurden in einem 50 ml Röhrchen vorgelegt. Hierauf wurden 30 ml verdünntes Blut geschichtet und 20 min bei 700×g und RT zentrifugiert. Der Interphasenring wurde im Anschluss vorsichtig abgenommen, mit PBS/EDTA(2 mM) verdünnt und abzentrifugiert. Hierauf wurde mit PBS gewaschen.

3.1.3 Gewinnung von Humanserum

Frisches Vollblut (ohne Heparin) wurde über Transfusionsbeutel abgenommen und in 50 ml Röhrchen überführt. Diese wurden bei RT 3-4 h stehen gelassen und anschließend 30 min bei 1.700×g abzentrifugiert. Das Serum wurde abgenommen und von mindestens 10 Spendern gepoolt. Dieses gewonnene Serum wurde im Wasserbad bei 56°C für 30 min hitzeinaktiviert. Im Anschluss wurde das Serum in üblichen Mengen aliquotiert und bei -20 Grad weggefroren.

3.1.4 Immunselektion mittels MACS MicroBeads

MACS-Puffer: D-PBS + 0,5% BSA + 2 mM EDTA

Zur Selektion der transduzierten T Zellen wurden MicroBeads verwendet (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach). Die vorher mit Antikörper gefärbten Zellen wurden anti-PE MicroBeads oder AntiBiotin Beads um die so markierten Zellen zu isolieren. Die Isolierung wurde nach dem Miltenyi Biotec Protokoll durchgeführt. Zur Elution der mit Beads gekoppelten Zellen wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und zweimal mit 5 ml MACS Puffer gespült.

3.1.5 Kultivierung humaner T Zellen

3.1.5.1 Isolierung von virus-spezifischen T Zellen

CTL-Medium: RPMI 1640 + 10% Humanserum + 100 U/ml PenStrep

MACS-Puffer: D-PBS + 0,5% BSA + 2 mM EDTA

Der IFN- γ Secretion Assay Kit (Miltenyi Biotec) wurde zur Anreicherung von virus-spezifischen T Zellen verwendet. Hier wurden $1-2 \times 10^8$ PBMC von CMV-seropositiven Donoren eingesetzt. Die PBMCs wurden nach dem Ficoll in Medium aufgenommen und auf eine Konzentration von 1×10^7 /ml eingestellt. Hinzugegeben wurde der PepMix(15/11)pp65 von JPT, Berlin in einer Konzentration von 1 μ g/ml. Die Zellen wurden auf eine 6-well Platte verteilt (3-4 ml pro well) und 16 h bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Hiernach wurden die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen, resuspendiert und mit einem bispezifischen Antikörper für CD45 und IFN- γ versetzt. Der Ansatz wurde für 5min im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für die Sekretionsphase auf 1×10^6 Zellen/ml mit Medium verdünnt und bei 37°C im Brutschrank für 45min inkubiert. Während dieser Zeit ist eine ständige Rotation mit dem MACS-Rotator gegeben. Hierauf wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit einem PE konjugierten anti-IFN- γ Antikörper inkubiert (15 min, 4°C). Zur Zellsuspension wurden nach erneutem Waschen anti-PE Microbeads (10min 4°C) hinzugefügt. Um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen wurde erneut gewaschen und mit 2ml MACS Puffer resuspendiert. Die nun markierten Zellen werden auf eine LS-Säule gegeben und nach Anleitung 3 mal mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Um die markierten Zellen zu eluieren wurde die Säule aus dem Magneten genommen und mit 5 ml MACS Puffer gespült.

3.1.5.2 Kultivierung von virus-spezifischen T Zellen

Die über die Säule eluierten Zellen aus 3.1.5.1 wurden in 24-well Platten kultiviert. Hier wurden $1-2 \times 10^5$ Zellen pro well in 2 ml CTL-Medium mit 50 IU/ml IL-2 inkubiert. Zudem wurden Feeder-Zellen (Negativfraktion 30Gy bestrahlt) $2,5 \times 10^7$ Zellen pro well eingesetzt. Die Vermehrung der Zellen erfolgte über 10-12 Tage mit Zugabe von Zytokinen alle 3 Tage (50 IU/ml IL-2).

3.1.5.3 Expansion von T Zellen mit dem „Rapid Expansion Protocol“ (REP)

Die Expansion von T Zelllinien erfolgte nach dem Protokoll von Riddell und Greenberg [Ridell and Greenberg, 1990]. Hierbei wurden 1×10^5 T Zellen, 5×10^6 T2-Zellen (bestrahlt mit 60 Gy) und $2,5 \times 10^7$ allogene PBMC (bestrahlt mit 30 Gy) in CTL-Medium aufgenommen und mit 30 ng/ml anti-CD3 Antikörper (OKT 3) inkubiert. Die Zellen wurden in einer T-25 Zellkulturflasche im Brutschrank inkubiert. An Tag 1, 4, 7 der Kultur wurde zum Medium das Zytokin IL-2 (50IU) zugegeben. Ab Tag 10 wurde je nach CD 25 Expression die IL2 Menge auf 10 IU/ml reduziert. An Tag 4 wurden die Zellen zusätzlich gewaschen und in frischem Medium aufgenommen, um den anti-CD3 Antikörper aus der Kultur zu entfernen. Bei starkem Wachstum der T Zellen wurden die Kulturen mit zusätzlichem frischem Medium versetzt. An Tag 11-14 wurden die Zellen geerntet und gezählt.

3.1.6 Zellanalyse

3.1.6.1 Durchflusszytometrie (FACS)

FACS-Puffer: D-PBS + 10% FCS + 0,1% NaN_3

Mit der Durchflusszytometrie wurden die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften von Lymphozyten untersucht. Mit Hilfe eines FACS-Gerätes und monoklonaler Antikörper können im FSC und SSC Größe, Granularität gemessen werden. Die Expression und Dichte von bis zu acht verschiedene Proteinen auf und in einer Zelle kann über diese Methode gemessen werden.

FACS-Färbungen:

$0,2-1 \times 10^6$ Zellen wurden pro FACS Färbung verwendet und im FACS-Puffer gewaschen (150xg, 5 min, RT). Der Überstand wurde nach dem zentrifugieren abgeschüttet, die Zellen im Rücklauf resuspendiert, mit Fluorochrom-konjugierter mAk versetzt und 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden danach erneut in in FACS-Puffer gewaschen. Die so präparierten Zellen wurden in einem FACSCalibur mit CellQuestPro Software (BD Bioscience), zum späteren Zeitpunkt mit dem FACsCanto II und DIVA Software analysiert.

3.1.6.2 Tetramer FACS-Analyse

Zur Überprüfung der Reinheit von Epitop-spezifischen T Zelllinien wurden diese mit Hilfe von MHC-Peptid Multimeren untersucht. Dazu wurden $0,2-1 \times 10^6$ Zellen pro Färbung verwendet, mit FACS-Puffer gewaschen. Hinzugegeben wurden 5 µl Pentamer. Dies wurde für 15 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Zentrifugation mit kaltem Puffer wurden weitere fluoreszenzmarkierte Antikörper hinzugefügt und für 15 min im Kühlschrank belassen. Nach dieser Färbung wurde noch zweimal mit FACS Puffer gewaschen und zur Analyse in 200µl FACS Puffer aufgenommen.

3.1.6.3 Intrazelluläre IFN-γ Färbung (ICC)

ICC-Puffer: D-PBS + 0,5% BSA + 0,1% NaN_3

In der Durchflußzytometrie können auch intrazelluläre Proteine von Zellen bestimmt werden. Im ICC werden T Zellen mit dem gewünschten Antigen angeregt und die intrazellulär gebildeten Zytokine wie IFN-γ durch einen fluoreszenzmarkierten Antikörper angefärbt. Folgendes Protokoll soll hier beschrieben werden.

In einem 15 ml Röhrchen wurden 1×10^6 T Zellen im Verhältnis 1:1 mit Zielzellen in 500 µl RPMI-Medium (+ 10% FCS) aufgenommen. Für die Kostimulation wurden 0,5 µg/ml anti-CD49d und anti-CD28 Antikörper zugesetzt und 6 h im Brutschrank inkubiert. Nach einer Stunde wurden 10 µg/ml Brefeldin A als Golgistopp der Zellsuspension zugesetzt. Als Positivkontrolle verwendeten wir 1 µg/ml Ionomycin und 0,5 µg/ml PMA. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit ICC-Puffer gewaschen und anschließend in 500 µl FACS Perm2 (BD Biosciences) aufgenommen und bei Raumtemperatur für 12 min permeabilisiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen mit mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen IFN-γ und Oberflächenantigene gelabelt (39 min RT). Vor der Analyse wurden die Zellen erneut gewaschen und in FACS Puffer aufgenommen.

3.1.6.4 Zytotoxizitätstest (Chromium-release-assay)

Zur Quantifizierung der zytotoxischen Aktivität von spezifischen T Zellen wurden 5×10^5 Target-Zellen in 200 μ l Medium (RPMI + 10% FCS) in Suspension genommen und mit 20 μ l [^{51}Cr] Na_2CrO_4 (100 μCi) für 1 h bei 37°C radioaktiv markiert. Nach zweimaligem Waschen wurden in einer 96-well Platte 5000 Zellen/well pipettiert und in unterschiedlichen Verhältnissen mit Effektorzellen versetzt (Endvolumen 200 μ l). Alle Ansätze wurden aufgrund statistischer Zwecke in Triplikaten angesetzt. Für die Spontanfreisetzung wurden allein Target-Zellen eingesetzt, für die maximale Freisetzung wurden die Target-Zellen mit 1% Triton X-100 lysiert. Die Zellen wurden für 4 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 30 μ l Überstand entweder auf eine Szintillator-Platte oder in 150 μ l Szintillator-Cocktail pipettiert und in einem beta-counter (Perkin Elmer) gemessen. Die Berechnung der spezifischen Zytotoxizität erfolgte nach folgender Formel:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{cpm Probe} - \text{cpm Spontanfreisetzung}}{\text{cpm Maximumfreisetzung} - \text{cpm Spontanfreisetzung}} \times 100$$

3.1.6.5 JD Flow Kill Assay

Um beim Zytotoxizitätsassay mehrerer Zeitpunkte zu messen wurde eine weitere Methode die Zytotoxizität von T Zellen (Effektorzellen) darzustellen entwickelt. Hierbei wurden die Targetzellen (Awell/pp65) und Kontrollzellen (K562) mit dem Farbstoff CFSE (Carboxyfluoreszein-Succinimidyl) beladen. Bis zu 1×10^7 der Target- und Kontrollzellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden diese mit 500 μ l einer 54 μM CFSE/PBS Lösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde 500 μ l Humanserum für eine Minute hinzugegeben, um die Reaktion abzustoppen. Im Anschluss daran wurden die Zellen zweimal mit RPMI-10% FCS gewaschen. Somit kann die Targetpopulation im FL-1 Kanal durchflusszytometrisch von den Effektorzellen getrennt werden. Im Versuch werden 4×10^6 Effektorzellen und 2×10^6 Targetzellen pro Ansatz in 4ml CTL im 50ml Röhrchen bei 37 Grad im Brutschrank inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 h, 2,5 h, 5 h, 10h wird nach dem

Resuspendieren ein Teil der Zellen für die durchflusszytometrische Untersuchung abgenommen. Zur Diskriminierung der Populationen werden die T Zellen mit CD8 Horizon gefärbt. Die Targetzellen sind CFSE positiv und werden nach Elimination durch die Effektorzellen nicht mehr detektiert. Die Elimination der Targetzellen relativ gesehen zur Elimination der Kontrollzellen ergibt den Wert für spezifische Zytotoxizität.

Anhand des Verhältnisses von Effektor zu Targetzellen kann man über den Zeitverlauf eine Aussage über das Lyseverhalten der T Zellen treffen.

3.1.6.6 CFSE Proliferationsassay

Die Färbung von Zellen mit CFSE ermöglicht die Analyse von proliferierenden Zellen. Die Farbstoffmenge pro Zelle wird zur Hälfte auf die Tochterzellen weitergegeben und somit das Ausgangs-CFSE Signal abgeschwächt. Diese Abschwächung ist durchflusszytometrisch zu erfassen und kann später mit Hilfe von Auswertungsprogrammen bestimmten Tochtergenerationen zugeordnet werden. Gefärbt wurden die T Zellen wie unter 3.1.6.6 beschrieben. Pro Ansatz wurden 2×10^6 T Zellen und 1×10^6 Targetzellen verwendet. Die Kokulturen wurden in 48 well-Platten mit 1,5ml CTL und 10IU IL2 inkubiert. Die Proliferation wurde nach 0 Tagen, 2, 3, 4, 5, 6 und 7 Tagen gemessen. Als Kontrolle verwendeten wir T Zellen ohne Targetzellen. Für die untransduzierten CMV spezifischen T Zellen diente die LCL Zelllinie Awell als Kontrolle. Für die CD19z transduzierten T Zellen diente als Kontrolle die Effektorzelllinie 14.G2a.

3.1.6.7 CBA Signaling Technik

Verwendet wurde das CBA Signaling Master Buffer Kit mit entsprechenden CBA flex sets von BD Biosciences (Heidelberg).

Nach Stimulation der antigenspezifischen T Zellen ($3,3 \times 10^6$ Zellen) mit den entsprechenden Targetzellen ($1,65 \times 10^6$ Zellen) wurde nach 0, 5, 10, 20, 45, 60, 90, 120 und 180 Minuten die intrazelluläre Phosphorylierung durch Zugabe von 4°C kaltem PBS gestoppt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C vollzogen. Die Zellen wurden in der kalten Zentrifuge abzentrifugiert, der

Überstand abgesaugt und mit der entsprechenden Menge an Lysepuffer (Kit) lysiert. Dieser Lysepuffer wurde mit Phosphatase Inhibitorcocktail 1 und 2 von Sigma (Taufkirchen) nach Herstellerangaben versetzt. Nach dem fünfminütigen Erhitzen im Wasserbad bei 99°C, was zur endgültigen Denaturierung führt, wurde das Zelllysate auf die Qiaprep Spin Säulen überführt und für 2 Minuten bei 16000 g zentrifugiert und anschließend bei -80°C für nicht mehr als 2 Wochen gelagert. Die Analyse wurde nach dem Protokoll von BD Biosciences durchgeführt, im FACSCanto II gemessen und mit der FCAP Software ausgewertet.

3.1.6.8 Quantibrite

0.5x10⁶ der zu bestimmenden Zellen wurden in ein FACS Röhrchen überführt und mit FACS Puffer gewaschen. Die Zellen wurden zur CAR Oberflächenbestimmung mit dem FabAcris PE Antikörper (25µl) für 25 min bei 4° Celsius gefärbt. Die Zellen für die Bestimmung der CMV T Zell Rezeptordichte wurden mit NLV-PE Pentamer über 20 min bei 37° gefärbt. Nach den Färbungen wurden die Zellen zweimal mit FACS Puffer gewaschen und anschließend per Durchflusszytometrie gemessen. Die Beadmessungen und anschließende Rezeptordichtebestimmung wurden nach den Anleitungen von BD durchgeführt.

3.1.7 Produktion von retroviralem Überstand

3.1.7.1 Virusproduktion mit FLYRD Zellen

Stabil transfizierte FLYRD Zellen (bereitgestellt von C. Rössig, Münster) wurden zur Virusproduktion in IMDM-Medium ausgesät. Ca. 6x10⁶ Zellen wurden in einer 75 cm² Zellkulturflasche 18-24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Bei einer Konfluenz von 80-90% wurde das Medium abgesaugt und 7,5 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben und für weitere 24 h bei 32°C und 5% CO₂ Virus produziert. Der Überstand wurde dann abgenommen, über einen 0,45 µm Filter von Zellpartikeln befreit und frisch verwendet, oder bei -20°C gelagert.

3.1.7.2 Virusproduktion mit transient transfizierten 293T Zellen

Pro Zellkulturschale (100mm x 20mm, Corning) wurden $2,5 \times 10^6$ 293T Zellen in 5ml IMDM 10% FCS ausplattiert und für ca. 5 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zur Transfektion wurde pro Zellkulturschale in einem Reaktionsgefäß ein Transfektionsmix angesetzt. Dazu wurden 470µl serumfreies DMEM mit 30µl Genejuice (Novagen) versetzt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Dann wurden 3,75µg pSFG CD19-CD28ξ, 3,75µg pRDF (env) und 2,5µg pEQPAM (gag, pol) (bereitgestellt von Martin Pule) hinzugegeben, gut gemischt und nach einer Inkubation von 15 Minuten bei RT wurde dieser Ansatz tropfenweise auf die zu ca. 80% konfluenten 293 T Zellen gegeben. Nach dem Schwenken der Zellkulturschale wurde diese bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach 48h erfolgte die Ernte des Virusüberstandes. Nach der Filtration durch einen 0,45µm Filter wurde der Überstand auf Reaktionsgefäße verteilt und in einer gekühlten Tischzentrifuge für mindestens 2h bei 16.000g um Faktor 3-6 aufkonzentriert.

3.1.8 Retrovirale Transduktion

3.1.8.1 Retrovirale Transduktion mit Retronectin

Für die Transduktion wurde eine 24well Platte mit 7µg/ml Retronectin in PBS beschichtet, über Nacht bei 4°C inkubiert und nach dem Entfernen der Retronectinlösung mit PBS 2% BSA für 30 Minuten bei RT blockiert. Nach dem Waschen mit PBS wurde 1ml des aufkonzentrierten Virusüberstandes in jedes well gegeben.

Die zu transduzierenden Zellen wurden an Tag 2 des REP- Protokolls (3.1.5.3) geerntet (Tag 0: Aussäen von 600.000Z), auf drei Zellkulturröhrchen verteilt und zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in je 1ml CTL aufgenommen und zu den Virusüberständen auf der retronectinbeschichteten Platte gegeben. Nach Zugabe von 50IU IL-2 wurde die Platte bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 48 h wurden die Zellen aus 3 24wells gepoolt, zentrifugiert, in 18ml frischem CTL aufgenommen und mit 50IU IL-2 versetzt. Die Aufreinigung der Zellen erfolgte an Tag 9 oder 10 des REPs.

3.1.8.2 Retrovirale Transduktion „spin infection“

Die retrovirale Transduktion von Zellen wurde nach der Methode der sog. 'spin infection' durchgeführt. Es wurden $0,5-2 \times 10^6$ Zellen pro ml an Virusüberstand (siehe 3.1.7.1) aufgenommen, mit 8 µg/ml Polybrene versetzt und in eine 6-well Platte transferiert. Die Infektion erfolgte durch Zentrifugation bei 700xg und 32°C für 1 Stunde. Die Zellen wurden für weitere 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, danach gewaschen und in das Medium aufgenommen. Nach einigen Tagen Kultivierung wurde die Transduktionseffizienz durch FACS-Analyse festgestellt. Die so hergestellte Zellpopulation wurde mit Microbeads selektioniert und über das Rapid Expansion Protokoll hochgezogen und in Stickstoff weggefroren.

3.1.9 Aufreinigung der transduzierten T Zellen

Die Aufreinigung der transduzierten T Zellen erfolgte an Tag 7 nach Transduktion. Hierzu wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen in 80µl PBS+0,2% BSA pro 1×10^6 Zellen aufgenommen und 10µl der 1:10 Verdünnung des Antikörpers Goat anti mouse Fab, Jackson pro 1×10^6 Zellen zugegeben. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS+0,5% BSA, 2mM EDTA (MACS Puffer) gewaschen. Die Aufnahme der Zellen erfolgte in 80µl kaltem MACS Puffer à 1×10^7 Zellen. Auf 1×10^7 Zellen wurden 20µl Anti-Biotin Microbeads (Miltenyi) gegeben und 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit kaltem MACS Puffer wurden die Zellen im entsprechenden Volumen (bis 1×10^8 Zellen in 500µl) aufgenommen und auf die vorbereitete Säule gegeben. Nach dem Waschen und Eluieren der Positivfraktion nach Protokoll (Miltenyi) wurde die Zellzahl bestimmt, die Zellen in einem adäquaten Volumen an CTL-Medium aufgenommen und 50 IU IL-2 hinzugegeben. Die Zellen wurden für weitere 4 bis 5 Tage expandiert und anschließend eingefroren oder erneut mit dem REP-Protokoll (siehe 3.1.5.3) expandiert.

3.2 Mathematische Analysen

Die Auswertung der Phosphoproteindaten wurde freundlicherweise von Dr. Dr. Markus Dittrich aus der Biomathematik (Lehrstuhl Prof. Dandekar) übernommen. Hierzu wurden die Daten auf den 180 Minuten Wert normiert. Die Maxima wurden aus den beiden höchsten Phosphorylierungsevents der Zeitreihe entnommen und gemittelt. Die Signifikanz wurde über den Wilcoxon rank sum test ermittelt.

Alle weiteren statistischen Analysen wurden mittels des Programms Graphpad prism durchgeführt. Zur Signifikanzberechnung wurde der Students t test benutzt.

4. Ergebnisse

4.1 Generierung von CMV spezifischen T Zell Linien

Nach dem klinischen Protokoll von Rauser et al. 2004 wurden CMV spezifische T Zellen generiert. Dies geschieht über die Aufreinigung von virusspezifischen T Zellen mit dem IFN- γ Secretion Assay (siehe 3.1.5.1).

Zunächst wurden die Vorläuferfrequenzen für das CMV spezifische Epitop NLVPMVATV bei Spendern über ein MHC-Klasse I Pentamer bestimmt. Nach Auswahl geeigneter Spender mit entsprechenden Vorläuferfrequenzen (Daten nicht gezeigt) konnten so aus den PBMCs der Donoren nach Peptidstimulation und anschließender Isolation NLV positive T Zellen generiert werden. Diese wurden mit dem sogenannten Rapid Expansion Protokoll (siehe 3.1.5.3) expandiert. Es wurden Zelllinien von 3 unterschiedlichen Spendern generiert.

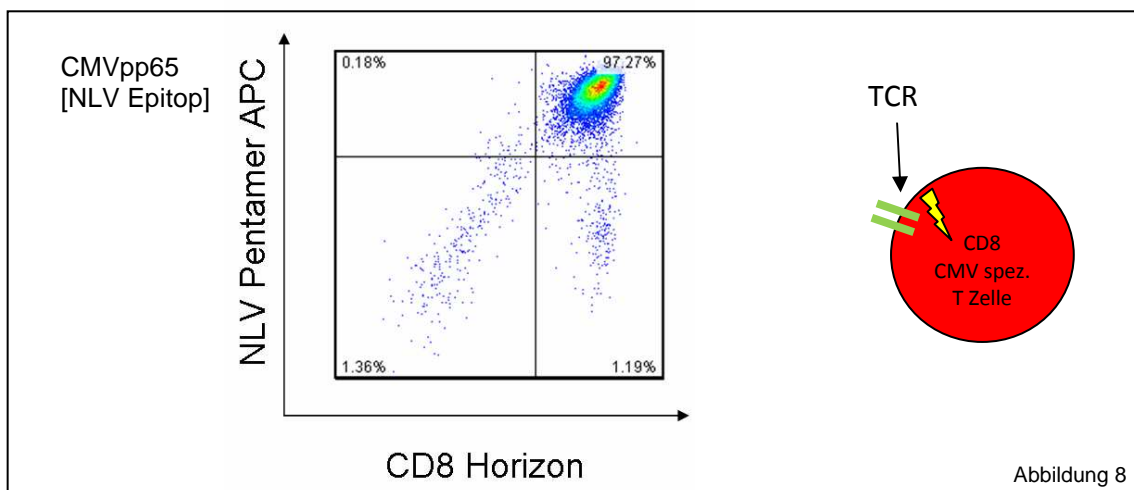


Abbildung 8: FACS Analyse von CMV spezifischen T Zellen nach Peptidstimulation, Isolation und Expansion an Tag 14. Gezeigt ist eine repräsentative Zelllinie. Rechts daneben: Schematische Darstellung einer CMV spezifischen CD8 T Zelle.

4.2 Herstellen der T Zelllinien mit chimärischen Rezeptoren

4.2.1 CARs der ersten Generation

Mit den Verpackungszelllinien FLYRD 14G2a und FLYRD CD19z (zur Verfügung gestellt von C. Rössig, Münster) wurde nach dem Protokoll für Virusproduktion (siehe 3.1.7.1), retroviraler Überstand produziert. Dieser enthält die DNA mit dem jeweiligen chimärischen Rezeptor. Durch die Methode der

„spin infection“ (siehe 3.1.8.2) wurde die DNA des chimärischen Rezeptors in das Genom der T Zellen integriert und somit der Rezeptor von den CMV virusspezifischen T-Zellen konstant exprimiert. Die transduzierten Zellen konnten mit MACS BEADS über einen FabIgG2 Antikörper, der an den Fc Teil des chimärischen Rezeptors bindet, selektioniert und somit aufgereinigt werden. Diese Zellen reagieren sowohl auf das Antigen CMVpp65 als auch auf den Liganden des jeweiligen chimärischen Rezeptors. Der Rezeptor anti14G2a ist spezifisch für das GD2, ein Tumorepitop von Neuroendokrinen Tumoren. Dieser Rezeptor dient als Kontrolle für die antiCD19 chimärischen Rezeptoren, der die CAR T Zellen antigenspezifisch auf den B Zell Marker CD19 reagieren lässt. Durch die Aufreinigung der transduzierten Zellen über MACS BEADS konnte eine Reinheit von über 90% erreicht werden (siehe Abbildung 9).

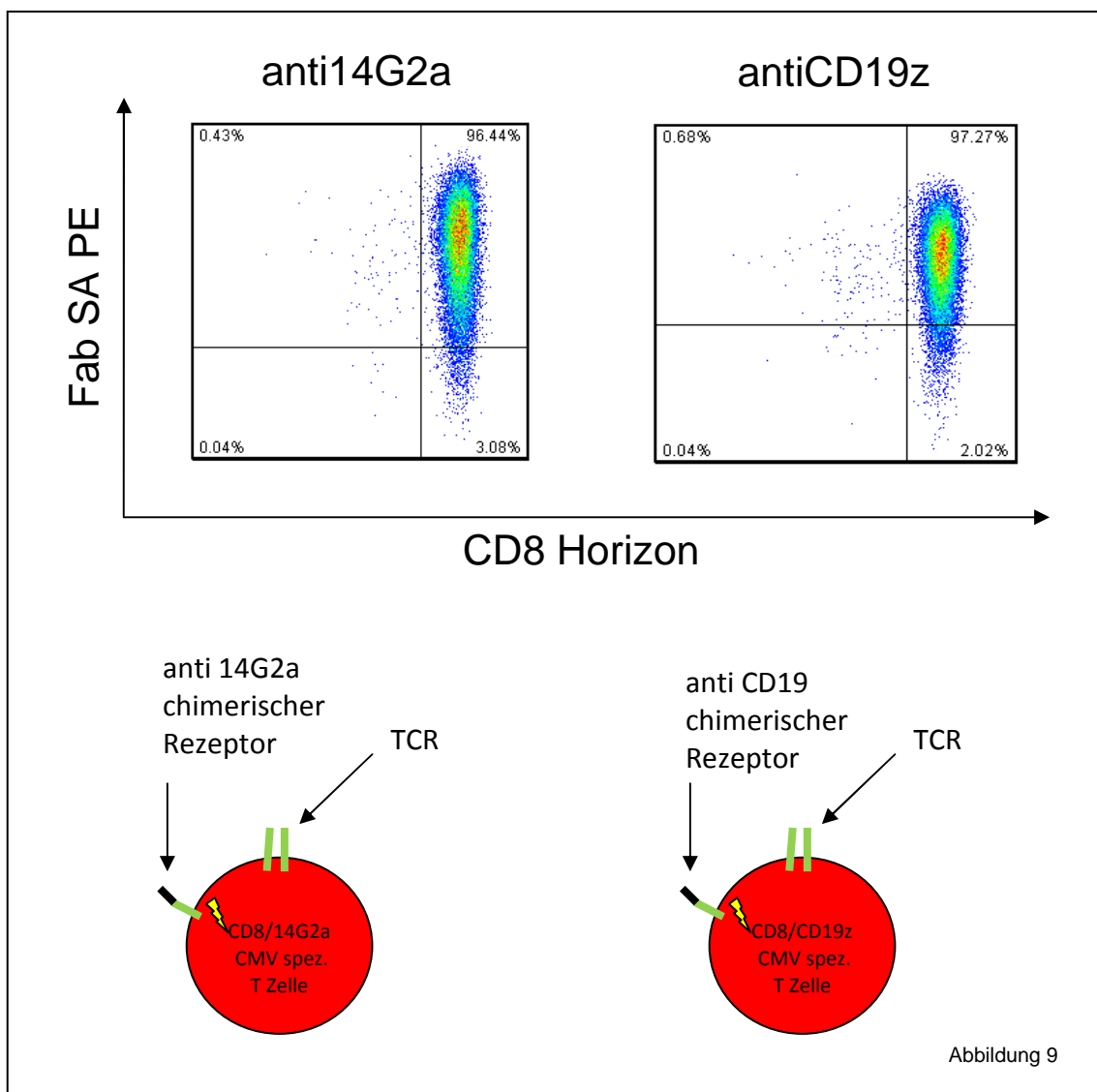


Abbildung 9:

FACS Analyse des Expressionsmusters der CMV spezifischen Zelllinie mit dem anti14G2a Rezeptor (Kontrolle) und dem antiCD19z Rezeptor. Gefärbt wurde mit dem Primärantikörper Fab IgG2 und dem Sekundärantikörper SA-PE.

Schematische Darstellung der jeweiligen CMV spezifischen Zelllinie mit den Rezeptoren der ersten Generation.

4.2.2 CARS der zweiten Generation

Der Virusüberstand des Vektors CD19/28z (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von C. Rössig) wurde mittels transientscher Infektion mit 293T Zellen produziert (siehe 3.1.7.2). Um eine initial höhere Transduktionseffizienz in den CMV spezifischen T Zellen zu erreichen, wurde die Methode der Retronektintransduktion verwendet (siehe 3.1.8.1). Nach Transduktion der T Zellen mit den Zweitgenerationrezeptoren wurden diese wie oben beschrieben über den FabIgG2 Antikörper und MACS Beads selektioniert. Somit wurde auch hier ebenfalls eine sehr hohe Reinheit der positiv transduzierten Zellen von über 90% erreicht (siehe Abbildung 10).

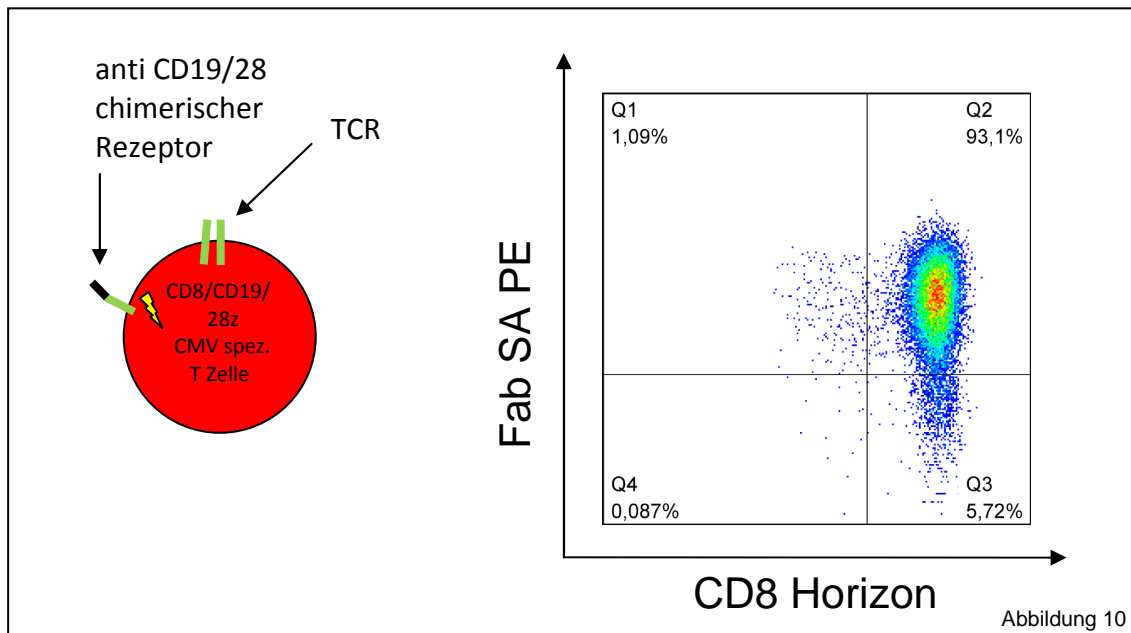


Abbildung 10: FACS Analyse des Expressionsmusters der CMV spezifischen Zelllinie mit dem CD19/28z Rezeptor der zweiten Generation. Gefärbt wurde mit dem Primärantikörper Fab IgG2 und dem Sekundärantikörper SA-PE.

Schematische Darstellung der CMV spezifischen Zelllinie mit dem Rezeptor der zweiten Generation.

4.3 Analyse der Rezeptordichte

Um die verschiedenen T Zelllinien miteinander vergleichen zu können, ist es wichtig, die Dichte derjenigen Rezeptoren zu bestimmen, die das spätere Signal in der Zelle auslösen. Bei den genetisch veränderten Zelllinien wurden die Expressionsdichten der chimärischen Rezeptoren mit einem IgG2 Antikörper von FabAcris bestimmt. Das Expressionsverhalten wird in einem Histogramm dargestellt und mit der Quantibritetechnologie (siehe 3.1.6.9) verglichen. Die Ratio der Bindestelle der Antikörper zu PE Molekülen ist bei dem antiIgG Antikörper der Firma Acris Antibodies (Herford) 1:1. Die beiden verwendeten T Zelllinien haben vergleichbare Rezeptordichten. Es besteht hier kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$). Wir konnten eine Rezeptordichte von 16500 Rezeptoren pro Zelle quantifizieren. Dies bietet die Grundlage dafür, die untersuchten Zelllinien in ihrer Funktion und ihrer Signalkapazität zu vergleichen. Gemeinsamkeiten und Unterschiede sind somit nicht auf unterschiedliche Signalstärken zurückzuführen, die sich aus der Anzahl der aktivierten Rezeptoren begründen könnten.

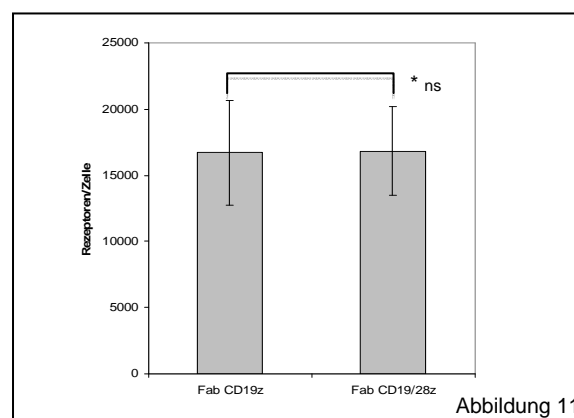


Abbildung 11:

Bestimmung der Rezeptordichte der chimärischen Rezeptoren der ersten und zweiten Generation auf den Zelllinien CD19z und CD19/28z. Gefärbt wurde mit 25µl des IgG2 Antikörpers FabAcris. Kein signifikanter Unterschied in der Expression der beiden chimärischen Rezeptoren. n=7 p value: not significant.

4.4 Funktionelle Analysen

4.4.1 Vergleich der Lysierungseffektivität zwischen CMV spezifischen CD8 T Zellen, den CD19z- und CD19/28z-transduzierten T Zellen

4.4.1.1 Lysierungseffektivität der CMV spezifischen T Zellen transduziert mit dem Erstgenerationrezeptor CD19z.

Die Lysierungseffektivität der T Zellen, die über den TCR aktiviert werden (CMV spezifischen T Zellen), wird mit T Zellen, die über den chimärischen Rezeptor aktiviert werden (CAR T Zellen CD19z, CAR T Zellen CD19/28z), anhand von zwei verschiedenen Methoden verglichen.

Hierbei verwendeten wir initial einen standardisierten Cr51 Freisetzung-Assay (siehe 3.1.6.4).

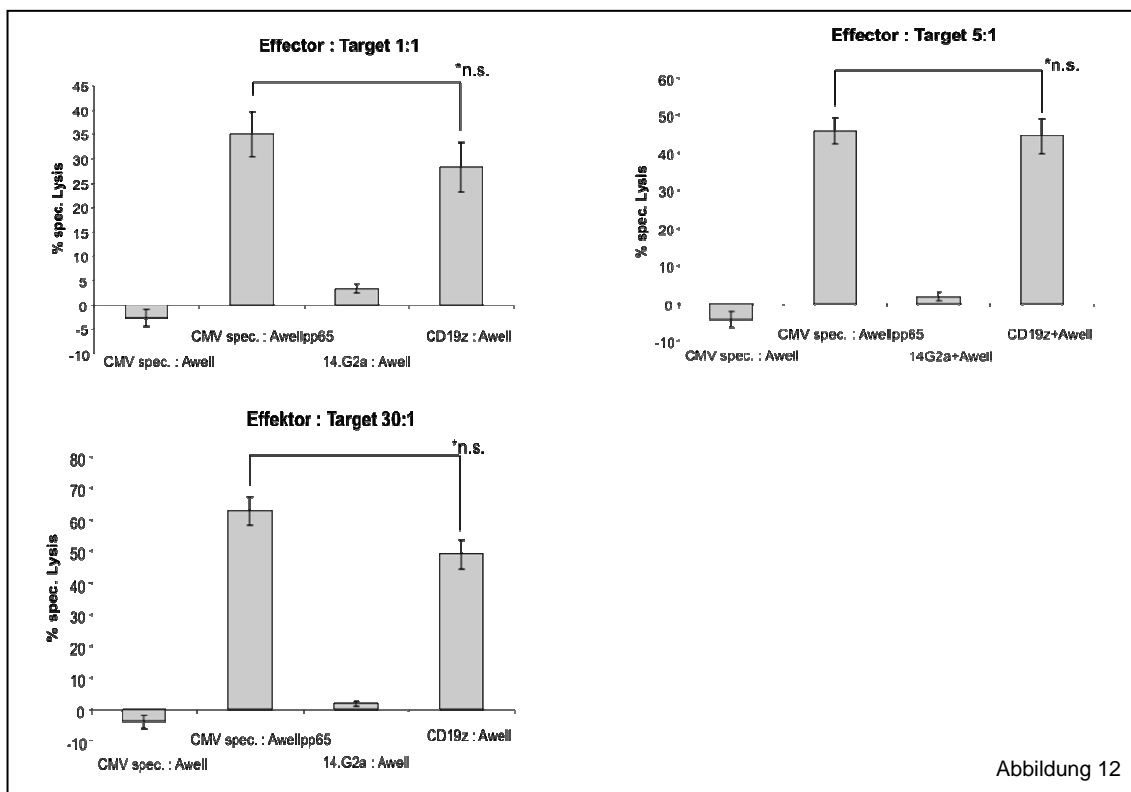


Abbildung 12

Abbildung 12: Chrom Release Assay mit verschiedenen Effektor-zu-Target Verhältnissen. (Effektor : Target 1:1; 5:1; 30:1). Dargestellt ist die spezifische Lyse der CMV spezifischen T Zellen mit Ihrem Target Awellpp65 und der Kontrolle Awell. Ebenso die spezifische Lyse der CAR T Zellen CD19z mit ihrem Target CD19 auf der Zelllinie Awell. Als Kontrolle dienen hier die CAR T Zellen 14.G2a. Der Mittelwert +-SEM ergibt sich aus 7 Experimenten von 2 Donoren (n.s.)

Wie in Abbildung 12 zu sehen, konnte kein signifikanter Unterschied in der spezifischen Lyse zwischen den CMV spez. T Zellen und den CAR CD19z T Zellen festgestellt werden. Beide lysieren bis zu 60% der Target Zellen in gleicher Spezifität innerhalb von 4 Stunden.

Um die Dynamik der Lyse herauszustellen, wurde ein FACS basierter Kill Assay (siehe 3.1.6.5) entwickelt. Dies ermöglicht, die Lysefunktion der beiden T Zellpopulation genauer zu charakterisieren. Beide Assays sind parallel etabliert und von den Ergebnissen im direkten Vergleich kongruent.

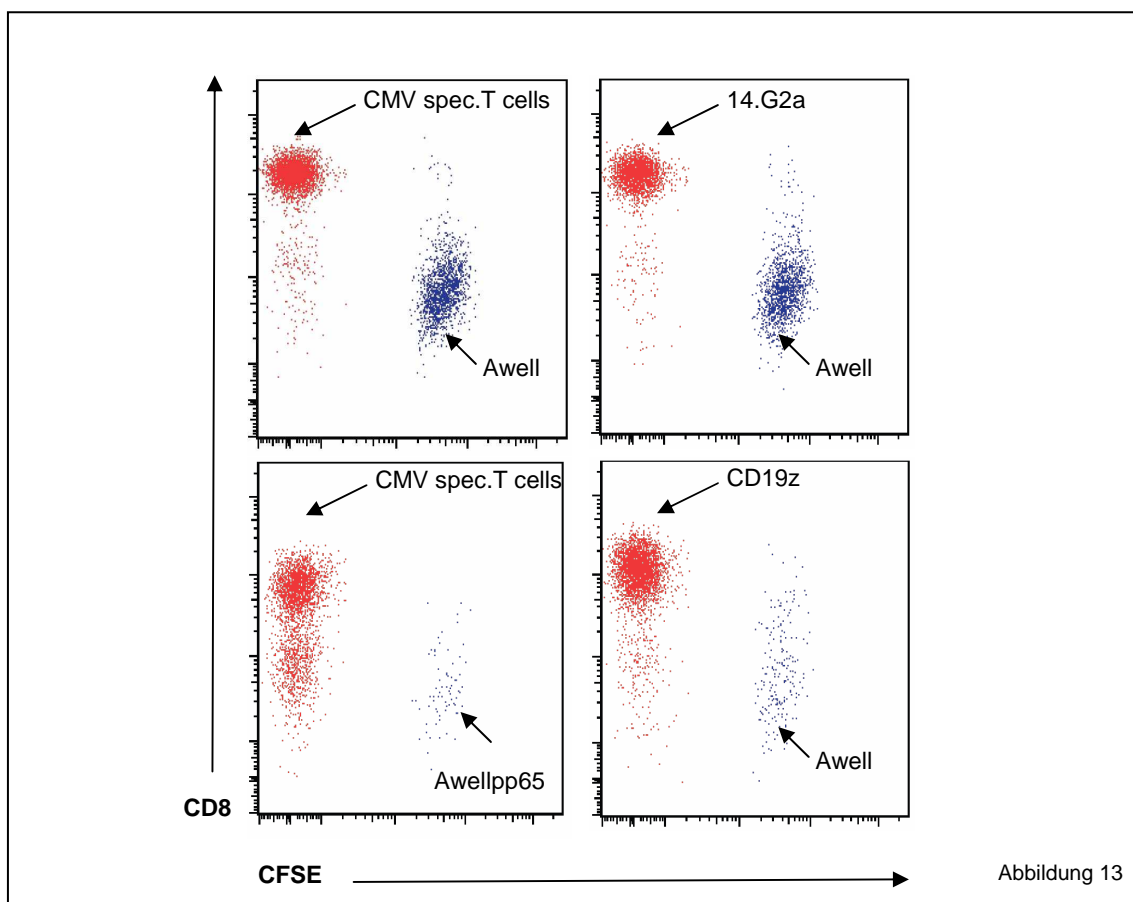


Abbildung 13: FACS Analyse nach 15h Kokultur der Effektorzellen (CMV spez. T Zellen und CD19z,) und Kontrollzellen 14.G2a mit den Targetzellen (Awell, Awellpp65). Targetzellen wurden zur Zelldiskriminierung mit CFSE gefärbt. Die T Zellpopulation wurde mit CD8 Horizon (BD) markiert.

Die Targetzellen Awellpp65 werden von den Effektorzellen CMV spez T Zellen nach 15h Kokultur lysiert (Abbildung 4.6 links unten). Ebenso werden die Targetzellen Awell von den Effektor-CAR CD19z T Zellen lysiert (Abbildung 4.6 rechts unten). Die jeweiligen Kontrollen befinden sich direkt darüber.

4.4.1.2 Lysierungseffektivitätsvergleich der CMV spezifischen T Zellen transduziert mit Erstgenerationrezeptor CD19z im Vergleich zur Zweitgenerationrezeptor CD19/28z

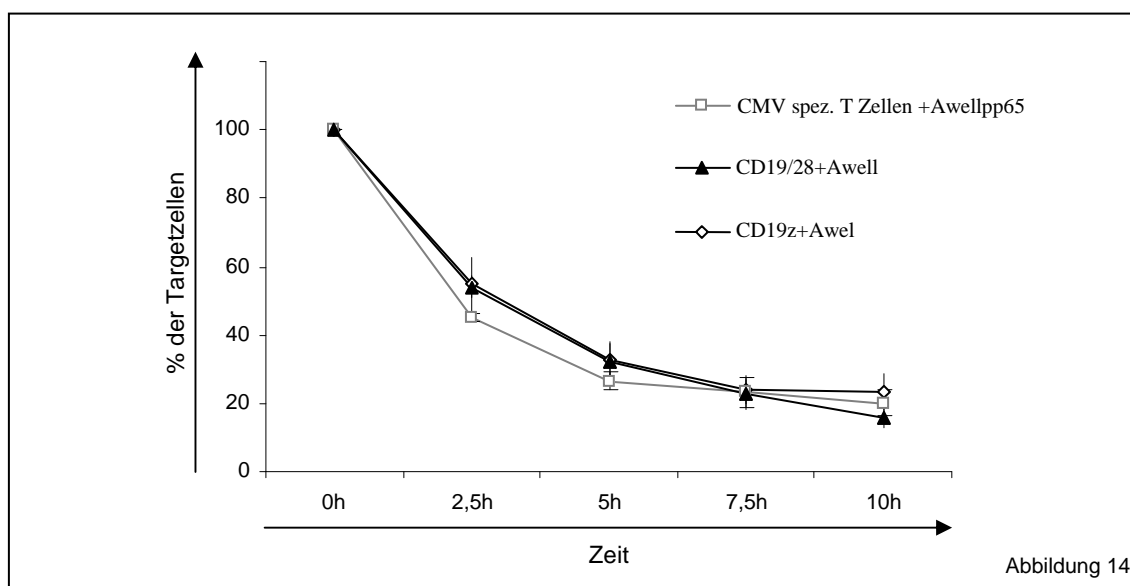


Abbildung 14: Analyse der Prozent Targetzellen nach Kokultur mit den Effektorzellen (vgl. Cr51 Assay) im Zeitverlauf von 0h, 2,5h, 5h, 7,5h, 10h. Verglichen wird das Lyseverhalten der Effektorzellen zu ihren jeweiligen Targetzellen Awell und Awellpp65. Awellpp65 wurden kokultiviert mit CMV spez. T Zellen. Awell wurden kokultiviert mit CAR CD19z und CD19/28z T Zellen. Die Effektor-zu-Target-Ratio ist 2:1. Methode des Flow Kills (siehe 3.1.6.5). Mittelwerte und Standardabweichung von 5 unabhängigen Versuchen mit 3 unterschiedlichen Spendern.

In der zeitlichen Dynamik konnte herausgestellt werden, dass kein signifikanter Unterschied zwischen dem Lyseverhalten der CMV spez. T Zellen, der CAR CD19z und der CAR CD19/28z T Zellen besteht. Dies bestätigt die Fähigkeit von chimärischen T Zellen der ersten und zweiten Generation, ihre Zielzellen

mit gleicher Dynamik zerstören zu können wie physiologisch aktivierte CMV spezifische T Zellen. Hier besteht ebenfalls keine Signifikanz in der Lysierungsaktivität zwischen der Aktivierung über den TCR, dem Erstgenerationrezeptor und Zweitgenerationrezeptor. Alle Zellen lysieren ihr Target zu 40% nach 2,5h.

4.4.2 Vergleich der Proliferationskapazität

Ein Problem, das die Therapie mit chimären Rezeptoren limitiert, ist die ungenügende Proliferation der CAR T Zellen (siehe Einleitung) in vivo und in vitro.

Die Proliferationseigenschaften der genetisch veränderten T Zellen wurde mit einem CFSE basierten Proliferationsversuch gezeigt (siehe Abbildung 15).

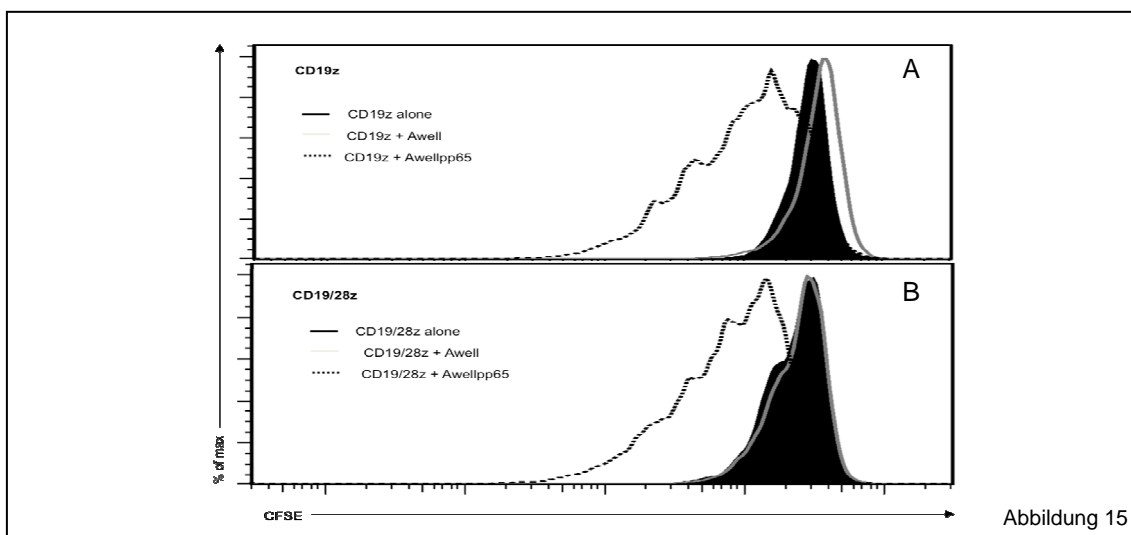


Abbildung 15: CFSE Proliferationsversuch (siehe 3.1.6.7). Gezeigt ist die Abnahme der CFSE Intensität auf Grund der Verteilung des Farbstoffes auf die Tochterzellen.

A: CAR antiCD19z T Zellen: schwarz: T Zellen kultiviert ohne Targetzellen als Kontrolle. Grau: T Zellen kultiviert mit den Targetzellen Awell. Schwarz gestrichelt: T Zellen kultiviert mit der Zelllinie Awellpp65 dem Target des TCR.
 B: CAR antiCD19/28 T Zellen: Kulturbedingungen und farbliche Zuweisung idem zu A.

Allen Kulturbedingungen wurden 10 IU/ml IL2 exogen hinzugegeben. Gemessen wurde an Tag 7 nach Stimulation der Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von 5.

Im CFSE Proliferationsassay ist ein deutlicher Unterschied zwischen den T Zellen zu sehen, die über den TCR mit Awellpp65 aktiviert wurden, und den T Zellen, die über ihren CAR aktiviert wurden. Eine Proliferation fand nur bei den Zellen statt, die über den TCR aktiviert wurden. Selbst exogen zugesetztes IL2 erbrachte keine Proliferation und konnte die Anergie bei den durch den chimärischen Rezeptor aktivierten T Zellen nicht durchbrechen. Bei den Kontrollen der T Zellen alleine, der CMV spezifischen T Zellen kultiviert mit Awell (nicht gezeigt) und der CAR 14.G2a T Zellen (nicht gezeigt) fand keine Proliferation statt. Das Ergebnis bestätigt die Beobachtungen in vivo und vitro, dass virusspezifische T Zellen, die über einen chimärischen Rezeptor der ersten und zweiten Generation aktiviert werden, kein Proliferationspotential besitzen. Dies ist ein weiteres Ergebnis, das die Defizienz der chimärischen Rezeptoren zeigt.

4.4.3 Expression des Aktivierungsmarkers CD25 nach Restimulation

Der Aktivierungsmarker CD25 ist ein gutes Indiz für den Aktivitätszustand von T Zellen. Fehlt dieser Marker oder ist er niedrig exprimiert, verlieren die T Zellen die Fähigkeit zu proliferieren und die Fähigkeit zur Zytokinproduktion.

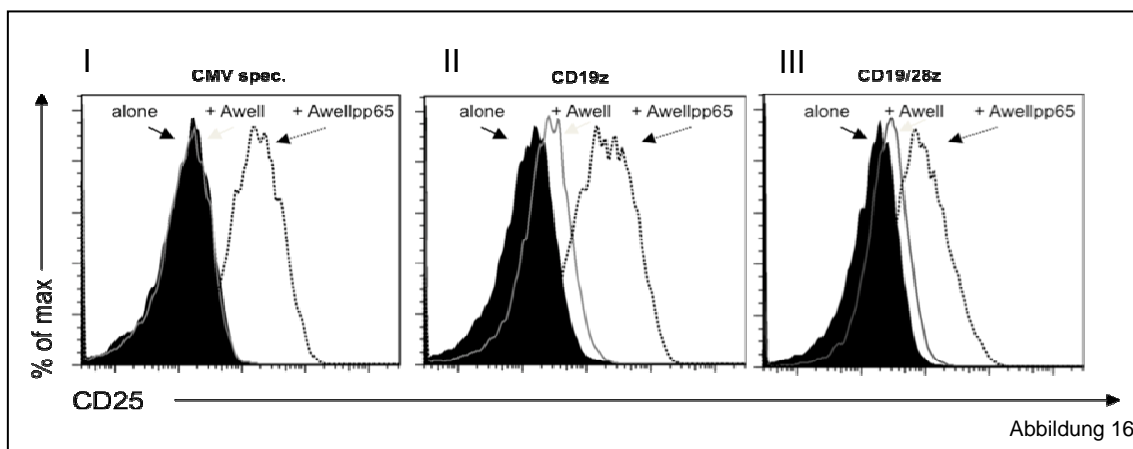


Abbildung 16: FACS-Analyse mit CD25PerCPCy5 nach 48h Kokultur der T Zellen mit ihren Targetzellen und Kontrollen. (I) CD25 Expression von CMV

spez. T Zellen kultiviert ohne Target Zellen (schwarz), CMV spez. T Zellen kultiviert mit den Kontrollzellen Awell (grau); CMV spez. T Zellen kultiviert mit Awellpp65 (schwarz gestrichelt); (II) CAR antiCD19z T Zellen kultiviert ohne Target Zellen (schwarz), mit Targetzellen Awell (grau) und Targetzellen Awellpp65 (schwarz gestrichelt). (III) CAR antiCD19z T Zellen experimenteller Aufbau und Beschriftung siehe (II). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von 5.

In der FACS Analyse der CD25 Expression zeigt sich nach 48h eine starke Hochregulation bei der Aktivierung der CMV spezifischen T Zellen mit ihren Targetzellen Awellpp65. Bei der Kontrolle mit Awell ist die CD25 Expression gleich der Expression von CMV spezifischen T Zellen ohne Targetzellen. Hier ist keine Aktivierung und Hochregulation von CD25 zu sehen. Die chimärischen T Zellen CAR antiCD19z und CAR antiCD19/28z zeigen im Vergleich zur Kontrolle eine sehr geringe Hochregulation der CD25 Expression bezüglich der Aktivierung über den chimärischen Rezeptor (Awell). Die interne Kontrolle der chimärischen Rezeptoren mit einer Aktivierung über den TCR (Awellpp65) zeigt eine deutliche Hochregulation vergleichbar zu den untransduzierten T Zellen, die mittels pp65 über den TCR aktiviert werden. Es zeigt sich somit ein wesentlicher Unterschied zwischen dem Aktivierungsstatus der CMV spez. aktivierten T Zellen über den TCR und den CAR CD19z bzw. CD19/28z aktivierten T Zellen. Somit kann gezeigt werden, dass diese Zellen prinzipiell gleich potent sind aber die Aktivierung über den TCR stärker ist als über den chimärischen Rezeptor. Dieser Unterschied des Aktivierungsstatus zeigt sich auch auf Zytokinebene. Gemessen wurde die CD25 Expression nach 48h Kokultur mit den jeweiligen Targetzellen (Abbildung. 16)

4.4.4 IFN γ Zytokinproduktion bei antigenspezifischen T Zellen und CAR T Zellen

Das Augenmerk richtet sich auf das proinflammatorische Zytokin IFN γ , das in der T Zell Antwort eine wichtige Rolle spielt. IFN- γ fördert die TH-1 Differenzierung, aktiviert Makrophagen, erhöht die Expression von MHC-I Molekülen und wird von aktivierten T Zellen ausgeschüttet.

Über 60% aller antigenspezifisch aktivierten CMV spezifischen T Zellen produzieren IFN γ . Dagegen liegt die IFN γ Produktion bei der Aktivierung der T Zellen über den chimärischen Rezeptor sowohl der ersten als auch der zweiten Generation bei 17-21%, also wesentlich niedriger. Das Experiment zeigt die hohe Vergleichbarkeit der einzelnen T Zellen untereinander, die bei gleicher „Potenz“ und bei Aktivierung über den TCR, IFN γ produzieren. Dies ist die Grundvoraussetzung für die Analyse intrazellulärer Phosphoproteine.

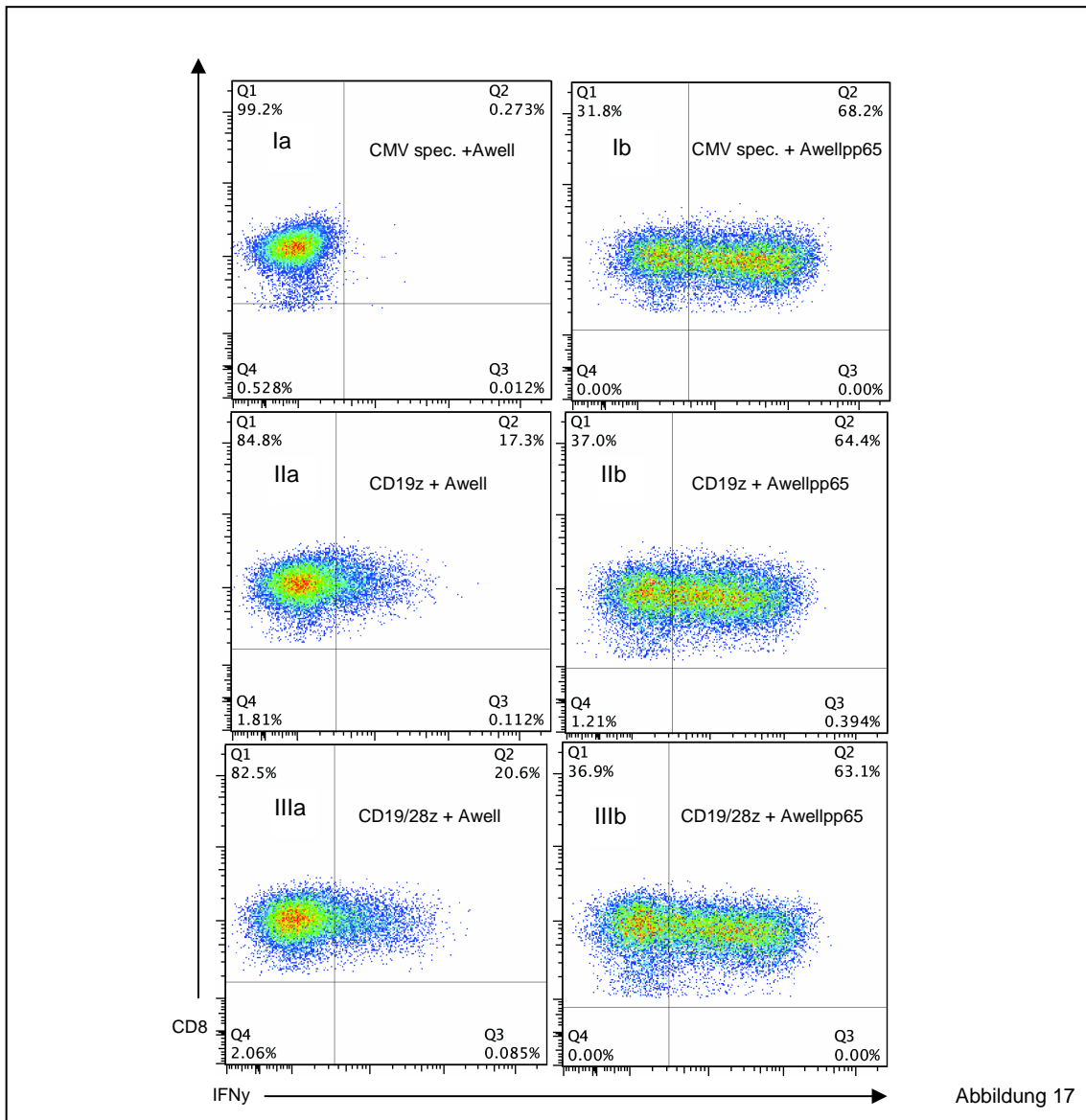


Abbildung 17:

IFN- γ Produktion der T Zellen nach 6h Kokultur mit ihren Targetzellen bzw. Kontrollen. Gemessen wurde die Zytokinproduktion durch intrazellulärer FACS Analyse mittels ICC (Intracellular Cytokine Staining siehe 3.1.6.3). Ia: CMV

spezifische T Zellen kokultiviert mit Awell als Kontrolle. Ib: CMV spezifische T Zellen kokultiviert mit Awellpp65. IIa: CAR CD19z T Zellen kokultiviert mit Awell als Targetzellen. IIb: CAR CD19z T Zellen kokultiviert mit Awellpp65 als interne Positivkontrolle und Vergleich zu den untransduzierten CMV spez. T Zellen. III: CAR CD19/28z T Zellen. Aufbau idem zu II. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von 6.

4.5 Signaltransduktionsanalyse von Phosphoproteinen in aktivierten T Zellen

Die aufgezeigten Defekte in der T Zell Aktivierung über die chimerischen Rezeptoren sowohl der ersten als auch der zweiten Generation geben Hinweise darauf warum diese T Zell Aktivierung und somit die T Zell Therapie mit CAR T Zellen in vivo defizient ist. Diese Probleme haben viele Arbeitsgruppen bereits schon adressiert und gezeigt. Nun stellte sich die Frage, ob es ein messbares Korrelat für diese funktionellen Defekte gibt. Immer wieder wird zu Recht die mögliche unvollständige Signaltransduktionsaktivierung durch die chimärischen Rezeptoren diskutiert. Wenn man sich den Aufbau eines chimärischen Rezeptors anschaut, wird sofort bewusst, dass bei der ersten Generation der CAR T Zellen die kostimulatorische Komponente fehlt. Dies wurde bei den Rezeptoren der zweiten Generation versucht, zu verbessern, indem man CD28 als „die“ kostimulatorische Funktionseinheit hinzugefügt hat. Trotz alldem stellt sich die Frage, ob dies ausreicht, vor allem in Bezug auf das Formen der immunologischen Synapse. Auf Grund dessen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Signaltransduktion auf der Ebene der phosphorylierten MAP Kinasen untersucht. Hierfür war es wichtig, die Signalstärke zu quantifizieren und dynamisch darzustellen. Eine Messung über 9 Zeitpunkte bei drei zu messenden Phosphoproteinen und eine genaue Quantifizierung übersteigt methodentechnisch die Möglichkeiten des Westernblots. Somit fiel die Entscheidung für die auf primär humaner T Zell Basis noch nicht etablierte CBA Bead Technologie von BD.

Dynamisches Phosphoprotein-Monitoring

Die bisherigen Daten über die Dynamik von Phosphorylierung der MAP Kinase Reihe wurden mit Jurkat T Zellen erhoben, die mit Antikörpern stimuliert wurden. Hier zeigte sich ein sekunden- bis minutenschneller Anstieg der Phosphorylierung und ein schnelles Abflachen der Aktivierung. Dies entspricht nach unseren Daten nicht der Zeitkinetik einer physiologischen Aktivierung einer T Zelle (Abbildung 18).

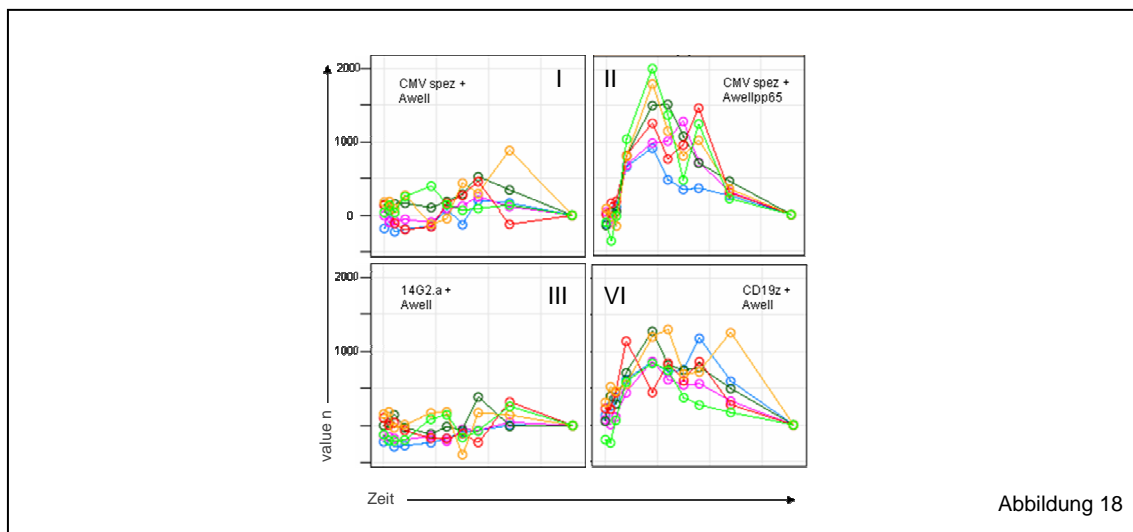


Abbildung 18:

Dynamische Messung des Phosphoproteins p38 durch die FACS CBA flex Set Methode von BD. Gezeigt sind die normalisierten Rohdaten aus n verschiedenen Messungen zum Zeitpunkt 0, 5, 10, 20, 45, 60, 90, 180 Minuten des phosphorylierten Proteins P38. (I) CMV spezifische T Zellen kokultiviert mit Awell als Kontrolle, (II) CMV spez. T Zellen physiologisch aktiviert über den TCR mit Awellpp65, (III) CAR CD14G2.a T Zellen kokultiviert mit Awells als Kontrolle zu (IV) CAR CD19z T Zellen kokultiviert mit Awell. Die Daten wurden auf den 180 Minuten Wert normiert.

Eine physiologische Aktivierung von T Zellen sowie eine Aktivierung über einen CAR zeigen einen wesentlich langsameren und anhaltenden Anstieg der Phosphorylierung von MAP Kinasen als bisherige Daten. Ein Maximum lässt sich am Beispiel von p38 bei 45 Minuten ausmachen. Durch diese Methode

haben wir nun die Möglichkeit, die Aktivierungsmuster der unterschiedlichen Aktivierungsformen über den TCR oder die der chimärischen Rezeptoren miteinander zu vergleichen.

4.5.1 Signifikant quantifizierbarer Unterschied der Phosphorylierung in den MAP Kinasen zwischen physiologischer TCR Aktivierung und Aktivierung über einen CAR der ersten Generation

Die hier untersuchten Phosphoproteine ERK, JNK und p38 gehören in die Gruppe der MAP Kinasen. Diesen Kinasen ist ein eigener Signalweg beschrieben (siehe Einleitung). ERK, JNK und p38 sind sogenannte „downstream signaling events“, das heißt, sie befinden sich fast am Ende einer Aktivierungskaskade und kumulieren somit viele „upstream events“. Aktivierung von MAP Kinasen führt letztendlich zu Zellproliferation, Zellaktivierung und Differenzierung. Somit sollte die Phosphorylierung dieser Kinasen mit der Funktionalität (Proliferation, Zytokinproduktion etc.) korrelieren. Die Defekte in der Funktionalität von CAR Aktivierung wurden vorhergehend dargestellt. Nun konnte gezeigt werden, wie sich dies auch in der Signalkaskade darstellt. Es gibt einen signifikanten Unterschied in der maximalen Phosphorylierung von ERK, JNK und p38 zwischen der physiologischen Aktivierung der CMV spezifischen T Zellen und der Aktivierung der T Zellen über einen CAR der ersten Generation. Hier kann ein Zusammenhang zwischen der Quantität der Phosphorylierung und der Funktion der T Zellen postuliert werden. Somit können wir darstellen dass die Aktivierung von T Zellen über einen chimärischen Rezeptor, der durch die alleinige Zeta Kette agiert, die MAP Kinasen nicht in gleicher und vollständiger Weise aktiviert und phosphoryliert wie eine physiologische Aktivierung über den T Zell Rezeptor. Die in Abbildung 19 zu sehenden Box Blots zeigen die Maximum Phosphorylierung von p38, ERK und JNK. Diese wurden nach Normalisierung der Daten dargestellt. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Maximum Phosphorylierung, zwischen der Aktivierung der CMV spezifischen T Zellen über den TCR und der Aktivierung über den chimärischen Rezeptor CAR CD19z.

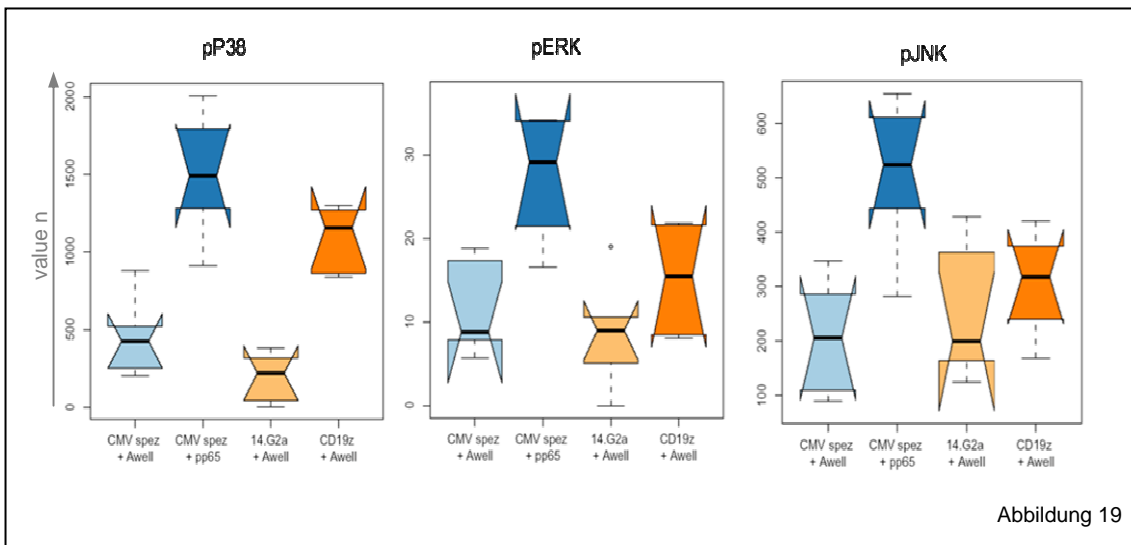


Abbildung 19

Abbildung 19:

Box Blots von drei unterschiedlichen Phosphoproteinen. Diese zeigen die maximale Aktivierung des jeweiligen Phosphoproteins der unterschiedlichen Effektorzellen (CMV spezifische T Zellen, CAR 14.G2a T Zellen und CAR CD19z T Zellen). Als Targetzellen für die TCR Aktivierung wurden Awellpp65 und für die Aktivierung der CAR CD19z T Zellen wurde die Awell Zelllinie verwendet.

4.5.2 Kein Signifikanter Unterschied in der Phosphorylierung zwischen Erst- und Zweitgenerationrezeptoren in CMV spezifischen T Zellen.

Chimäre Rezeptoren der zweiten Generation sollen aufgrund einer hinzugefügten kostimulatorischen Komponente die defiziente Signalkaskadenaktivierung verbessern. Wir verwenden hier einen klassischen CAR der zweiten Generation mit einer CD28 kostimulatorischen Komponente. Funktionell kann der Defekt in CD3 selektionierten primären T Zellen, was die Proliferation und Zytokinproduktion angeht, teilweise ausgeglichen werden, nicht aber so in virusspezifischen T Zellen [Altvater et al. 2006]. Dies zeigt sich auch in der Analyse der Phosphorylierung der MAP Kinasen. Hier zeigte sich kein Unterschied zwischen Erst- und Zweitgeneration-Rezeptoren. Alle untersuchten MAP Kinasen haben keine signifikant unterschiedlichen Maximum-Levels. In dieser Versuchsreihe zeigt sich wieder eine Korrelation mit der Funktion der T Zellen. Der Zweitgeneration Rezeptor bringt funktionell

keinen Vorteil weder in der Proliferation, Zytokinproduktion noch im Kill Verhalten. Dies ist eine Besonderheit bei viruspezifischen T Zellen.

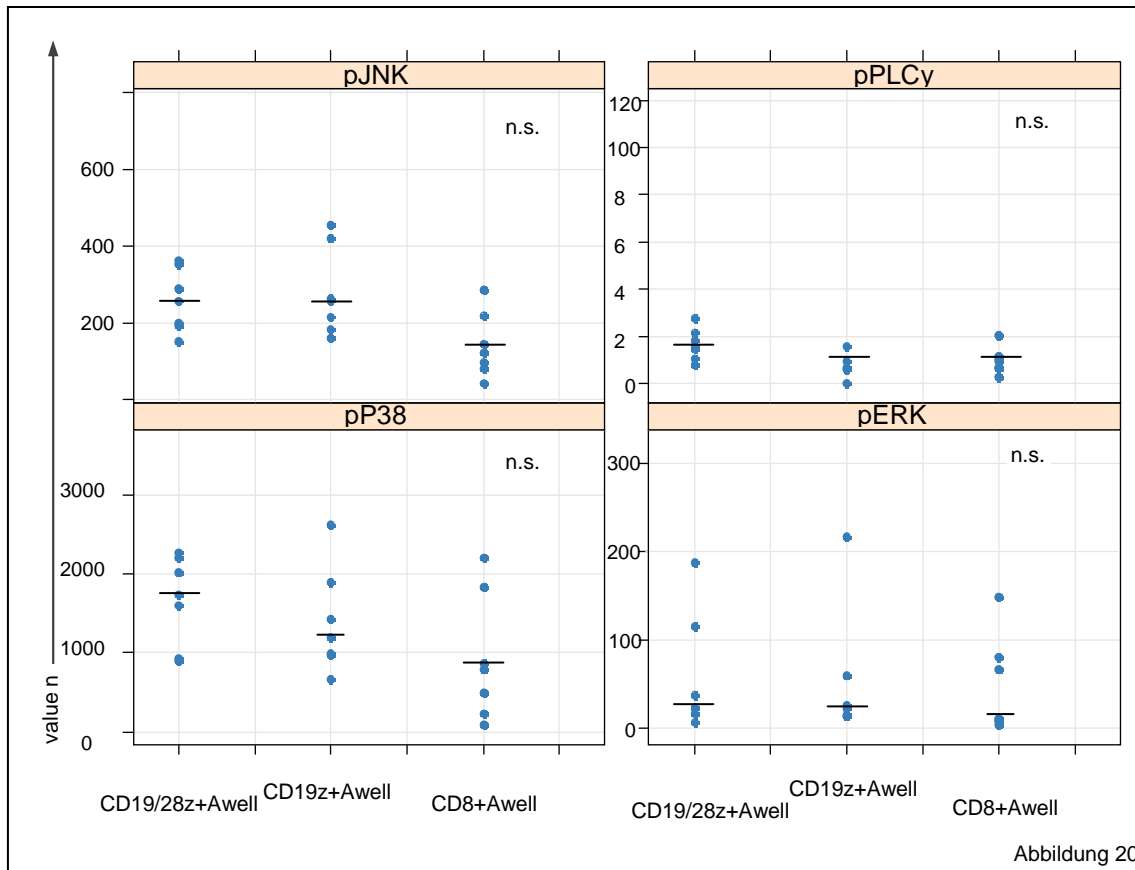


Abbildung 20:

Box Blots zeigen die Maximum Phosphorylierung von p38, ERK, JNK und PLCy. Diese wurden nach Normalisierung der Daten dargestellt. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Maximum Phosphorylierung, zwischen der Aktivierung der T Zellen über den erst Generation Rezeptor CAR CD19z (I) und dem zweit Generation Rezeptor CAR CD19/28z (II). Als Targetzellen für die Aktivierung wurde die CD19 exprimierende Awell Zelllinie verwendet.

5. Diskussion

Die Bestimmung von Phosphoproteinen in der Signalkaskade ist per se eine nicht leicht zu realisierende Aufgabe. Viele Faktoren wie Phosphatasen, Temperatur und Zustand der Zellen limitieren diese Methode. Um valide Ergebnisse zu erzielen müssen die äußeren, vom Versucher beeinflussbaren, versuchstechnischen Probleme berücksichtigt werden. Hierbei Verweise ich auf den Methodenteil (siehe 3.1.6.8). Ein Schlüsselfaktor um die unterschiedlichen Aktivierungsmodi der T Zellen zu vergleichen ist die Anzahl der auf den Zellen exprimierten Rezeptoren, die intrazellulär die Signalkaskade induzieren. Wir nähern uns diesem Problem mit der Bestimmung der Anzahl der Rezeptoren auf einer Zelle. Dies ist bei den chimärischen Rezeptoren möglich. Bei der Bestimmung der Anzahl der CMV spezifischen T Zell Rezeptoren ist dies nur Näherungsweise möglich. Dies soll diskutiert werden.

5.1 Rezeptordichte

Bei der Messung der Rezeptordichte wurde die Quantibrite Technologie verwendet. Hiermit kann gezeigt werden, dass bei unseren transduzierten Zelllinien keine Unterschiede in der Expression der chimärischen Rezeptoren vorhanden sind. Ein direkter Vergleich ist allerdings nur zwischen den Zelllinien der chimärischen Rezeptoren der ersten und zweiten Generation möglich, da hierfür derselbe Antikörper zur Detektion verwendet werden kann. Ein Vergleich zu den T Zell Rezeptoren der untransduzierten CMV spezifischen T Zellen ist nur indirekt möglich. Dies geschieht über das Pentamer von Proimmune. Hier liegt nicht eine 1:1 Bindung von Antikörper zu gelabeltem PE Molekül vor, wie es bei dem zur Detektion des chimärischen Rezeptors verwendeten Antikörper der Fall ist. Bei einem Pentamer liegen fünf mögliche Bindestellen für den T Zell Rezeptor und fünf gebundene PE Moleküle vor. Ein Pentamer kann also bis zu fünf T Zell Rezeptoren gleichzeitig binden. Wäre dies tatsächlich der Fall hätte man ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Bindestellen und PE Molekülen und somit ein 1:1 Verhältnis wie bei der Quantibrite Technologie gefordert. Es ist allerdings davon auszugehen, dass die fünf Bindestellen des Pentamers

schon aus sterischen Gründen nicht alle an einem TCR binden. Somit wäre das Signal durch die PE Moleküle überrepräsentiert. Bei den hierzu im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen sich im Schnitt ca. 27000 T Zell Rezeptoren auf den untransduzierten CMV spezifischen T Zellen (Daten nicht gezeigt). Gehen wir rein hypothetisch davon aus, dass nur 3 von 5 Bindestellen des Pentameres binden, haben wir eine tatsächliche Rezeptoranzahl, die um das 3/5 Fache niedriger läge als die eigentlich ermittelte Zahl. Somit wären dies 16200 T Zell Rezeptoren pro Zelle. Dies ist ein Hinweis, dass die Anzahl der chimärischen Rezeptoren vergleichbar mit der Anzahl der T Zell Rezeptoren auf einer CMV spezifischen T Zelle ist.

5.2 Verbesserung der CAR Technologie

Wie in der Einleitung erwähnt, bleiben die klinischen Erfolge mit der CAR Technologie hinter ihren Erwartungen zurück. Somit gibt es immer wieder von vielen Arbeitsgruppen Bestrebungen, diese Technik weiterzuentwickeln. Wie zuvor beschrieben, ist eines der Hauptprobleme die fehlende Proliferationskapazität. In den meisten Patienten können die transduzierten Zellen nicht länger als 2 Wochen nachgewiesen werden. Dies korreliert auch mit dem klinischen Ansprechen [Pule et al. 2008].

5.2.1 Drittgeneration-Rezeptoren

Um das Problem zu beheben, dass sich, wie wir nachgewiesen haben auch in der maximalen Phosphorylierung niederschlägt (siehe Kapitel 4.5), versuchen verschiedene Gruppen, die intrazelluläre Signaltransduktion durch weitere kostimulatorische Komponenten wie OX40 und 41BB zu erweitern [Pule MA et al. 2005, Wang J et al. 2007]. Hiermit soll eine verbesserte Zellfunktion mit höherer Zytokinproduktion und erhöhter Proliferationskapazität erreicht werden. Dies funktioniert in den in vitro Versuchen. Allerdings gibt es die Einschränkung für virusspezifische T Zellen schon bei 2. Generationsrezeptoren wie Altvater et al. 2006 zeigen konnten. In Mausmodellen konnten bei den Drittgenerationsrezeptoren im Vergleich mit den Zweitgenerationsrezeptoren ein verlängertes Zellüberleben und verbessertes Tumorsprechen gezeigt werden [Zhao Y 2009, Milone MC 2009]. Die Phosphorylierung der MAP

Kinasen wurde nicht untersucht. Zur Weiterführung dieser Arbeit wäre es interessant, diese Drittgenerationrezeptoren mit den Zweitgenerationrezeptoren zu vergleichen. Bei verbesserter Funktionalität durch die zusätzliche Kostimulation der Drittgenerationsrezeptoren wäre eine unterschiedlich hohe Phosphorylierung in den MAP Kinasen zu erwarten. Ob die Drittgenerationrezeptoren für die Klinik einen Durchbruch bedeutet, kann aktuell nicht beantwortet werden. Im präklinischen Setting zeigen diese jedoch vielversprechende Daten.

5.2.2 Auswahl der Effektor Zellpopulation

Weiterhin stellt sich das zentrale Problem beim adoptiven T Zell Transfer mit CAR T Zellen. Nach Infusion dieser T Zellen überleben diese und haben einen gewissen Antitumoreffekt. Allerdings sind die transduzierten T Zellen in kurzer Zeit im Patienten nicht mehr detektierbar. Um dieses Problem in den Griff zu bekommen, benutzen einige Investigatoren eine Lymphoablative Chemotherapie, um Freiraum für die infundierten T Zellen zu schaffen [Wrzesinski C. 2010, Dudley ME 2002]. Des Weiteren werden nach dem Transfer Zytokine unterstützend hinzugegeben. Dies alles bringt allerdings nur einen geringen Erfolg. Um die Persistenz der transferierten Zellen zu erhöhen, wurden verschiedene Effektorzellen als Ausgangszellen getestet. Es stellte sich heraus, dass virusspezifische T Zellen, die mit dem chimärischen Rezeptor verändert wurden, länger im Körper zirkulierten als nicht virale CAR CTLs [Pule MA et al. 2008]. Des Weiteren konnte im Affenmodell gezeigt werden, dass Central Memory Cells länger persistierten als differenzierte Effektor Zellen [Berger et al., 2008]. Somit bestünde die Möglichkeit, schon mit der Vorauswahl der zu transduzierenden Zellen eine Population zu selektionieren, die per se kostimulatorische Moleküle und das Potential mitbringt, in vivo zu proliferieren und sich in das etablierte Zellsystem zu integrieren. Persönlich sehe ich dies als eine vielversprechende Variante, da hier eine definierte Population transduziert werden würde. Im Gegensatz dazu verwenden einige Arbeitsgruppen CD3 selektionierte Zellen. Diese indifferente Population enthält aber unter anderem regulatorische T Zellen, die die Effekte der Therapie limitieren können. Die in

dieser Arbeit verwendeten CD8 CMV spezifischen Effektor Memory Zellen haben nach unseren Untersuchungen nicht das Potential für eine langanhaltende Tumorkontrolle und Persistenz im Patienten. Als Indiz hierzu verweise ich auf den durchgeführten CFSE Proliferationsassay, der bei den CAR Zellen kaum eine Teilung nach Aktivierung anzeigte. Weitere Untersuchungen mit vorselektionierten CMV spezifischen Central Memory Zellen wären der nächste Schritt, um eine geeignete Population zu definieren. Die in dieser Arbeit durchgeführten Phosphoproteinmessungen, zusammen mit den Funktionalitätsanalysen, können in Zukunft als prädiktiver Test für CARs und deren Effektorzellpopulation dienen.

5.3 Verwendung der CBA Technologie als Präklinisches Screening auf neue CARs

Eine Vielzahl klinischer Phase I Studien wurden mit CARs und großem Aufwand durchgeführt. Der Erfolg war nur marginal. Somit heißt es aus meiner Sicht für die Investigatoren: „From bed back to bench“. Ziel ist es, chimärische Rezeptoren zu konstruieren, die die oben beschriebenen Defizite ausgleichen. Die Ansätze, Drittgenerationrezeptoren zu verwenden, wie in 5.2.1 beschrieben, laufen im präklinischen Setting vielversprechend. Dies war allerdings bei den Zweitgenerationrezeptoren auch der Fall. Nun stellt sich die Frage, wie man ein besseres präklinisches Monitoring für neue CARs etabliert. Hiermit könnte man schon eine geeignete Auswahl an chimärischen Rezeptoren treffen, bevor diese den Weg in den Patienten finden. Dies könnte durch die in dieser Arbeit beschriebene Methode der Detektion von Phosphoproteinen erfolgen (siehe 3.1.6.7). Hierbei können die Phosphorylierungsstärken innerhalb der Zelle mit einer physiologisch aktivierten Zelle verglichen werden, um Rückschlüsse auf das Potential des jeweiligen chimärischen Rezeptors zu schließen. Als weiterer Readout muss natürlich der bisherige Standard mit Kill-Versuchen und Proliferationsassays eingehalten werden. Somit wäre eine Vorauswahl der Rezeptoren möglich, die eine möglichst physiologische und vollständige Aktivierung der Zelle ermöglichen. Diese hätten auch eine reelle Chance, sich

im bestehenden Zellsystem und Immunsystem des Patienten zu etablieren, um somit eine lang anhaltende Tumormunität zu gewährleisten.

5.4 Patientensicherheit

Wie oben erwähnt wurden die chimärischen Rezeptoren aufgrund des unzulänglichen Ansprechens in der Klinik verbessert, indem weitere Signaldomänen hinzugefügt wurden. T Zellen, die mit diesen CARs genetisch verändert wurden, sind in vitro hochreaktiv und produzieren große Mengen an Zytokinen. Wenn diese Zellen in den Patienten infundiert werden, hat man für die erste Zeit keine Handhabe über diese Zellen. Sie reagieren spezifisch auf ihr Target. Probleme treten auf, wenn diese Reaktion überschießend ausfällt, oder aber das so genannte Tumortarget kein adequates Tumortarget ist.

So wurde bei der Phase I Studie von Porter DL et al. 2011, ein chimärischer Rezeptore der zweiten Generation bei Patienten mit fortgeschrittener CLL eingesetzt. Ein Patient entwickelte durch die genetisch veränderten T Zellen ein Tumorlysesyndrom mit Harnsäureanstieg, LDH Anstieg und akutem Nierenversagen. Dies geschah aufgrund der hohen Potenz der genetisch modifizierten T Zellen, die Tumorzellen in kurzer Zeit zu lysieren. Diese Reaktion lässt sich nicht stoppen wie bei einer Antikörpergabe mit geringer Halbwertszeit durch Anhalten der Infusion.

Bei der Studie von Zhao Y et al. 2009 wurden Zweitgenerationrezeptoren verwendet, um Tumore mit ErbB2 Expression zu behandeln. Hierbei kam es zu einem Zwischenfall, der zum Ableben eines Patienten führte. Die genetisch veränderten T Zellen erkannten auch die in niedrigen Leveln vorhandene Expression von ErbB2 in der Lunge. Es kam zu einem Zytokinsturm mit hohen Zytokinmengen von IFN- γ , GM-CSF, TNF α und IL10. Der Patient entwickelte ein ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrom) gefolgt von Asystolie und verstarb. Dieser Fall beinhaltet zwei kritische Punkte in der CAR Technologie. Der eine Punkt ist die Überreaktion der T Zellen nach Antigenstimulation. Dies sollte vor allem auch bedacht werden, wenn CARs so modifiziert werden, dass die T Zellen dadurch immer mehr Zytokine produzieren. Die Überreaktion lässt sich im Einzelfall evtl. nur durch schnelle und hohe Gaben von Steroiden in den

Griff bekommen. Der zweite Punkt ist die schon in der Einleitung erwähnte Problematik der Tumorzielstruktur. Oft sind die Targetstrukturen bei den Tumorzellen überexprimiert. Wie im Beispiel der ErbB2 Expression gibt es diese Struktur allerdings auch in der Lunge. Dieses Organ ist besonders anfällig und wird bei einer Reaktion dort stark geschädigt. Die katastrophalen Folgen für den Patienten wurden bereits oben beschrieben. Somit muss die Suche nach besseren Tumortargets auch in Zukunft erfolgen.

Um die genetisch veränderten Zellen zu steuern bzw. besser zu kontrollieren, gibt es eine mögliche Lösung. Durch sogenannte Suicide Genes im Vektor der chimärischen Rezeptoren können die transduzierten T Zellen durch eine 2. Substanz ausgeschaltet werden. Dies wurde bereits bei Patienten getestet, die eine Donor-Lymphozyteninfusion nach allogener Transplantation bekommen haben [Cicerei et al 2009]. Die Aktivierung des Suicide Genes führt zur Elimination der T Zellen durch Apoptose. Entwickelt wurde zum Beispiel eine induzierbare Caspase (icasp9), die durch ein small molecule in die aktive Form gebracht wird [Hoyos V. et al. 2010]. Nach Aktivierung wird über die Caspase die Apoptose der Zelle eingeleitet. Dies wäre ein Mittel bei einer Überreaktion der transgenen Zellen, diese schnell und zuverlässig auszuschalten.

Trotz dieser Zwischenfälle ist anzumerken, dass die Infusion und Therapie mit CAR T Zellen sicher und praktikabel ist.

6. Zusammenfassung

Durch die im Labor der AG Topp standardisierte Verfahren konnten im Rahmen dieser Arbeit stabile T Zell Linien aus primär humanen CMV spezifischen T Zellen und CMV spezifischen T Zellen mit chimärischen Rezeptoren hergestellt werden. Diese konnten durch das Rapid Expansion Protocol (siehe 3.1.5.3) stabil expandiert werden. Die Anzahl der chimärischen Rezeptoren auf den unterschiedlichen T Zelllinien ist nicht signifikant unterschiedlich und beträgt ca. 17000 Rezeptoren pro Zelle. Vor dem jeweiligen Assay wurden diese T Zellen auf die Expression der jeweiligen Rezeptoren überprüft. Dies ist die Grundvoraussetzung für wirklich vergleichbare Bedingungen vor allem bei der nachfolgenden Analyse der Signaltransduktion. Bei der Überprüfung des Lyseverhaltens CMV spezifischer T Zellen gegenüber CMV spezifischer T Zellen transduziert mit einem chimärischen Rezeptor zeigt sich das gleiche Lyseverhalten. Dies wurde zuerst in einem standardisierten Chrom Release Assay überprüft. Um die zeitliche Dynamik dieses Verhaltens besser darzustellen, wurde ein FACS basierter Lysierungsversuch selbstständig entwickelt und etabliert. Dieser zeigte in der Validierung genau dieselben Ergebnisse. Somit konnte herausgestellt werden, dass das Lyseverhalten der T Zelllinien sowohl der CMV spezifischen T Zellen als auch das der Erst- und Zweitgeneration- T Zelllinien CAR CD19z und CAR CD19/28z vergleichbar war. Alle genannten Zelllinien lysieren ihre Targetzellen sowohl in der Quantität als auch in der zeitlichen Dynamik vergleichbar. Es zeigt sich eine 40-50% Lyse nach 2,5 h und eine 60-70% Lyse der Targetzellen nach 5h. Somit zeigt sich hier ein sehr schnelles Lyseverhalten.

Dies ist die einzige Gemeinsamkeit der verglichenen T Zell Aktivierungssysteme. In allen anderen funktionellen Versuchen ist die Aktivierung der T Zellen über einen chimärischen Rezeptor dem der physiologischen Aktivierung über den T Zell Rezeptor unterlegen.

Der Proliferationsversuch mit CFSE zeigt eindeutig, dass nur die T Zellen, die über den TCR aktiviert werden, das Potential haben, sich zu teilen. Die T

Zellen, die über den CAR sowohl der ersten als auch der zweiten Generation aktiviert werden, teilen sich nicht.

Der Defekt der CAR T Zellen zeigt sich auch in der Hochregulation von CD25, einem Aktivierungsmarker für T Zellen. Die T Zellen, die durch die chimärischen Rezeptoren sowohl der ersten als auch der zweiten Generation aktiviert werden, regulieren CD25 nicht so stark nach oben wie die T Zellen, die physiologisch durch den TCR aktiviert werden.

Diese Minderaktivierung spiegelt sich auch in der Zytokinproduktion wieder. Auch hier zeigt sich die unvollständige Aktivierung der CAR T Zellen. In der intrazellulären Zytokinmessung sieht man, dass bei CAR T Zellen der ersten und zweiten Generation zum einen die Einzelzellen weniger IFN γ produzieren, zum anderen die Gesamtzahl der Zellen, die Zytokine produzieren, weniger ist als im Vergleich zur TCR Aktivierung.

Dieses Phänomen der defizienten Aktivierung und der funktionellen Defekte von CAR T Zellen ist bekannt. Dies konnte noch einmal unter standardisierten und kontrollierten Bedingungen bestätigt werden. Eine Korrelation dieser Funktionseinschränkungen wurde von vielen Gruppen vermutet, aber nie untersucht.

Durch die relativ neue Methode der durchflusszytometrischen Bead Technologie konnte dies nun zum ersten Mal realisiert werden. Es zeigte sich, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Aktivierungsmodi der T Zellen besteht. Eine physiologische Aktivierung von T Zellen führt zu einer höheren Maximum-Phosphorylierung als eine Aktivierung über den Erstgeneration CAR. Die Kontrollen zeigen lediglich Hintergrundphosphorylierung, die wohl alleine schon durch den Zell Zell Kontakt zustande kommt. Der signifikante Unterschied zeigt sich bei den MAP Kinasen ERK, JNK und p38. Somit ist dies ein Hinweis, dass die Signaltransduktion auf breiter Ebene aufgrund des alleinigen Vorhandenseins der Zeta Kette bei den CAR CD19z T Zellen, defizient ist und nicht ausreicht für eine volle Aktivierung, die eine volle Funktionalität der T Zelle nach sich ziehen würde. Diese unzureichende Aktivierung soll durch die kostimulatorische Komponente CD28 beim Zweitgenerationrezeptor CAR CD19/28z aufgehoben werden. In der

Proliferation, Zytokineproduktion und den Aktivierungsmarkern zeigt sich keine Verbesserung im Vergleich zum Erstgenerationrezeptor bei CMV spezifischen T Zellen. Dieses Ergebnis wird bestätigt und korreliert damit, dass es keinen Unterschied in der maximalen Phosphorylierung von ERK, JNK und p38 zwischen Erstgeneration CAR CD19z und Zweitgeneration CAR CD19/28z gibt. Somit ist dieses System geeignet, um aus dem Phosphorylierungsstatus von MAP Kinasen von CAR T Zellen auf die Funktionalität dieser T Zellen zu schließen. Die Funktionalität einer T Zelle hängt somit mit dem maximalen Phosphorylierungsstatus der MAP Kinasen ERK, JNK und p38 zusammen. Nur eine genügend hohe Phosphorylierung der MAP Kinasen führt auch zu einer vollen Funktionalität der Zellen. Diese Erkenntnis kann eingesetzt werden, um CAR T Zellen neuerer Generationen präklinisch auf deren möglichen Erfolg in vivo zu testen.

Literaturverzeichnis

A

Azuma, M.; Phillips, J.H.; Lanier, L.L.

CD28- Lymphocytes-T - Antigenic and Functional-Properties

Journal of Immunology, 1993; 2; 1147-1159

Appleman, L.J.; Boussiotis, V. A.;

T cell anergy and costimulation

Immunological Reviews 2003; 192; 161-180

Altvater B, Pscherer S, Landmeier S, Niggemeier V, Juergens H, Vormoor J, Rossig C.

CD28 co-stimulation via tumour-specific chimaeric receptors induces an incomplete activation response in Epstein-Barr virus-specific effector memory T cells.

Clin Exp Immunol. 2006; 144(3); 447-57.

B

Boeckh, M.; Bowden, R.A.; Gooley, T.; Myerson, D.; Corey, L.

Successful modification of a pp65 antigenemia-based early treatment strategy for prevention of cytomegalovirus disease in allogeneic marrow transplant recipients

JID. 2003;188; 967-72

Brentjens, R.J.; Latouche, J.B.; Santos, E.; Marti, F.; Gong, M.C.; Lyddane, C.; King, P.D.; Larson, S.; Weiss, M.; Riviere, I.; Sadelain, M.

Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15

Nat.Med. 2003; 9.; 279- 286

Boise,L.H.; Minn,A.J.; Noel,P.J.; June,C.H.; Accavitti,M.A.; Lindsten,T.;
Thompson,C.B.

CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression
of Bcl-XL

Immunity 1995; 3; 87-98

Berger C, Jensen MC, Lansdorp PM, et al.

Adoptive transfer of effector CD8_ T cells derived from central memory cells
establishes persistent T cell memory in primates.

J Clin Invest. 2008;118; 294-305.

C

Callan,M.F.C.; Tan,L.; Annels,N.; Ogg,G.S.; Wilson,J.D.K.; O'Callaghan,C.A.;
Steven,N.; McMichael,A.J.; Rickinson,A.B.

Direct visualization of antigen-specific CD8(+) T cells during the primary
immune response to Epstein-Barr virus in vivo

J Exp Med. 1998; 187(9); 1395-402.

Ciceri F, Bonini C, Stanghellini MT, Bondanza A, Traversari C, Salomoni M,
Turchetto L, Colombi S, Bernardi M, Peccatori J, Pescarollo A, Servida P,
Magnani Z, Perna SK, Valtolina V, Crippa F, Callegaro L, Spoldi E,
Crocchiolo R, Fleischhauer K, Ponzoni M, Vago L, Rossini S, Santoro A,
Todisco E, Apperley J, Olavarria E, Slavin S, Weissinger EM, Ganser A,
Stadler M, Yannaki E, Fassas A, Anagnostopoulos A, Bregni M, Stampino
CG, Bruzzi P, Bordignon C

Infusion of suicide-gene-engineered donor lymphocytes after family
haploidentical haemopoietic stem-cell transplantation for leukaemia (the
TK007 trial): a non-randomised phase I-II study.

Lancet Oncol 2009; 10(5); 489–500.

D

Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D.
The three Es of cancer immunoediting.
Annu. Rev. Immunol. 2004; 22, 329–360

Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D.
The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting.
Immunity 2004; 21; 137–148

Dudley, M.E.; Wunderlich, J.R.; Shelton, T.E.; Even, J.; Rosenberg, S.A.
Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive
transfer therapy for melanoma patients
Journal of Immunotherapy 2003; 26; 332-342

Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, et al.
Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with
antitumor lymphocytes.
Science. 2002;298(5594); 850-854.

Diekmann J.
Prozessierung der Ebsteins-Barr Virus-Antigene LMP1 und LMP2:
Konsequenzen in der CD8 T Zellantwort
Dissertation 2008; Eberhard Karls Universität Tübingen

E

Emanuel D, Cunningham I, Jules-Elysee K, Brochstein JA, Kernan NA, Laver
J, Stover D, White DA, Fels A, Polsky B, et al.
Cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation successfully
treated with the combination of ganciclovir and high-dose intravenous
immune globulin.
Ann Intern Med. 1988; 15;109(10); 777-82.

Einsele,H.; Roosnek,E.; Rufer,N.; Sinzger,C.; Riegler,S.; Loffler,J.;
Grigoleit,U.; Moris,A.; Rammensee,H.G.; Kanz,L.; Kleihauer,A.; Frank,F.;
Jahn,G.; Hebart,H.

Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV
infection not responding to antiviral chemotherapy
Blood. 2002; 99(11); 3916-22.

Einsele,H.; Hebart,H.; Kauffman-Schneider,C.; Sinzger,C.; Jahn,G.;
Bader,P.; Klingebiel,T.; Dietz,K.; Loffler,J.; Bokemeyer,C.; Muller,C.A.;
Kanz,L.

Risk factors for treatment failures in patients receiving PCR-based
preemptive therapy for CMV infection
Bone Marrow Transplantation 2000; 757-763

Einsele H, Hebart H.
CMV-specific immunotherapy.
Hum Immunol. 2004; 65(5); 558-64

F

G

Gottschalk,S.; Rooney,C.M.; Heslop,H.E.
Post-transplant lymphoproliferative disorders
Annual Review of Medicine 2005; 22-44

Garber,D.A.; Silvestri,G.; Barry,A.P.; Fedanov,A.; Kozyr,N.; McClure,H.;
Montefiori,D.C.; Larsen,C.P.; Altman,J.D.; Staprans,S.I.; Feinberg,M.B.
Blockade of T cell costimulation reveals interrelated actions of CD4+ and
CD8+ T cells in control of SIV replication
Journal of Clinical Investigation 2004; 836-845

Girardi,M.; Oppenheim,D.E.; Steele,C.R.; Lewis,J.M.; Glusac,E.; Filler,R.;
Hobby,P.; Sutton,B.; Tigelaar,R.E.; Hayday,A.C.

Regulation of cutaneous malignancy by gamma delta T cells

Science 2001; 294; 605-609

Gross,G.; Waks,T.; Eshhar,Z.

Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A 1989; 86; 10024-1028

H

Heslop,H.E.; Ng,C.Y.C.; Li,C.F.; Smith,C.A.; Loftin,S.K.; Krance,R.A.;

Brenner,M.K.; Rooney,C.M.

Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes

Nature Medicine 1996; 2(5); 551-5.

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. 2001; 167; 6123-6131

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. 2004; 1; 173(1); 695.

Hoyos V, Savoldo B, Quintarelli C, Mahendravada A, Zhang M,

Vera J, Heslop HE, Rooney CM, Brenner MK, Dotti G

Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety.

Leukemia 2010; 24(6):1160–1170

I

J

Johnson BD, Truitt RL.

A decrease in graft-vs.-host disease without loss of graft-vs.-leukemia reactivity after MHC-matched bone marrow transplantation by selective depletion of donor NK cells in vivo.

Transplantation. 1992; 54(1): 104-12.

Charles A. Janeway/Paul Travers, Mark Walport, Mark Shlomchik;

Immunologie 5. Auflage Berlin: Spektrum, Akad. Verl. 2002

K

Kowolik, C.M.; Topp, M.S.; Gonzalez, S.; Pfeiffer, T.; Olivares, S.; Gonzalez, N.; Smith, D.D.; Forman, S.J.; Jensen, M.C.; Cooper, L.J.

CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells

Cancer Res 2006; 66; 10995-11004

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. 2006; 12; 6106-6115

Knapp W., Dorken B., Gilks W.R.

Leucocyte typing IV: White Cell Differentiation Antigens
Oxford Universal Press 1989; 34-36

L

Ljungman,P.; Engelhard,D.; Link,H.; Biron,P.; Brandt,L.; Brunet,S.;
Cordonnier,C.; Debusscher,L.; Delaurenzi,A.; Kolb,H.J.; Messina,C.;
Newland,A.C.; Prentice,H.G.; Richard,C.; Ruutu,T.; Tilg,H.; Verdonck,L.
Treatment of Interstitial Pneumonitis Due to Cytomegalovirus with Ganciclovir
and Intravenous Immune Globulin - Experience of European Bone-Marrow
Transplant Group
Clin Infect Dis. 1992; 14(4); 831-5.

Leen,A.M.; Heslop,H.E.
Cytotoxic T lymphocytes as immune-therapy in haematological practice
British Journal of Haematology 2008; 169-179

Lamers,C.H.; Sleijfer,S.; Vulto,A.G.; Kruit,W.H.; Kliffen,M.; Debets,R.;
Gratama,J.W.; Stoter,G.; Oosterwijk,E.
Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes
genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience
J.Clin.Oncol. 2006; 24; e20-e22

Life,P.; Aubry,J.P.; Estoppey,S.; Schnuriger,V.; Bonnefoy,J.Y.
CD28 functions as an adhesion molecule and is involved in the regulation of
human IgE synthesis
Eur.J.Immunol. 1995; 25; 333-339

Lenschow,D.J.; Walunas,T.L.; Bluestone,J.A.
CD28/B7 system of T cell costimulation
Annu.Rev.Immunol. 1996; 14; 233-258

Loskog A, Giandomenico V, Rossig C, Pule M, Dotti G, Brenner MK.

Addition of the CD28 signaling domain to chimeric T-cell receptors enhances chimeric T-cell resistance to T regulatory cells.

Leukemia 2006; 20(10); 1819-1828

M

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 2006; 314; 126-129

Mezzanzanica,D.; Canevari,S.; Mazzoni,A.; Figini,M.; Colnaghi,M.I.; Waks,T.; Schindler,D.G.; Eshhar,Z.

Transfer of chimeric receptor gene made of variable regions of tumor-specific antibody confers anticarbohydrate specificity on T cells

Cancer Gene Ther. 1998; 5; 401-407

Milone MC, Fish JD, Carpenito C, et al.

Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo.

Mol Ther. 2009; 17; 1453–1464.

N

O

P

Pule,M.A.; Savoldo,B.; Myers,G.D.; Rossig,C.; Russell,H.V.; Dotti,G.; Huls,M.H.; Liu,E.; Gee,A.P.; Mei,Z.; Yvon,E.; Weiss,H.L.; Liu,H.; Rooney,C.M.; Heslop,H.E.; Brenner,M.K.

Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma
Nat.Med. 2008; 14; 1264-1270

Pule MA, Straathof KC, Dotti G, et al. A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. Mol Ther. 2005; 12; 933–941.

Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH
Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia.
N Engl J Med 2011; 365(8); 725–733

Q

R

Claudia Rössig, Malcolm K. Brenner
Chimeric T-Cell Receptors for the Targeting of Cancer Cells
Acta Haematol 2003; 110; 154–159

Reed EC, Bowden RA, Dandliker PS, Lilleby KE, Meyers JD.
Treatment of cytomegalovirus pneumonia with ganciclovir and intravenous cytomegalovirus immunoglobulin in patients with bone marrow transplants.
Ann Intern Med. 1988; 109(10); 783-8.

Rauser G, Einsele H, Sinzger C, Wernet D, Kuntz G, Assenmacher M, Campbell JD, Topp MS.
Rapid generation of combined CMV-specific CD4+ and CD8+ T-cell lines for adoptive transfer into recipients of allogeneic stem cell transplants.
Blood. 2004; 103(9); 3565-72

Rosenberg, S.A.; Dudley, M.E.
Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma
Current Opinion in Immunology 2009; 21; 233-240

Ragheb, J.A.; Deen, M.; Schwartz, R.H.

CD28-Mediated regulation of mRNA stability requires sequences within the coding region of the IL-2 mRNA

J. Immunol. 1999; 163; 120-129

S.R. Riddell, P.D. Greenberg

The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells

J. Immunol. Methods 1990; 128; p. 189

S

Smyth, M. J., Dunn, G. P. & Schreiber, R. D.

Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity.

Adv. Immunol. 2006; 90; 1–50

Sadelain, M.; Riviere, I.; Brentjens, R.

Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes

Nat. Rev. Cancer 2003; vol 3; 35-45

T

Topp, M.S.; Riddell, S.R.; Akatsuka, Y.; Jensen, M.C.; Blattman, J.N.;

Greenberg, P.D.

Restoration of CD28 expression in CD28-CD8+ memory effector T cells reconstitutes antigen-induced IL-2 production

Journal of Experimental Medicine 2003; 947-955

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 2008; 112; 2261-2271

U

V

W

Walter,E.A.; Greenberg,P.D.; Gilbert,M.J.; Finch,R.J.; Watanabe,K.S.;
Thomas,E.D.; Riddell,S.R.
Reconstitution of Cellular-Immunity Against Cytomegalovirus in Recipients of
Allogeneic Bone-Marrow by Transfer of T-Cell Clones from the Donor
N Engl J Med. 1995; 333(16); 1038-44.

Waldrop SL, Davis KA, Maino VC, Picker LJ.
Normal human CD4+ memory T cells display broad heterogeneity in their
activation threshold for cytokine synthesis.
J Immunol. 1998; 15; 161(10); 5284-95.

Wang J, Jensen M, Lin Y, et al.
Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a
chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory
domains.
Hum Gene Ther. 2007; 18; 712–725.

Wrzesinski C, Paulos CM, Kaiser A, et al.
Increased intensity lymphodepletion enhances tumor treatment efficacy of
adoptively transferred
tumor-specific T cells.
J Immunother. 2010; 33(1)

X

Y

Z

Zitvogel,L.; Tesniere,A.; Kroemer,G.

Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion

Nature Reviews Immunology 2006; 715-727

Zhao Y, Wang QJ, Yang S, et al.

A herceptin-based chimeric antigen receptor with modified signaling domains leads to enhanced survival of transduced T lymphocytes and antitumor activity.

J Immunol. 2009; 183; 5563–5574

Abbildungen

- 1) © Zitvogel,L.; Tesniere,A.; Kroemer,G.
Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion
Nature Reviews Immunology 2006; 724
- 2) © Michael H. Kershaw, Michele W. L. Teng, Mark J. Smyth and Phillip K. Darcy
Supernatural T cells: Genetic modification of T cells for cancer therapy
Nature Reviews Immunology 2005; 931
- 3) bis 21) © Dissertation Johannes Düll 2010

Danksagung

Vielen Dank geht an meinen Doktorvater und Mentor Prof. Max Topp der mich in der langen Zeit unterstützt und gefördert hat.

Ein besonderer Dank geht an Sarah Zehnter (ehemals Lurati), die mir bei der Durchführung der sehr arbeitsintensiven Versuche und während meiner gesamten Zeit im Labor immer zur Seite stand. Vielen Dank für die exzellente Zusammenarbeit.

Außerordentlichen Dank geht an meine Frau Berenika, für die volle Unterstützung in jeder Lebenslage. Dies gilt ebenso für meinen Bruder und meinen Vater.

Merci vielmal

