OPTIMIERUNG DES T-ZELL-REZEPTOR-GENTRANSFERS IN PRIMÄREN T-ZELLEN FÜR DIE ADOPTIVE IMMUNTHERAPIE

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften

des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Universität Hamburg

vorgelegt von

Belinda Berdien

aus Henstedt-Ulzburg

Hamburg 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Professor Dr. B. FEHSE Weiterer Gutachter der Dissertation: Professor Dr. H.-P. MÜHLBACH Tag der Disputation: 25. Oktober 2013

Hamburg, den 08. Oktober 2013

Professor Dr. C. Lohr Vorsitzender des Fach-Promotionsausschusses Biologie

DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Boris Fehse, der mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses interessante Thema in seiner Arbeitsgruppe zu bearbeiten. Ich danke dir für deine Unterstützung und deine immer offen stehende Tür während der letzten Jahre.

Ebenfalls möchte ich unseren Kooperationspartnern PD. Dr. Djordje Atanackovic, Dr. Henrike Reinhard, Stefanie Spöck, Sabrina Meyer und Dr. Sara Yousef der AG Tumorimmunologie des UKE für die erfolgreiche Zusammenarbeit und Publikation der Ergebnisse danken.

Ein weiterer Dank geht an meine Kollegen der Arbeitsgruppe Zell- und Gentherapie für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit im Labor. Ich glaube, nicht alle Doktoranden können behaupten, dass ihre "Lehrjahre" insgesamt eine wirklich schöne Zeit waren. Ihr seid sicherlich ein Grund dafür, dass ich mich zu dieser Gruppe zählen kann. Besonders möchte ich meiner Mitstreiterin und inzwischen guten Freundin Ulrike danken. Ich werde unsere gemeinsame Zeit im Büro und Labor vermissen. An dieser Stelle möchte ich mich ebenfalls besonders bei Tanja, Tim und Johannes bedanken, die mir in den letzten "Runden-Monaten", die eine oder andere Laborarbeit abgenommen haben.

Weiterhin danke ich Pierre, Tim und meiner lieben Mutti für das Korrekturlesen der Arbeit. Meine zuweilen etwas kompliziert verschachtelten Sätze waren sicher nicht immer einfach zu entschlüsseln. Danke für eure Zeit, Gedanken und Mühe.

Abschließend gilt mein Dank den wichtigsten Menschen in meinem Leben, meiner Familie, meinen Freunden und meinem Ino. Danke für eure Unterstützung und euren Rückhalt.

PUBLIKATION

Ein Teil der hier präsentierten Ergebnisse wurde in folgender Fachzeitschrift publiziert:

<u>Berdien B</u>, Reinhard H, Meyer S, Spöck S, Kröger N, Atanackovic D, Fehse B. **Influenza virus-specific TCR-transduced T cells as a model for adoptive immunotherapy**. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2013;9(6):1–12.

INHALTSVERZEICHNIS

	DANKSAGUNG	3
	PUBLIKATION	4
	INHALTSVERZEICHNIS	5
	ZUSAMMENFASSUNG	8
	SUMMARY	9
1.	EINLEITUNG	10
1.1.	. DER T-ZELL-REZEPTOR-KOMPLEX	10
1.	.1.1. Struktur des T-Zell-Rezeptors und assoziierter CD3-Moleküle	10
1.	.1.2. Interaktionen des T-Zell-Rezeptors mit MHC-Molekülen	13
1.	.1.3. T-Zell-Rezeptor Signaltransduktion	15
1.2.	ADOPTIVE T-ZELL-IMMUNTHERAPIE	16
1.	.2.1. T-Zell-Rezeptor-Gentherapie	17
1.	.2.2. Retrovirale Vektoren für den Gentransfer	20
1.	.2.3. Antigene für die TCR-Gentherapie	25
1.3.	. GENOME ENGINEERING MIT GENETISCH MODIFIZIERTEN NUKLEASEN	26
1.4.	. FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	30
2.	MATERIAL UND METHODEN	
2.1.	. Material	
2	2.1.1. Laborgeräte	31
2	2.1.2. Verbrauchsmaterialien	32
2	2.1.3. Kommerzielle Kits	32
2	2.1.4. Chemikalien und Reagenzien	33
2	2.1.5. Medien und Puffer	34
2.	2.1.6. Bakterienstämme, Zelllinien und primäre Zellen	35
2	2.1.7. Enzyme	
2	2.1.8. Plasmide	37
2	2.1.9. Oligonukleolide	
2	2 1 11 Pentide und Tetramere	
2	2.1.12. Software	
2.2.	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	
2		/2
2	2.2. Quantifizierung von Nukleinsäuren	42 42
2	2.2.3. Isolierung von Plasmid-DNA	
2	2.2.4. Isolierung von genomischer DNA	
2	2.2.5. Aufreinigung von DNA-Fragmenten	43
2	2.2.6. Verwendung von Restriktionsenzymen	43
2	2.2.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
2	2.2.8. Transformation von Plasmid-DNA	45

2.2.9.	Ligation von DNA-Fragmenten	45
2.2.10	. Subklonierung von PCR-Produkten	46
2.2.11	. Sequenzierungen	46
2.2.12	. Identifizierung von T-Zell-Rezeptor-Ketten	46
2.2.13	. Identifizierung und Klonierung von TALE-Nukleasen	48
2.2.14	. In vitro-Transkription von mRNA	48
2.2.15	Endonukleaseassay	49
2.2.16	. Hybridisierung von Oligonukleotiden	49
2.2.17	. Modifikationen von DNA-Enden für Klonierungen	49
2.2.18	. Klonierungsstrategien	50
2.3. Ze	LLBIOLOGISCHE METHODEN	54
2.3.1.	Krvokonservierung & Auftauen von Zellen	54
2.3.2.	Zellzählung	54
2.3.3.	Kultivierung von Zelllinien	54
2.3.4.	Isolierung von PBMCs und autologem Plasma	55
235	Stimulierung und Kultivierung von primären T-Zellen	55
2.3.6	Virusproduktion	56
2.3.7	Titration von Virusüberständen	57
2.3.8	Aufkonzentrierung von Virusüberständen	57
2.0.0.	Transduktion von Zelllinien	58
2.3.3.	Transduktion von primären T-Zellen	58
2.3.10	Durchflusszytometerische Analysen	58
2.3.11	Zellsortierung	50
2.3.12	Elektronoration von primären T-Zellen und Zellinien	50
2.3.13	Magnetische Zellsenaration von CD3 ^{+/-} -Zellen	60
2.3.14	Cytoking-Release-Assay	60
2.3.13	³ H Thymidin Proliferationsassay	60
2.3.10	Enzyme linked Immuneserbent Assay (ELISA)	61
2.3.17	Enzyme Linked Immuno Soldent Assay (ELISA)	61
2.3.10	Statistische Auswertung	61
2.3.19	. Statistische Auswenung	01
3. ER	GEBNISSE	62
31 105		
S.T. IDE SPI	EZIFISCHEN TCRs	62
3.1.1.	Optimierung der RLM-RACE-PCR zur Identifizierung von antigenspezifischen T-Ze Rezeptor-Ketten	ell- 62
3.1.2.	Identifikation von T-Zell-Rezeptor-Ketten aus potentiell MAGE-C2-spezifischen T-	88
3.1.3.	J76-T-Zelllinie zur funktionellen Überprüfung klonierter T-Zell-Rezeptoren	67
314	Funktionelle Überprüfung identifizierter, potentiell MAGE-C2-spezifischer T-Zell-	0.
0.111	Rezeptoren in J76-Zellen	68
2.2 his		
3.2. INF	LUENZASPEZIFISCHE TORS ALS MODELLSYSTEM FUR DIE OPTIMIERUNG DER TOR-	70
GE		10
3.2.1.	Identifikation von TCR-Ketten aus influenzaspezifischen CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-	
		70
3.2.2.	Kionierung und tunktionelle Überprutung identifizierter influenzaspezifischer T-Zell-	70
0.0.0	Rezeptoren in J/6-Zellen	12
3.2.3.	Transfer der Flu-spezifischen TCR-Konstrukte in primare T-Lymphozyten	15

3.	.3.	Genetische Modifikationen zur optimierten Expression des Influenzaspezifischen TCR in primären T-Lymphozyten	75
	3.3	 Optimierung des LeGO-iG2-Vektors f ür eine verst ärkte Expression in prim ären Lymphozyten 	T- 76
	3.3	 Genetische Modifikationen der influenzaspezifischen TCR-Ketten durch das Einfügen einer weiteren Disulfidbrücke 	78
	3.3	 Murinisierung der influenzaspezifischen TCR-Ketten f ür eine verst ärkte Expres des exogenen TCR 	sion 80
3.	.4.	KNOCKOUT DER ENDOGENEN T-ZELL-REZEPTOR-GENE ZUR VERHINDERUNG DES T MISPAIRINGS	FCR- 85
	3.4 3.4 3.4 3.4 3.4 3.4	 Identifikation TCR-spezifischer TALEN-Zielsequenzen	86 90 93 en 95 98
	3.4	TCR-Ketten	102
4.		DISKUSSION	105
4.	.1.	MAGE-C2 als Zielstruktur der adoptiven Immuntherapie des Multiplen Myeloms	105
	4.1	1. Alternativen zur TCR-Gentherapie	107
4.	.2.	Optimierungen des TCR-Gentransfers	108
	4.2 4.2 4.2	 Optimierung der transgenen Expressionskassette Verwendung eines optimalen Transfervektors Probleme bei der Expression von transgenen TCRs in primären T-Lymphozyte 	108 110 en111
4.	.3.	TALEN-VERMITTELTER KNOCKOUT DER ENDOGENEN TCR-KETTEN	114
4.	.4.	KOMPLETTE UMPROGRAMMIERUNG VON T-ZELLEN	118
4.	.5.	AUSBLICK	119
5.		ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	120
6.		LITERATURVERZEICHNIS	122
7.		ANHANG	131
7.	.1.	KODONOPTIMIERTE MUFLU-SEQUENZ	131
		EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	132

ZUSAMMENFASSUNG

Die Umprogrammierung von T-Zellen durch die Transduktion spezifischer T-Zell-Rezeptoren (TCR) ist ein effektiver Ansatz für die adoptive Immuntherapie. Diese erfordert anspruchsvolle Techniken für die Identifikation und Klonierung geeigneter TCRs, sowie für die Transduktion von primären T-Zellen. Zugleich stellt das TCR-*Mispairing*, die unerwünschte Paarung transgener TCR-Ketten mit komplementären endogenen Ketten, eine große Herausforderung der TCR-Gentherapie dar.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Optimierung des TCR-Gentransfers in primären T-Zellen, wozu als Modellsystem ein influenzaspezifischer (Flu) TCR verwendet wurde.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Optimierungen durchgeführt, die primär zu einer verstärkten Transgenexpression des Flu-TCR geführt haben. Dabei konnte ein neuer lentiviraler Vektor (LeGO-MP) entwickelt werden, der eine signifikante Erhöhung der Expressionsstärke von Transgenen in T-Zelllinien und in primären T-Zellen gegenüber dem bisherigen lentiviralen Vektor ermöglichte. Bei der Optimierung der verwendeten Expressionskassette wurde gezeigt, dass die stärkste Expression der TCR-Ketten über die 2A-Sequenz des porzinen Teschovirus in der Konfiguration TCR β -2A-TCR α erreicht wird. Nach zusätzlicher Kodonoptimierung und Murinisierung der transgenen Flu-TCR-Sequenzen konnte erstmals die Generierung von aktiven influenzaspezifischen primären Effektor-T-Zellen gezeigt werden, die durch starke Sekretion von IL-2, IFN- γ und TNF- α nach Kontakt zu ihrem Antigen charakterisiert waren.

Der zweite Teil der Dissertation widmete sich der Verhinderung des TCR-*Mispairings* durch das Ausschalten der endogenen TCR-Gene mit Hilfe von TAL-Effektor-Nukleasen (TALEN). Nach Identifizierung der TCR-spezifischen TALEN und nach Optimierung von Transportmethoden und Kulturbedingungen konnte erstmals ein Knockout der endogenen TCRα- und TCRβ-Ketten durch TALEN-mRNA-Elektroporation in primären T-Zellen nachgewiesen werden. Durch den sukzessiven Knockout der endogenen TCR-Ketten und der jeweils anschließenden Transduktion mit den entsprechenden Flu-TCR-Ketten wurde eine komplette Umprogrammierung von primären T-Zellen erreicht. Diese Zellen zeigten aufgrund der Abwesenheit des TCR-*Mispairings* deutlich verbesserte Flu-Oberflächenexpression sowie verstärkte Effektorfunktionen.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit Methoden entwickelt, die zu einer verstärkten TCR-Expression in primären T-Zellen sowie zur kompletten Verhinderung des TCR-*Mispairings* geführt haben. Diese können bei klinischen Anwendungen der adoptiven TCR-Immuntherapie zukünftig von großem Nutzen sein.

SUMMARY

Engineering T cells with antigen specific T-cell receptors (TCR) represents a promising strategy in adoptive immunotherapy. The approach of identification and cloning of suitable TCRs and the transduction of primary T cells remains technically demanding. Moreover TCR mispairing, the incorrect pairing between an introduced α/β chain and the complementary endogenous TCR α/β chain, remains a major challenge in the field of TCR gene therapy.

The main goal of this thesis was the optimization of TCR gene transfer in primary T cells by using influenza virus (Flu)-specific T-cell responses as a model system.

The goal of the first part of the thesis was the development of strategies facilitating enhanced surface expression of Flu-TCR molecules. In this process a novel lentiviral self-inactivating vector (LeGO-MP) which significantly enhanced transgene expression in T-cell lines and primary T cells was developed. The optimization of the transgene cassette showed that the 2A element of the porcine Teschovirus as a linker for the TCR chains in the configuration TCR β -2A-TCR α mediated the highest levels of TCR surface expression. Codon-optimization and murinization of the Flu-TCR chains led to the successful generation of active anti-Flu effector T cells, characterized by the secretion of high amounts of IL-2, IFN- γ und TNF- α after contact with their cognate antigen.

The second part of this thesis focused on the prevention of TCR mispairing by knocking out the expression of endogenous TCR chains with TCR specific TAL effector nucleases (TALEN). Following the identification and cloning as well as the optimization of delivery strategies and culture conditions for the TCR specific TALEN, an efficient knockout of the endogenous TCR α and TCR β genes was, for the first time, successfully induced by TALEN-mRNA electroporation. The successive knockout of the endogenous TCR chains and the subsequent transduction of the appropriate Flu-TCR chains led to the complete editing of primary T cells. These cells showed enhanced surface expression and were superior at mediating effector functions, likely because of the absence of TCR mispairing. In conclusion, new approaches for the enhanced surface expression of TCR molecules as well as for the complete prevention of TCR mispairing were successfully developed. Together these new techniques might be beneficial for the further development of TCR gene transfer for clinical applications of adoptive immunotherapy.

1. EINLEITUNG

1.1. Der T-Zell-Rezeptor-Komplex

Seit den 1960er Jahren ist es offenkundig, dass die Funktionen sowohl von B- als auch von T-Lymphozyten für die adaptive Immunantwort eine zentrale Rolle spielen. Zu diesem Zeitpunkt war jedoch noch unklar, wie die Erkennung körperfremder Antigene und die Auslösung einer Immunantwort durch diese Zellen erfolgt¹. Die Identifizierung des T-Zell-Rezeptors (TCR, engl. T-cell receptor) und der ihn kodierenden Gene stellte sich dabei als wesentlich komplizierter heraus als die Identifikation des B-Zell-Rezeptors. Erst Anfang der 1980er Jahre konnte der Rezeptorkomplex auf T-Zellen mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern identifiziert und charakterisiert werden²⁻⁴. Kurze Zeit später folgten die Identifikation und Klonierung der humanen und murinen Gene, die für die TCRα- bzw. TCRβ-Ketten kodieren^{1,5-9}. Es zeigte sich, dass der TCR-Komplex zusammen mit weiteren Molekülen eine komplizierte Transmembranrezeptor-Struktur bildet¹⁰. Heute wissen wir, dass dieser Komplex eine Schlüsselfigur des adaptiven Immunsystems ist. Neben der Erkennung einer immensen Anzahl unterschiedlichster Antigene mit dem Ziel der Bekämpfung von Pathogenen und entarteter Körperzellen ist er u.a. für die T-Zell-Entwicklung im Thymus und die Differenzierung von T-Zellen in verschiedene Subpopulatonen verantwortlich¹¹.

1.1.1. Struktur des T-Zell-Rezeptors und assoziierter CD3-Moleküle

Jeder T-Lymphozyt weist ca. 30.000 identische Antigenrezeptor-Komplexe auf seiner Oberfläche auf, die u.a. für das Auslösen einer Immunantwort nach Antigenerkennung zuständig sind¹². Der Komplex setzt sich aus dem T-Zell-Rezeptor und assoziierten CD3-Molekülen zusammen^{12,13}. Der TCR ist ein Heterodimer, das aus den beiden glykolisierten Polypeptidketten TCR α - und TCR β bzw. in selteneren Fällen aus den alternativen, aber strukturell sehr ähnlichen γ - und δ -Ketten besteht¹². Die Rezeptorketten werden in die aminoterminale variable Region (V) und in die carboxyterminale konstante Region (C) unterteilt. Die extrazelluläre variable Region beinhaltet die Antigenbindungsstelle und ist somit für die Erkennung von Antigenen zuständig. Sie enthält die 3 hypervariablen Bereiche CDR1, CDR2 und CDR3 (CDR, engl. *complementarity determining regions*), welche die Antigenbindungstelle bilden und damit direkten Kontakt zum Antigen (CDR3) bzw. zu den antigenpräsentierenden Strukturen (CDR1 und CDR2) aufnehmen. Die konstante Region besteht aus einer direkt an die V-Region anschließenden extrazellulären Region. Die folgende Gelenk-Region beherbergt je ein Cystein, das für die Ausbildung der Disulfidbrücke verantwortlich ist, die die TCR-Ketten miteinander verbindet. Auf die Gelenk-Region folgen eine hydrophobe Transmembrandomäne, sowie ein kurzer 2-7 Aminosäuren langer zytoplasmatischer Anteil (Abb. 1)^{14,15}.



Abb. 1. Schematische Darstellung des T-Zell-Rezeptors. Der TCR ist ein Heterodimer, das aus den über eine Disulfidkette verbundenen TCR α - (grün) und TCR β -Ketten (grau) besteht. Die TCR-Ketten bestehen aus einer variablen Region (V), die die Antigenbindungsstelle enthält, sowie aus einer konstanten Region (C), welche den TCR über die Transmembranregion in der zellulären Membran verankert. Abbildung modifiziert nach Janeway *et al.*¹².

Die genomische Organisation des humanen TCR α - und β -Locus ist in Abb. 2 dargestellt. Der TCR α -Locus befindet sich auf Chromosom 14 und besteht aus 70-80 variablen Gensegmenten (V), 61 verbindenden Gensegmenten (J, engl. *joining*) und einem konstanten Gensegment (C)¹². Der TCR β -Locus befindet sich dagegen auf Chromosom 7 und besteht aus einer Gruppe von 52 funktionalen V $_{\beta}$ -Gensegmenten und aus 2 Gruppen von 6 bzw. 7 J $_{\beta}$ -Gensegmenten, die je ein Diversitätsgensegment (D) und je ein C $_{\beta}$ -Gensegment enthalten¹². Die beiden C $_{\beta}$ -Gene besitzen sehr große Homologie, und bislang wurde kein funktioneller Unterschied zwischen ihnen festgestellt. Um die hohe Diversität der T-Zell-Rezeptoren zu erreichen, die notwendig ist, um eine nahezu unbegrenzte Anzahl von Antigenen erkennen zu können, erfolgt ein komplexer und gut koordinierter Prozess namens *V(D)J-TCR-Rearrangement*¹⁶. Dabei werden die einzelnen V, D, und J-Gensegmente während der T-Zell-Entwicklung im Thymus zu einem zusammenhängenden TCR-V-Exon rekombiniert¹⁷. Die Umordnung der V(D)J-Gensegmente wird hauptsächlich durch die beiden Enzyme RAG1 und RAG2 (RAG, engl. *recombination-activating gene*) vermittelt¹⁶. Die hohe Diversität der T-Zell-Rezeptoren entsteht zusätzlich durch Addition und/oder Deletion von wenigen Nukleotiden in den Verbindungsbereichen der kombinierten Fragmente. Diese Bereiche befinden sich v.a. in der CDR3-Region, was die Hypervariabiltät dieses Abschnittes erklärt¹⁶. Nach der Transkription wird zur Generierung der reifen mRNA das rekombinierte V-Exon an die konstante TCR-Region gespleißt¹⁷.



Abb. 2: Schematische Darstellung des TCR α - und TCR β -Locus. A. Der TCR α -Locus auf Chromosom 14 besteht aus 70-80 variablen (V), 61 verbindenden (J) und einer konstanten Domäne (C). B. Der TCR β -Locus befindet sich auf Chromosom 7 und besteht aus 52 V-, 61 J- und 2 C-Domänen. Abbildung modifiziert nach Janeway *et al.*¹².

Die invarianten CD3-Moleküle des TCR-CD3-Komplexes sind negativ geladene Transmembranproteine, die zur Immunglobulin-Superfamilie gehören und mit den positiv geladenen TCRα- und β-Ketten interagieren. Sie sind für den Transport des Komplexes an die Zelloberfläche sowie für die Initiierung der intrazellulären Signalkaskade nach Kontakt des T-Zell-Rezeptors mit einem extrazellulären Liganden verantwortlich. Der CD3-Komplex besteht aus den Heterodimeren CD3 $\epsilon\delta$, CD3 $\gamma\epsilon$ und dem Homodimer $\zeta\zeta$. Die CD3-Proteine ϵ , δ und γ besitzen extrazelluläre, immunglobulinähnliche Domänen und einen kurzen zytoplasmatischen Anteil, der je ein hochkonserviertes Immunoglobulin-Tyrosin-Aktivierungsmotiv (ITAM) besitzt. Die beiden ζ-Proteine weisen dagegen eine kurze extrazelluläre- und eine lange intrazelluläre Domäne auf, die mit je 3 ITAM-Motiven ausgestattet ist. Insgesamt hat der TCR-CD3-Komplex somit 10 ITAMs zur Verfügung, die eine große Flexibilität bei der Signalübertragung ermöglichen.



Abb. 3: Schematische Darstellung des TCR-CD3-Komplexes. Der TCR-CD3-Komplex besteht aus dem T-Zell-Rezeptor (grau) und den assoziierten CD3-Molekülen ϵ (pink), δ (rosa), γ (orange) und ζ (blau). Die für die Signaltransduktion notwendigen ITAMs sind weiß/rot-schraffiert dargestellt. Abbildung modifiziert nach Janeway *et al.*¹².

1.1.2. Interaktionen des T-Zell-Rezeptors mit MHC-Molekülen

Im Jahre 1976 konnten Zinkernagel und Doherty erstmals zeigen, dass die T-Zell-Aktivierung nicht nur von der Antigenerkennung, sondern zusätzlich von einer gleichzeitigen Erkennung von sogenannten MHC-Molekülen durch den T-Zell-Rezeptor abhängt¹⁸. Bei den MHC-Molekülen handelt es sich um membrangebundene Glykoproteine, die durch eine große Gruppe von über 200 Genen kodiert werden, die den sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, engl. major histocompatibility *complex*) bilden¹². Im Menschen werden diese Gene auch humane Leukozytenantigene (HLA) genannt, da sie erstmals bei der Transplantationen von Leukozyten entdeckt wurden¹². Eine bemerkenswerte Eigenschaft des MHC-Komplexes ist seine, durch Polygenie und Polymorphismus entstandene, beträchtliche genetische Variabilität¹². Die MHC-Moleküle lassen sich in die MHC-Klasse-I- und die MHC-Klasse-II-Moleküle einteilen (Abb. 4). Bei beiden Klassen handelt es sich um Heterodimere mit sehr ähnlicher Struktur^{14,19}. Klasse-I-Moleküle bestehen aus einer größeren α -Polypeptidkette, die aus den 3 Domänen $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$ zusammengesetzt ist. Die α -Polypeptidkette ist mit der kleineren, nicht-kovalent assoziierten β2-Mikoglobulin-Kette verbunden. MHC-Klasse-II-Moleküle bestehen aus den zwei Polypeptidketten α und β , die jeweils aus den 2 Domänen α 1, α 2 bzw. β 1, β 2 zusammengesetzt sind¹².



Abb. 4: Schematische Darstellung der MHC-Klasse-I (links) und MHC-Klasse-II-Moleküle (rechts). Die MHC-Moleküle lassen sich in MHC-Klasse-I (links) und MHC-Klasse-II (rechts) einteilen. Klasse-I-Moleküle bestehen aus der Polypeptidkette $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, die mit der nicht-kovalent assoziierten $\beta 2$ -Mikoglobulin-Kette ($\beta 2m$) verbunden ist. Klasse-II-Moleküle setzten sich aus den beiden Polypeptidketten $\alpha 1$, $\alpha 2$ sowie $\beta 1$, $\beta 2$ zusammen. Die Proteindomänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ (MHC-I) bzw. $\alpha 1$ und $\beta 1$ (MHC-II) bilden die Peptidbindungsspalte für die Antigenpräsentation. Abbildung modifiziert nach Janeway *et al.*¹².

In beiden Klassen bilden die gepaarten Proteindomänen, die am weitesten von der Membran entfernt sind, eine α -Helix/ β -Faltblatt-Superdomäne. Diese Struktur bildet eine Spalte, in der Peptide für die Antigenerkennung durch den TCR präsentiert werden¹⁴. Polymorphe Reste gruppieren sich dabei innerhalb und um die Spalte herum und schaffen die notwendigen Variationen, die für die Bindung unterschiedlichster Peptide benötigt werden^{20,21}. MHC-Moleküle der Klasse II präsentieren klassischerweise Peptide mit einer Länge zwischen 13-17 Aminosäuren, die aus der Proteolyse von extrazellulären Antigenen in endosomalen Kompartimenten entstehen. MHC-Moleküle der Klasse I hingegen präsentieren hauptsächlich Peptide aus 8-10 Aminosäuren, die aus der intrazellulären Degradation von Proteinen im Zytosol stammen¹⁴. T-Zell-Rezeptoren auf CD4⁺-Zellen erkennen Peptide, die durch MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert werden, während TCRs auf CD8⁺-Zellen MHC-Klasse-I-gebundene Peptide erkennen. Der Kontakt zum präsentierten Peptid erfolgt dabei hauptsächlich durch die hypervariable CDR3-Region des TCR, wohingegen der Kontakt zu den MHC-Molekülen durch die CDR1- und CDR2-Regionen vermittelt wird²². Abb. 5 stellt diese Interaktion schematisch dar.



Abb. 5: Darstellung der MHC-Peptid-TCR-Interaktion. Bei der MHC-Peptid-TCR-Interaktion erkennt der TCR einen Komplex aus einem gebundenen Peptid und den MHC-Molekülen **A.** Schematische Darstellung der MHC-Peptid-TCR-Interaktion am Beispiel eines MHC-Klasse-II-Moleküls. APC, antigenpräsentierende Zelle. **B.** Struktur der MHC-Peptid-TCR-Interaktion am Beispiel eines MHC-Klasse-II-Moleküls. Die Domänen des MHC-Moleküls (α 1, α 2, α 3, β 2m) und des TCR (V α , C α , V β , C β) sind markiert. Das durch das MHC-Molekül präsentierte und durch den TCR gebundene Peptid ist gelb markiert (P1-P2). Die hypervariablen Regionen des TCR sind ebenfalls farbig markiert (CDR1, 2α – lila, CDR3 α – gelb, CDR1, 2β – blau, CDR3 β – grün). Abbildungen modifiziert nach Janeway *et al.*¹².

1.1.3. T-Zell-Rezeptor Signaltransduktion

Die genauen molekularen Mechanismen, die der TCR-Peptid-MHC-Ligation folgen, und zu einer Initiierung der Signalkaskade der T-Zell-Immunantwort führen, sind noch immer Diskussionen^{23,24}. unzureichend verstanden und Gegenstand zahlreicher Unterschiedlichste Modelle wurden vorgeschlagen, um die Initiierung der TCR-Aktivierung durch den TCR-Peptid-MHC-Kontakt, das sogenannte TCR triggering, zu erklären. Bei den beiden momentan populärsten Modellen handelt es sich um das Konformationsänderungsmodell, sowie um das Segregationsmodell. Das Konformationsänderungsmodell postuliert, dass die Bindung des Peptid-MHC-Komplexes durch den TCR zu einer Konformationsänderung des TCR führt, die die Initiierung der Signalkaskade auslöst^{25,26}. Das Segregationsmodell schlägt hingegen vor, dass die Initiierung der TCR-Signalkaskade aufgrund einer Partitionierung des TCR in bestimmte Bereiche der Lipidmembran erfolgt. Diese Bereiche sind reich bzw. arm an bestimmten Molekülen, die für die Initiierung und den weiteren Verlauf der Signalkaskade notwendig sind^{2727,28}. Unabhängig von den tatsächlich vorherrschenden Mechanismen beim TCR triggering führt die Erkennung eines passenden Peptid-MHC-Moleküls durch den T-Zell-Rezeptor zu einer Phosphorylierung der ITAM-Motive der TCR-assoziierten CD3γ-, CD3δ-, CD3ε- und ζ-Ketten durch die Tyrosin-Kinase LCK (engl. lymphocyte-specific protein tyrosine kinase). Die Kinase LCK ist mit den zytoplasmatischen Domänen der TCR-Korezeptoren CD4 und CD8 assoziiert, was deren essentielle Rolle für eine optimale Signalübertragung deutlich macht¹². Die Phosphorylierung der ITAMs ermöglicht anschließend die Phosphorylierung und Aktivierung von ZAP70 (ζ-Kette assoziierte Proteinkinase mit einem Gewicht von 70 kDa)²³. Aktiviertes ZAP70 phoshoryliert daraufhin LAT (engl. *linker of activation of T* cells). LAT rekrutiert zahlreiche Signalmoleküle, was zur Entstehung eines Mutliproteinkomplexes namens LAT-Signalosom führt²⁹. Über das LAT-Signalosom werden anschließend drei Hauptsignalwege aktiviert. Diese führen zu einer intrazellulären Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration und zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren NF-ĸB, NFAT. AP-1). Die (u.a. Aktivieruna der Transkriptionsfaktoren bewirkt die Expression spezifischer Effektorproteine (bspw. IL-2, IFN- γ , Perforin), die für eine effiziente Immunantwort notwendig sind²⁴.

1.2. Adoptive T-Zell-Immuntherapie

Das Potential transferierter T-Zellen zur Heilung von Krebs konnte bereits vor über 50 Jahren zum ersten Mal gezeigt werden. Damals konnten Mäuse mit einer Leukämie durch eine allogene Knochenmarkstransplantation geheilt werden³⁰. In den folgenden Jahren wurde deutlich, dass die transplantierten T-Zellen für diesen Erfolg entscheidend waren, da sie in der Lage sind einen graft-versus-leukaemia (Spender-gegen-Leukämie) Effekt zu vermitteln^{31–33}. Der adoptive Transfer von spezifischen T-Zellen gegen Krebsoder Virusantigene konnte daraufhin in den nächsten Jahrzehnten etabliert werden (s. Abb. 6). Seitdem wurden im Zuge der adoptiven T-Zell-Immuntherapie sowohl autologe als auch allogene tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) aus Tumorgewebe, oder virusspezifische T-Zellen aus mononukleären Zellen isoliert, in vitro expandiert und Patienten infundiert^{31,34,35}. Die Funktionalität der Therapie konnte anhand der Bekämpfung des Epstein-Barr-Virus (EBV) und des Cytomegalovirus (CMV) in klinischen Studien gezeigt werden^{36,37}. Auch in der Behandlung von soliden Tumoren, wie dem metastasierenden Melanom, konnte die therapeutische Wirksamkeit demonstriert werden^{38,39}. Ungeachtet dieser Erfolge wurden allerdings auch die Grenzen der adoptiven T-Zell-Immuntherapie deutlich. Das größte Hindernis zeigte sich in der Generierung einer ausreichenden Anzahl spezifischen T-Zellen mit hoher Avidität in

einer mit den klinischen Studien kompatiblen Zeitspanne. Außerdem wiesen nicht alle Melanom-Patienten ausreichend große Tumorläsionen auf, um genügend Ausgangsmaterial für die Zellkultur bereitzustellen. Zusätzlich gelang in nur etwa 50% der Fällen eine erfolgreiche Isolierung von TIL aus diesen Proben^{34,35}. Eine weitere wesentliche Einschränkung war zudem die Schwierigkeit der Isolierung von TIL aus anderen Tumorentitäten³⁵.



Abb. 6: Schematische Darstellung der adoptiven autologen T-Zell-Immuntherapie. TIL werden aus dem Patienten isoliert und kultiviert. Die kultivierten Zellen werden anschließend auf ihre Spezifität gegenüber ausgewählten Antigenen getestet, und die reaktiven Zellen weiter expandiert. Die klonalen antigenspezifischen TIL werden anschließend dem Patienten infundiert.

1.2.1. T-Zell-Rezeptor-Gentherapie

Eine Alternative zur adoptiven T-Zell-Immuntherapie stellt die T-Zell-Rezeptor-Gentherapie dar. Bei der TCR-Gentherapie werden normale periphere T-Zellen der Patienten verwendet. Die Zellen werden mit Hilfe von genetischen Transfervektoren, meist gammaretrovirale oder lentivirale Vektoren (s. 1.2.2), mit den TCRα- und β-Genen aus zuvor identifizierten hochreaktiven tumor- oder virusspezifischen T-Zellen ausgestattet⁴⁰. Die eingebrachten TCR-Ketten sorgen dann für eine Übertragung der in der Ausgangszelle vorhandenen Spezifität auf die T-Lymphozyten des Patienten³¹. Dadurch lassen sich relativ schnell große Mengen antigenspezifischer T-Zellen herstellen. Die genetisch modifizierten Zellen können anschließend dem Patienten infundiert werden. Abb. 7 zeigt den schematischen Ablauf der TCR-Gentherapie.



Abb. 7: Schematische Darstellung der adoptiven TCR-Gentherapie. Bei der TCR-Gentherapie werden T-Zellen aus dem Blut des Patienten isoliert. Diese werden mit zuvor identifizierten und in virale Vektoren klonierten virus- oder tumorspezifischen TCRs transduziert. Die Transduktion führt zu einer Übertragung der TCR-Spezifität auf die T-Zellen des Patienten. Die umprogrammierten T-Zellen werden anschließend dem Patienten infundiert.

Der erste erfolgreiche TCR-Gentransfer in humane T-Lymphozyten erfolgte 1999 mit einem TCR, der für das HLA-A2 restringierte MART-1 Antigen spezifisch war⁴¹. Seitdem haben viele verschiedene wissenschaftliche Experimente gezeigt, dass der Transfer von tumorantigenspezifischen TCRs in T-Lymphozyten zur Generierung von antigenspezifischen T-Zell-Populationen führt. Es konnten bislang u.a. die Spezifitäten gegen meist HLA-A2 restringierte Epitope der Antigene gp-100, NY-ESO-1, CEA, WT1 oder TARP durch TCR-Gentransfer übertragen werden⁴²⁻⁴⁶. Als erste erfolgreiche klinische Studie mit TCR-modifizierten Zellen gilt die Studie durch Morgan et al. aus dem Jahr 2006. Es wurde gezeigt, dass die Infusion von autologen T-Zellen, die mit einem MART-1 antigenspezifischen TCR modifiziert waren, in 2 von 15 (13%) Patienten mit metastasierendem Melanom zu einem klinischen Ansprechen führte. Der Transfer der genetisch modifizierten T-Lymphozyten vermittelte in diesen beiden Patienten, die zuvor auf keine Therapieformen mehr ansprachen, einen kompletten Rückgang der klinischen Krankheitserscheinungen, was einen großen Erfolg darstellte⁴⁷. Zusätzlich zeigte diese Studie die grundsätzliche Eignung dieser Therapieform für Patienten auf, bei denen keine Infusion von TILs möglich ist. In einer weiteren klinischen Studie durch dieselbe Arbeitsgruppe konnte durch die Verwendung eines MART-1 spezifischen TCRs mit verbesserter Affinität und eines anti-gp100-TCR sogar ein klinisches Ansprechen bei 30% (6/20) und 19% (3/16) der Patienten erreicht werden. Allerdings wurden bei diesen Studien neben den erwünschten Effekten auch unerwünschte Nebenwirkungen, die durch die Erkennung des Antigens auf gesundem Gewebe (on-target/off-tumor) hervorgerufen wurden, beobachtet⁴⁴. Weitere klinische Studien konnten in den folgenden Jahren ebenfalls die prinzipielle klinische Anwendbarkeit der TCR-Gentherapie zeigen^{44,48–51}. Robbins et al. erreichten z.B. 2010 ein klinisches Ansprechen bei 65% (4/6, synoviales Sarkom) und 45% (5/11, metastatisches Melanom) der Patienten nach Infusion von autologen NY-ESO-1 antigenspezifischen T-Zellen⁴⁸. Allerdings zeigten sich auch bei einigen dieser Studien Nebenwirkungen, die ebenfalls durch on-target/off-tumor Reaktionen der modifizierten TCRs ausgelöst wurden. Obwohl dieses Nebenwirkungen häufig unterdrückt werden können und z.T. auch reversibel sind, verdeutlichen diese Fälle die Bedeutung der Wahl eines sicheren Zielantigens, das optimalerweise nicht auf gesundem Gewebe exprimiert wird (s. 1.2.3). Des Weiteren zeigte eine Reihe der an den klinischen Studien teilnehmenden Patienten keinerlei klinisches Ansprechen durch die TCR-Gentherapie. Um ein zukünftiges klinisches Ansprechen bei einer größeren Anzahl von Patienten zu erreichen, bedarf es daher, neben der Auswahl von geeigneten Zielantigenen zur Vermeidung von on-target/off-tumor-Toxizitäten, einiger weiterer Optimierungen. Dazu gehören u.a. die Optimierung der Avidität und Affinität der transgenen TCRs, die Verbesserung der Persistenz der Zellen in vivo sowie die Optimierung der Oberflächenexpression der transgenen TCR-Moleküle. Die Optimierung dieser Attribute ist entscheidend für den Erfolg der Gentherapie. Vor allem der Optimierung der Oberflächenexpression der transgenen TCR-Moleküle sollte große Aufmerksamkeit gewidmet werden. Das TCR-Mispairing ist eine der größten Herausforderungen bei der TCR-Gentherapie und der Hauptgrund für die verminderte Oberflächenexpression transgener TCR-Moleküle in primären T-Lymphozyten. Die Transduktion von TCR-Ketten in primäre T-Lymphozyten, die bereits einen endogenen T-Zell-Rezeptor besitzen, kann zu einer falschen Paarung (engl. Mispairing) der exogenen und endogenen TCR-Ketten und somit zu einer Expression von theoretisch vier verschiedenen TCRa/β-Ketten führen (s. Abb. 8). Das Mispairing kann mehrere Konsequenzen haben. In jedem Fall führt es zu einer verminderten Expression des exogenen TCRs und somit zu einer daraus resultierenden geringeren Funktionsfähigkeit der modifizierten Zellen. Zusätzlich kann die Fehlpaarung der TCR-Ketten zur Generierung von potentiell autoreaktiven T-Zellen führen, die im schlimmsten Fall eine letale Spender-gegen-Wirt Krankheit auslösen könnten⁵². Strategien zur Verringerung und im besten Fall zur Vermeindung des TCR-Mispairings sind daher von großer Wichtigkeit^{31,35,53}.



Abb. 8: Schematische Darstellung des TCR-*Mispairings*. Durch die Transduktion von T-Zellen mit exogenen TCRs besteht die Möglichkeit der Paarung der exogenen mit den endogenen TCR-Ketten. Dadurch kann es zur Entstehung von vier verschiedenen TCR-Ketten-Kombinationen kommen. Das *Mispairing* hat einen negativen Einfluss auf die Reaktivität der transduzierten Zellen und kann zu neuen, unerwünschten Antigenspezifitäten einschließlich autoreaktiver TCRs führen.

1.2.2. Retrovirale Vektoren für den Gentransfer

Ein Schlüsselfaktor einer erfolgreichen Gentherapie ist die Entwicklung von Gentransfer-Methoden, die in der Lage sind, einen effizienten Gentransfer in unterschiedliche Zelltypen zu gewährleisten, ohne dabei pathogene Nebeneffekte zu verursachen. Im Laufe der Jahre wurden verschiedenste Verfahren für den Gentransfer entwickelt, die grob in zwei Kategorien eingeteilt werden können: physiko-chemische nicht-virale und virale Methoden⁵⁴. Der Gentransfer mittels nicht-viraler Systeme, zu denen u.a. Liposomen, Nanopartikel oder Polykationen gehören, wird als Transfektion bezeichnet, die als Vorteil generell eine hohe Biosicherheit hat. Gleichzeitig ist die Transfektion jedoch häufig auch mit einer geringen Effektivität assoziiert. Zusätzlich handelt es sich bei der Transfektion meist um einen transienten Gentransfer, der für viele Anwendungen nicht ausreichend ist⁵⁴. Der Transfer genetischen Materials mit Hilfe von viralen Vektoren wird als Transduktion bezeichnet, da er rezeptorvermittelt abläuft. Virale Vektoren sind von natürlich vorkommenden Viren abgeleitet. Sie haben die Fähigkeit, ihre Gene effizient und je nach Virustyp dauerhaft oder transient in das Genom einer Wirtszelle zu integrieren. Die bislang verwendeten viralen Vektoren basieren dabei auf verschiedenen RNA- und DNA-Viren, und können grob in nicht-integrierende und integrierende Vektoren eingeteilt werden. Zu den nicht-integrierenden viralen Vektoren gehören u.a. Vektoren, die auf Adenoviren und Herpes Simplex Viren basieren⁵⁴. Zu den

integrierenden Vektoren gehören die in dieser Arbeit verwendeten retroviralen Vektoren. Die Integration des viralen Genoms in die genomische DNA der Wirtszelle ist ein obligatorischer Schritt im Lebenszyklus von Retroviren⁵⁴.



Abb. 9: Aufbau eines retroviralen Partikels. Das ~100 nm große Viruspartikel ist von einer Lipidmembran umhüllt, in die die viralen Hüllproteine verankert sind. Die Matrixproteine sind von innen an die Hüllmembran angelagert. Das konische Kapsid enthält zwei Kopien des einzelsträngigen viralen RNA-Genoms, die komplexiert mit den Nukleokapsidproteinen vorliegen. Im Kapsid befinden sich zusätzlich die viralen Enzyme und akzessorische Proteine. Abbildung modifiziert nach Modrow *et al.*⁵⁵.

Retroviren wurden erstmals vor ca. 100 Jahren beschrieben⁵⁵. Es handelt sich dabei um eine große Familie umhüllter, ca. 100 nm großer, einzelsträngiger RNA-Viren (s. Abb. 9). Die Familie trägt ihren Namen aufgrund der Fähigkeit, ihr RNA-Genom im Zuge der Infektion mit Hilfe der reversen Transkriptase in doppelsträngige DNA umzuschreiben. Die Familie der Retroviren (Retroviridae) lässt sich in die sieben Gattungen der α -, β -, γ -, δ - und ϵ -Retroviren sowie der Lentiviren und der Spumaviren einteilen. Aufgrund der Genomorganisation unterscheidet man zwischen einfachen und komplexen Retroviren⁵⁶ (s. Abb. 10). Die bekanntesten Vertreter der zu den komplexen Retroviren zählenden Lentiviren sind die humanen Immundefizienz-Viren HIV-1 und HIV-2.

A. Einfaches Retrovirus (z.B. γ-Retrovirus)



B. Komplexes Retrovirus (z.B. Lentivirus)



Abb. 10: Schematische Darstellung der Genomorganisation einfacher und komplexer Retroviren als **Provirus.** Beide Typen von Retroviren sind charakterisiert durch LTR-Sequenzen, die die viralen Gene flankieren. Stromabwärts des 5'-LTR befindet sich das Verpackungssignale Ψ. **A.** Einfache Retroviren, wie bspw. γ-Retroviren, besitzen lediglich die drei kodierenden Gene *gag, pol* und *env*. **B.** Komplexe Retroviren enthalten neben den Genen *gag, pol* und *env* zusätzlich akzessorische Gene. Dargestellt sind die *tat, rev, vif, vpr* und *nef* Proteine des zu den Lentiviren gehörenden HI-Virus. Abbildung modifiziert nach Stripecke *et al.*⁵⁶. Nicht maßstabsgetreu.

Die virale RNA einfacher Retroviren, zu denen u.a. die γ -Retroviren gehören, enthält lediglich die drei essentiellen Gene *gag*, *pol* und *env*. Diese werden von den 5' und 3' vorhandenen langen endständigen Sequenzwiederholungen (LTR, *engl. long terminal repeat*) flankiert. *Gag* kodiert für die Kapsid-, Matrix- und Nukleokapsidproteine. Die notwendigen viralen Enzyme (Protease, reverse Transkriptase, Integrase) werden durch das *pol*-Gen kodiert. Das *env*-Gen kodiert für die viralen Glykoproteine, die durch Bindung an den zellulären Rezeptor den Viruseintritt in die Wirtszelle vermitteln (Abb. 10A). Das Signal für den Zusammenbau der viralen Proteine zu einem Virion wird durch das *cis*-aktive Verpackungssignal Ψ (Psi, engl. *packaging signal*) gegeben, das sich stromabwärts vom 5' LTR befindet. Komplexe Retroviren kodieren darüber hinaus für weitere virale Proteine. Im Falle des Lentivirus HIV sind dies bspw. die sechs viralen Proteine *vif, vpr, vpu, tat, rev,* und *nef* (Abb. 10B)^{54,56}. Abb. 11 zeigt den Verlauf einer retroviralen Infektion am Beispiel eines Lentivirus.



Abb. 11: Retroviraler Replikationszyklus am Beispiel eines Lentivirus. Die Infektion einer Zelle durch ein Retrovirus erfolgt nach Bindung der viralen Hüllproteine durch zelluläre Rezeptoren. Die Bindung löst die Fusion der viralen mit der zellulären Membran aus. Im Zytoplasma erfolgt die reverse Transkription (RT) der viralen RNA in doppelsträngige DNA. Die virale DNA wird anschließend als Präintegrationskomplex aus dem Kapsid durch die Poren des Zellkerns transportiert. Im Zellkern vermittelt die virale Integrase (IN) die Integration der Virus-DNA in die genomische DNA der Zelle. Die integrierte DNA (Provirus) wird durch die RNA-Polymerase II der Zelle transkribiert. Die nachfolgende Prozessierung führt zur Entstehung ungespleißter, einfach gespleißter und mehrfach gespleißter mRNAs. Die im Zytoplasma translatierten viralen Proteine dienen zum einen zur Regulation der Transkription und zum anderen zur Bildung neuer infektiöser Viruspartikel. Die Ausbildung neuer Viruspartikel erfolgt nach Knospung der unreifen Viruspartikel von der Zelloberfläche und Reifung der viralen infektiösen Partikel durch die virale Protease. Abbildung modifiziert nach Modrow *et al.*⁵⁵.

Etwa 70 Jahre nach Beschreibung der Retroviren wurden erstmals von ihnen abgeleitete Vektoren für den Transfer von genetischem Material eingesetzt⁵⁷. Eines der ersten Viren, dessen Genom in seiner Gesamtheit sequenziert und kloniert wurde, und anschließend in einen viralen Vektor umgewandelt wurde, war das zu den einfachen Retroviren gehörende *Moloney murine leukemia virus* (MMLV)⁵⁶. In den darauf folgenden Jahren und Jahrzehnten erfolgten viele Vektormodifikationen, um verschiedenste Aspekte, u.a.

den Titer, die Transduktionseffizienz, die Stabilität der Viruspartikel und v.a. die Sicherheit der Vektoren, zu optimieren. Die Generierung von replikationsinkompetenten Vektoren war dabei ein Schlüsselaspekt der erfolgreichen Entwicklung virusbasierter Transportwerkzeuge⁵⁴. Um diesen Replikationsdefekt zu erreichen, wurden, soweit möglich, die für virale Proteine kodierenden Sequenzen aus dem Vektor entfernt. Die Biosicherheit der Vektoren konnte durch die Entwicklung der sog. SIN-Vektoren (engl. *self-inactivating vectors*) weiter verbessert werden. Diese Vektoren enthalten unterschiedlich lange Deletionen im 3'-LTR.⁵⁸ Während des Prozesses der reversen Transkription wird die Deletion in den 5'-LTR kopiert, wodurch dessen Promotoraktivität beseitigt und das Risiko einer Rekombinationen mit Wildtyp-Viren stark reduziert wird⁵⁸. Um trotz der beschriebenen Entfernung viraler Proteine funktionale Viruspartikel herstellen zu können, die das Transgen der Wahl enthalten, werden die essentiellen viralen Gene in *trans* während der Virusproduktion durch das sogenannte Komplementierunsprinzip von Helferplasmiden bereitgestellt⁵⁸.

Eine weitere Herausforderung bei der Entwicklung von retroviralen Vektoren war die natürlicherweise vorhandene Wirtsspezifität von Retroviren. Diese Herausforderung konnte durch die Pseudotypisierung gelöst werden. Dabei werden bei der Virusproduktion unterschiedliche Hüllproteine anderer Viren verwendet, was die Transduktion vieler verschiedener Zelltypen ermöglicht^{56,59}. In Abb. 12 ist die Transduktion einer Zelle durch einen retroviralen Vektor schematisch dargestellt.



Abb. 12: Schematische Darstellung der Transduktion einer Zelle durch einen retroviralen Vektor. Die ersten Schritte der Transduktion durch den retroviralen Vektor verlaufen analog zu der Infektion durch ein unverändertes Retrovirus (s. Abb. 11). Im Falle des retroviralen Vektors kommt es zur Integration des Vektors inkl. Transgen (z.B. TCR-Gene) in die genomische DNA. Das Transgen wird meist über einen internen Promotor des Vektors transkribiert und im Zytoplasma translatiert. Im Falle der translatierten TCR-Moleküle können diese sich nun mit den CD3-Molekülen verbinden (s. 1.1.1) und an die Oberfläche der T-Zelle gelangen. Je nach verwendetem Transgen können die translatierten Proteine nun ihre Funktion übernehmen. Im Gegensatz zu der Infektion mit einem unveränderten Retrovirus kann es bei der Transduktion von Zellen durch retrovirale Vektoren aufgrund der Entfernung der für die viralen Proteine kodierenden Gene nicht zur Produktion von infektiösen Viruspartikeln kommen. Abb.modifiziert nach Modrow et al.55

1.2.3. Antigene für die TCR-Gentherapie

Für eine zielgerichtete Immuntherapie ist das Wissen um spezifische tumorassoziierte Antigene von grundlegender Bedeutung. In den letzten 20 Jahren wurden mit Hilfe verschiedener Analysemethoden große Fortschritte bei der Identifizierung solcher Antigene gemacht⁶⁰. Sie lassen sich in die Klassen der Differenzierungsantigene, viralen Antigene, mutierten Antigene, überexprimierten Antigene und Cancer-Testis-(CT)Antigene einteilen⁶¹. Für eine Immuntherapie geeignete Tumorantigene sollten dabei spezifisch und stabil vom Tumor exprimiert werden, im besten Fall in gesundem Gewebe nicht exprimiert werden und immunogen sein. Optimalerweise sollten sie für das Überleben der Tumorzelle relevant sein, so dass eine Herabregulierung des Antigens unwahrscheinlich ist. Bei den CT-Antigenen, die vermeintlich alle diese Eigenschaften erfüllen, handelt es sich um aussichtsreiche Zielantigene der Immuntherapie. Die allgemeine Ansicht zum Beginn dieser Dissertation war, dass die CT-Antigene neben der Expression in vielen verschiedenen Tumorentitäten ein sehr eingeschränktes Expressionsmuster auf gesundem Gewebe aufweisen und lediglich in nicht MHCexprimierendem Keimbahngewebe (Hoden, Throphoblast, Plazenta) vorkommen⁶². Bislang konnten über 60 verschiedene zum Teil hochimmunogene CT-Antigene identifiziert werden, die meist auf dem X-Chromosom vorliegen⁶⁶².

1.2.3.1. Das Cancer-Testis-Antigen MAGE-C2 beim Multiplen Myelom

Beim Multiplen Myelom (MM), auch Plasmozytom oder Morbus Kahler genannt, handelt sich um eine klonale maligne Erkrankung ausdifferenzierter Plasmazellen. Diese akkumulieren zu großer Anzahl vorwiegend im Knochenmark und führen zu einer übermäßigen Produktion von abnormalen Antikörpern (M-Protein/Paraprotein)^{63–65}. Die malignen Myelomzellen verdrängen durch ihr starkes Wachstums die normale Hämatopoese, wodurch eine Immundefizienz und Anämie entsteht. Weitere Auswirkungen der Krankheit sind Destruktionen der knöchernen Substanz (Osteoporose, lytische Läsionen), Hyperkalzämie und Schädigungen der Nieren⁶⁶. Das Multiple Myelom ist die am zweithäufigsten auftretende hämatologische Neoplasie mit einer Inzidenz von ca. 4 Erkrankungen/100.000 Menschen im Jahr und betrifft mit einem durchschnittliche Alter von 65-70 Jahren bei Diagnose eher ältere Menschen^{64,65}. Die Prognose ist mit einer durchschnittlichen Lebenserwartung von 3-4 Jahren nach Diagnose sehr schlecht, da es trotz vorhandener Therapiemöglichkeiten, u.a. der hochdosierten Chemotherapie inkl. autologer und allogener Stammzelltransplantation, in nahezu allen Fällen nach einer

vorübergehenden Remission zu einem tödlich verlaufendem Rezidiv kommt⁶⁷⁻⁶⁹. Aufgrund der eingeschränkten Therapiemöglichkeiten werden für das Multiple Myelom daher dringend neue, z.B. immuntherapeutische Ansätze benötigt. Dabei könnte sich z.B. die TCR-Gentherapie mit dem CT-Antigen MAGE-C2 als Zielantigen eignen. Die Eignung anderer CT-Antigene als Zielstruktur in der Gentherapie konnte bereits in vitro und in ersten klinischen Studien für verschiedene Tumorentitäten gezeigt werden^{48,49}. Das 373 Aminosäuren-lange CT-Antigen MAGE-C2 wurde im Jahre 2000 zeitgleich vom Brüsseler und New Yorker Ludwig Institute for Cancer Research entdeckt^{70,71}. Die MAGE-Familie, zu der MAGE-C2 gehört, ist durch das Vorhandensein einer großen zentralen Region, der MAGE homology domain (MHD) charakterisiert, die vermutlich ein wichtiger Ort von Protein-Protein-Interaktionen ist⁷². Die biologische Funktion von MAGE-C2 konnte bislang nicht aufgeklärt werden. Es wird spekuliert, dass es die transkriptionale Regulation beeinflussen könnte⁷². MAGE-C2 wird in signifikanter Weise in vielen unterschiedlichen Tumorentitäten (malignes Melanom, Harnblasen-, Bronchial, Kopf-Hals-, Ösophagus- und Mamma- und hepatozelluläres Karzinom) exprimiert. Beim Multiplen Myelom ist MAGE-C2 mit 56% das am häufigsten exprimierte CT-Antigen⁷³. Die MAGE-C2-Expression im MM weist eine negative Korrelation mit dem Fortschreiten der Krebserkrankung sowie dem Grad der Entdifferenzierung aus⁷⁴. Diese Erkenntnis sowie die Tatsache der fehlenden Therapiemöglichkeiten beim MM macht MAGE-C2 als Zielstruktur für eine mögliche Therapie sehr interessant.

1.3. *Genome Engineering* mit genetisch modifizierten Nukleasen

Das Genome Engineering hat es Wissenschaftlern in den letzten Jahren ermöglicht, nahezu jedes Gen in vielen verschiedenen Zelltypen und Organismen nach Wahl zu manipulieren⁷⁵. Der Kern dieser Technologie basiert auf der Nutzung von gentechnisch veränderten Nukleasen. Diese bestehen aus seguenzspezifischen DNA-Bindemotiven, die mit DNA-unspezifischen Nukleasedomänen fusioniert wurden⁷⁵. Die gentechnisch modifizierten Nukleasen fügen Modifikationen in die Ziel-DNA ein, in dem sie Doppelstrangbrüche (DSB) induzieren, die anschließend durch zelleigene Reparaturmechanismen wieder zusammengefügt werden können. Der eukaryotischen Zelle stehen zur Reparatur von DSB zwei Hauptmechanismen zur Verfügung. Eine Möglichkeit für eine präzise Reparatur des DSB ist die homologe Rekombination (HR). Bei der HR wird eine homologe Sequenz, wie bspw. das Schwester-Chromatid, als Vorlage für eine exakte Kopie verwendet. Der zweite Reparaturmechanismus ist das *Nonhomologues End-Joining* (NHEJ), mit dem die beiden offenen Enden eines DSB ohne Vorlage wieder verbunden werden⁷⁶. Das NHEJ ist ein häufig unpräziser Mechanismus, der zu Insertionen oder Deletionen an der Schnittstelle führen kann. Diese Mutationen können durch Verschiebungen des Leserahmen zu "Missense"und/oder "Nonsense"-Mutationen führen^{76,77}. NHEJ-vermittelte Mutagenese wird daher häufig für die gezielte Disruption (Knockout) von Genen verwendet. Neben der Fusion mit Nukleasedomänen gibt es inzwischen die Möglichkeiten, unterschiedliche Effektordomänen an die DNA-Bindedomäne zu fusionieren, um andere genetische Modifikationen einzufügen. Dazu gehören u.a Transkriptionsaktivatoren oder -repressoren, sequenzspezifische Rekombinasen, Transposasen, Methyltransferasen oder auch Histonacetyltransferasen⁷⁵.

Zum Ausgangszeitpunkt der vorliegenden Dissertation, waren drei unterschiedliche Klassen sequenzspezifischer Nukleasen bekannt: die Zinkfingernukleasen (ZFN), die Meganukleasen, sowie die TAL-Effektor-Nukleasen (TALEN, engl. *Transcription activator-like effector nucleases*)⁷⁶.

Die Zinkfingernukleasen waren die ersten genetisch veränderten sequenzspezifischen Nukleasen, die effizient spezifische Mutationen in das Genom einfügen konnten. Mit Hilfe der ZFN konnte bislang in einer großen Anzahl verschiedener Spezies, u.a. in Ratten⁷⁸, im Mais⁷⁹, im Tabak⁸⁰ und auch in humanen Zellen, sehr effizientes Genome Engineering durchgeführt werden⁷⁶. Das in ZFN verwendete DNA-Bindemotiv ist das Zinkfinger-Motiv Cys2–His2, das häufigste DNA-Bindemotiv in Eukaryoten^{75,76,81}. Ein Zinkfinger besteht aus ca. 30 Aminosäuren und bindet meist über zwei Hystidine und Cysteine ein zentrales Zink-Ion, wodurch eine kompakte und stabile fingerartige Struktur entsteht, welche meist drei Nukleotide der DNA-Helix bindet⁸². Beim Zusammenbau von Zinkfingern zu Zinkfingernukleasen werden in der Regel 3-6 Zinkfinger-Module über Linker-Sequenzen miteinander verbunden. Es werden daher typischerweise 9-18 Nukleotide der DNA erkannt und durch fusionierte Dimere der Nuklease geschnitten. ZFN haben sich als wirkungsvolles Werkzeug für das Genome Engineering erwiesen, allerdings ist die Entwicklung aktiver ZFN schwierig, da ihre Module kontextabhängig funktionieren, d.h. in Abhängigkeit vom benachbarten Zinkfinger unterschiedlich mit der DNA interagieren⁸³. Zudem wurde ZFN-assoziierte Zelltoxizität beobachtet, die durch induzierte DSB außerhalb der Zielsequenz (off-target) entstanden ist^{84,85}.

Eine weitere Gruppe sequenzspezifischer Nukleasen sind die Meganukleasen. Diese von Natur aus hochspezifischen Nukleasen stammen ursprünglich von mobilen Introns ab. Meganukleasen erkennen typischerweise eine DNA-Sequenzlänge von 12-40

Einleitung

Nukleotiden⁷⁷. Ein großer Nachteil der Meganukleasen liegt darin, dass die DNA-Bindedomäne und die Nuklease-Domäne überlappen. Die Protein-DNA-Interaktion ist zudem sehr komplex, so dass die Produktion von Meganukleasen mit neuen Sequenzspezifitäten sehr aufwendig und schwierig ist⁷⁶.

Etwa eineinhalb Jahrzehnte nach der Einführung der ZFN und der Meganukleasen wurde mit den TAL-Effektor Nukleasen (TALENs) eine weitere Alternative für die präzise Modifikation von DNA vorgestellt. Die DNA-Bindedomäne der TAL-Effektoren stammt ursprünglich aus einem Pflanzenpathogen der Gattung Xanthomonas. Während der Infektion werden die TAL-Effektoren vom Bakterium in die Pflanzenzelle eingebracht, binden dort spezifisch an pflanzliche Promotoren und beeinflussen dadurch die Expression verschiedener Gene, was zu einer Verstärkung der pathogenen Virulenz führt. Die natürlichen TALE-Bindedomänen bestehen zumeist aus 13-28 Wiederholungen (Tandem-Repeats) von typischerweise jeweils 34 Aminosäuren⁷⁶ (s. Abb. 13A). Die Sequenz der 34 Aminosäuren ist mit Ausnahme von zwei Aminosäuren hochkonserviert. Lediglich die Aminosäuren an den Positionen 12 und 13, die sogenannten repeat variable di-residues (RVDs), sind variabel. Diese beiden variablen Aminosäuren bestimmen dabei die Spezifität der DNA-Bindung, wobei jedes Repeat typischerweise genau eine Base der DNA-Zielsequenz bindet⁸⁶. Die Aminosäure an Position 12 ist v.a. für die Stabilisierung der Haarnadel-Stuktur des Repeats verantwortlich, während die Aminosäure an Position 13 einen direkten Kontakt zur Base in der großen Furche der DNA ausbildet. Bislang wurden sieben verschiedenen RVDs mit starker Bindung zu den vier DNA-Basen identifiziert. Die RVDs NI, HD, NG, und NN binden jeweils an Adenosin, Cytosin, Thymin und entweder Guanin oder Adenosin. Zusätzlich wurden die zwei weiteren RVDs NH und NK identifiziert, die mit etwas größerer Spezifität aber geringerer Affinität als NN an Guanin binden können. Das RVD NA bindet sowohl an Adenosin, Cytosin, Thymin als auch an Guanin (s. Abb. 13A). Die einzelnen TALE-Repeats können, genau wie bei den Zinkfingern, miteinander verlinkt werden. Die Repeats werden dann mit der katalytischen Domäne eines Typ2-Restriktionsenzyms, meist Fokl, verbunden, das für die Induktion des DSB in der DNA verantwortlich ist. Das Enzym Fokl funktioniert dabei genau wie bei den ZFN als Dimer, so dass zwei TALEN-Moleküle für das Einfügen eines DSB benötigt werden, die in einem bestimmten Abstand auf den gegenläufigen Strängen der DNA binden (Abb. 13B).



Abb. 13: Schematische Darstellung des Aufbaus eines TAL-Effektors. A. Ein TAL-Effektor besteht aus einer DNA-Bindedomäne (farbige Blöcke) und einer Effektordomäne, wie bspw. der Fokl-Nuklease (dunkelgrau). Ein TAL-*Repeat* der Bindedomäne bindet dabei genau eine Base der DNA. Der Protein-DNA-Bindecode, der durch die zwei variablen Positionen (RVDs) im Repeat bestimmt wird, ist ebenfalls dargestellt. **B.** Schematische Darstellung eines TALEN-Paares, das an die DNA gebunden ist. Die Dimerisierung der Fokl-Endonuklease führt zu ihrer Aktivierung und zur Generierung eines Doppelstrangbruches in der DNA. Abbildung modifiziert nach Sanjana et al.⁸⁷.

Es ist ein großer Vorteil der TALEN, dass sie im Gegensatz zu den ZFN kontextunabhängig funktionieren. Sie sind daher wesentlich leichter zu entwickeln. Zudem gibt es keine Beschränkung bei der Auswahl der Ziel-DNA. Darüber hinaus sind inzwischen für den modularen Zusammenbau der TAL-*Repeats* mehrere verschiedene Kits frei erhältlich (Addgene: catalog #100000016, #100000017, and #100000019). TALENs scheinen zudem ein höheres Aktivitätslevel beim Induzieren von DSB sowie ein niedrigeres Zytotoxizitätslevel durch *off-target* Bindungen zu haben⁷⁶.

Aufgrund ihrer vielen Vorteile im Vergleich zu den anderen Gruppen sequenzspezifischer Nukleasen, habe ich mich in der vorliegenden Dissertation für die Arbeit mit den TALE-Nukleasen entschieden. Sie wurden verwendet, um sequenzspezifische DSB innerhalb der konstanten Regionen der humanen TCR-Gene zu induzieren, die zu einem Knockout der endogenen TCR-Moleküle führen sollten.

1.4. Fragestellung und Zielsetzung

In den letzten Jahren konnten sowohl präklinische Modelle als auch klinische Studien zeigen, dass die Umprogrammierung von T-Lymphozyten durch die Transduktion spezifischer TCRs ein effektiver Ansatz für die adoptive TCR-Gentherapie ist. Jedoch sind die Techniken für die Identifikation und Klonierung geeigneter TCRs sowie ihre Transduktion in primäre T-Zellen technisch sehr anspruchvoll und viele Methoden noch nicht ausgereift. Zudem stellt das TCR-*Mispairing*, d.h. die falsche Paarung der transgenen TCR-Ketten mit den komplementären endogenen TCR-Ketten eine große Herausforderung dar. Das *Mispairing* führt zu verminderter Oberflächenexpression und Funktionalität des transgenen TCR und kann zusätzlich zu neuen, potentiell autoreaktiven TCR-Spezifitäten führen.

Ziel dieser Arbeit war daher die Optimierung des TCR-Gentransfers in primären T-Zellen für die adoptive Immuntherapie zu erreichen.

Ein sehr wichtiger Aspekt dieser Therapieform ist die Auswahl eines geeigneten Zielantigens. Dieses sollte u.a. immunogen sein, stabil exprimiert werden und auf gesunden Körperzellen nicht vorkommen. Das CT-Antigen MAGE-C2 ist in dieser Hinsicht eine vielversprechende Zielstruktur beim Multiplen Myelom. Im ersten Abschnitt der Dissertation sollten daher TCRs aus MAGE-C2-spezifischen T-Zellklonen mit optimierten Methoden identifiziert, isoliert und charakterisiert werden.

Im zweiten Teil der Dissertation sollten anhand eines influenzaspezifischen TCR-Modellsystems primär Optimierungen des TCR-Gentransfers erfolgen, die zu einer Verstärkung der Transgenexpression in primären T-Zellen führen. Dafür sollten sowohl an der TCR-Sequenz als auch an dem verwendeten lentiviralen Vektor verschiedene Modifikationen durchgeführt werden.

Im dritten Teil der Dissertation stand die Vermeidung des TCR-*Mispairings* im Vordergrund. Aufgrund der angesprochenen Problematik dieser Fehlpaarungen sind Strategien für ihre Verringerung und bestenfalls kompletten Verhinderung bei der Optimierung des TCR-Gentransfers äußerst wichtig. Um ein *Mispairing* auszuschließen, sollte die Expression der endogenen TCR-Gene durch Genomeditierung mit Hilfe von TALEN-Designernukleasen ausgeschaltet werden. Nach Identifizierung und Klonierung der TALEN, sollten Optimierung von Transportmethoden und Kulturbedingungen für ein effizientes Ausschalten der TCR-Gene sorgen. Anschließend sollte überprüft werden, ob sich die TALEN-modifizierten T-Zellen mit exogenen TCR-Ketten komplett in ihrer Spezifität umprogrammieren lassen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Laborgeräte

Die folgende Liste umfasst alle für die Datenerhebung relevanten Laborgeräte. Alle darüber hinaus verwendeten Laborgeräte, wie bspw. Zentrifugen, Heizblöcke, Pipetten, Thermocycler etc. entsprechen den aktuellen Laborstandards und werden nicht separat aufgelistet.

Anwendung und Gerätebezeichnung	Firma
Durchflusszytometrische Analysen	
LSR Fortessa	BD Biosciences
Laseraustattung: 405-, 488-, 561- und 640 nm	
FACSCanto II	BD Biosciences
Laseraustattung: 407-, 488- und 633 nm	
Zellsortierung	
Laseraustatiung: 407-, 488-, 561- und 633 nm	
Elektroporation von Zellen	
Gene Pulser Xcell Total System	BIO-RAD
Photometrische Auswertung von ELISA Mikrotiterplatten	
Sunrise [™] Basic	Tecan
Auswertung von ELISPOT-Platten	
AID EliSpot Reader classic	Autoimmun Diagnostika
Auswertung der "H-Thymidin Proliferationsassays	
Wallac Victor 1420 Multilabel Plate Reader	Perkin-Elmer
Bestimmung von Nukleinsaurekonzentrationen	
Nanodrop 1000	Thermo Scientific

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Firma
Corex Zentrifugationsröhrchen	Fisher Scientific
Elektroporationsküvetten Plus, BTX (4 mm)	VWR International
ELISA-Platten Microlon (96-Loch)	Greiner-Bio-One
Eppendorf Combitips plus	Eppendorf
FACS Röhrchen (5 ml)	Sarstedt
Falcon Reaktionsgefäße (15-, 50 ml)	BD Falcon
Gewebekulturplatten (96-, 24-, 12-, 6-Loch)	Greiner Bio-One
Kryoröhrchen (1,2 ml)	Thermo Scientific
Mehrzweckgefäß (30 ml)	Greiner Bio-One
Mikroreaktionsgefäße (0,2-, 0,5-, 1,5- 2 ml)	Sarstedt
Nitrozellulose-beschichtete ELISPOT Platten	Millipore, Whatman
Petrischalen für die Molekularbiologie (10 cm)	Greiner Bio-One
Petrischalen für die Zellkultur (10 cm)	Sarstedt
Pipettenspitzen (10-, 20-, 200-, 1000 μl)	Sarstedt / Eppendorf
Serologische Pipetten (2-, 5-, 10-, 25 ml)	BD Falcon
Sterilfilter (0,22-, 0,45 µm)	Millipore, Whatman
Zellkulturplatten für RetroNectin-Transduktionen (24-Loch)	BD Falcon

2.1.3. Kommerzielle Kits

Firma
Miltenyi Biotec
Thermo Scientific
Zeptometrix
eBiosciene
eBiosciene
Mabtech AB
eBiosciene
Qiagen
Peqlab
Life Technologies
Qiagen

RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit Rneasy Mini Kit T7 mScriptTM Standard mRNA Production System

2.1.4. Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Firma
³ H-Thymidin	Hartmann Analytic
6 x DNA Loading Dye	Thermo Scientific
6 x Orange DNA Loading Dye	Thermo Scientific
Adenosintriphosphat (ATP)	Thermo Scientific
Agarose – Ultrapure	Life Technologies
Ampicillin / Kanamycin	Carl Roth
Anti-A,B BioClone	Ortho Clinical Diagnostics
Biocoll Trennlösung (1,077 g/ml)	Biochrom AG
Bovines Serumalbumin (BSA – 7,5%ige Lösung)	Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA)	Thermo Scientific
Chloroquin	Sigma-Aldrich
Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs)	Thermo Scientific
Destilliertes Wasser, Rnase/Dnase-frei	Life Technologies
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Scientific
Dynabeads CD3	Life Technologies
Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28	Life Technologies
Ethanol, absolut reinst	Th. Geyer
Ethidiumbromid	Life Technologies
Fetales Kälberserum (FCS)	Lonza
Flebogamma (5%ige Lösung)	Grifols
Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Scientific
Gene Ruler Low Range DNA Ladder	Thermo Scientific
Glycerol	Sigma-Aldrich
HEPES (1 M)	Gibco
Interleukin-2 (IL-2 / Proleukin / Aldesleukin)	Prometheus
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck
L-Glutamin (200 mM)	Gibco
Natriumpyruvat (100 mM)	Gibco
Oligo(dt) ₁₈ -Primer	Thermo Scientific
Penicillin-Streptomycin	Gibco
Phythämagglutinin (PHA)	Sigma-Aldrich
Polybren	Sigma-Aldrich
RetroNectin	TaKaRa

Thermo Scientific Qiagen Biozym

Rnase AWAY	Thermo Scientific
Streptavidin HRPO	BD Biosciences
TMB Stop Solution	KPL
TMB SureBlue Microwell	KPL
Trypanblau-Lösung (0,4%)	Gibco
Trypsin/EDTA (0,05%)	Gibco
Tween 20	Merck Millipore
β-Mercaptoethanol (50 mM)	Gibco
	1

2.1.5. Medien und Puffer

Bezeichnung	Firma
Agar-Agar Kobe I	Roth
DMEM, High Glucose, GlutaMAX, Pyruvate	Gibco
LB-Medium (Lennox)	Roth
Opti-MEM	Life Technologies
PBS ^{-/-} ohne Ca ^{2+/} Mg ²⁺	Gibco
RPMI 1640, GlutaMAX	Gibco
UltraPure 50 x TAE Puffer	Life Technologies
X-VIVO 10, X-VIVO 15	Lonza
Ready-Set-Go! ELISA-Puffer	
1 x PBS	
+ 0,05% Tween 20	
RetroNectin-Block-Puffer:	
1 x PBS	
+ 2% BSA	
Waschpuffer für Dynabeads:	
1 x PBS	
+ 0,1% BSA	
	ICN Biomedicals
2 x HBS-Puffer:	Roth
42 mM HEPES	Roth
280 mM NaCl	Merck
10 mM KCl ₂	Roth

	1,5 mM Na ₂ HPO ₄	
	11 mM Glukose	
	рН 7,05	
1 x An	nealing-Puffer:	
	10 mM Tris	Merck
	50 mM NaCl	Roth
	1 mM EDTA	Sigma-Aldrich
	рН 7,5 – 8,0	

2.1.6. Bakterienstämme, Zelllinien und primäre Zellen

Bakterienstamm	Firma
Top10 F' chemically competent <i>E.coli</i> One Shot Stbl3 chemically competent <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	Invitrogen Invitrogen
Zelllinie	Referenz
293T Jurkat	ATCC*: CRL-11268 ATCC*: TIB-152
J76	bereitgestellt von Prof. W. Uckert/Berlin
K562	ATCC*: CCL-243
PM1	89
T2	ATCC*: CRL-1992
293T Jurkat J76 K562 PM1 T2	ATCC*: CRL-11268 ATCC*: TIB-152 ⁸⁸ , freundlicherweise bereitgestellt von Prof. W. Uckert/Berlin ATCC*: CCL-243 ⁸⁹ ATCC*: CRL-1992

*American Type Culture Collection, Manassas, USA

Für die Kultivierung der Zellen wurden folgende Medien verwendet:

DMEM, High Glucose, GlutaMAX, Pyruvate

+ 10% FCS

 \rightarrow Dieses Medium wurde zur Kultivierung von 293T-Zellen verwendet.

RPMI 1640, GlutaMAX

+ 10% FCS, + 2% L-Glutamin, + 1% Natriumpyruvate, + 20 mM HEPES

 \rightarrow Dieses Medium wurde für die Kultivierung von Jurkat-, J76-, K562-, PM1-, und T2-Zellen verwendet.

X-VIVO 10 oder X-VIVO 15

- + 10 mM Natriumpyruvate, + 50 μM β-Mercaptoethanol, + 16% autologes Plasma,
- + 100-150 U/ml Interleukin-2
- → Dieses Medium wurde für die Kultivierung von primären T-Zellen verwendet.

2.1.7. Enzyme

Alle Enzyme wurden, soweit nicht anders vermerkt, gemäß Herstellerangaben und mit den mitgelieferten Puffern verwendet.

Bezeichnung	Firma
Dream Taq (Green) DNA Polymerase	Thermo Scientific
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Thermo Scientific
Herculase II Fusion DNA Polymerase	Agilent Technologies
Klenow-Fragment	Thermo Scientific
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Scientific
PlasmidSafe ATP-dependent Dnase	Epicentre
RiboLock Rnase Inhibitor	Thermo Scientific
T4 DNA Ligase	Thermo Scientific
T4 Polynucleotide Kinase	Thermo Scientific
T4 RNA Ligase	Thermo Scientific
T7 DNA Ligase	Enzymatics
T7 Endonuklease I	New England Biolabs
Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP), 10 U/µI	Biozym

2.1.7.1. Restriktionsenzyme

Bezeichnung	Firma
Afel (Eco47III)	Thermo Scientific
BamHI	Thermo Scientific
BgIII	Thermo Scientific
Bsal-HF [™]	New England Biolabs
BsiWI	Thermo Scientific
BsmBI (Bsp3I)	Thermo Scientific
BsrGl	Thermo Scientific
BstBl	Thermo Scientific
EcoRI	Thermo Scientific
HindIII	Thermo Scientific
Nhel	Thermo Scientific
-------	-------------------
Pstl	Thermo Scientific
Spel	Thermo Scientific
Xbal	Thermo Scientific
AsiSI	Thermo Scientific
Notl	Thermo Scientific

2.1.8. Plasmide

Bezeichnung	Referenz
LeGO-G2	90
LeGO-iG2	90
LeGO-iS2	90
LeGO-iTALEN-iG2-p(A)	91
MP91-wPRE-LMO2	92
pcDNA3.MLVgp	93
phCMV-GALV-C4070A	zur Verfüung gestellt von Dr. Carol Stocking, Heinrich-Pette-Insitut, Hamburg
phCMV-VSV-G	94
pHD_v2	87
pJET1.2/blunt	Thermo Scientific
pMDLg/pRRE	58
pMDLg/pRRE_ΔRT	91
pNG_v2	87
pNI_v2	87
pNN_v2	87
pRSV-Rev	58
pTALEN_v2 (HD)	87
pTALEN_v2 (NG)	87
pTALEN-TF	87

2.1.9. Oligonukleotide

Die folgende Liste führt die verwendeten Oligonukleotide in 5' \rightarrow 3' Orientierung. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert.

Bez.	Name und Sequenz	Quelle
Primer m	it interner Nummer:	
5	5'RACEouter-For	Ambion

	GCTGATGGCGATGAATGAACACTG	
6	5'RACEinner-For	Ambion
	CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG	
7	CaUTR-Rev	
	GGGAGCACAGGCTGTCTTACA	
8	CaCDSende-Rev	
	CGAGCGGCCGCTCAGCTGGACCACAGCCGCAGCGTCATG	
10	Cβ1+2inner-Rev	
	CGAGCGGCCGCGCAGTATCTGGAGTCATTGAGGG	
24	TRBV19*01 – BsiWI – F	
	GTCCGTACGATGAGCAACCAGGTGCTCT	
58	5'RACEinnerF	
	GAACACTGCGTTTGCTGGCTTTG	
60	Cb1_innerR	
	TCAGAAATCCTTTCTCTTGACCATGG	
62	Cb2_innerR	
	CTAGCCTCTGGAATCCTTTCTCTTGAC	
63	Ca_innerR	
	TCAGCTGGACCACAGCCGCAG	
73	B2AA-TRBC1-Rev	
	GTCGCCGGCCTGCTTCAGCAGGCTGAAGTTGGTGGCGCCGCTGCCGA AATCCTTTCTCTTGACCATGGCCATCAA	
74	B2AA-TRBC2-Rev GTCGCCGGCCTGCTTCAGCAGGCTGAAGTTGGTGGCGCCGCTGCCGC CTCTGGAATCCTTTCTCTTGACCATGGC	
75	Flu-V17-2A-A-F	
	CTGCTGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGACCGATGGA AACTCTCCTGGGAGTGTC	
76	AF16+-V2-2A-A-F	
	CTGCTGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGACCGATGGC TTTGCAGAGCACTCTGGG	
77	AF21V26.1-2A-AF CTGCTGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGACCGATGAG GCTGGTGGCAAGAGTAAC	
78	AP11V12.2-2A-AF CTGCTGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGACCGATGAA ATCCTTGAGAGTTTTACTAGTG	
79	IE-V8.1-2A-A-F CTGCTGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGACCGATGCT CCTGTTGCTCATACCAGTGC	
81	AF16V5.6-ASI-B-F	
	GCTATGCGATCGCACCATGGGCCCCGGGCTCCTCTG	
82	AF21BV2-ASI-B-F	
	GCTATGCGATCGCACCATGGATACCTGGCTCGTATGCTG	

83	AP11BV7.7-ASI-BF
	GCTATGCGATCGCACCATGGGTACCAGTCTCCTATGCTG
85	AV17-ASISI-Koz_F
	GCTATGCGATCGCGCCACCATGGAAACTCTCCTGGGAGTGTCTTTGG
86	BV19-ASISI-Koz_F
	GCTATGCGATCGCGCCACCATGAGCAACCAGGTGCTCTGCTG
99	MPSV-U3-For
	AATGAAAGACCCCACCTGTAGGTTTGGC
100	MPSV-Rregion-Rev
	AGGGATCCGGGCGACTCAGTCAATCGGAGGACTG
101	TRBV19-Vregion-R
	CTGAACAGGTACTTCGGGGACTGAGTGA
102	MCS_for
	CCGGATCCGCTAGCGATCGCACTTTCGAAGCGTACGACCTCGAGCGC GGCCGCGT
103	MCS_rev
	ACGCGGCCGCGCTCGAGGTCGTACGCTTCGAAAGTGCGATCGCTAGC GGATCCGG
113	hAlpha-Cys-for
	GATGTGTATATCACAGACAAATGCGTGCTAGACATGAGGTCTA
114	hBETA-Cys-rev
	TGAGGGGCTGCGGGTCTGTGCAGACCCCACTGTGCACCTCC
123	TLN-2A+MCS-F
	GAACTAGTCTCGAGGGATCCTTCGAAGGCAGCGGCGCCACCAACTTCA GCCTGCTGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGACCGC GTACGTGTACATCG
124	TLN-2A+MCS-R
	CGATGTACACGTACGCGGTCCGGGGGTTCTCCTCCACGTCGCCGGCCT GCTTCAGCAGGCTGAAGTTGGTGGCGCCGCTGCCTTCGAAGGATCCCT CGAGACTAGTTC
127	BamHI-NLS-F
	GTAGGATCCGCCACCATGGACTATAAGGACCACGACGGAGACTAC
128	BsiWI-NLS-F
	CTACGTACGGGATCCGCCACCATGGACTATAAGGACCACGACGGAGAC
129	Fok-NoSt-BstBI-R
	AGTTCGAATGAGCGGAAATTGATCTCGCCATTGTT
130	FokStop-BsrGI-R
	ACGTGTACATTATGAGCGGAAATTGATCTCGCCATTGTT

Primer für die Konstruktion und Überprüfung der TALE-Nukleasen:

Ex-F1	TGCGTCCGTCTCCGAACCTTAAACCGGCCAACATACCGGTCTCCTGAC	87
	CCCAGAGCAGGTCGTG	

Ex-F2	TGCGTCCGTCTCCGAACCTTAAACCGGCCAACATACCGGTCTCGACTT ACACCCGAACAAGTCGTGGCA ATTGCGAGC	87
Ex-F3	TGCGTCCGTCTCCGAACCTTAAACCGGCCAACATACCGGTCTCGCGGC CTCACCCCAGAGCAGGTCG	87
Ex-F4	TGCGTCCGTCTCCGAACCTTAAACCGGCCAACATACCGGTCTCGTGGG CTCACCCCAGAGCAGGTCG	87
Ex-R1	GCTGACCGTCTCCGTTCAGTCTGTCTTTCCCCTTTCCGGTCTCTAAGTC CGTGCGCTTGGCAC	87
Ex-R2	GCTGACCGTCTCCGTTCAGTCTGTCTTTCCCCTTTCCGGTCTCAGCCGT GCGCTTGGCACAG	87
Ex-R3	GCTGACCGTCTCCGTTCAGTCTGTCTTTCCCCTTTCCGGTCTCTCCCAT GGGCCTGACATAACACAGGCAG CAACCTCTG	87
Ex-R4	GCTGACCGTCTCCGTTCAGTCTGTCTTTCCCCTTTCCGGTCTCTGAGTC CGTGCGCTTGGCAC	87
In-F2	CTTGTTATGGACGAGTTGCCCGTCTCGTACGCCAGAGCAGGTCGTGGC	87
In-F3	CCAAAGATTCAACCGTCCTGCGTCTCGAACCCCAGAGCAGGTCGTG	87
In-F4	TATTCATGCTTGGACGGACTCGTCTCGGTTGACCCCAGAGCAGGTCGT G	87
In-F5	GTCCTAGTGAGGAATACCGGCGTCTCGCCTGACCCCAGAGCAGGTCGT G	87
In-F6	TTCCTTGATACCGTAGCTCGCGTCTCGGACACCAGAGCAGGTCGTGGC	87
In-R1	TCTTATCGGTGCTTCGTTCTCGTCTCCCGTAAGTCCGTGCGCTTGGCAC	87
In-R2	CGTTTCTTTCCGGTCGTTAGCGTCTCTGGTTAGTCCGTGCGCTTGGCAC	87
In-R3	TGAGCCTTATGATTTCCCGTCGTCTCTCAACCCGTGCGCTTGGCACAG	87
In-R4	AGTCTGTCTTTCCCCTTTCCCGTCTCTCAGGCCGTGCGCTTGGCACAG	87
In-R5	CCGAAGAATCGCAGATCCTACGTCTCTTGTCAGTCCGTGCGCTTGGCA C	87
Hex-F	CTTAAACCGGCCAACATACC	87
Hex-R	AGTCTGTCTTTCCCCTTTCC	87
TALE- Seq- F1	CCAGTTGCTGAAGATCGCGAAGC	87
TALE- Seq- F2	ACTTACACCCGAACAAGTCG	87
TALE- Seq- R1	TGCCACTCGATGTGATGTCCTC	87

Sonstige Primer:

pJET1.2-F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Thermo Scientific
pJET1.2-R	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	Thermo Scientific
u62	GGTCTAGACCAAAGAAGAAGCGGAAGG	91
u63	TAGCGGCCGCTTATGAGCGGAAATTG	91
RACE RNA Anker	GCUGAUGGCGAUGAAUGAACACUGCGUUUGCUGGCUUUG AUGAAA	Ambion

2.1.10. Antikörper

Antigen	Klon	Fluorochom	Firma
CD2 CD3	RPA-2.10 BW264/56	PE FITC / APC	BD Miltenyi
CD4	L120	FITC	BD
CD8	RPA-T8	APC	BD
CD28	15E8	APC	Miltenyi
CD45	J33	FITC	IOTest
TCR	BW242/412	PE	Miltenyi

2.1.11. Peptide und Tetramere

Name	AS-Sequenz	Firma
Influenza Matrixprotein (Flu-M)	GILGFVFTL (58–66)	Bio-Synthesis
Influenza A Nucleoprotein (Flu-NP)	FWRGENGRKTRIAYERMCNILKGK (206–229)	Iris Biotech
SSX-2 Peptid	FGRLQGISPKIMPKKPAEEG (101–120)	Iris Biotech
HLA-A2 Flu-Tetramer	spezifisch für Flu-M (58–66)	Ludwig Institute

2.1.12. Software

Name	Firma / Urheberrecht
Adobe Photoshop CS2 BD FACSDiva v6.2	Adobe BD Bioscience
BioEdit v7.0	Tom Hall
EliSpot4.0	Autoimmun Diagnostika
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc.
Magellan 5	Tecan
Office Excel 2003	Microsoft Corporation
pDraw32	ACACLONE software

2.2. Molekularbiologische Methoden

Die im Folgenden beschriebenen molekularbiologischen Methoden wurden in Sicherheitslaboren der Stufe S2 mit den unter 2.1 aufgeführten Materialien durchgeführt.

2.2.1. Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren anhand ihrer Fragmentgröße wurde die Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Alle Gele wurden in TAE-Puffer angesetzt. Je nach Fragmentgröße wurden die Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,8% - 4% angesetzt. Das für die Elektrophorese verwendete elektrische Feld hatte eine Stärke von ca. 10 V/cm. Zur Darstellung der Nukleinsäuren wurden die Gele mit Ethidiumbromid gefärbt (~ 20 µg/50 ml) und unter UV-Licht im Transilluminator visualisiert.

2.2.2. Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren (DNA und RNA) erfolgte spektralphotometrisch, basierend auf dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm. Die Messung erfolgte mit Hilfe des Nanodrop 1000 gemäß Herstellerangaben.

2.2.3. Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA (pDNA) aus Bakterienkulturen erfolgte je nach Maßstab mit unterschiedlichen Kits. Plasmidpräparation im analytischen Maßstab (~ 20 μ g) wurden mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit durchgeführt. Für präparative Plasmidisolationen (~ 500 μ g) wurde sowohl das PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit sowie das QIAGEN Plasmid Maxi Kit verwendet. Alle Kits wurden den Herstellerangaben entsprechend verwendet.

2.2.4. Isolierung von genomischer DNA

Die Isolierung von genomischer DNA (gDNA) aus primären Zellen und Zelllinien erfolgte mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit gemäß Herstellerangaben.

2.2.5. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Zur Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurde das peqGOLD Gel Extraction Kit oder das QIAquick Gel Extraction Kit verwendet. Bei geringen DNA-Mengen wurde das MinElute Gel Extraction Kit verwendet, bei dem ein kleines Elutionsvolumen von 10 µl verwendet werden kann. Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus PCR- oder Restriktionsansätzen wurde das QIAquick 96 PCR Purification Kit verwendet. Alle Kits wurden gemäß Herstellerangaben eingesetzt.

2.2.6. Verwendung von Restriktionsenzymen

Restriktionsenzyme wurden bei der Herstellung von DNA-Fragmenten für Klonierungen, sowie für die Überprüfung von Klonierungsprodukten verwendet. Je nach Verwendungszweck wurden $0,5 - 4 \mu g$ DNA mit 1 U/ μg Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 20 – 50 μ l versetzt und bei 37°C für 20 min – 2 h inkubiert.

2.2.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Polymerase-Kettenreaktionen⁹⁵ erfolgten entweder mit der DreamTaq DNA Polymerase oder mit der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase gemäß Herstellerangaben. Die DreamTaq Polymerase wurde für analytische PCR-Reaktionen verwendet, während die Phusion Polymerase aufgrund ihrer sehr viel geringeren Fehlerrate zur Amplifikation von präparativen PCR-Produkten eingesetzt wurde. Bei schwierigen oder sehr langen Templates wurde dabei der GC-Puffer (+DMSO) gegen den üblicherweise verwendeten HF-Puffer ausgetauscht. Die Annealing-Temperatur wurde ca. 4°C unterhalb des Primerschmelzpunktes gewählt. Je nach Verwendungszweck wurden positive PCR-Produkte per Agarosegelelektrophorese (2.2.1) überprüft und per Gelelution oder PCR Purification Kit (2.2.5) aufgereinigt.

2.2.7.1. Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR diente zur schnellen Analyse von Bakterienkolonien auf die Präsenz rekombinanter Plasmide. Die Bakterienkolonie dient dabei direkt als *Template* in der PCR. Sie wurde mit einer sterilen Pipettenspitze zuerst in den vorbereiteten PCR-Ansatz getaucht und anschließend für die spätere Kutivierung in vorgelegtes LB_{AMP} überführt. Die Kolonie-PCR wurde mit Plasmid-spezifischen Primern und der DreamTaq DNA Polymerase gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Abweichend zu einer Standard-PCR wurde die initiale Denaturierung auf 3 min verlängert, um ein vollständiges Aufschließen der Bakterienkolonien zu gewährleisten. Bakterienkolonien, die ein positives PCR-Produkte zeigten, wurden anschließend einer Plasmidpräparation (2.2.3) unterzogen.

2.2.7.2. nested-PCR

Die *nested*-PCR wurde für die Identifikation von T-Zell-Rezeptor-Ketten verwendet (s. 2.2.12). Bei der *nested*-PCR handelt es sich um zwei aufeinanderfolgende, verschachtelte PCR-Reaktionen. Sie eignet sich aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Spezifität besonders gut zur Amplifikation von DNA, die nur in sehr geringer Konzentration in der Ausgangsprobenmenge vorhanden ist. Bei der ersten *nested*-PCR-Reaktion handelt es sich um eine Standard-PCR. Das Produkt aus der ersten PCR dient in der zweiten PCR anschließend als Template und wird über Primer, die innerhalb des Templates binden, mit sehr hoher Spezifität, amplifiziert.

2.2.7.3. Overlap Extension PCR

Um die Expression der unter 2.2.12 identifizierten TCR-Ketten in äquimolaren Mengen und von nur einem Plasmid aus zu ermöglichen, wurden die Alpha- (α) und Beta- (β) Ketten über die 2A-Sequenz des porzinen Teschovirus 1 verbunden. Der Zusammenbau der TCR-Ketten und der 2A-Sequenz erfolgte per Overlap-Extension PCR. Diese Methode ermöglichte es, ohne Restriktionsschnittstellen kleinere DNA-Fragmente zwischen größere einzusetzen. Im ersten Schritt erfolgte die Fusion der überlappenden 2A-Sequenz an das jeweils zu verbindende Ende der TCR-Ketten per Standard-PCR. Das Design der in dieser Reaktion verwendeten Primer berücksichtigte, dass das Stopkodon des Gens vor der 2A-Sequenz in der PCR entfernt wurde, um eine Kotranslation des zweiten Gens hinter der 2A-Sequenz zu ermöglichen. Im zweiten Schritt erfolgte die Verbindung der im ersten Schritt hergestellten Fragmente über die komplementären Bereiche der 2A-Sequenz. Abschließend wurde das komplette Beta-2A-Alpha-Konstrukt über eine weitere Standard-PCR amplifiziert

2.2.7.4. Megaprimer-PCR

Für die Entstehung einer weiteren Disulfidbrücke zwischen den konstanten Regionen der TCRα- und β-Ketten wurden in diese Punktmutationen über zwei Megaprimer-PCRs eingefügt. Die Orte der Punktmutationen wurden in Anlehnung an Cohen *et al.*⁹⁶ gewählt. Die Mutation wird im ersten Schritt über ein Oligonukleotid, das als Primer dient, eingefügt. Das so mutierte PCR-Produkt dient im zweiten Schritt als sog. Megaprimer und wird zur Amplifikation des Volllängen-Gens eingesetzt. Da als Template ein TCR diente, dessen TCR-Ketten über eine 2A-Sequenz miteinander verbunden waren, waren in diesem Fall zwei aufeinanderfolgende Megaprimer-Reaktionen notwendig, um die beiden Punktmutationen in die Alpha- sowie in die Beta-Kette einzufügen. Im ersten Schritt wurden zwei Megaprimer hergestellt, die jeweils die Mutationen in der konstanten Region trugen. Nach erfolgreichem Einfügen der ersten Mutation über die erste Megaprimer-PCR, diente das Produkt als Template für das Einfügen der zweiten Punktmutation, bei dem der zweite Megaprimer zum Einsatz kam.

2.2.8. Transformation von Plasmid-DNA

Die Transformation von pDNA erfolgte mit Hilfe der CaCl₂-Methode in chemische kompetente Top 10 F' *E. coli*-Bakterien. 100 µl Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit ~100 ng pDNA versetzt. Der Bakterien/DNA-Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert, für ca. 60 s einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen und erneut kurz auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 900 µl LB-Medium und eine 40-minütige Inkubation bei 37°C. Zur Selektion der transformier ten Bakterien wurden dann 50 – 100 µl des Transformationsansatzes auf Agarplatten bzw. in flüssiges LB-Medium inkl. Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin) überführt. Die folgende Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

2.2.9. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten zur Herstellung neuer Plasmidvarianten erfolgte gemäß Herstellerangaben mit Hilfe der T4 DNA Ligase. Die Ligationsreaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10 µl bei RT für 3-5 h bzw. bei 16°C ü.N. Es wurden ca. 100 ng des Plasmids pro Ligationsansatz verwendet. Bei *sticky-end*-Ligationen wurde das Insert in vierfachem molaren Überschuss, bei *blunt-end*-Ligationen in sechsfachem

molaren Überschuss eingesetzt. Nach der Ligation erfolgte die Transformation des kompletten Ligationsansatzes in chemisch kompetente Bakterien (s. 2.2.8)

2.2.10. Subklonierung von PCR-Produkten

Eine Subklonierung von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe des CloneJet PCR Cloning Kits in den Vektor pJET1.2/blunt gemäß Herstellerangaben. Bei diesem Klonierungssystem handelt es sich um ein hocheffizientes positives Selektionssystem, bei dem aufgrund eines letalen Restriktionsenzyms nur Bakterien mit rekombinanten Plasmiden anwachsen können, wodurch das spätere Screening stark erleichtert wird.

2.2.11. Sequenzierungen

DNA-Sequenzierungen wurden von den Firmen Eurofins MWG Operon und Seqlab durchgeführt. Für die Sequenzierungsreaktionen wurden 600 – 700 ng Plasmid und 20 pmol des gewünschten Sequenzierungsprimers in einem Endvolumen von 7 µl benötigt. Die Auswertung der Sequenzierergebnisse erfolgte mit Hilfe der Basic Local Alignment Search-(BLAST)-Programme des National Center for Biotechnology Information (NCBI- https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) und mit Hilfe der Software BioEdit.

2.2.12. Identifizierung von T-Zell-Rezeptor-Ketten

Die Identifikation von TCR-Ketten aus primären Einzelzellklonen oder aus *Bulk*-Kulturen erfolgte mit Hilfe einer modifizierten RLM-RACE (*RNA Ligase mediated Rapid amplification of cDNA ends*) PCR. Diese Methode ermöglicht die Identifikation von kompletten, d.h. Volllängengenen, von denen zuvor nur ein kurzer Bereich bekannt ist. Abb. 15 gibt einen schematischen Überblick über den Versuchsablauf zur Identifikation der TCR-Ketten.

mRNA-Isolierung

Zunächst wurde die mRNA der Einzelzellklone bzw. Bulk-Kulturen isoliert. Die Isolation erfolgte mit Hilfe des µMacs mRNA Isolation Kits gemäß Herstellerangaben. Isolierte mRNA wurde entweder direkt verwendet oder in Aliquots bei -80°C bis zur späteren Verwendung gelagert.

RLM Race-Reaktionen

Bei der RLM Race-Reaktion erfolgte zu Anfang eine Behandlung der mRNA mit der Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP). Diese löst die Triphosphatbindung der Cap-Struktur und entfernt diese von intakten mRNAs. An die dabei entstandenen freien Phosphatenden wurde anschließend der RNA-Anker mit bekannter Sequenz ligiert. Die folgende cDNA Synthese wurde mit Hilfe des RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit und Oligo(dt)₁₈-Primern nach Herstellerangaben durchgeführt.

Nested-PCR

Für die Identifikation der spezifischen TCR-Sequenzen aus der gesamten Menge von mRNAs wurde eine *nested*-PCR (2.2.7.2) durchgeführt. Dabei wurden die Produkte der ersten PCR per Agarosegelelektrophorese aufgereinigt. Wie zu erwarten, waren nach der ersten PCR keine Banden auf dem Agarosegel sichtbar, so dass Gelfragmente der erwarteten Höhe (~ 1000 bp für die Alpha-Kette, ~ 1100 bp für die Beta-Kette) anhand des Größenstandards herausgeschnitten wurden. Die aufgereinigten DNA-Fragmente dienten anschließend als Matrize für die verschachtelte zweite PCR. Die Produkte der *nested*-PCR wurden erneut per Gelelektrophorese (2.2.1) aufgetrennt und die sichtbaren DNA-Fragmente aus dem Gel eluiert.

Subklonierung der PCR-Produkte

Die Subklonierung der eluierten PCR-Produkte erfolgte mit dem CloneJet PCR Cloning Kit in den Vektor pJET1.2/blunt (s. 2.2.10).

Screening und Sequenzierungen der Plasmide

Das Screening der gewachsenen Bakterienkolonien erfolgte per Kolonie-PCR (2.2.7.1). Kolonien, die ein PCR-Produkt der erwarteten Größe zeigten, wurden ü.N. in LB_{AMP} kultiviert und anschließend einer Plasmidpräparation unterzogen. Die klonierten DNA-Fragmente der isolierten Plasmide wurden per Sequenzierung mit dem Primer pJET1.2-R identifiziert. Für jede α - bzw. β -Kette wurden mind. 10 verschiedene Plasmide sequenziert um einen Rückschluss auf die Klonalität der TCR-Ketten zu erhalten. Bei einem heterogenen Sequenzierungsbild wurden weitere Klone sequenziert. Die erhaltenen TCR-Sequenzen wurden mit Hilfe der IMGT-Datenbank (http://www.imgt.org) analysiert.

2.2.13. Identifizierung und Klonierung von TALE-Nukleasen

Bei transcription activator-like effectors (TALE) handelt es sich um natürlich vorkommende DNA-Bindeproteine aus dem Pflanzenpathogen Xanthomonas sp., die die Transkription von Wirtsgenen für die bakterielle Besiedelung beeinflussen. Die DNA-Bindeproteine lassen sich u.a. mit der katalytischen Domäne der Endonuklease Fokl fusionieren und können somit als spezifische Werkzeuge bei der Genommodifizierung genutzt werden. Die so entstandenen TALE-Nukleasen (TALENs, transcription activatorlike effector nucleases) können spezifisch an ihre DNA-Sequenzmotive binden und über die Fokl-Nuklease-Domäne Doppelstrangbrüche induzieren, die zu Gendisruptionen (Knockout) führen können (s. 1.3). Um einen Knockout des TCR-Locus zu erreichen, wurden TALENs kloniert, die spezifisch in den konstanten Bereichen der TCRα- und β-Ketten binden und schneiden. Die Identifizierung dieser TALE-Sequenzen erfolgte mit Hilfe des TALE Sequence Generators 2.0⁹⁷. Um mögliche Off-Targets der ausgewählten TALE-Nukleasen zu identifizieren, wurde anschließend der Paired Target Finder⁹⁷ verwendet. Die Klonierung der ausgewählten TCR-spezifischen TALEN erfolgte anschließend nach dem Protokoll von Sanjana et al. 2012. Kurz zusammengefasst, wurde zunächst eine Monomer-Bibliothek hergestellt, in der jedes Monomer einen spezifischen Ligationsadapter erhält, der die Position des Monomers im späteren TALE-Tandemrepeat spezifiziert. Für die ausgewählten TCR-spezifischen TALEN-Konstrukte wurden anschließend die gewünschten Monomere zunächst als Hexamere per Golden-Gate-Ligation zusammengefügt und per PCR amplifiziert. In einer zweiten Golden-Gate-Ligation wurden daraufhin die 3 Hexamere in den TALEN-Klonierungsvektor ligiert. Die richtige Länge des TALEN-Zusammenbaus wurde per Kolonie-PCR (2.2.7.1) überprüft. Die Korrektheit der TALEN-Sequenz wurde per Sequenzierung (2.2.11) verifiziert.

2.2.14. In vitro-Transkription von mRNA

Die *in vitro*-Transkription von mRNA erfolgte mit dem T7 mScriptTM Standard mRNA Production System gemäß Herstellerangaben. Für die notwendigen Aufreinigungsschritte wurde das Rneasy Kit (Protokoll: RNA clean up) nach Herstellerangaben verwendet. Die notwendige Linearisierung der Plasmide im Vorfeld des Versuches erfolgte für die TALEN-Konstrukte durch die Inkubation mit dem Restriktionsenzym BgIII. Das Plasmid pJET-T7-eGFP wurde durch HindIII linearisiert. Nach der Restriktion wurden die Plasmide mit Hilfe des PCR Purification Kits aufgereinigt (2.2.5).

2.2.15. Endonukleaseassay

Um den Anteil der TALEN-vermittelten modifizierten DNA auf genomischer Ebene zu bestimmen, diente der Endonukleaseassay. Dabei wurde zuerst die gDNA von behandelten Zellen isoliert (s. 2.2.4) und per PCR (s. 2.2.7) die modifizierten Bereiche des Gens amplifiziert. Die PCR wurde gelelektrophoretisch (s.2.2.1) auf das Vorhandensein von nur einem PCR-Produkt überprüft und per PCR Purification Kit aufgereinigt (2.2.5). 150 ng des PCR-Produktes wurden bei 98°C für 10 min denaturiert und anschließend wieder auf RT abgekühlt. Bei der Abkühlung entstehen dabei sog. Heteroduplexe, d.h. Mismatch-Paarungen von TCR-TALEN modifizierten mit unmodifizierten DNA-Strängen. Diese Heteroduplexe werden von mismatch-sensitiven Endonukleasen erkannt und geschnitten. Dafür wurden nach dem Reannealing 10 U T7 Endonuklease zu der DNA gegeben und bei 37°C für 30 min inkubiert. Das Produkt wurde anschließend erneut gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.16. Hybridisierung von Oligonukleotiden

Zur Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide wurden jeweils 200 µM der Oligonukleotide mit 1 x Annealing-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde 4 min bei 94°C im Heizblock erhitzt und anschließend durch das Ausschalten des Heizblockes langsam auf RT abgekühlt. Die erfolgreiche Hybridisierung wurde per Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.2.17. Modifikationen von DNA-Enden für Klonierungen

2.2.17.1. Auffüllen von 5'-Überhängen mit dem Klenow Fragment

Zum Auffüllen von 5'-Überhängen wurde das Klenow Fragment nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.17.2. Phosphorylierung von 5'-DNA-Enden

Die 5'-DNA-Enden von hybridisierten Oligonukleotiden mussten, wenn sie nicht mit Restriktionsenzymen behandelt wurden, für eine Ligation in dephosphorylierte Vektoren zuerst phosphoryliert werden. Hierfür wurde die T4 Polynukleotidkinase gemäß Herstellerangaben verwendet.

2.2.17.3. Dephosphorylierung von 5'-Phosphatresten

Um bei Klonierungen eine Selbstligation der pDNA zu vermeiden, wurden die während des Restriktionsverdaus entstehenden 5' Phosphatreste der Plasmide mit der FastAP Thermosensitiven Alkalischen Phosphatase nach Herstellerangaben entfernt. Nach der Reaktion erfolgte die Aufreinigung der Produkte (2.2.5).

2.2.18. Klonierungsstrategien

Die Klonierungsstrategien der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sind nachfolgend aufgeführt. Für einen optimalen Start der Translation wurde in der Regel bei den Konstrukten die Kozak-Sequenz "GCCACC" vor das Startkodon eingefügt. Alle fertigen Vektorkonstrukte wurden zunächst per Restriktionsanalyse (2.2.6) überprüft und anschließend die korrekte Sequenz zusätzlich per Sequenzierung (2.2.11) verifiziert.

2.2.18.1. LeGO-iG2-MCS, LeGO-iS2-MCS, MP91-MCS

Um die Klonierung der unterschiedlichen TCRs mit unbekannter Spezifität zu ermöglichen, wurde eine neue Multiple Cloning Site (MCS)in die Vektoren eingefügt. Die zuvor aus den Oligonukleotiden 102 und 103 hergestellte neue MCS wurde über die Restriktionsschnittstellen BamHI/NotI in die LeGO-Vektoren iG2 und iS2 eingefügt. Zur Herstellung des Vektors MP91-MCS diente der Ausgangsvektor MP91-wPre-LMO2. Das LMO2-Gen wurde zunächst mit EcoRI/NotI aus dem Vektor ausgeschnitten und die Überhänge mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt. Die neue MCS wurde mit der T4 Polynucleotide Kinase phosphoryliert und in den vorbereiteten Vektor ligiert.

2.2.18.2. LeGO-iS2-Fluα, LeGO-iG2-Fluβ

Zum Einfügen der identifizierten Flu-TCR-Ketten wurden diese per PCR mit den Primern 35 und 8 (α -Kette) bzw. 10 und 24 (β -Kette) amplifiziert. Die Flu α -Kette wurde über die Restriktionsschnittstellen AsiSI/NotI in den Vektor LeGO-iS2-MCS kloniert. Die Flu β -Kette wurde in den Vektor LeGO-iG2-MCS über die Restriktionsschnittstellen BsiWI/NotI ligiert.

2.2.18.3. LeGO-iG2-Flua2AB, LeGO-iG2-FluB2Aa

Zur äquimolaren Expression der beiden TCR-Ketten aus einem Vektor wurden sie per Overlap Extension PCR (2.2.7.3) über die 2A-Sequenz des porzinen Teschovirus verbunden. Zur Herstellung des Konstrukts LeGO-iG2-Flu α 2A β wurden die α - und β -Flu-Ketten mit den Primer 85 und 71 bzw. 72 und 70 per PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden aus dem Gel eluiert und dienten für den anschließenden Zusammenbau über die 2A-Sequenz per PCR mit den Primern 85 und 70 als Template. Das hergestellte PCR-Produkt Flu α 2A β wurde anschließend über die Restriktionsschnittstellen AsiSI/NotI in den Vektor LeGO-iG2-MCS kloniert. Zur Herstellung des Konstrukts LeGO-iG2-Flu β 2A α wurden die TCR-Ketten mit den Primern 86 und 74 (β) bzw. 75 und 8 (α) per PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit den Primern 86 und 8 miteinander verbunden und über die Restriktionsschnittstellen AsiSI/NotI in den Vektor LeGO-iG2-MCS kloniert.

2.2.18.4. LeGO-iG2-MPSV, LeGO-iG2-MPSV-MESV (LeGO-MP), LeGOiG2-SFFV-MESV

Als Ausgangsvektor für die Veränderung von Promotoren- und Leader-Elementen diente LeGO-iG2. Als Template für die Amplifizierung des MPSV-Promotors sowie des MESV-Leaders diente gDNA von J76-Zellen. Die J76-Zellen waren mit dem gammaretroviralen MPSV- und MESV-Elemente erfolgte per PCR. Der MPSV-Promotor wurde mit den Primern 99 und 100, das MPSV/MESV-Element mit den Primern 99 und 101 amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in den Vektor pJET1.2/blunt subkloniert, sequenziert und anschließend in LeGO-iG2 umkloniert. Der Austausch des SFFV Promotors durch den MPSV-Promotor bzw. den MPSV-Promotor und den MESV-Leader erfolgte über die Schnittstellen Nhel/BamHI. Durch die Restriktion mit Nhel/BamHI wurde der SFFV-Promotor in LeGO-iG2 entfernt, der anschließend durch die Promotor und Leader-Elemente über die gleichen Schnittstellen ersetzt wurde. Zur Klonierung des MESV-Leaders hinter den SFFV-Promotor in den LeGO-iG2-Vektor wurde der MESV-Leader ebenfalls per PCR mit den Primern 104 und 105 aus gDNA von transduzierten J76-Zellen amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde erneut subkloniert, sequenziert und anschließend über die Schnittstellen BamHI/EcoRI hinter den SFFV-Promotor in den LeGO-iG2 kloniert.

2.2.18.5. LeGO-MP-FluCYS

Die Herstellung der Flu-TCR-Sequenz mit einer zusätzlichen Disulfidbrücke zwischen der α - und β -Kette erfolgte per Megaprimer-PCR (2.2.7.4). Als Template zum Einfügen der Mutationen diente der Vektor LeGO-MP-Flu β 2A α . Die Megaprimer wurden per PCR mit den Primerpaaren 113 und 8 (α -Megaprimer) bzw. 112 und 114 (β -Megaprimer) synthetisiert. Das Einfügen der ersten Mutationen erfolgte per PCR mit dem α -Megaprimer und dem Primer 8. Das PCR-Produkt wurde in pJET1.2/blunt subkloniert und sequenziert. Das Einfügen der zweiten Mutation erfolgte per PCR mit dem in der ersten PCR mutierten PCR-Produkt als Template und dem α -Megaprimer sowie dem Primer 112. Das PCR Produkt wurde erneut subkloniert und per Sequenzierung auf die beiden eingefügten Mutationen hin überprüft. Die Klonierung in den Vektor-LeGO-MP erfolgte anschließend über die Schnittstellen EcoRI/NotI.

2.2.18.6. MP91-muFlu, LeGO-MP-muFlu

Die Synthetisierung der murinisierten und kodonoptimierten TCR-Flu-Sequenz (s. Anhang 7.1) erfolgte durch die Firma Genart. Die Sequenz wurde aus dem gelieferten Vektor über die Schnittstellen AsiSI/NotI in die Vektoren MP91 und LeGO-MP umkloniert.

2.2.18.7. pJET-T7-eGFP

Um die Herstellung von eGFP-mRNA per *in vitro*-Transkription zu ermöglichen, wurde der offene Leserahmen von eGFP aus LeGO-G2 über EcoRI/BamHI herausgeschnitten, mit Hilfe des CloneJet-Kits gebluntet und hinter den T7-Promotor, der zur mRNA-Produktion notwendig ist, in den Vektor pJET1.2/blunt ligiert.

2.2.18.8. pTALEN-TCRα1L, pTALEN-TCRα1R, pTALEN-TCRα2L, pTALEN-TCRα2R, pTALEN-TCRβ1L, pTALEN-TCRβ1R, pTALEN-TCRβ2L, pTALEN-TCRβ2R

Die Klonierung der identifizierten TCR-spezifischen α - und β -TALEN Arme erfolge nach dem Protokoll von Sanjana *et al.*⁸⁷ in den Vektor pNG_v2. Als einzige Ausnahme wurde das TALEN-Kontrukt TCR β 1L in den Vektor pHD_v2 ligiert.

2.2.18.9. pTALEN-2A-TCRβ1L, pTALEN-2A-TCRβ1R

Um die TCR-spezifischen TALEN-Arme über einen Vektor in die Zellen einzubringen, wurden die jeweils linken und rechten TALEN-Arme über eine 2A-Sequenz miteinander verbunden. Die 2A-Sequenz sowie die für die weitere Klonierung notwendigen Restriktionsschnittstellen wurden per Oligonukleotide 123 und 124 nach Annealing in den Vektor pTALEN-TF(NN) über die Restriktionsschnittstellen Spel/BsrGI eingefügt. Der linke TALEN-Arm wurde per PCR mit den Primern 127 und 129, der rechte TALEN-Arm mit den Primern 128 und 130 amplifiziert. Die TALEN-Arme wurden anschließend über die Restriktionsschnittstellen BamHI/BstBI bzw. BsiWI/BsrGI sukzessiv in den zuvor hergestellten pTALEN-TF(NN)-2A Vektor kloniert.

2.2.18.10. LeGO-iTALEN-TCRa2L, LeGO-iTALEN-TCRa2R

Um einen lentiviralen Transport der TALE-Nukleasen zu ermöglichen, wurden die unter 2.2.13 identifizierten TCR-spezifischen TALEN-Sequenzen in den lentiviralen Vektor LeGO-iTALEN-iG2-p(A) kloniert. Der Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen Pstl/Xbal, sowie Notl/Pstl geschnitten. Durch die Restriktion mit Pstl/Xbal wurde die IRES-Sequenz herrausgeschnitten, die in dem späteren Ligationsschritt jedoch wieder in den Vektor eingesetzt wurde. Dieser Zwischenschritt war aufgrund der in der IRES-Sequenz vorhandenen Notl-Schnittstelle notwendig, die für das Einfügen der TALEN-Sequenzen verwendet wurde. Die TCR-TALEN-Arme wurden aus den Vektoren pTALEN-TCRα1L und pTALEN-TCRα1R per PCR mit den Primern u62 und u63 amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen Xbal/Notl in den LeGO-iTALEN-iG2-p(A) ligiert.

2.2.18.11. LeGO-iG2-AF16, LeGO-iG2-AF21, LeGO-iG2-AP11, LeGOiG2-HS1, LeGO-iG2-IE32

Die identifizierten MAGE-C2-spezifischen TCR α - und β -Ketten wurden per Overlap Extension PCR (2.2.7.3) über eine 2A-Sequenz miteinander verbunden. Im ersten Schritt wurden die 2A-Sequenzen an die TCR-Ketten angefügt. Folgende Primerpaare wurden dafür verwendet: AF16 (81 und 73 (β) bzw. 76 und 8 (α)), AF21 (82 und 74 (β) bwz. 77 und 8 (α)), AP11 (83 und 74 (β) bzw. 78 und 8 (α)), HS1 (84 und 73 (β) bwz. 76 und 8 (α)), IE (84 und 74 (β) bzw. 79 und+ 8 (α)). In einer zweiten PCR wurden die Produkte anschließend über folgende Primerpaare miteinander verbunden: AF16 (81 und 8), AF21

(82 und 8), AP11 (83 und 8), HS1 (84 und 8), IE (84 und 8). Die PCR Produkte wurden anschließend über AsiSI/NotI in den Vektor LeGO-iG2-MCS eingefügt.

2.3. Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden in Sicherheitslaboren der Stufe S2 durchgeführt. Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in S2-Sicherheitswerkbänken durchgeführt. Die Kultivierung von primären Zellen und Zelllinien erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in Inkubatoren bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit.

2.3.1. Kryokonservierung & Auftauen von Zellen

Die zu kryokonservierenden Zellen wurden pelletiert, zu 2×10^6 (Zelllinien) bzw. 2×10^7 (primäre Zellen) Zellen/ml in 1 ml eiskaltem FCS + 10% DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Das langsame Abkühlen der Zellen (-1°C/min) erfolgte ü.N. bei - 80°C in speziellen Isopropanol-Einfrierbehältern. Am nächsten Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und dort bis zur erneuten Verwendung gelagert. Zum Wiederauftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen bei 37°C erwärmt, die Zellen in ein 15 ml Falcon Reaktionsgefäß überführt und mit 10 ml Kulturmedium gewaschen. Die pelletierten Zellen wurden in frisches Medium überführt und wie üblich kultiviert (s. 2.3.3).

2.3.2. Zellzählung

Die Bestimmung der Zellzahl von primären Zellen und Zelllinien erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Zur Exklusion von toten Zellen wurden die Zellen kurz vor dem Zählen mit Trypanblau gefärbt, das durch defekte Zellmembranen eindringen kann und somit ausschließlich tote Zellen blau anfärbt. Die Zellzahl errechnete sich nach dem Auszählen von vier Großquadraten folgendermaßen:

Zellen / ml =
$$\frac{\text{Zellen der 4 Großquadrate}}{4}$$
 x Verdünnungsfaktor x 10⁴

2.3.3. Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung von Suspensions- als auch von adhärenten Zelllinien erfolgte mit den unter 2.1.6 aufgeführten Zellmedien. Suspensionszellen wurden alle 2-3 Tagen je nach

Verdopplungszeit und Zelldichte in einem Verhältnis von 1:3 – 1:5 mit frischem Zellkulturmedium verdünnt. Das Ablösen der adhärent wachsenden 293T-Zellen erfolgte nach Waschen des Zellrasens mit PBS durch die Zugabe einer Trypsin/EDTA-Lösung. Nach 1-2-minütiger Inkubationszeit erfolgte der Reaktionsstopp durch die Zugabe von serumhaltigem Zellkulturmedium. Die Zellen wurden anschließend durch Auf- und Abpipettieren in Suspension genommen und 1:10 mit frischem Medium verdünnt. Das Passagieren der adhärenten Zellen erfolgte ebenfalls alle 2-3 Tage.

2.3.4. Isolierung von PBMCs und autologem Plasma

Die Isolierung von humanen primären T Lymphozyten erfolgte per Dichtegradienten-Zentrifugation aus sog. Buffy Coats, die vom Blutspendedienst des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bezogen wurden. Der Buffy Coat ist ein Lymphozytenkonzentrat, das bei der Herstellung von Erythrozytenkonzentraten aus Vollblut als Nebenprodukt entsteht. Mittels Dichtegradienten-Zentrifugation lassen sich aus dem Konzentrat die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs, engl. peripheral blood mononuclear cells), d.h. Lymphozyten und Monozyten isolieren. Entsprechend ihrer spezifischen Dichte lassen sie sich von den anderen Teilen des Buffy Coats (Plasma, Thrombozyten, Granulozyten, Erythrozyten) abtrennen. Der Buffy Coat wurde zunächst 1:2 mit PBS verdünnt, in einem 50 ml Reaktionsgefäß über 15 ml Biocoll (1,077 g/ml) geschichtet und bei 400 x g für 40 min ohne Bremse zentrifugiert. Die bei der Zentrifugation entstandene Interphase, in der sich die PBMCs befinden, wurde abgenommen und zweimal mit PBS - bei 300 x g 30 min bzw. 200 x g 15 min gewaschen. Die Zellen wurden gezählt und anschließend kryokonserviert oder direkt stimuliert und kultiviert (2.3.5). Die bei der Dichtegradienten-Zentrifugation entstandene obere Phase, die vom autologen Plasma gebildet wird, wurde ebenfalls abgenommen und für 30 min bei 57°C hitzeinaktiviert. Nach zwei maliger Zentrifugation bei 1000 x g wurde der Überstand aliquotiert und bei -20° bis z ur weiteren Verwendung gelagert.

2.3.5. Stimulierung und Kultivierung von primären T-Zellen

Die Stimulierung von T-Lymphozyten aus isolierten PBMCs (s. 2.3.4) erfolgte mit Hilfe des Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28 Kits gemäß Herstellerangaben. Die an Beads gekoppelten Antikörper liefern den T-Zellen die nötigen stimulatorischen Signale, die für ihre Aktivierung und Expansion nötig sind. Die PBMCs wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit den Beads versetzt und in X-VIVO 10 oder X-VIVO 15 mit 100-

150 U/ml IL2 und 16% autologem Serum kultiviert. Nach 3-tägiger Aktivierung wurden die T-Zellen für nachfolgende Experimente verwendet.

2.3.6. Virusproduktion

Die Herstellung von lentiviralen und gammaretroviralen infektiösen Viruspartikeln erfolgte über die transiente Kotransfektion von 293T-Zellen nach dem Komplementierungsprinzip⁵⁸. Dafür wurden am Abend vor der Virusproduktion 5 x 10⁶ 293T-Zellen in Petrischalen (10 cm) für die Zellkultur ausplattiert. Am nächsten Morgen wurde das Zellkulturmedium durch frisches DMEM, supplementiert mit 25 µM Chloroquin, ausgetauscht. Die benötigten Vektoren (s. Tabelle 1) wurden in 450 µl H₂O gelöst. Nach Zugabe von 50 µl 2,5 M CaCl₂ wurde das Plasmidgemisch tropfenweise zu 500 µl 2 x HBS-Puffer gegeben, während dabei zur optimalen Durchmischung mit einer Pasteurpipette Luft durch den Puffer geblasen wurde. Das Plasmid/CaCl₂/HBS-Präzipitat wurde anschließend auf die vorbereiteten 293T-Zellen verteilt. Nach mindestens 6 h wurde der Zellüberstand durch frisches Medium ersetzt und die Zellen bei 37℃ kultiviert. Das Ernten des Virusüberstandes erfolgte im Falle des Hüllproteins VSV nach 24 und 48 h. Im Falle des GALV-Hüllproteins konnten bis zu 4 Überstände nach 12, 24, 36, und 48 h geerntet werden. Die Virusüberstände wurden filtriert (0,22 µM) und in Aliquots bei -80℃ gelagert.

Plasmid	Menge [µg]
Vektor-Plasmid inkl. Transgen	10
Gag/Pol-Plasmide:	10
pMDLg/pRRE (Lentivirus)	
pcDNA3.MLVgp (Gammaretrovirus)	
Rev-Plasmid:	5
pRSV-Rev	
Hüllproteine:	
phCMV-VSV-G	2
phCMV-GALV-C _{4070A}	5

Tabelle 1: Für die Virusprodukion benötigte Plasmide:

Virusproduktion von nicht-revers-transkribierenden Lentiviren (NRTLV)

Bei der Virusproduktion von nicht-revers-transkribierenden Lentiviren (NRTLV) wurde das Gag/Pol Plasmid pMDLg/pRRE durch das Plasmid pMDLg/pRRE_ΔRT ausgetauscht,

welches eine inaktivierte reverse Transkriptase aufweist. Alle anderen Plasmide und Reaktionsschritte blieben unverändert.

2.3.7. Titration von Virusüberständen

Die Titration von Virusüberständen erfolgte per Durchflusszytometrie auf 293T-Zellen. Die Zellen wurden hierfür mit verschiedenen Volumina der Virusüberstände transduziert (s. 2.3.9) und die Prozentzahl transduzierter Zellen nach 72 h anhand der Expression des vom Vektor kodierten fluoreszierenden Reporterproteins im Durchflusszytometer bestimmt. Vektorvolumina, mit denen Tranduktionsraten zwischen 5% und 20% erreicht wurden, dienten anschließend der Titerberechnung. In diesem Prozentbereich werden Mehrfachintegrationen der Vektoren in die Zellen, und damit ein Unterschätzen des Titers weitgehend vermieden⁹⁸. Der Titer ist folgendermaßen definiert:

$$T(IE/mI) \!=\! \frac{N \times P}{V}$$

T: Titer

IE/ml: Infektiöse Einheiten/ml N: Anzahl der zur Infektion eingesetzten Zellen

V: Volumen des verwendeten Virusüberstandes

P: Prozentzahl transduzierter Zellen

Für den Vergleich von Vektorkonstrukten (s. 3.3.1) erfolgte die Titration der Virusüberstände abweichend hierzu nicht per Durchflusszytometrie, sondern mit Hilfe des HIV-1 p24 Antigen ELISA 2.0 nach Herstellerangaben. Die Titer wurden anhand eines Referenzvektors mit bekanntem Titer eingeordnet.

2.3.8. Aufkonzentrierung von Virusüberständen

Für eine Erhöhung des viralen Titers durch Aufkonzentrierung wurden 30 ml des Virusüberstandes in Corex-Röhrchen bei 6000 x g und 4°C für ca. 15 h zentrifugiert. Das virushaltige Pellet wurde in 500 μ l – 2 ml frischem Medium resuspendiert. Der Titer des aufkonzentrierten Virusüberstandes wurde durchflusszytometrisch bestimmt (2.3.7).

2.3.9. Transduktion von Zelllinien

Die Transduktion von Zelllinien erfolgte mit VSV-pseudotypisierten Virusüberständen nach der sog. Spin-Infektionsmethode. Dabei wurden die zu transduzierenden Zellen zu $1-2 \times 10^5$ Zellen in 24-Loch-Gewebekulturplatten ausgesät. Je nach gewünschter Transduktionsrate wurden unterschiedliche Volumina des Virusüberstandes in das Kulturmedium gegeben. Dem Kulturmedium wurden außerdem 8 µg/ml Polybren hinzugefügt. Die Zellen wurden anschließend für 1 h bei 1000 x g und 22°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen bei 37°C kultiviert und das Medium am nächsten Tag 1:2 mit frischem Medium verdünnt.

2.3.10. Transduktion von primären T-Zellen

Die Transduktion von primären T-Zellen erfolgte mit GALV-pseudotypisierten Virusüberständen in Zellkulturplatten, die mit RetroNectin vorbeschichtet wurden. RetroNectin, ein rekombinant hergestelltes Fibronektin-Fragment, vermittelt eine Kolokalisierung der viralen Partikel und der Zielzelle, wodurch es zu einer signifikanten Erhöhung der Transduktionsrate kommt^{99,100}. Zunächst wurden 24-Loch-Zellkulturplatten für die RetroNectin-Transduktion mit 0,4 ml RetroNectin (9 µg/cm²) 2 h bei RT oder ü.N. bei 4°C beschichtet. Ungebundenes RetroNectin wurde anschließend entfernt und unspezifische Bindungsstellen mit dem RetroNectin-Block-Puffer für 30 min bei RT geblockt. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die RetroNectin-beschichteten Platten entweder direkt verwendet oder max. eine Woche bei 4°C gelagert. Die Beladung der beschichteten Platten mit den viralen Überständen erfolgte in vier aufeinander folgenden Schritten per Zentrifugation (1000 x g, 4°C, 30 min) mit jeweils max. 400 µl des Virusüberstandes. Die Multiplicity of Infection (MOI) wurde unter der Annahme, dass 50% der Viruspartikel aus dem Überstand an das RetroNectin binden, errechnet. Auf die virusbeladenen Platten wurden 2 x 10⁵ primäre T-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf neue unbehandelte 24-Loch-Zellkulturplatten umgesetzt.

2.3.11. Durchflusszytometerische Analysen

Mit Hilfe von durchflusszytometrischen Analysen wurden Zellen bzgl. verschiedener Zelleigenschaften analysiert. Die Zellen wurden u.a. anhand von vektorkodierten Fluoreszenzproteinen und durch die Markierung mit Antikörpern voneinander unterschieden. Die Antikörperfärbung erfolgte nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS in 150 µl PBS + 50 µl Fc-Block. Die benötigte Menge des Antikörpers sowie die notwendige Inkubationsdauer erfolgten nach Herstellerangaben. Eine Liste der verwendeten Antikörper findet sich unter 2.1.10. Nach der Inkubation wurden die Zellen vor der durchflusszytometrischen Analyse erneut in PBS gewaschen.

2.3.12. Zellsortierung

Die Sortierung von Zellen erfolgte am FACSAriaIII in der FACS-Core Facility des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Die Zellen wurden vor der Sortierung gewaschen und nach Resuspendierung durch ein Zellsieb (70 µm) gegeben. Die Sortierung der Zellen erfolgte anhand von Antikörperfärbungen. Da die Sortierung unter nicht-sterilen Bedingungen erfolgte, wurde das Medium nach der Sortierung mit 2% Penicillin/Streptomycin versetzt.

2.3.13. Elektroporation von primären T-Zellen und Zelllinien

Bei der Elektroporation handelt es sich um eine effiziente Transfektionsmethode, bei der die Zellmembran durch einen elektrischen Impuls transient permeabilisiert wird, wodurch DNA- oder RNA-Moleküle in die Zelle eindringen können. Zur Vorbereitung auf die Elektroporation wurden die Zellen 2x mit Opti-MEM gewaschen und anschließend auf 1-2 x 10⁶ Zellen/600 µl in Opti-MEM resuspendiert. Bei der Elektroporation von mRNA wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt und sowohl die Zellen, als auch die Elektroprorationsküvetten vor der Verwendung für einige Minuten vorgekühlt. Die zu elektroporierende DNA oder mRNA wurde in die Küvette pipettiert und mit 600 µl der Zellsuspension vermischt. Die Elektroporation wurde im Gene Pulser Xcell[™] Total System mit einem Square-Wave-Puls (bei mRNA) bzw. mit Exponentiell-Decay (bei DNA) durchgeführt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 24-Loch-Kulturplatten umgesetzt. Bei TALE-Nukleasen erfolgte die auf die Elektroporation folgende Inkubation für 24 h bei 32℃ und anschließend bei 37℃. Zur Wiederverwendung der Elektroporationsküvetten wurden diese einige Mal mit dH₂0 gespült. Anschließend wurden die Küvetten für mind. 30 min in 80% Ethanol eingelegt. Das Trocknen der Küvetten erfolgte unter der Sicherheitswerkbank. Die Küvetten waren daraufhin zur Wiederverwendung geeignet. Im Falle von DNA-Elektroporationen wurden die Küvetten nach dem dH₂0-Waschschritt zusätzlich für 5 min mit offenem Deckel unter UV-Licht gestellt.

2.3.14. Magnetische Zellseparation von CD3^{+/-}-Zellen

Die Trennung von CD3-negativen und CD3-positiven T-Zellen erfolgte mit Hilfe des Magneten Dynal MPL-L und dem Dynabeads CD3-Kit gemäß Herstellerangaben.

2.3.15. Cytokine-Release-Assay

Um die Antigenspezifität von T-Zellen zu testen, die mit verschiedenen TCR-Konstrukten transduziert worden waren, wurde der Cytokine-Release-Assay durchgeführt. Die antigenpräsentierenden Zielzellen (T2 bzw. autologe PBMCs) wurden mit Zellkulturmedium gewaschen und auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt, mit den zu präsentierenden Peptiden versetzt (0,01 - 20 µM) und bei 37°C für 3 h inkubi ert. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und auf 1×10^6 Zellen/1,5 ml eingestellt. Die transduzierten Effektorzellen wurden ebenfalls in Zellmedium gewaschen und auf $1-5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Target- (150 µl $\triangleq 1 \times 10^5$ Zellen) und Effektorzellen (100 µl $\triangleq 1 - 5 \times 10^5$ Zellen) wurden gemeinsam in 96-Loch-Platten pipettiert, gemischt und bei 37°C inkubiert. Nach einer Reaktionszeit von 20 h wurde der Zellüberstand abgenommen und per ELISA (s. 2.3.17) auf die Sekretion verschiedener Zytokine überprüft.

2.3.16. ³H-Thymidin Proliferationsassay

Um die Proliferation von Zellen nach Kontakt zu ihrem Antigen zu testen, wurde der ³H-Thymidin Proliferationsassay verwendet. Dazu wurden 2,5 x 10⁴ transduzierte Zellen mit 5 x 10⁴ antigenpräsentierenden T2-Zellen bzw. 1 x 10⁵ antigenpräsentierenden autologen PBMCs in einem Gesamtvolumen von 200 µl in X-VIVO 10 in 96-Loch-Platten kokultiviert. Die antigenpräsentierenden Zellen wurden vor der Kokultivierung entweder mit dem spezifischen Peptid oder mit einem Kontrollpeptid versetzt (Konzentration: 20 µM) und mit 60 Gy (T2) bzw. mit 35 Gy (autologe PBMC) bestrahlt. Die Kokultivierung erfolgte für 48 h bei 37℃, bevor die Zugabe von 1 µCu ³H-Thymidin/Probenansatz in einem Volumen von 50 µl erfolgte. Nach einer weiteren Inkubationsphase von 16 h wurden die Zellen geerntet und mit Hilfe des Wallac Readers analysiert. Die Ansätze wurden jeweils in Triplikaten durchgeführt. Der Stimulationsindex (SI) wurde folgendermaßen ermittelt:

 $SI = \frac{Mittlere CMP (Counts pro Minute) mit spezifischem Antigen}{Mittlere CMP ohne spezifisches Antigen}$

2.3.17. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Zellüberstände des Cytokine-Release-Assays (s. 2.3.15) wurden per ELISA auf das Vorhandensein verschiedener Zytokine untersucht. Dafür wurde das Human IFN gamma ELISA Ready-SET-Go!-, Human IL-2 Ready-SET-Go! ELISA (2nd Generation)- und das Human TNF alpha ELISA Ready-SET-Go!-Kit gemäß Herstellerangaben verwendet. Die Messung der Proben erfolgte in Duplikaten. Proben, die außerhalb des Standards lagen, wurden mit Assay Diluent verdünnt. Die Analyse der ELISA-Platten erfolgte mit dem Sunrise Basic Tecan ELISA Analyzer bei einer Wellenlänge von 450 nm (Korrekturwellenlänge 570 nm). Die Auswertung der Daten erfolgte mittels *Four parameter logistic fit curve*-Analyse (MyAssays Ltd, http://www.myassays.com).

2.3.18. Enzyme Linked Immuno Spot Assay (ELISPOT)

ELISPOT Assays wurden mit dem Human Interferon-gamma ELISpot Kit gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Als antigenpräsentierende Zellen dienten entweder T2-Zellen oder autologe PBMCs, die ü.N. in X-VIVO15 mit den spezifischen- oder mit Kontrollpeptiden versetzt wurden (Peptidkonzentration 20 μ M). 5 x 10⁴ oder 1 x 10⁴ transduzierte Effektorzellen wurden mit 1 x 10⁴ antigenpräsentierenden Zielzellen für 16 h auf den ELISPOT Platten kokultiviert und anschließend die IFN- γ Sekretion der Zellen detektiert. Die S*pot-forming units* (SFU) wurden mit Hilfe des AID EliSpot Readers detektiert und mit Hilfe der Software EliSpot 4.0 ausgewertet. Als positiv wurden Proben definiert die >10 Spots/Probe sowie 3 x mehr Spots im Vergleich zur Negativ-Kontrolle aufwiesen.

2.3.19. Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5. Fehlerbalken in Säulendiagrammen repräsentieren die Standardabweichung (SD) vom Mittelwert. Signifikanzen wurden mit dem gepaarten t-test oder per One-way ANOVA ermittelt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Identifizierung, Klonierung und funktionelle Überprüfung von MAGE-C2-spezifischen TCRs

Ein sehr wichtiger Aspekt der adoptiven T-Zell-Rezeptor-Gentherapie ist die Auswahl eines geeigneten Zielantigens. Dieses Antigen sollte u.a. immunogen sein, stabil exprimiert werden und auf gesunden Körperzellen nicht vorkommen. Die CT-Antigene scheinen in dieser Hinsicht eine vielversprechende Zielstruktur zu sein (s. 1.2.3). In dem ersten Abschnitt meiner Dissertation habe ich TCRs aus T-Zellklonen, die Peptide des CT-Antigens MAGE-C2 erkannt haben, isoliert. Dazu habe ich zunächst die Methode zur Identifizierung von unbekannten TCR-Genen optimiert. Anschließend habe ich die TCR-Gene aus MAGE-C2 T-Zellklonen isoliert, in virale Transfervektoren kloniert und in T-Zellen übertragen. Die Funktionalität und Spezifität der Rezeptoren, die sich für eine mögliche adoptive Immuntherapie des Multiplen Myeloms eignen könnten, habe ich anschließend in den transduzierten T-Lymphozyten mit Hilfe verschiedener zellbiologischer Methoden überprüft.

3.1.1. Optimierung der RLM-RACE-PCR zur Identifizierung von antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor-Ketten

Der T-Zell-Rezeptor ist ein membrangebundenes Heterodimer, das aus einer α - und einer β -Polypeptidkette zusammengesetzt ist. Diese bestehen jeweils aus einer variablen (V) und einer konstanten (C) Domäne (s. 1.1.1). Für die Identifikation von unbekannten TCR-Genen wurde eine *RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends PCR* (RLM-RACE-PCR) durchgeführt. Diese Art der PCR ist für die Amplifikation von cDNAs geeignet, bei denen lediglich ein kurzer Teil der Sequenz bekannt ist. Der bekannte Teil der TCR-Ketten ist dabei die C-Region, während die V-Region aufgrund der hohen Diversität von TCR-Ketten (s. 1.1.1) den zu identifizierenden Teil darstellt. Ein großer Vorteil der RLM-RACE-PCR gegenüber traditionellen RACE-PCRs ist die exklusive Amplifikation von Volllängen-mRNAs, die zur Generierung von nur einer einzelnen Gelbande führt (Ambion Herstellerangabe). Abb. 14 zeigt ein repräsentatives Ergebnis einer RLM-RACE-PCR von zwei verschiedenen Klonen zur Identifikation von TCR-Ketten. Der Versuch wurde dabei nach Herstellerprotokoll (Ambion) durchgeführt. Nach der ersten PCR (s. Abb. 14A) waren, wie erwartet, keine PCR-Produkte sichtbar. Nach

der anschließenden *nested*-PCR konnte bei 5 von 6 Ansätzen eine deutliche DNA-Bande identifiziert werden (s. Abb. 14B). Die Größe der amplifizierten DNA-Produkte war allerdings in keinem Fall entsprechend der erwarteten Volllängen TCR-Ketten. Diese haben eine Größe von ~ 1000 bp (TCRα) bzw. ~ 1100 bp (TCRβ). Die amplifizierten Größen waren mit 300-700 bp deutlich unter diesen Werten, was für eine Amplifikation von unvollständigen cDNAs spricht. Kleinere DNA-Fragmente werden in PCR-Reaktionen bevorzugt amplifiziert, so dass es auch in Gegenwart der Volllängen-cDNAs wahrscheinlich nicht zur vermehrten Amplifikation letzterer kommen würde.



Abb. 14: Elektrophoretische Auftrennung einer RLM-RACE-PCR von zwei Klonen zur Identifikation von TCR-Ketten. A. Wie erwartet, sind bei der Auftrennung der Proben nach der ersten PCR keine Gelbanden zu erkennen. B. Nach der *nested*-PCR (zweite PCR) sind deutliche Gelbanden auf dem Agarosegel sichtbar. Allerdings sollten die erwarteten Banden zwischen 1000 bp und 1100 bp liegen (markiert durch die rot-gestrichelte Linie).

Um eine erfolgreiche Amplifikation der Volllängen-TCR-Ketten zu erreichen, wurde das Herstellerprotokoll der RLM-RACE-PCR verändert. Ein Überblick des optimierten Versuchsablaufes ist in Abb. 15 dargestellt. Der entscheidende Unterschied zum ursprünglichen Herstellerprotokoll liegt dabei in der Aufreinigung der Proben nach der ersten PCR (Abb. 15, Schritt 6). Im Originalprotokoll diente das PCR-Produkt der ersten Reaktion ohne Aufreinigungsschritt direkt als Template für die nested-PCR. In dem optimierten Protokoll wird das Produkt der ersten PCR stattdessen per Gelelektrophorese aufgetrennt. Da nach der ersten PCR meist keine DNA-Banden auf dem Agarosegel sichtbar waren, wurden die Gelfragmente der richtigen Größe (~ 1000 bzw. ~ 1100 bp) anhand des aufgetragenen Größenstandards aus dem Gel ausgeschnitten. Das aufgereinigte Produkt diente anschließend als Template für die nested-PCR. Durch den Aufreinigungsschritt werden alle Produkte aus der ersten PCR mit falscher Größe, aus der *nested*-PCR-Reaktion ausgeschlossen. Somit dienen ausschließlich PCR-Produkte der richtigen Größe als DNA-Template für die *nested*-PCR.

(1)	mRNA-Isolation	
Ŭ	5'-Cap-Struktur – mRNA – Po	y(A)-Schwanz
2	TAP-Enzym zum Entfernen der 5'-Cap-Struktur intakt 5'-Cap-Struktur – mRNA – Po	er mRNAs y(A)-Schwanz
3	RNA-Anker-Ligation an freie Phosphatenden der mRI RNA-Anker mRNA	NAS Poly(A)-Schwanz
4	Reverse Transkription RNA-Anker mRNA	Poly(A)-Schwanz - Oligo(dt) ₁₈
5	1. PCR Race-outer-Primer	pez. Primer
6	Aufreinigung der 1. PCR über Gelelektrophorese	
7	nested-PCR (2. PCR) Race-inner-Primer	ner
€	Aufreinigung der Produkte über Gelelektrophorese Subklonierung der PCR-Produkte Sequenzierung zur Identifizierung der verwendeten T	CR-Ketten

Abb. 15: Schematische Darstellung des optimierten RLM-RACE-PCR-Versuchsablaufs. Zunächst erfolgt die Isolierung von mRNA aus T-Zellklonen (Schritt 1). Anschließend wird die mRNA mit dem TAP-Enzym inkubiert, das die mRNA-Cap-Struktur von intakten mRNAs ablöst (Schritt 2), und sie damit zugänglich für die Ligation eines RNA-Ankers macht (Schritt 3). Auf die reverse Transkription mit Oligo(dT)-Primern (Schritt 4) folgt die Amplifikation TCR-spezifischer Sequenzen per PCR (Schritt 5). Das Produkt der PCR-Reaktion wird geleektrophoretisch aufgetrennt, die TCR-spezifische DNA aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert (Schritt 6). Das Elutionsprodukt dient in der folgenden *nested*-PCR als Template für die weitere Amplifikation der TCR-spezifischen Sequenzen (Schritt 7). Die *nested*-PCR-Produkte werden erneut per Gelelektrophorese aufgetrennt, ausgeschnitten und eluiert. Anschließend erfolgt die Sequenzierung der PCR-Produkte sowie die Klonierung der identifizierten TCR-Ketten in einen Expressionsvektor.

Klonierung der TCR-Ketten in den Expressionsvektor der Wahl

Die Ergebnisse der optimierten RLM-RACE-PCR zeigten, dass die Veränderungen zu einer wesentlichen Verbesserung der Amplifikation von TCR-spezifischen VolllängenmRNAs geführt haben. Nach der ersten PCR waren erneut, wie erwartet, keine DNA-Banden sichtbar (nicht gezeigt). Abb. 16 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der RLM-RACE-PCR-Ergebnisse von 6 T-Zellklonen nach der nested-PCR. Die Spuren 1-6 zeigen die Ergebnisse des RLM-RACE-Versuches mit Primern, die für die C-Region der TCRa-Kette spezifisch waren. Für alle verwendeten Klone konnten einzelne DNA-Banden in der richtigen Fragmenthöhe identifiziert werden. Da für den Zusammenbau der TCRβ-Rezeptorketten zwei unterschiedliche C-Regionen (β1 und β2) zur Verfügung stehen (s. 1.1.1), wurden für die Identifizierung der TCRβ-Kette pro Klon zwei unterschiedliche Primerpaare eingesetzt, die spezifisch für die TCRBC1 oder die TCR_bC2 waren. Die Spuren 7-12 bzw. 13-18 in Abb. 16 zeigen die Amplifikationsergebnisse mit den TCRBC1- bzw. TCRBC2-spezifischen Primern. Es wurden erneut meist einzelne, deutliche DNA-Banden der richtigen Höhe amplifiziert. Trotz großer Homologien der TCRBC1- und TCRBC2-Regionen konnten die verwendeten Primer spezifisch zwischen ihnen unterscheiden, so dass entweder TCR-Sequenzen mit der TCRBC1-Kette (Klon 1-5) oder der TCRBC2-Kette (Klon 6) amplifiziert wurden. Die Sequenzierung der DNA-Banden bestätigte, dass es sich bei ihnen tatsächlich um vollständige TCRα- und β-Gene handelte. Das optimierte Protokoll zeigte auch bei der Identifizierung weiterer TCR-Ketten aus anderen T-Zellklonen zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse.



Abb. 16: Erfolgreiche Amplifikation TCR-spezifischer DNA mittels optimiertem RLM-RACE-PCR-Protokoll. Die Abbildung zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der Ergebnisse des optimierten RLM-RACE-PCR-Protokolls nach der *nested*-PCR für 6 verschiedene T-Zellklone. Die Spuren 1-6 zeigen die erfolgreiche Amplifikation der ca. 1000 bp großen TCR α -Kette. Die Spuren 7-12 (TCR β C1) bzw. 13-18 (TCR β C1) zeigen die Amplifikation der ca. 1100 bp großen TCR β -Kette. Je nach verwendeter C-Region kommt es entweder bei der Amplifikation mit den TCR β C1-Primern (Klon 1-5) oder den TCR β C2-Primern (Klon 6) zu einer deutlichen Gelbande der erwarteten Höhe.

3.1.2. Identifikation von T-Zell-Rezeptor-Ketten aus potentiell MAGE-C2-spezifischen T-Zellklonen

Die Identifizierung von TCR-Ketten aus potentiell MAGE-C2-spezifischen T-Zellklonen wurde mit Hilfe des unter 3.1.1 optimierten RLM-RACE-PCR-Protokolls durchgeführt. In Vorarbeiten wurden zur Anreicherung von MAGE-C2-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mononukleäre Zellen aus dem Blut von Patienten, die am Multiplen Myelom erkrankt waren, verwendet. Um die immunogenen Epitope des Proteins zu bestimmen wurde das gesamte MAGE-C2-Protein in 37 sich überlappende 20 Aminosäure lange Peptide aufgeteilt. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen der Patienten wurden daraufhin mit den Peptiden des MAGE-C2-Proteins stimuliert und die Immunantworten per IFN-y-ELISPOT oder IFN-y-Sekretionsassay überprüft. Die auf die Peptide mit einer Immunantwort reagierenden Zellen wurden per Limiting Dilution bzw. per FACS-Zellsortierung und Einzelzellablage zur Generierung von T-Zellklonen weiter bearbeitet. Wie in Tabelle 2 zu sehen, konnten die TCR-Sequenzen von 11 CD4⁺ und von 2 CD8⁺ T-Zellklonen identifiziert werden. Alle analysierten Sequenzen zeigten produktive, umgeordnete TCRα- bzw. TCRβ-Ketten, die sich aus der V-Region, der J-Region und der C-Region, sowie im Falle der TCR^β-Kette zusätzlich aus der D-Region zusammensetzten. Die Sequenzen zeigten des Weiteren eindeutige CDR1, CDR2 und CDR3 Abschnitte. 2 der 11 analysierten CD4⁺-Klone wiesen ein nicht klonales Bild auf, da 2-3 verschiedene TCR-Ketten identifiziert wurden. Alle weiteren analysierten Klone waren klonal hinsichtlich ihrer TCR-Verwendung. Es wurde zudem beobachtet, dass verschiedene Klone ein und desselben Patienten, die mit demselben Peptid bzw. Peptidpool stimuliert worden waren, dieselbe TCR-Verwendung zeigten (s. IE 10, 32, 43 oder AF16, 25). Klone eines Patienten, die mit unterschiedlichen Peptiden stimuliert worden waren, zeigten dagegen bei der Analyse unterschiedliche TCR-Ketten (s. AF16, 21, 25).

Tabelle 2: Übersicht identifizierter, potentiell MAGE-C2-spezifischer 1	-Zell-Rezeptoren.	TRA, T-Zell-Rezeptor
Alpha; TRB, T-Zell-Rezeptor Beta		

Klon +	CD4 ⁺ /	TRAV	TRAJ	CDR3α	TRBV	TRBJ	TRBD	CDR3β - Kette
#Peptia	CDo							
AF16 #16-18	CD4 ⁺	TRAV2*01	TRAJ4*01	CAVEPGSGGYNKLIF	TRBV5-6*01	TRBJ1-6*02	TRBD1*01	CASSFRQETHSPLHF
AF21 #30	CD4 [⁺]	TRAV26-1*01	TRAJ47*01	CIVRGLREYGNKLVF	TRBV2*01	TRBJ2-7*01	TRBD1*01	CASSLGGQLREQYF
AF25 #16-18	CD4 ⁺	TRAV2*01	TRAJ4*01	CAVEPGSGGYNKLIF	TRBV5-6*01	TRBJ1-6*02	TRBD1*01	CASSFRQETHSPLHF
					TRBV2*01	TRBJ2-7*01	TRBD1*01	CASSLGGQLREQYF
AK3 #32+36	CD4 [⁺]	TRAV2*01,	TRAJ17*01	CAAAPKAAGNKLTF	TRBV6-5*01	TRBJ2-1*01	TRBD1*01	CASQKAGYNEQFF
		TRAV12-2*02	TRAJ31*01	CAVNFPARLMF	TRBV11-3*01	TRBJ2-3*01	TRBD2*01	CASSAGKRGGTDTQYF
					TRBV4-2*01	TRBJ2-3*01	-	CASSQDVPDTQYF
AK4 #32+36	$CD4^+$	TRAV12-2*02	TRAJ31*01	CAVNFPARLMF	TRBV6-1*01	TRBJ1-4*01	TRBD1*01	CASSDGDVVRKKLFF
		TRAV2*01	TRAJ17*01	CAAAPKAAGNKLTF				
AP10 #25	CD4 ⁺	TRAV3*01	TRAJ9*01	CAVRDPHTGGFKTIF	TRBV5-1*01	TRBJ1-2*01	TRBD1*01	CASSLALKAEDGYTF
AP11 #27	$CD4^+$	TRAV12-2*02	TRAJ8*01	CAVNEDFQKLVF	TRBV7-7*01	TRBJ2-7*01	TRBD2*01	CASSQNKVGEQYF
DN1 #18	CD8 ⁺	-	-	-	TRBV6-1*01	TRBJ2-4*01	TRBD1*01	CASSEHGQGVPAKNIQYF
DN2 #18	CD8 ⁺	TRAV8-1*01	TRAJ43*01	CAVNARNNNDMRF	TRBV6-1*01	TRBJ2-4*01	TRBD1*01	CASSEHGQGVPAKNIQYF
IE10 #32	$CD4^+$	TRAV8-1*01	TRAJ39*01	CAVKVNNAGNMLTF	-	-	-	CASSLTGSAPTDTQYF
IE32 #32	CD4 ⁺	TRAV8-1*01	TRAJ39*01	CAVKVNNAGNMLTF	TRBV7-3*01	TRBJ2-3*01	TRBD2*02	CASSLTGSAPTDTQYF
IE43 #32	$CD4^+$	TRAV8-1*01	TRAJ39*01	CAVKVNNAGNMLTF	TRBV7-3*01	TRBJ2-3*01	TRBD2*02	CASSLTGSAPTDTQYF
HS1 #18	CD4 ⁺	TRAV2*01	TRAJ29*01	CAVEAYSGNTPLVF	TRBV7-8*01	TRBJ1-6*01	TRBD1*01	CASSLDLDRGNSPLHF

3.1.3. J76-T-Zelllinie zur funktionellen Überprüfung klonierter T-Zell-Rezeptoren

Um im ersten Schritt die grundsätzliche Funktionalität und Peptidspezifität der klonierten TCR-Ketten zu überprüfen, wurde die T-Zelllinie J76 verwendet. Bei der Zelllinie handelt es sich um immortalisierte, von Jurkat T-Zellen abgeleitetet T-Lymphozyten, die als αβ-TCR-defizient beschrieben wurden⁸⁸. Sie zeigen keine Expression von endogenen TCR-Ketten, besitzen allerdings alle notwendigen CD3-Moleküle, um mit exogen eingebrachten TCRs den CD3-TCR-Komplex zu bilden, der anschließend auf der Oberfläche der J76-Zellen exprimiert wird. Die Expression jedes beliebigen ektop eingebrachten TCR kann damit ohne Beeinflussung von endogenen TCR-Ketten durch anti-TCR oder anti-CD3 Antikörper überprüft werden. Zur Bestätigung des beschriebenen Phänotyps wurden die J76-Zellen mit verschiedenen Antikörpern gegen T-Zell-Oberflächenmoleküle angefärbt (Abb. 17). Als Vergleich diente die Ausgangs-T-Zelllinie Jurkat. Es ist zu erkennen, dass die J76-Zellen, wie beschrieben und im Gegensatz zu den Jurkat T-Zellen, keine Expression von CD3- und TCR-Molekülen zeigten. Weitere T-Zell-Marker bzw. Leukozytenmarker wie CD45, CD2 oder CD28, das wichtige kostimulatorische Signale für die T-Zellaktivierung liefert, wurden sowohl vom Großteil der J76-Zellen als auch der Jurkat-Zellen exprimiert. Für die zwei weiteren Oberflächenmarker CD4 bzw. CD8, die T-Zellen in T-Helferzellen bzw. zytotoxische T-Effektorzellen unterteilen zeigten die J76-Zellen keine oder nur minimale Anfärbung durch die entsprechenden Antikörper. Auch die Jurkat-Zellen, die ursprünglich als CD4⁺ beschrieben wurden, zeigten keine Anfärbung.



Abb. 17: Vergleichende Analyse von J76 T-Zellen und Jurkat T-Zellen auf T-Zell-spezifische Oberflächenmoleküle. Die T-Zellinien J76 und Jurkat wurden mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen die T-Zell- bzw. Leukozyten-spezifischen Oberflächenmoleküle CD2, CD3, TCR, CD4, CD8, CD28 und CD45 angefärbt und die Expression durchflusszytometrisch überprüft.

3.1.4. Funktionelle Überprüfung identifizierter, potentiell MAGE-C2-spezifischer T-Zell-Rezeptoren in J76-Zellen

Von den identifizierten, potentiell MAGE-C2-spezifischen T-Zell-Rezeptoren wurden die TCRs der Klone AF16, AF21, AP11, IE und HS1 für weitere Versuche ausgewählt (s. Tabelle 2). Die identifizierten Rezeptor-Ketten wurden über die 2A-Sequenz des porzinen Teschovirus verbunden und in den lentiviralen Vektor LeGO-iG2 kloniert (Abb. 18A). Bei diesem Vektor handelt es sich um einen lentiviralen Vektor der 3. Generation⁹⁰. IRES-eGFP-Sequenz, Er enthält eine SO dass transduzierte Zellen durchflusszytometrisch anhand ihrer eGFP-Expression verfolgt werden können. Der korrekte Zusammenbau der klonierten TCR-Konstrukte konnte nach Transduktion der αβ-TCR-defizienten T-Zelllinie J76 anhand von CD3- und TCR-Antikörperfärbungen nachgewiesen werden. Die Anzahl an TCR/CD3-positiven T-Zellen korrelierte dabei stark mit der Anzahl an eGFP-positiven Zellen (Abb. 18B). Um die Spezifität der identifizierten TCRs zu überprüfen, wurden die transduzierten J76-Zellen mit autologen PBMCs kokultiviert. Die PBMCs dienten als antigenpräsentierende Zellen und waren MAGE-C2-Peptiden zuvor mit den entsprechenden beladen worden. Die Effektorreaktionen der transduzierten J76-Zellen wurden per IFN-y-ELISPOT, IL-2-ELISA sowie mit Hilfe des ³H-Thymidin Proliferationsassays analysiert. In Abb. 18 sind die Ergebnisse des ELISPOTs sowie des Proliferationsassays dargestellt. Es zeigte sich, dass keiner der klonierten MAGE-TCRs spezifisch auf sein Antigen reagierte. Im ELISPOT war kein Unterschied zwischen der Kokultivierung mit dem spezifischen Antigen (Abb. 18C, mittlere Spalte) und dem Kontrollantigen (Abb. 18C, rechte Spalte) zu erkennen. Im Proliferationsassay konnte ebenfalls keine Proliferationsunterschiede als Folge der verschiedenen Kokultivierungsbedingungen festgestellt werden (Abb. 18D). Auch im IL-2-ELISA war keine vermehrte Sekretion von IL-2 nach Kokultivierung mit den spezifischen Peptiden detektierbar (nicht gezeigt). Aufgrund der Vielzahl an unterschiedlichen Tests mit negativem Ergebnis muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei den identifizierten T-Zellklonen nicht um MAGE-C2-spezifische Zellen handelte.



Abb. 18: Funktionelle Überprüfung der identifizierten MAGE-C2 TCRs. A. Schematische Darstellung der LeGO-Vektorkonstrukte nach Klonierung der identifizierten MAGE-C2 TCR-Ketten. **B.** Erfolgreiche Expression der MAGE-C2 TCR-Konstrukte in J76-Zellen. J76-Zellen wurden 3 Tage nach Transduktion mit einem CD3-spezifischen Antikörper gefärbt. Die Prozentzahlen geben die Anzahl eGFP- und CD3-positiver Zellen an. **C.** Die MAGE-C2-transduzierten J76-Zellen wurden nach Kokultivierung mit spezifischen und unspezifischen Peptiden per ELISPOT auf die Sekretion von IFN-γ getestet. Dargestellt sind jeweils 5 x 10⁴ Zellen. **D.** MAGE-C2-transduzierte J76-Zellen wurden per ³H-Thymidin Proliferationsassays auf ihre Spezifität getestet und entweder mit ihrem spezifischen Antigen oder ohne Antigen kokultiviert und ihre Proliferation gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD aus den Doppelbestimmungen eines Versuches. Unterschiede nicht signifikant. ccpm, engl. *corrected counts per minute.*

3.2. Influenzaspezifische TCRs als Modellsystem für die Optimierung der TCR-Gentherapie

Nachdem keine MAGE-C2-spezifischen T-Zellklone und T-Zell-Rezeptoren identifiziert werden konnten, habe ich Antigene des Influenza A Virus als Modellantigene für die Optimierung des TCR-Gentransfers verwendet. Influenzaspezifische Antigene eignen sich gut, da ein großer Anteil der Population eine starke T-Zell-vermittelte Immunantwort gegen sie zeigt. Zunächst habe ich erneut die TCR-Gene aus influenzaspezifischen T-Zellklonen isoliert, in virale Transfervektoren kloniert und die Transduktion von T-Zelllinien und primären T-Zellen mit diesen Vektoren durchgeführt. Anschließend habe ich überprüft, ob es durch die Transduktion zu einem Transfer der ursprünglichen Spezifität der T-Zellklone gekommen ist.

3.2.1. Identifikation von TCR-Ketten aus influenzaspezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellklonen

In Vorarbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden influenzaspezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus PBMCs von HLA-A2-positiven, gesunden Blutspendern angereichert. Zur Anreicherung wurden die PBMCs mit zwei unterschiedlichen Peptiden des Influenza A Virus stimuliert. Um die Proliferation von influenzaspezifischen CD8⁺-Zellen zu erreichen, wurde das Influenza-Matrixprotein (Flu-M: GIL GFV FTL) verwendet. Für die Proliferation von influenzaspezifischen CD4⁺-Zellen wurde das Influenza-Nukleoprotein (Flu-NP: FWR GEN GRK TRI AYE RMC NIL KGK) eingesetzt. Die Spezifität der stimulierten T-Zellen wurde u.a. mittels IFN-y-ELISPOT und Tetramer-Färbung überprüft, spezifische Zellen als Einzellzellen abgelegt und die daraus entstehenden T-Zellklone expandiert. Anschließend wurden die TCR-Ketten identifiziert (2.2.12). Die Identifikation der TCR-Ketten konnte für 14 CD8⁺ T-Zellklone, sowie für 2 CD4⁺ T-Zellklone per optimierter RLM-RACE-PCR (s. 3.1.1) erfolgreich durchgeführt werden. Die Analyse der Sequenzierung bestätigte die klonale Identität der T-Zellen. Bei allen analysierten Sequenzen handelte es sich um produktiv umgeordnete TCRa- bzw. TCRB-Ketten, die sich aus der V-Region, der J-Region und der C-Region, sowie bei der TCRβ-Kette zusätzlich aus der D-Region zusammensetzten. Bei allen analysierten Sequenzen konnten eindeutige CDR1, CDR2 und CDR3 Abschnitte identifiziert werden. Die überwiegende Mehrheit der analysierten CD8⁺ T-Zellklone (11 von 14), die mit dem Flu-M-Peptid stimuliert worden waren, zeigten die Verwendung der gleichen TCR-Kette: TRAV17*01, TRAJ42*01, TRBV19*01, TRBJ2–7*01, TRBD2*02. Für zwei weitere CD8⁺ T-Zellklone wurde die TCR-Kette TRAV14/DV4*02, TRAJ52*01, TRBV19*01, TRBJ1-5*01, TRBD1*02, und für einen weiteren CD8⁺ Klon die TCR-Kette TRAV27*01, TRAJ42*01, TRBV19*01, TRBJ1-5*01, TRBD1*01 identifiziert. Dabei ist auffällig, dass alle 14 analysierten T-Zellklone die gleiche variable Beta-Kette TRBV19*01 verwenden. Abb. 19 zeigt die bei der überwiegenden Mehrheit der T-Zellklone identifizierten TCR-Sequenzen sowie die dazugehörigen Aminosäuren. Die Bereiche für die V-, J-, D- und C-Regionen sowie die CDR1-3-Regionen sind markiert. Die Analyse der Sequenzierung der beiden CD4⁺ T-Zellklone bestätigte auch hier die Klonalität der generierten Klone. Die beiden Klone verwendeten dabei jeweils unterschiedliche TCR-Ketten: TRAV8-1*01. TRAJ43*01, TRBV6-1*01, TRBJ2-4*01, TRBD1*01 sowie TRAV8-1*01, TRAJ30*01, TRBV6-5*01, TRBJ2-7*01, TRBD2*01.

> Α. ATG GAA ACT CTC CTG GGA GTG TCT TTG GTG ATT CTA TGG CTT CAA CTG GCT AGG GTG AAC AGT CAA CAG GGA GAA GAG GAT CCT CAG GCC TTG AGC ATC CAG GAG GGT GAA AAT GCC ACC ATG AAC CDR1 AGT ATA AAC AATITTA CAG TGG TAT AGA CAA AAT TCA GGT N N L Q W Y R Q N S G TGC AGT TAC ACT AGA AAA GGC TCA AAT GAA AGA GAG AAA CAC AGT GGA AGA TTA AGA GTC ACG S N E R E K H S G R L R V GTC CAC CTA ATT TTA LATA CGT Ē., I TRAV17*01 TCC TTG TTG ATC ACG GCT TCC CGG GCA GCA GAC ACT GCT CTT GAC ACT TCC AAG AAA AGC AGT CDR3 Ν GEC GET GEA GEA ASC CAA GEA AAT CTC ATC TTT GCT ACG GAC TCT TẠC TỊC TỘT GGA AAA eğc TRAJ42*01 ACT AAA CTC TCT GTT AAA CCA AAT ATC CAG AAC CCT GAC CCT GCC GTG TAC CAG CTG AGA GAC TRAC TỘT ANA TỘC AỘT GẠC ANG TỘT GỰC TỘC CTÁ TỆC AỘC GẠT TỆT GẠT TỘT CAN AỘA AÑT GỮG TỘA CẠA AGT AAG GAT TÇT GAT GTG TAT ATC ACA GAC AAA ACT GTG CTA GAC ATG GGG TCT ATG GAC TTC AAG AGC AAC AGT GCT GTG GCC TGG AGC AAC AAA TCT GAC TTT GCA TGT GCA AAC GCC TTC AAC ANC AGC ATT ATT CCA GAA GAC ACC TTC TTC CCC AGC CCA GAA AGT TCC TGT GAT GTC AAG CTG GTC GAG ARA AGC TET GAA ACA GAT ACG AAC CTA AAC TET CAA AAC CTG TCA GTG ATT GGG TEC cea atc ctc ctc ctg ara gtg gcc ggg ttt art ctg ctc atg acg ctg cgg ctg tgg tcc agc tag

В.

ATG AGC AAC CAG GTG CTC TGC TGT GTG GTC CTT TGT CTC CTG GGA GCA AAC ACC GTG GAT GGT GGA ATC ACT CAG TCC M S N Q V L C C V V L C L L G A N T V D G G I T Q S GAT GCCIATG TAC P K Y L F R K E G Q N V I L S CDR2 CDR2 CDR2 ATA GCT GAA GGG TẠC AGC GTC TCT CGG GAG AAG AAG GAA TCC TTT CCT CTC ACT GTG ACA TCG GCC CAA AAG AAC CCG AÇA GÇT TIÇ TAT CTCITĞT GÇC AĞT AĞT ATT CĞG AĞC AĞC TAC GAG CAG TAC TIÇ GGG CÇG GGC AÇC AGG CTC AÇG GTC AÇA GAG GAC CTG AAA AAC GTG TIC CCA CCC GAG GTC GCT GTG TIT GAG CCA TCA GAG GCA GAG ATC TCC CAC ACC CAA ANG GẮC ACA CTG GTG TỘC CTG GẶC ACA GẶC TỊC TẠC CỘC GẠC CÁC GTG GẠG CTG AỐC TỘG TỘG GTG AAT GẶG AÃG GẠG GTG CAC AGT GGG GTC AGC ACA GAC CCG CAG CCC CTC AAG GAG CAG CCC GCC CTC AAT GAC TCC AGA TAC TCC CTG AGC AGC CGC CTG AGG GTC TCG GCC ACC TTC TGG CAG AAC CCC CGC AAC CAC TTC CGC TGT CAA GTC CAG TTC TAC GGG CTC TÇG GAG AAT GAC GAG TGG ACC CAG GAT AGG GCC AAA CCT GTC ACC CAG ATC GTC AGC GCC GAG GCC TGG GGT AGA GCA GAC TET GEC TEC ACC TEC GAG TET TAC CAG CAA GEG GTC CTG TET GEC AEC ATC CTC TAT GAG ATC TTG CTA GEG AAG

TRBC2

GCC ACC TTG TẠT GCC GTG CTG GTC AGT GCC CTC GTG CTG ATG GCC ATG GTC AAG AGA AAG GAT TCC AGA GGC TẠG

Abb. 19 Identifizierte TCR-Sequenzen der Flu-spezifischen CD8⁺ T-Zellklone. Dargestellt sind die Sequenzen der TCRa- und ß-Ketten, die von der überwiegenden Mehrzahl der influenzaspezifischen T-Zellklone verwendet wurden. Die verschiedenen Bereiche der TCR-Ketten sind farbig markiert: V-Region (blau), D-Region (grün), J-Region (rot), C-Region (grau), einzelne Nukleotid-Insertionen (braun). Die CDR 1-3 sind mit schwarz gestrichelten Balken umrandet. A. TCRα-Kette TRAV17*01, TRAJ42*01. B. TCRβ-Kette TRBV19*01, TRBJ2-7*01, TRBD2*02.

TRBV19*01 N1 / N2 TRBD2*02 TRBJ2-7*01

3.2.2. Klonierung und funktionelle Überprüfung identifizierter influenzaspezifischer T-Zell-Rezeptoren in J76-Zellen

Für einen Transfer der Spezifität der unter 3.2.1 identifizierten influenzaspezifischen TCRs in T-Zelllinien und primären T-Zellen wurden die TCR-Gene in den lentiviralen Vektor LeGO-iG2 kloniert. Bei der Klonierung wurden die TCR α - bzw. TCR β -Ketten zum einen getrennt in 2 unterschiedliche Vektoren kloniert (Abb. 20A, LeGO-iS2-Flu α , LeGO-iG2-Flu β), zum anderen über die 2A-Sequenz des porzinen Teschovirus in einem Vektor miteinander verbunden. Dabei wurden sowohl die Konfigurationen TCR α -2ASequenz-TCR β (Abb. 20B, LeGO-iG2-Flu α 2A β), als auch die Konfiguration TCR β -2ASequenz-TCR α (Abb. 20C, LeGO-iG2-Flu β 2A α) erfolgreich kloniert. Alle Vektoren enthielten ein Fluoreszenzprotein (eGFP bzw. T-Sapphire), das die Detektion transduzierter Zellen ermöglichte.



Abb. 20: Schematische Darstellung der LeGO-Vektorkonstrukte nach Klonierung der identifizierten influenzaspezifischen CD8⁺ TCR-Ketten. A. LeGO-iS2-Fluα und LeGO-iG2-Fluβ. B. LeGO-iG2-Fluα2Aβ. C. LeGO-iG2-Fluβ2Aα. Nicht maßstabsgetreu.

Um die Funktionalität der klonierten Konstrukte zu überprüfen, erfolgte die Transduktion der Vektoren in die αβ-TCR-defiziente T-Zelllinie J76 (s. 3.1.3). Dazu wurden VSV-Gpseudotypisierte Virusüberstände der Vektoren und eine MOI von 2 verwendet. Die J76-Zellen konnten mit allen Vektorkonstrukten erfolgreich zu ~ 90%, basierend auf der eGFP bzw. T-Sapphire-Expression, transduziert werden (Abb. 21). Bei der Zweifach-Transduktion der J76-Zellen mit den Vektoren LeGO-iG2-Fluα und LeGO-iS2-Fluβ konnten ebenfalls ~ 90% doppelt-positive T-Zellen identifiziert werden (Abb. 21A). Die Überprüfung der Expression des klonierten TCRs auf der Oberfläche transduzierter Zellen erfolgte über die Anfärbung mit monoklonalen anti-TCR Antikörpern. Die
Expression des TCR wurde durch alle Vektorkonstrukte effizient vermittelt. Die Prozentzahl der TCR-positiven Zellen war dabei in Übereinstimmung mit der zuvor gemessenen Prozentzahl an eGFP-positiven bzw. eGFP/T-Sapphire-doppelt-positiven Zellen. Dabei war kein Unterschied zwischen den mit zwei Vektoren transduzierten J76-Zellen (Abb. 21A) und den mit einem Vektor transduzierten Zellen (Abb. 21B, C) zu erkennen. J76-Zellen, die mit dem Kontrollvektor LeGO-iG2 oder entweder mit LeGO-iS2-Fluα oder LeGO-iG2-Fluβ transduziert wurden, zeigten dagegen zwar eine ebenso hohe eGFP- bzw. T-Sapphire-Expression, allerdings keine TCR- bzw. CD3-Expression nach Antikörperfärbung (nicht gezeigt).



Abb. 21: Erfolgreiche Expression der Flu-TCR-Konstrukte in J76-Zellen. J76-Zellen wurden mit den LeGO-Vektorkonstrukten **A.** LeGO-iS2-Fluα und LeGO-iG2-Fluβ, **B.** LeGO-iG2-Fluα2Aβ oder **C.** LeGO-iG2-Fluβ2Aα transduziert. 3 Tage nach Transduktion wurden die Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten TCR-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind die Zellen im *Forward Scatter* (FSC-A) gegen den *Side Scatter* (SSC-A), sowie die Expression der Vektor-Reporterproteine T-Sapphire (blau) bzw. eGFP (grün) und die TCR-Expression nach Antikörperfärbung (grau). Die Prozentzahlen geben die Anzahl eGFP-, T-Sapphire- und TCR-positiver Zellen an.

Als Nächstes wurde überprüft, ob die klonierten Flu-TCRs auf den Kontakt mit ihrem spezifischen Influenza-Antigen "Flu-M" mit Effektorfunktionen reagieren. Um dies zu klären, wurden die Flu-transduzierten J76-Zellen mit antigenpräsentierenden T2-Zellen kokultiviert, die entweder mit dem Flu-M-Peptid oder dem Kontrollpeptid SSX-2 beladen waren. Als zusätzliche Kontrolle der Effektor-Zielzellen-Interaktion dienten J76-Zellen, die mit dem Leervektor LeGO-iG2 transduziert waren. Als Positivkontrolle für die Sekretion von IFN- γ nach Aktivierung, wurden die J76-Zellen mit PMA/Ionomycin stimuliert. Die IFN- γ -Sekretion der Zellen wurde in allen Fällen per IFN- γ -ELISPOT analysiert. Wie in Abb. 22A zu sehen, reagierten die mit den verschiedenen Vektoren transduzierten J76-Zellen auf die unspezifische Stimulation mit PMA/Ionomycin mit einer

starken Sekretion von IFN-y (linke Spalte). Flu-transduzierte J76-Zellen reagierten nach Kokultivierung mit Flu-M-antigenpräsentierenden T2-Zellen ebenfalls mit starker IFN-y-Sekretion (mittlere Spalte). Alle Vektorkonstrukt-Varianten waren in der Lage, diese IFNy-Sekretion zu vermitteln. Nach Inkubation der Zellen mit dem Kontrollpeptid SSX-2 wurde eine sehr viel geringere IFN-y-Sekretion detektiert (rechte Spalte). J76-Zellen, die mit der Negativkontrolle LeGO-iG2 transduziert waren reagierten weder auf die Kokultivierung mit dem Flu-M-Peptid, noch mit dem SSX-2-Peptid (untere Spalte). Die Quantifizierung der IFN-y-Sekretion nach spezifischer Flu-M-Stimulation aus drei unabhängigen Versuchen ergab, dass die verschiedenen Vektorkonstrukte eine unterschiedlich starke IFN-y-Sekretion vermittelten (Abb. 22B). Die durch die Konstrukte LeGO-iS2-Flua/LeGO-iG2-Fluß bzw. LeGO-iG2-Flua2Aß vermittele IFN-y-Sekretion war mit 353 ± 169 Spots pro Loch (SpL) bzw. 377 ± 116 SpL etwas geringer als die 446 ± 79 SpL, die durch das Konstrukt LeGO-iG2-Fluß2Aa vermittelt wurden. Die durch LeGOiG2-Fluβ2Aα vermittelte Sekretion war dabei ähnlich stark wie die Sekretion von J76-Zellen nach unspezifischer Stimulation mit PMA/Ionomycin (459 ± 70 SpL). Wie bereits beschrieben, war die IFN-y-Sekretion nach Kokultivierung mit dem Kontrollpeptid SSX-2 durch alle Vektorkonstrukte gering (iS2-Flua/iG2-Fluß: 62 ± 53 SpL; iG2-Flua2AB: 63 ± 18 SpL; iG2-Flu β 2A α : 67 ± 26 SpL; iG2: 20 ± 11 SpL). Diese Resultate zeigen, dass die Antigenspezifität der influenzaspezifischen T-Zellklone mittels TCR-Gentransfer erfolgreich auf die J76 T-Zelllinie transferiert werden konnte.



Abb. 22. Deutliche IFN-γ-Sekretion von Flu-TCR-transduzierten J76-Zellen nach Kokultivierung mit dem Flu-M-Peptid. A. J76-Zellen wurden mit den Vektorkonstrukten LeGO-iS2-Fluα/LeGO-iG2-Fluβ, LeGO-iG2-Fluα2Aβ, LeGO-iG2-Fluβ2Aα, sowie mit der Vektorkontrolle LeGO-iG2 transduziert und nach Kokultivierung mit Flu-M bzw. SSX-2 per ELISPOT auf IFN-γ-Sekretion getestet. Als Positivkontrolle wurde PMA/Ionomycin zu den Zellen gegeben. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen IFN-γ-ELISPOTs. Die Ziffern geben die Anzahl IFN-γ-sekretierender Zellen an. B. Quantifizierung der detektierten ELISPOT-Punkte nach Kokultivierung der J76-Zellen mit Flu-M (grau) bzw. SSX-2 (schwarz.). Dargestellt ist der Mittelwert ± SD von mind. 3 unabhängigen Versuchen.

3.2.3. Transfer der Flu-spezifischen TCR-Konstrukte in primäre T-Lymphozyten

Nach erfolgreichem Flu-TCR-Transfer in die Zelllinie J76 (siehe. 3.2.2) wurde der Flu-TCR-Transfer in primäre T-Zellen mit endogenem TCR überprüft. Der endogene TCR erschwert die erfolgreiche Expression des exogenen TCR in primären Zellen, da sich die TCR-Ketten falsch miteinander verbinden können. Zusätzlich konkurrieren die Ketten um die Verfügbarkeit von CD3-Molekülen¹⁰¹. Für die Transduktion von primären T-Zellen wurden PBMCs von zwei gesunden Spendern mit CD3/CD28-Dynabeads aktiviert und mit GALV-pseudotypisiertem Virusüberstand transduziert. Für den Versuch wurde der LeGO-iG2-Fluβ2Aα ausgewählt, da er in Vorarbeiten die besten Ergebnisse geliefert hatte (s. 3.2.2). Die Transduktionsrate der primären T-Lymphozyten war mit max. 5% (gemessen an der eGFP-Markerfluoreszenz) sehr gering. In durchflusszytometrischen Analysen waren die primären Zellen zudem nicht mit dem spezifischen CD8⁺-Flu-Tetramer anfärbbar. Auch die IFN-γ-ELISPOT-Funktionalitätstests waren durchgehend negativ (nicht gezeigt). Daher ist davon auszugehen, dass die geringe Transduktionsrate und/oder die Interferenz durch den endogenen T-Zell-Rezeptor ausschlaggebend für die fehlenden Effektorreaktionen waren.

3.3. Genetische Modifikationen zur optimierten Expression des influenzaspezifischen TCR in primären T-Lymphozyten

Im zweiten Teil der Dissertation habe ich genetische Modifikationen durchgeführt, die eine verbesserte Expression des influenzaspezifischen TCR gewährleisten sollten. Zum einen habe ich eine Optimierung des für den Gentransfer verwendeten lentiviralen Vektors LeGO-iG2 durchgeführt, um eine verstärkte Expression der Vektorkonstrukte in primären T-Lymphozyten zu erreichen. Zum anderen habe ich Modifikationen an der influenzaspezifischen TCR-Sequenz durchgeführt, die eine Verringerung des TCR-*Mispairings* zum Ziel hatten. Unter dem TCR-*Mispairing* versteht man die falsche Paarung von endogenen und exogenen TCR-Ketten (s. Abb. 8), die u.a. zu einer verminderten Expression des exogenen TCRs, und damit zu verringerter Aktivität transduzierter Zellen führt (s. 1.2.1). Strategien zur Verringerung und bestenfalls zur kompletten Vermeidung des *Mispairings* sind daher bei der Optimierung des TCR-Gentransfers äußerst wichtig.

3.3.1. Optimierung des LeGO-iG2-Vektors für eine verstärkte Expression in primären T-Lymphozyten

Um die Expression des influenzaspezifischen TCR in primären T-Zellen zu verbessern, wurde eine Optimierung des lentiviralen Vektors LeGO-iG2 für T-Lymphozyten angestrebt. Dazu wurde der SFFV-Promotor durch den T-zellspezifischeren MPSV-Promotor ausgetauscht. Zudem wurde das MESV-Leader-Element sowohl hinter den MPSV-Promotor, als auch hinter den SFFV-Promotor kloniert. Abb. 23A zeigt die schematische Darstellung der neu klonierten Vektorkonstrukte. Um zu überprüfen, ob die Veränderungen des LeGO-Vektors Auswirkungen auf den viralen Titer hatten, wurden die Titer einer Virusproduktion zellunabhängig per p24-ELISA bestimmt. Für alle vier Vektorkonstrukte konnten hohe Titer zwischen 3×10^7 TU/ml und 3.8×10^7 TU/ml erreicht werden (Abb. 23B). Dabei waren die Titer der veränderten LeGO-Vektoren in allen Fällen geringfügig höher als der Titer des Ausgangsvektor LeGO-iG2 (LeGO-iG2 = 3×10^7 ; LeGO-iG2-MPSV = 3.3×10^7 ; LeGO-iG2-MPSV = 3.8×10^7 ; LeGO-iG2-SFFV-MESV = 3.4×10^7).



Abb. 23: Übersicht modifizierter lentiviraler LeGO-Vektoren und ihre Titer nach der Virusproduktion. A. Schematische Darstellung der veränderten Vektorkonstrukte für eine verbesserte Expression in T-Zellen: LeGO-iG2 (Ausgangsvektor), LeGO-iG2-MPSV, LeGO-iG2-MPSV-MESV, LeGO-iG2-SFFV-MESV. Nicht maßstabsgetreu. B. Lentiviraler Titer der VSV-pseudotypisierten LeGO-Vektoren. Der Titer wurde per HIV-1 p24 Antigen ELISA bestimmt. Ein Versuch, Unterschiede nicht signifikant.

Für eine systematische Überprüfung der Funktionalität der modifizierten LeGO-Konstrukte wurden verschiedene Zelllinien sowie primäre T-Lymphozyten transduziert. Die Expression des Reporterproteins eGFP wurde anschließend durchflusszytometrisch bestimmt und die mittlere Fluoreszenzintensität gegen den Ausgangsvektor LeGO-iG2 normalisiert (Abb. 24). Um die veränderten Expressionsstärken unabhängig von der Anzahl integrierter Proviren bewerten zu können, wurden nur Zellen mit einer Transduktionsrate zwischen 5% und 20% in die Auswertung einbezogen. Die Analyse der Expressionsstärken der modifizierten LeGO-Vektoren ergab eine signifikante Steigerung der Expressionsstärke in allen T-Zelllinen für den Vektor iG2-MPSV-MESV im Vergleich zu den anderen modifizierten Vektorkonstrukten und dem Ausgangsvektor. In der Jurkat T-Zelllinie und der T-Zelllinie PM1 konnte eine Steigerung der Expressionsstärke um jeweils mehr als 200% (Jurkat = $2,76 \pm 0,45$, p < 0,001; PM1 = 2,13 ± 0,37, p < 0,001) erreicht werden. Der modifizierte Vektor iG2-MPSV-MESV vermittelte auch eine signifikante Steigerung der Expressionsstärke in den beiden weiteren untersuchten T-Zelllinien J76 und T2. Dabei war eine Verstärkung um den Faktoren 1,62 \pm 0,17 bzw. 1,56 \pm 0,14 detektierbar (p < 0,05). Entscheidend war, dass der Vektor iG2-MPSV-MESV auch in primären T-Zellen eine signifikante Steigerung der Expressionsstärke des eGFP-Reporterproteins vermitteln konnte (1,68 ± 0,11, p < 0,001). Die Veränderungen der Expressionsstärken nach Transduktion der T-Zelllinien durch die anderen modifizierten LeGO-Vektorkonstrukte iG2-MPSV und iG2-SFFV-MESV waren im Gegensatz dazu nicht signifikant, und entweder vergleichbar mit oder schwächer als der Ausgangsvektor iG2. Nach Transduktion der beiden Zelllinien 293T (Fibroblastenzelllinie) und K562 (Zelllinie myeloiden Ursprungs), war ebenfalls keine Verbesserung der Expressionsstärke durch die modifizierten Vektoren iG2-MPSV und iG2-SFFV-MESV zu beobachten. Auch der Vektor iG2-MPSV-MESV zeigte in den nicht-T-Zelllinien keine verbesserte Expression. Bezogen auf den Ausgangsvektor war eine deutlich verringerte Expressionsstärke aller modifizierter Vektorkonstrukte bei den K562-Zellen sichtbar (iG2-MPSV: 0,57 ± 0,04; iG2-MPSV-MESV: 0,62 ± 0,12; iG2-SFFV-MESV: 0,56 ± 0,06). In 293T-Zellen wurde eine ähnlich starke Abnahme der Expressionsstärke für die Vektoren iG2-MPSV (0,67 ± 0.09) und iG2-SFFV-MESV (0,35 ± 0,05) bzw. keine Veränderung der Expressionsstärke durch den Vektor iG2-MPSV-MESV gegenüber dem LeGO-Ausgangsvektor (1,01 ± 0,26) festgestellt. Daher ist davon auszugehen, dass die Modifikationen des LeGO-Vektors LeGO-iG2-MPSV-MESV, wie angestrebt, zu einer T-zellspezifischen Erhöhung der Expressionsstärke geführt haben. Aufgrund der Überlegenheit des modifizierten LeGO-iG2-MPSV-MESV Vektors, nun LeGO-MP genannt, gegenüber dem Ausgangsvektor LeGO-iG2 wurde dieser für die nachfolgenden Versuche verwendet.



Abb. 24: Steigerung der eGFP-Expressionsstärke in T-Zelllinien und primären T-Zellen durch Austausch des Promotors im Vektorkonstrukt LeGO-iG2-MPSV-MESV (LeGO-MP). A. Transduktion der Zelllinien Jurkat, PM1, J76, T2, 293T und K562 mit den LeGO-Vektoren LeGO-iG2, LeGO-iG2-MPSV, LeGO-iG2-MPSV-MESV (LeGO-MP) und LeGO-iG2-SFFV-MESV. Quantifizierung der durchflusszytometrisch gemessenen Expression 4 Tage nach Transduktion. Die Fluoreszenzintensität wurde gegen LeGO-iG2 normalisiert und ist als Mittelwerte \pm SD für drei unabhängige Versuche dargestellt. Die statistische Analyse wurde per *One-way* ANOVA durchgeführt: *p < 0,05, ***p < 0,001. B. Transduktion von aktivierten primären T-Zellen mit dem Ausgangsvektor LeGO-iG2 und LeGO-iG2-MP. Die Fluoreszenzintensität wurde gegen LeGO-iG2 normalisiert und ist als Mittelwerte \pm SD für drei Messungen dargestellt. Für die statistische Analyse wurde t: ***p < 0,001.

3.3.2. Genetische Modifikationen der influenzaspezifischen TCR-Ketten durch das Einfügen einer weiteren Disulfidbrücke

Um die Expression des influenzaspezifischen TCR in primären T-Zellen weiter zu verbessern, wurde getestet, ob das Einfügen einer zusätzlichen Disulfidbrücke zwischen den konstanten Regionen der transgenen TCR-Ketten zu geringerem *Mispairing* zwischen dem endogenen und exogenen TCRs führt. Dadurch könnte es zu einer verstärkten Expression des transgenen TCR kommen. Gleichzeitig wurde der für T-Zellen optimierte Vektor LeGO-MP verwendet. Die Punktmutationen für die Generierung der zusätzlichen Disulfidbrücke konnten erfolgreich per Megaprimer-PCR eingefügt und durch Sequenzierungen bestätigt werden (nicht gezeigt). Durch die Punktmutationen resultierte in der TCRα-Kette eine Substitution der Aminosäure Threonin an Position 48 mit der Aminosäure Cystein. Bei der TCRβ-Kette wurde durch die Punktmutationen die Aminosäure Serin an Position 57 durch ein Cystein ersetzt. Das resultierende Vektorkonstrukt LeGO-MP-FluCYS sowie die Punkmutationen sind in Abb. 25A schematisch dargestellt. J76-Zellen konnten anschließend effizient mit LeGO-MP-

FluCYS transduziert werden. Die Analyse der Expression des FluCYS-TCR an der Oberfläche der Zellen zeigte, dass fast alle transduzierten Zellen den TCR exprimierten (Abb. 25B). Nach Kokultivierung der J76-Zellen mit Flu-M-Peptid-präsentierenden Zellen konnte per ELISA eine deutliche IL-2- (3125 ± 1447 pg/ml) und IFN-v-Sekretion (230,7 ± 85,3 pg/ml) detektiert werden (Abb. 25C). Bei LeGO-iG2-transduzierten, sowie untransduzierten J76-Zellen konnten hingegen keine bzw. nur geringe Mengen IL-2 und IFN-y detektiert werden (LeGO-iG2: IL2 = nicht detektierbar, IFN-y = 29,9 pg/ml; J76untransduziert: IL2 = 12 pg/ml, IFN- γ = 13,2 pg/ml). Entscheidend war jedoch, ob die zusätzliche Disulfidbrücke in primären T-Zellen verbesserte Effektorfunktionen des transgenen TCR vermitteln konnte. Nach Kokultivierung der transduzierten primären Zellen mit Flu-M-Peptid-präsentierenden Zellen konnte diesmal eine deutliche Sekretion von IFN-γ durch die transduzierten Zellen detektiert werden (Abb. 25D, links). Diese war mit 267,5 ± 13,4 pg/ml in einem moderaten Bereich, jedoch deutlich über der Menge, die für die LeGO-iG2-transduzierten Kontrollzellen detektiert wurde (36 pg/ml). Die Analyse von IL-2 zeigte dagegen ähnlich hohe IL-2-Sekretionsmengen sowohl durch die FluCYStransduzierten primären T-Zellen als auch durch die Kontrollzellen (LeGO-MP-FluCYS = 265 ± 335 pg/ml; LeGO-iG2 = 338 ± 447 pg/ml). Es ist also davon auszugehen, dass die Expression des influenzaspezifischen TCR in primären Zellen durch das Einfügen einer weiteren Disulfidbrücke sowie durch die Verwendung des optimierten Vektors LeGO-MP geringfügig verbessert werden konnte. Für weitere Verbesserungen der Funktionalität des transgenen TCR bedurfte es allerdings weiteren Modifikationen.



Abb. 25: Modifizierung des influenzaspezifischen TCR durch das Einfügen einer zusätzlichen Disulfidbrücke führt in T-Zelllinien zu einer deutlicher Verbesserung und in primären T-Zellen zu einer moderaten Verbesserung der Expression. Α. Schematische Übersicht des modifizierten Vektorkonstruktes LeGO-MP-FluCYS (nicht maßstabsgetreu). Eingezeichnet sind die Orte der Cysteine gegen ersetzten Aminosäuren, sowie die Punktmutationen, die zu diesem Austausch geführt haben. В. Transduktion von J76-Zellen mit LeGO-MP-FluCYS. Detektion des influenzaspezifischen TCR mittels CD3- und TCR-Antikörperfärbung. C. IL-2- und IFN-y-Sekretion von LeGO-MP-FluCYS transduzierten J76-Zellen nach Kokultivierung mit Flu-M-präsentierenden Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD aus zwei bzw. drei Versuchen. D. Primäre T-Lymphozyten wurden mit LeGO-MP-FluCYS transduziert und die IL-2- bzw. IFN-y-Sekretion nach Kokultivierung mit Flu-Mpräsentierenden Zellen per ELISA überprüft. Dargestellt ist der SD Mittelwert ± aus zwei Versuchen.

3.3.3. Murinisierung der influenzaspezifischen TCR-Ketten für eine verstärkte Expression des exogenen TCR

Nachdem die Expression des influenzaspezifischen TCR in primären Zellen durch das Einfügen einer weiteren Disulfidbrücke, sowie durch die Verwendung des optimierten Vektors LeGO-MP nur geringfügig verbessert werden konnte (s. 3.3.2), wurden weitere Modifikationen der TCR-Ketten durchgeführt. Zum einen wurden die humanen C-Regionen der TCRα- und β-Ketten gegen die murinen Varianten ausgetauscht, um die falsche Paarung zwischen exogenen und endogenen TCR-Ketten weiter zu verringern. Zum anderen wurde die gesamte TCR-Sequenz für eine verbesserte Expression in

humanen Zellen kodonoptimiert (2.2.18.6). In Abb. 26A ist ein Vergleich der Aminosäuresequenz der humanen und murinen C-Regionen des TCR dargestellt. Die humane und murine Aminosäuresequenzen der TCRa-Kette haben eine Identität von 65% (91 von 141 AS sind identisch), während die humane TCRβ-Kette eine 79%ige Identität (139 von 179 AS) zu ihrem murinen Äquivalent aufweist. Zusätzlich zu dem optimierten lentiviralen Vektor LeGO-MP wurde der bereits für den TCR-Transfer etablierte gammaretrovirale Vektor MP91⁽⁹²⁾ verwendet. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass fehlende bzw. geringe Effektorfunktionen in primären Zellen aus ungenügender Eignung des lentiviralen Vektors resultierten. Beide Vektoren enthielten neben der gleichen murinisierten und kodonoptimierten TCR-Expressionskassette, ähnliche Promotor-Konfigurationen (MPSV-Promotor, MESV-Leader), ein posttranskriptionales Regulationselement (wPRE) sowie eine IRES-eGFP-Sequenz (Abb. 26B). Die Vektoren waren daher gut vergleichbar und die IRES-Sequenz ermöglichte den Vergleich der Transduktionseffizienzen und Expressionsstärken.

A. Konstante Region der TCRα-Kette

hcα	1	Q	Ν	Ρ	D	Ρ	Α	٧	Υ	Q	L	R	D	S	Κ	S	S	D	Κ	S	٧	С	L	F	Т	D	F	D	s	Q	Т	Ν
mca	1	Q	Ν	Ρ	Е	Ρ	Α	V	Υ	Q	L	Κ	D	Ρ	R	S	Q	D	S	Т	L	С	L	F	Т	D	F	D	S	Q	1	Ν
how	V	6	0	•	V	D	•	D	V	V	-	T	-	V	-		_	-		P	6		D	-	V		M	0	•	V	•	14/
ncu	v	3	Q	3	n	U	3	U	V	1	<u> </u>	<u> </u>	U	n	<u> </u>	V		0	IVI	л	3	IVI	U	г	n	3	IN	3	А	V	A	vv
mca	V	Ρ	Κ	Т	Μ	Е	S	G	Т	F	1	Т	D	Κ	Т	V	L	D	Μ	Κ	Α	М	D	S	Κ	S	Ν	G	А	1	Α	W
					_		_								_				_				_						_			
hcα	s	N	ĸ	s	D	F	Α	С	Α	N	Α	F	Ν	N	s	- I	- I	Р	E	D	т	F	F	Р	s	Р	E	s	S	с	D	V
mca	S	Ν	Q	Т	S	F	Т	С	Q	D	1	F	Κ	Е	Т	-	-	-	-	Ν	А	Т	Υ	Ρ	S	S	D	V	Ρ	С	D	А
hcα	ĸ	L	V	Е	κ	s	F	Е	т	D	т	Ν	L	Ν	F	Q	Ν	L	S	v	1	G	F	R	1	L	L	L	κ	v	Α	G
mcα	Т	L	Т	Е	Κ	S	F	Е	Т	D	M	Ν	L	Ν	F	Q	Ν	L	S	V	M	G	L	R	1	L	L	L	Κ	V	А	G
hcα	F	Ν	L	L	Μ	т	L	R	L	w	S	s	+																			
mca	F	N	L	L	Μ	Т	L	R	L	W	S	S	+																			

Konstante Region der TCRβ-Kette

													_																			
hcβ2	E	D	L	K	Ν	v	F	Р	Р	E	v	Α	V	F	Е	Р	S	E	Α	Е	1	S	н	Т	Q	к	А	т	v	v	С	L
mcβ2	E	D	L	R	N	V	Т	Ρ	Ρ	K	V	S	L	F	E	Ρ	S	K	Α	Е	1	Α	Ν	K	Q	Κ	Α	Т	L	V	С	L
hcß2	Α	Т	G	F	Y	Р	D	н	٧	Е	L	S	w	w	٧	Ν	G	κ	Е	٧	н	S	G	٧	s	т	D	Р	Q	Ρ	L	κ
mcß2	A	R	G	F	F	Ρ	D	н	V	E	L	S	W	W	V	Ν	G	K	Е	V	н	S	G	V	S	Т	D	Ρ	Q	A	Y	K
	_			_																									_			
hcβ2	E	Q	Ρ	Α	L	N	D	S	R	Y	С	L	S	S	R	L	R	٧	S	Α	т	F	W	Q	Ν	Р	R	Ν	н	F	R	С
mcβ2	E	-	-	-	-	S	N	Y	S	Y	С	L	S	S	R	L	R	V	S	Α	Т	F	W	н	Ν	Ρ	R	Ν	н	F	R	С
				_																			_							_		
hcß2	Q	V	Q	F	Y	G	L	S	Е	N	D	E	w	т	Q	D	R	A	κ	Ρ	V	т	Q	1	V	S	Α	Е	Α	W	G	R
mcB2	Q	V	Q	F	H	G	L	S	E	E	D	K	W	P	E	G	S	P	K	P	V	Т	Q	N	1	S	A	E	A	W	G	R
hcß2	Α	D	С	G	F	т	S	E	S	Y	Q	Q	G	v	L	S	Α	т	T	L	Y	Е	Т	L	L	G	к	Α	т	L	Y	A
mcB2	A	D	С	G	1	Т	S	A	S	Y	H	Q	G	V	L	S	A	Т	1	L	Y	E	1	L	L	G	K	A	Т	L	Y	A
										_																						
hcß2	v	L	v	S	A	L	v	L	М	Α	М	v	к	R	κ	D	S	R	G	_												
mcβ2	V	L	V	S	G	L	V	L	Μ	Α	Μ	V	К	K	Κ	N	S	-	-	_												



Abb. 26: Murinisierung des influenzaspezifischen TCR. A. Vergleich der Aminosäuresequenzen der humanen (h) und murinen (m) C-Regionen. Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind rot unterlegt, Lücken in der Aminosäuresequenz sind grau unterlegt, Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz sind weiß unterlegt. B. Schematische Darstellung der murinisierten und kodonoptimierten Vektorkonstrukte LeGO-MP-muFlu und MP91-muFlu. Nicht maßstabsgetreu. SD, *splice donor*, SA, *splice acceptor*.

Die Funktionalität der klonierten lentiviralen und gammaretroviralen murinisierten Vektorkonstrukte wurde erneut in der a
ß-TCR-defizienten Zelllinie J76 überprüft. Die Transduktion der Vektorkonstrukte LeGO-MP-muFlu, MP91-muFlu und LeGO-iG2 (Kontrolle) erfolgte mit VSV-pseudotypisierten Virusüberständen und einer MOI von 1. Die J76-Zellen konnten mit allen drei Vektoren erfolgreich transduziert werden. Basierend auf der eGFP-Expression wurden vergleichbare Transduktionseffizienzen (LeGO-MP-muFlu: 66,5%; MP91-muFlu 73,6%) für die beiden unterschiedlichen Vektortypen detektiert (Abb. 27A, linke Spalte). Die Expression des murinisierten Influenza-TCR an der Oberfläche transduzierter Zellen wurde durch Antikörperfärbungen gegen die murine TCR-Kette (mTCR) und gegen die CD3-Moleküle bestätigt (Abb. 27A, mittlere Spalten). Die Prozentzahlen der mTCR- und CD3-positiven T-Zellen waren dabei mit 63,9% und 61,7% für LeGO-MP-muFlu bzw. 72,6% und 71,2% für MP91-muFlu in Übereinstimmung mit den jeweiligen Prozentzahlen der eGFP⁺-Zellen. Im Einklang damit zeigten beim *Gating* auf die eGFP⁺-Zellen, diese fast alle eine gleichzeitige Expression des transgenen TCR und der CD3-Moleküle (Abb. 27B). Im Gegensatz dazu war bei den mit der Vektorkontrolle LeGO-iG2 transduzierten Zellen zwar eine sehr hohe eGFP-Expression (91,6%) detektierbar, jedoch keine Expression von TCR- oder CD3-Molekülen. Als Nächstes wurde untersucht, ob die murinisierten und kodonoptimierten TCRs noch immer spezifische Effektorfunktionen nach Kontakt zu ihrem Antigen (Flu-M) vermitteln. Wie in Abb. 27C zu erkennen, sekretierten muFlu-TCR transduzierte J76-Zellen große Mengen IL-2 nach Kontakt zum ihrem spezifischen Flu-M-Peptid, aber nicht nach Kokultivierung mit dem Kontrollpeptid SSX-2. Der Kontrollvektor LeGO-iG2 vermittelte weder bei Kokultivierung mit dem Flu- noch mit dem SSX-2-Peptid eine Sekretion von IL-2. Der Vergleich des lentiviralen Vektors LeGO-MP-muFlu und des gammaretroviralen Vektors MP91-muFlu zeigt, dass beide Vektoren in der Lage waren, eine etwa gleich starke IL-2-Sekretion zu vermitteln (LeGO-MP-muFlu = 2892,5 ± 2124,7 pg/ml; MP91-muFlu = 2599,0 ± 2759,1 pg/ml; LeGO-iG2 = keine Sekretion detektierbar). Die transduzierten Zellen zeigten außerdem eine moderate IFN-y-Sekretion bei Kontakt zum Flu-M-Peptid, jedoch keine IFN-y-Sekretion bei Kontakt zum SSX-2-Peptid (nicht gezeigt).



Abb. 27: Erfolgreiche Expression des murinisierten TCR in J76-Zellen sowie starke Zytokinsekretion von muFlu-transduzierten J76-Zellen. A. 3 Tage nach Transduktion von J76-Zellen mit den Konstrukten LeGO-MPmuFlu, MP91-muFlu und LeGO-iG2 (Vektorkontrolle) erfolgte die Detektion des murinisierten TCR durchflusszytometrisch nach Anfärbung mit CD3- und mTCR-Antikörpern. Die Prozentzahlen geben die Anzahl eGFP-, CD3-, mTCR- und hTCR-positiver Zellen an. B. Darstellung der CD3- und mTCR-doppeltpositiven J76-Zellen (oberer rechter Quadrant) nach *Gating* auf eGFP⁺-Zellen. C. Transduzierte J76-Zellen wurden mit peptidbeladenen, antigenpräsentierenden T2-Zellen kokultiviert. Die IL-2-Sekretion wurde nach 20-stündiger Inkubation per IL-2-ELISA gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD aus zwei unabhängigen Versuchen.

Nach erfolgreichem Flu-TCR-Transfer in die Zelllinie J76 wurde erneut die Funktionalität des Flu-TCR-Transfers in primäre T-Lymphozyten getestet. Primäre aktivierte T-Zellen zweier unterschiedlicher Spender wurden mit GALV-pseudotypisiertem Virusüberstand auf RetroNectin transduziert. Im Gegensatz zu vorherigen Transduktionsversuchen, bei denen lediglich eine Transduktionsrate von maximal 5% erreicht werden konnte, ergab die Transduktion mit dem murinisierten TCR wesentlich höhere Transduktionsraten. Es konnte sowohl für das lentivirale Konstrukt LeGO-MP-muFlu (zwischen 10-18%), als auch für den gammaretroviralen Vektor MP91-muFlu (zwischen 20-30%) eine deutliche

Steigerung der Transduktionsrate erreicht werden. Die Anzahl der transduzierten primären Zellen, die den transgenen TCR exprimierten, wurde mit einem murinen TCR-Antikörper sowie mit Hilfe eines für den Influenza-TCR-spezifischen Tetramers detektiert. Abb. 28A und B zeigen eine repräsentative Transduktion von primären T-Zellen aus dem Buffy Coat BCBBe3 mit LeGO-MP-muFlu. Von den 17,3% eGFP⁺-Zellen waren dabei mit 9,7% mehr als die Hälfte (56%) der Zellen durch den murinen Antikörper und über 40% durch das Flu-Tetramer anfärbbar. Mock-transduzierte Zellen konnten wie erwartet weder mit dem mTCR-Antikörper noch mit dem Flu-Tetramer angefärbt werden (nicht gezeigt). Nachdem der murinisierte influenzaspezifische TCR mit beiden Vektorkonstrukten erfolgreich in primären T-Zellen exprimiert werden konnte, wurde überprüft, ob die Zellen mit einer spezifischen Sekretion von Zytokinen (IFN- γ , TNF- α , IL-2) auf ihr Antigen (Flu-M) reagieren. Sowohl die lentiviral, als auch die gammaretroviral transduzierten primären T-Lymphozyten exprimierten nach Kontakt mit dem Flu-M-Peptid große Mengen an IFN-y (Abb. 28C, LeGO-MP-muFlu = 9086 ± 8304 pg/ml (BCBBe3) und 6789 ± 8548 pg/ml (BCBBe4); MP91-muFlu = 21706 ± 10150 (BCBBe3) und 12083 ± 12784 pg/ml (BCBBe4)). Zudem exprimierten sie große Mengen IL-2 (Abb. 28E, LeGO-MP-muFlu = 480 ± 538 pg/ml (BCBBe3) und 1035 ± 1137 pg/ml (BCBBe4); MP91-muFlu = 747 ± 801 pg/ml (BCBBe3)und 2050 ± 2262 pg/ml (BCBBe4)), sowie geringe Mengen TNF- α (Abb. 28D, LeGO-MP-muFlu = 32,5 ± 17,7 pg/ml (BCBBe4); MP91-muFlu = 193,5 ± 180,3 pg/ml (BCBBe3)). Dagegen zeigten muFlu-transduzierte Zellen bei Kontakt mit dem Kontrollpeptid SSX-2 keine Sekretion von Zytokinen. Auch die mit dem Kontrollvektor LeGO-iG2 transduzierten Zellen zeigten keine Zytokinsekretion nach der Kokultivierung mit dem Flu-M- bzw. dem SSX-2-Peptid. Vergleicht man die beiden Vektorkonstrukte, fällt auf, dass die T-Lymphozyten, die mit dem gammaretroviralen Vektor MP91-muFlu transduziert wurden, größere Mengen IL-2, IFN-γ und TNF-α produzierten. Um einen Einfluss der höheren Transduktionsrate des gammaretroviralen Vektors auszuschließen, wurden weitere Versuche mit Zellen durchgeführt, die anhand der Tetramer-Färbung die gleiche Prozentzahl transduzierter Zellen aufwiesen. Die Auswertung der IFN-y-ELISAs ergab, dass die gammaretroviral transduzierten Zellen auch in diesem Versuchsansatz höhere Mengen des Zytokins sekretierten (Abb. 28D, LeGO-MP-muFlu = 1346 \pm 667 pg/ml; MP91-muFlu = 2418 \pm 1304 pg/ml). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Kodonoptimierung sowie die Murinisierung der influenzaspezifischen TCR-Sequenzen zu einer stark verbesserten Expression des Transgens in primären T-Lymphozyten geführt hat, die sich anhand spezifischer Effektorfunktionen zeigte.



Abb. 28: Erfolgreiche Transduktion von primären T-Lymphozyten mit den murinisierten influenzaspezifischen TCR-Konstrukten, sowie starke Zytokinsekretion nach Kontakt mit dem spezifischen Influenza-Matrixpeptid. A. Transduktion von primären T-Lymphozyten 3 Tage nach Aktivierung mit CD3/CD28-Dynabeads. Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse einer repräsentativen Transduktion mit dem Vektor LeGO-MP-muFlu. Die Dot-Plots zeigen die Transduktionseffizienzen anhand der Vektor-eGFP-Expression, sowie die Antikörperfärbungen gegen den murinen TCR und die spezifische Flu-Tetramer-Färbung. B. Darstellung mTCR- und Flu-Tetramer doppetpositiver primärer T-Lymphozyten 3 Tage nach Transduktion. C-E. IL-2-, TNF-α- und IFN-γ-Sekretion primärer T-Zellen (BCBBe3, BCBBe4), die mit dem lentiviralen Vektorkonstrukt LeGO-MP-muFlu bzw. dem gammaretroviralen Vektorkonstrukt MP91-muFlu transduziert waren. Die transduzierten Zellen wurden mit antigenpräsentierenden (Flu-M oder SSX-2) Zellen kokultiviert und der Überstand nach 20 h per ELISA auf verschiedene Zytokine analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von 2-3 unabhängigen Experimenten. F. Für einen Vergleich der Vektorkonstrukte wurden primäre transduzierte Zellen eingesetzt, die die gleiche Anzahl von Flutetramerpositiven Zellen aufwiesen. Die IFN-y-Sekretion wurde ebenfalls per ELISA untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD für 3 verschiedene Buffy Coats und 2 unabhängige Experimenten. n.d., nicht detektierbar.

3.4. Knockout der endogenen T-Zell-Rezeptor-Gene zur Verhinderung des TCR-*Mispairings*

Das Ziel des dritten Abschnittes meiner Dissertation war die Optimierung des TCR-Gentransfers durch einen Knockout der endogenen TCR-Gene, wodurch die komplette Verhinderung des TCR-*Mispairings* erreicht werden sollte. Für den Knockout der endogenen TCR-Gene habe ich TCR-sequenzspezifische TALE-Nukleasen designt und kloniert. Für den Transfer der TALEN in T-Zelllinien und primäre T-Lymphozyten habe ich verschiedene Methoden optimiert. Der TALEN-vemittelte TCR-Knockout wurde sowohl durchflusszytometrisch, als auch auf genomischer Ebene bestätigt. Anschließend habe ich die Kultivierung und Transduktion der modifizierten T-Lymphozyten untersucht und getestet, ob es aufgrund der Verhinderung des TCR-*Mispairings* zu verbesserten Effektorfunktionen der transduzierte Zellen kommt.

3.4.1. Identifikation TCR-spezifischer TALEN-Zielsequenzen

Als Zielsequenz für die TCR-spezifischen TALEN wurden die konstanten Bereiche der TCR α - und β -Gene verwendet. Für die Auswahl der TALE-Sequenzen, die einen Knockout der konstanten Bereiche der α - und β -Gene ermöglichen sollten, wurden verschiedene Kriterien festgelegt. Das Ausgangskriterium war eine mit der Base T beginnende Zielsequenz mit einer Länge von 20 bp. Um die Fokl Dimerisierung des rechten und linken TALEN-Arms zu ermöglichen, wurde des Weiteren eine *Spacer*-Länge von mind. 14 bp und max. 20 bp festgelegt. Nach erstem Screening der Ausgangssequenzen auf passende TALEN-Paare konnten für die konstanten Bereiche der α - und β -Ketten je über 100 verschiedene TALEN-Paare identifiziert werden. Diese wurden mit Hilfe der TALEN-Design-Richtlinien nach Doyle *et. al.*⁹⁷ weiter selektioniert und anschließend jeweils zwei der verbliebenen TCR α - und β -spezifischen TALE-RVDs für die Klonierung ausgewählt. Für die ausgewählten RVDs fanden sich mit Hilfe des *Paired Target Finder*⁹⁷ keine *off-target-Hits*. Die RVDs der verwendeten TALE-Monomere, ihre Zielsequenzen sowie die Position ihrer Bindungsstellen im humanen Genom sind in Abb. 29 dargestellt.



Abb. 29 Schematische Darstellung der identifizierten TCR-spezifischen TALEN-RVDs, ihrer Zielsequenzen, sowie ihrer Bindungsstellen auf den Chromosomen. A,C: Schematische Darstellung eines Teils von Chromosom 14 bzw. 7 mit eingezeichneten Bindungsstellen der klonierten TALEN. B,D. Darstellung der ausgewählten TCR-Zielsequenz sowie der entsprechenden TALE-Monomere.

3.4.2. DNA-Elektroporation von Reporterproteinen und TALEN in Jurkat-Zellen

Für die Transfektion von T-Lymphozyten mit den TCR-spezifischen TALEN wurde zunächst die Elektroporation von Plasmid-DNA getestet. Bei der Elektroporation wird durch Spannungsimpulse eine vorübergehende Permeabilität der Zellmembran erreicht, wodurch DNA oder andere Moleküle in die Zelle gelangen können. Als Zielzellen dienten Jurkat Überprüfung zunächst T-Zellen, die zur bereits beschriebener Elektroporationsparameter (1050 μF, 1000 Ω, 300 V, Exponential Decay) mit den Markerplasmiden LeGO-iG2 und LeGO-iS2 elektroporiert wurden. Der Erfolg der Elektroporation wurde durchflusszytometrisch anhand der Expression der Reporterproteine eGFP bzw. T-Sapphire ermittelt. Die Elektroporation mit zwei Plasmiden sollte Erkenntnis darüber bringen, zu welchem Prozentsatz beide Plasmide durch eine Zelle aufgenommen werden. Diese Fragestellung ist insofern von großer Wichtigkeit, als dass die verwendeten TALEN nur als Paare erfolgreich funktionieren können. Abb. 30 zeigt das Ergebnis der Elektroporation von Jurkat-Zellen ohne DNA, sowie mit gleichzeitig jeweils 5 µg bzw. 20 µg der DNA-Plasmide LeGO-iG2 und LeGOiS2. Anhand der exprimierten Fluoreszenzproteine ist zu erkennen, dass die Elektroporation sowohl mit 5 µg, als auch mit 20 µg pDNA erfolgreich war. Dabei war die Elektroporationseffizienz bei der Verwendung von je 5 µg Plasmid-DNA mit 56,1% (eGFP⁺) und 49,4% (T-Sapphire⁺) deutlich geringer als bei der Verwendung von 20 μg pDNA (82,2% eGFP⁺, 76,3% T-Sapphire⁺).



Abb. 30: Erfolgreiche DNA-Elektroporation von Jurkat-Zellen mit den Plasmiden LeGO-iG2 und LeGO-iS2. Durchflusszytometrische Analyse pDNA-elektroporierter Jurkat-Zellen 24 h nach der Elektroporation. Die Prozentzahlen geben die Zahl eGFP- (linke Spalte), T-Sapphire-positiver (mittlere Spalte) bzw. eGFP- und T-Sapphire- (rechte Spalte) doppeltpositiver Zellen nach gleichzeitiger Elektroporation beider Plasmide an.

Bei der Verwendung von je 20 µg pDNA wurde nach der Elektroporation eine deutlich geringere Anzahl von vitalen Zellen (~ 45%) gemessen, als bei der Elektroporation von 5 µg pDNA (~78%). Jedoch nahm bei niedrigeren Transfektionsraten, die durch die Elektroporation geringerer DNA-Mengen sowie durch den Einsatz von niedrigeren Voltzahlen (225 V, 250 V, 275 V) resultierten, auch die Anzahl doppeltpositiver (eGFP⁺/T-Sapphire⁺) Zellen deutlich ab (42,9% im Vergleich zu 86,2%). Dies dürfte sich im Hinblick auf die Elektroporation der TALEN-Paare deutlich nachteilig auswirken. Die der **TCR-spezifischen** TALEN wurde daher Elektroporation trotz eines elektroporationsbedingten Zelltods von ca. 50% mit 20 µg pDNA durchgeführt. Elektroporierte Zellen wurden 3-4 Tage bei 37°C kul tiviert und anschließend mit TCRund CD3-Antikörpern gefärbt. Die Antikörperfärbung zeigte bei allen vier verwendeten TALEN-Paaren eine, im Vergleich zu den Kontrollzellen, deutlich verringerte Anzahl der TCR- und CD3-exprimierenden Jurkat-Zellen. Dies lässt auf einen erfolgreichen Knockout der TCR-Loci durch die TALE-Nukleasen schließen. Abb. 31A zeigt die durch TALEN-TCRα2 sowie durch die TALEN-TCRβ1-vermittelten Knockouts als die Histogramm (TALEN-TCR α 1- bzw. – β 2-Knockout als Histogramm nicht gezeigt). Abb. 31B zeigt die Quantifizierung des TCR-Knockouts in Jurkat-Zellen anhand von drei unabhängigen Versuchen. Für den Knockout des TCR α -Locus war die TALEN-TCR α 2 etwas effizienter als die TALEN-TCR α 1 (TALEN α 2 = 24,6 ± 12,13%; TALEN α 1 = 19,63 ± 12,84%). Beim TCR β -Locus konnte durch die TALEN-TCR β 1 ein höherer Knockout detektiert werden als durch die TALEN-TCR β 2 (TALEN β 1 = 23,5 ± 7,24%; TALEN β 2 = 13,87 ± 4,5%). Als Kontrolle dienten zum einen ohne pDNA, sowie jeweils nur mit dem linken oder dem rechten TALEN-Arm elektroporierte Zellen. Dabei wiesen 4,9 ± 0,5% an Zellen, TALEN-unvermittelt, keinen TCR-CD3-Komplex auf. Für die folgenden Versuche wurden die TALEN-TCR α 2 und die TALEN-TCR β 1 verwendet.



Abb. 31: Erfolgreicher TCR-Knockout durch alle vier identifizierten und klonierten TALEN-Paare in Jurkat T-Zellen. A. Darstellung eines repräsentativen TCR α - und TCR β -Knockouts in Jurkat-Zellen. Das Histogramm zeigt den Overlay des TALEN-vermittelten Knockouts (hellgrau/dunkelgrau) und die Kontrolle, bei der jeweils nur der rechte oder der linke TALEN-Arm elektroporiert wurde (ungefüllt). B. Quantifizierung des durch die TALEN-Paare α 1, α 2, β 1 und β 2 vermittelten TCR-Knockouts in Jurkat Zellen 4 Tage nach der Elektroporation. Als Kontrolle wurde jeweils entweder der rechte oder der linke TALEN-Arm elektroporiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von 3 unabhängigen Versuchen. Für die statistische Analyse wurde der gepaarte t-test verwendet: *p < 0,05.

Aufgrund der beobachteten Toxizität bei der DNA-Elektroporation von zwei Plasmiden, wurde getestet, ob die Expression beider TALEN-Arme aus einem Plasmid möglich ist. Die TALEN-Arme der TALEN-TCR β 1 wurden dazu über eine 2A Sequenz verbunden (Abb. 32) und erneut per DNA-Elektroporation (1050 µF, 1000 Ω , 300 V) in Jurkat-Zellen eingebracht. Erfolgreich elektroporierte Zellen konnten aufgrund der im Vektor vorhandenen IRES-eGFP-Sequenz detektiert werden. Nach Anfärbung mit einem TCR-spezifischen Antikörper wurde lediglich ein TALEN-vermittelter Knockout von 10% (Abb. 32B) detektiert, der verglichen mit dem zuvor erzielten Knockout durch die Elektroporation der Einzelkonstrukte (23,5 ± 7,24%) wesentlich geringer war.



Abb. 32: Geringer TCR-Knockout durchdie DNA-Elektroporation des TALENβ1-2A-Vektorkonstruktes.A.SchematischeDarstellung des Vektorkonstruktes pTALEN-2A-TCRβ1.Nichtmaßstabsgetreu.B.DurchflusszytometrischeAnalyse der mit dem2A-TALEN-Konstrukt elektroporierten bzw. ohneDNA elektroporierten Jurkat-Zellen.DNA elektroporierten Jurkat-Zellen.Darstellungder eGFP-positiven sowie TCR-positiven und -negativen Zellen.RS, Restriktionsschnittstelle.

3.4.3. Reporterprotein- und TALEN-mRNA-Elektroporation in Jurkat-Zellen

Für den Transport der TALEN wurde als Alternative zur DNA-Elektroporation die Elektroporation von in vitro-transkribierter mRNA getestet (s. 2.2.14), um eine geringere Toxizität zu erreichen. Zunächst wurden die optimalen Elektroporationsparameter für Jurkat-Zellen etabliert. Dazu wurden diese mit eGFP-mRNA (2 µg und 5 µg) unter verschiedenen Parametern elektroporiert (Voltzahlen: 200 V, 250 V, 275 V, 300 V; Pulslängen: 30 ms, 20 ms, 10 ms, 5 ms, 2 ms). Die Expression des Reporterproteins wurde nach 24 h durchflusszytometrisch bestimmt. Es zeigte sich, dass Jurkat-Zellen mit einer Square Wave Elektroporation, einer Voltzahl von 300 V, einer Pulslänge von 20 ms und sowohl mit 2 µg mRNA, als auch mit 5 µg mRNA, sehr effizient zu über 90% transfiziert werden können (Abb. 33A). Gleichzeitig war der durch die Elektroporation induzierte Zelltod mit ca. 20% sehr viel geringer als bei vergleichbar effizienter DNA-Elektroporation (Zelltod ca. 55%). Zur weiteren Optimierung der mRNA-Elektroporation wurden Jurkat-Zellen mit ansteigenden Mengen an eGFP-mRNA transfiziert und die Expressionsstärken über die mittlere eGFP-Fluoreszenzintensität (MFI) verglichen. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität, die mit ansteigender mRNA-Menge korrelierte (Abb. 33B, 2 μ g = 5280; 5 μ g = 16385; 10 μ g = 38850; 20 μ g = 93379). Bei erhöhten mRNA-Mengen wurde, im Gegensatz zu der DNA-Elektroporation, keine Verminderung der Zellvitalität beobachtet. Um dies zu verifizieren, wurden die Zellen nach der Elektroporation gezählt und gegen Zellen, die ohne mRNA elektroporiert wurden, normalisiert. Der Mittelwert aus 2 unabhängigen Versuchen ± SD bestätigte die mikroskopische Beobachtung: 0 μ g mRNA = 100%; 2 μ g mRNA = 107,5 ± 10,6%; 5 μ g mRNA = $106.5 \pm 5.0\%$; 10 µg mRNA = $114.5 \pm 12.0\%$; 20 µg mRNA = $102.5 \pm 10.6\%$. Als weitere Optimierung wurde der Einfluss verschiedener Inkubationstemperaturen auf die Expressionsstärke überprüft. Nach der Elektroporation wurde ein Teil der Zellen für 24 h hypothermischen Bedingungen bei 32°C ausgesetz t, während die andere Hälfte wie üblich bei 37°C inkubiert wurde. Durch die hypother mischen Bedingungen konnte eine signifikante Steigerung der MFI um den Faktor 2,1 erreicht werden (Abb. 33C, 37°C = 19319 ± 7024; 32℃ = 40730 ± 13830; p < 0,05). Um die transiente Natur der eGFPmRNA-Elektroporation zu bestätigen, wurde die Kinetik des mRNA-Abbaus über 10 Tage gemessen (Abb. 33D). Die stärkste Expression wurde nach 24-stündiger Inkubation gemessen. Anschließend verringerte sich die Expressionsstärke pro Tag kontinuierlich um ca. die Hälfte. EGFP-positive Jurkat-Zellen, die mit 2 µg bzw. 5 µg mRNA elektroporiert waren, konnten etwa 7 Tage lang detektiert werden. Abweichend dazu war das eGFP-Signal im Resultat der Elektroporation mit 10 µg mRNA erst nach 10 Tagen auf das Hintergrundniveau abgesunken.



Abb. 33: Optimierung der mRNA-Elektroporation in Jurkat-Zellen. Durchflusszytometrische Analyse der Elektroporationseffizienz 24 h nach Elektroporation anhand der eGFP-Fluoreszenz in Jurkat-Zellen. Die Prozentzahlen geben den Anteil eGFP⁺-Zellen an. **B.** Steigerung der eGFP-Fluoreszenzintensität nach Elektroporation mit ansteigenden Mengen eGFP-mRNA in Jurkat-Zellen. Darstellung der eGFP-Expressionsstärke als Histogramm: 0 µg (grau), 2 µg (dunkelgrün), 5 µg (grün), 10 µg (hellgrün), 20 µg (gelb). Die Detektion erfolgte 24 h nach der Elektroporation. **C.** Deutliche Steigerung der eGFP-Fluoreszenzintensität durch hypothermische Kulturbedingungen. Jurkat-Zellen wurden für einen Vergleich nach der Elektroporation für 24 h entweder bei 32°C oder bei 37°C kulti viert, und die eGFP-Fluoreszenzintensität anschließend durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD für 3 Versuche. Für die statistische Analyse wurde der gepaarte t-test verwendet: *p < 0,05. **D.** Kinetik der eGFP-Fluoreszenzintensität nach Elektroporation unterschiedlicher Mengen mRNA in Jurkat-Zellen über 10 Tage. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD für 2 Versuche.

Elektroporationsbedingungen Anschließend wurden die optimierten bei der Elektroporation der TCR-spezifischen TALEN angewandt. Zunächst erfolgte die Elektroporation von Jurkat-Zellen mit dem für die TCRα-Kette spezifischem TALEN-Paar TALEN-TCRα2. Jurkat T-Zellen wurden dabei mit ansteigenden Mengen der TALEN-TCRα2-mRNA elektroporiert, für 24 h bei 32℃ und anschl ießend bei 37℃ inkubiert. Die Überprüfung eines erfolgreichen TCR-Knockouts erfolgte durchflusszytometrisch per Antikörperfärbung gegen den CD3-TCR-Komplex. Vier Tage nach der TALEN-Elektroporation wurden für alle mRNA-Konzentrationen deutliche Verringerungen der CD3/TCR-Expression detektiert. Abb. 34A zeigt, dass die Stärke des erreichten Knockouts dabei deutlich mit der verwendeten mRNA-Menge korrelierte (2 µg mRNA = 15,9% KO; 5 μg mRNA = 43,0% KO; 10 μg mRNA = 52,1% KO; 20 μg mRNA = 63.7% KO). Die Elektroporation ohne mRNA (Abb. 34A, grau = 3,9% ohne CD3/TCR-Expression) führte, genau wie die Elektroporation mit nur einem der TALEN-TCRa-Arme (nicht gezeigt) zu keiner Veränderung der CD3/TCR-Expression. Die Analyse der Kinetik des TALEN-vermittelten TCR-Knockouts nach der Elektroporation mit 20 µg mRNA zeigt, dass bereits nach 24 h eine deutliche Verringerung der CD3/TCR-Expression detektierbar war (Abb. 34B). 19,2% der Zellen zeigten schon zu diesem Zeitpunkt, im Gegensatz zu den an Tag 0 gemessenen 4,5%, keine Expression des CD3-TCR-Komplexes. An Tag 2 (56,7% KO) und Tag 3 (63,7% KO) nach der Elektroporation wurde jeweils eine weitere Verringerung der CD3/TCR-Expression beobachtet. An den darauf folgenden Tagen konnte kein weiterer Abfall der CD3/TCR-Expression detektiert werden, so dass die Anzahl der Jurkat-Zellen ohne TCR weitestgehend konstant blieb. Auch die TALEN-TCR^β1-mRNA war in der Lage, einen sehr effizienten TCR-Knockout in Jurkat-Zellen zu vermitteln. Die Quantifizierung der TALEN-vermittelten TCRa- und ß-Knockouts ergab, dass der TCR-Knockout durch die TALEN-TCRα2 mit 59,7 ± 4,0% etwas erfolgreicher war, als der durch die TALEN-TCRβ1-vermittelten Knockout von 37,4 ± 7,3% (Abb. 34C). Abb. 34D zeigt die deutliche Veränderung der CD3-Expression von Jurkat-Zellen nach Elektroporation mit den TCR-spezifischen TALEN als FACS-Dot-Plots.



Abb. 34: Erfolgreicher TALEN-vermittelter Knockout des TCR-Locus durch mRNA-Elektroporation in Jurkat T-Zellen. A. Erfolgreiche Verringerung der TCR-Expression auf Jurkat-Zellen nach mRNA-Elektroporation mit ansteigender Menge der TALEN-TCR α -mRNA. Dargestellt ist die TCR-Anfärbung als Histogramm. Bei allen verwendeten Konzentrationen ist ein deutlicher Rückgang der TCR-Expression zu erkennen: 20 µg mRNA (rot), 10 µg mRNA (dunkelblau), 5 µg mRNA (grün), 2 µg mRNA (gelb), keine mRNA (grau). **B.** Histogrammdarstellung des TCR α -Knockouts im Verlauf der ersten drei Tage nach der Elektroporation: KO nach Tag 1 (gelb), KO nach Tag 2 (rot), KO nach Tag 3 (blau). Nach dem dritten Tag konnte kein weiterer Anstieg des TCR-Knockouts detektiert werden. **C.** Quantifizierung des TCR α - und TCR β -Knockouts in Jurkat-Zellen 3-5 Tage nach mRNA-Elektroporation. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der CD3/TCR-Antikörperfärbungen von 3-6 unabhängigen Versuchen. Als Negativkontrollen dienten sowohl ohne RNA elektroporierte, als auch nur mit einem der TALEN-Arme elektroporierte Jurkat-Zellen (nicht dargestellt). Für die statistische Analyse wurde die *One-way* ANOVA verwendet: ***p < 0,001. **D.** Repräsentative Dot-Plots des TCR-Knockouts nach Elektroporation von 0 µg (links) bzw. 10 µg TALEN-mRNA (rechts). Die Prozentzahlen geben den Anteil CD3-positiver und -negativer Jurkat-Zellen an.

3.4.4. Transduktion der TCR-spezifischen TALE-Nukleasen durch nicht-revers transkribierende lentivirale Vektoren

Als Alternative zum Transport der TCR-spezifischen TALEN-Konstrukte durch die Elektroporation wurde ein lentivirales Transportsystem getestet. Ein Vorteil bei der Verwendung von viralen Vektoren ist u.a. die Möglichkeit der Anpassung der viralen Hüllproteine. Durch die Pseudotypisierung kann ein zelltypspezifischer Gentrasfer erreicht werden. Als lentiviraler Transfervektor wurde ein NRTL-Vektor verwendet⁹¹. Bei diesen Vektoren wird die RNA des Transgens nicht revers transkribiert, sondern direkt für die Translation verwendet. Zusätzlich sorgt die inaktive Integrase für eine transiente Expression des Transgens. Abb. 35A zeigt eine schematische Darstellung der verwendeten NRTL-Vektoren, in die die Sequenzen des TALEN-TCRα2 kloniert wurden. Durch die IRES-eGFP-Sequenz konnte die Transduktionseffizienz der Vektoren anhand der eGFP-Expression durchflusszytometrisch bestimmt werden. In Abb. 35B ist die Transduktion mit ansteigenden Virusüberstandsmengen der VSV-pseudotypisierten

iTALEN-Vektoren in Jurkat-Zellen dargestellt. Gemessen an der eGFP-Fluoreszenz wurde eine Transduktionseffizienz zwischen 20% (Transduktion von nur einem iTALEN-Konstrukt) und 61% (nach Transduktion beider iTALEN-Konstrukte) erreicht. Bei der Doppeltransduktion beider iTALEN-Arme konnte allerdings nicht zwischen der Transduktionseffizienz der einzelnen Vektoren unterschieden werden, da beide Vektoren mit dem gleichen Reporterprotein ausgestattet waren. Aus den Einzeltransduktionen (Abb. 35B, links und 2. v. links) lässt sich jedoch schließen, dass die Transduktion durch die TALEN-Arme wahrscheinlich unterschiedlich effizient war. Die Analyse der transduzierten Jurkat-Zellen ergab, dass auch der lentivirale Transport der TALEN zu einem erfolgreichen TCR-Knockout führt (Abb. 35C, D). Der Knockout war dabei bei der Verwendung von je 100 µl der Virusüberstände mit 18.8% am stärksten und nahm bei größeren Virusüberstandsvolumina, wahrscheinlich aufgrund vermehrter Toxizität, wieder ab.





FSC-A

Abb. 35: Erfolgreicher TCR-Knockout nach Transfer der TALEN durch lentivirale NRTL-Vektoren. A. Schematische Darstellung der nicht-revers transkribierenden lentiviralen iTALEN Vektorkonstrukte. Nicht maßstabsgetreu. B. Durchflusszytometrische Überprüfung der Transduktionseffizienz der NRTL-Vektoren in Jurkat-Zellen anhand des eGFP-Reporterproteins. C. Detektion des TALEN-induzierten TCRα-Knockouts durch unterschiedliche Mengen von NRTLV-Vektorüberständen anhand von CD3- und TCR-Antikörperfärbungen. D. Quantifizierung des iTALEN-induzierten TCR-Knockouts. Als Kontrolle dienten untransduzierte, sowie jeweils nur mit einem der TALEN-Arme (iTALEN-TCRα2L oder iTALEN-TCRα2R) transduzierten Jurkat-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD der Kontrollen aus zwei unabhängigen Versuchen sowie der durch die iTALEN-induzierte Knockout aus einem Versuch.

3.4.5. Transduktion von Jurkat-Zellen ohne endogene TCR-Ketten mit dem transgenen influenzaspezifischen TCR

Um eine komplette Verhinderung des TCR-Mispairing zu erreichen, wurde getestet, ob sich Jurkat-Zellen ohne endogenen TCR weiter kultivieren und mit transgenen TCR-Ketten transduzieren ließen. Dafür wurde die in Abb. 36A dargestellte Strategie entwickelt. Zunächst wurde die endogene TCRβ-Kette durch TALEN-mRNA-Elektroporation der Jurkat-Zellen ausgeschaltet. Die CD3-negativen Zellen wurden anschließend per Dynabeads-CD3-Kit isoliert. Auf diese Weise konnte nach 2 aufeinanderfolgenden Depletionen eine Reinheit von 99.5% CD3-negativen Zellen erreicht werden (Abb. 36B). Die Zellen wurden anschließend mit der transgenen Flu-TCRβ-Kette transduziert, wodurch eine erneute CD3-Expression auf der Zelloberfläche detektierbar war. Die Transduktionseffizienz der TALEN-behandelten Zellen war ebenso gut wie die Effizienz bei unbehandelten Zellen (nicht gezeigt). Die Anzahl CD3exprimierender Zellen war in Übereinstimmung mit der Anzahl an Flu-TCRβtransduzierten Zellen (Abb. 36C, untere Zeile, 88,7% und 87,0%). Die Transduktion der endogenen TCRβ-defizienten Zellen mit der Flu-TCRα-Kette führte dagegen zu keiner CD3-Expression. Auch untransduzierte Zellen zeigten keine CD3-Expression (Abb. 36C, Zeile 1-3). Im nächsten Schritt erfolgte die FACS-Sortierung der CD3-positiven Zellen und daran anschließend der TALEN-vermittelte Knockout der endogenen TCRα-Kette, wodurch erneut ein Teil CD3-negativer Zellen detektierbar war. Die CD3-negativen Zellen wurden abermalig isoliert und mit der entsprechenden Flu-TCRa-Kette transduziert. Erneut konnte daraufhin die Expression von CD3 in transduzierten Zellen detektiert werden. Diese CD3-positiven Zellen sollten nun komplett umprogrammiert sein, und statt des endogenen TCR den transgenen Flu-TCR exprimieren. Die Spezifität der Jurkat-Zellen wurde per Flu-Tetramer-Färbung überprüft. Nach Knockout der endogenen TCR-Ketten konnten 83.9% der CD3-positiven Zellen mit dem spezifischen Tetramer angefärbt werden (Abb. 36D). Im Vergleich dazu konnten nur 19.1% der Jurkat-Zellen mit endogenem und transgenem TCR durch das Tetramer angefärbt werden. Es konnte also eine wesentliche Steigerung der Transgenexpression auf der Zelloberfläche der Jurkat-Zellen erreicht werden. Die Expression der transgenen TCR-Moleküle ließ sich auch bereits durch den Knockout von nur einer der beiden endogenen TCR-Ketten erreichen (s. Abb. 36A, Schritt 2, Alternative Möglichkeit). Mit dieser Strategie konnte eine ca. 2fache Steigerung der Anzahl tetramerpositiver-Zellen erreicht werden (Abb. 36D). Abschließend habe ich überprüft, ob die verstärkte Transgenexpression auch zu einer Verstärkung der Effektorfunktionen der transgenen Zellen führte. Dafür wurden Jurkat-Zellen nach partiellem bzw. komplettem Knockout der endogenen TCR-Ketten mit dem transgenen Flu-TCR transduziert und mit Fluantigenpräsentierenden T2-Zellen kokultiviert. Die Sekretion von IL-2 auf diesen Kontakt hin wurde per ELISA analysiert. Alle mit dem Flu-TCR transduzierten Zellen produzierten, im Gegensatz zu den untransduzierten Jurkat-Zellen, nach Kontakt zu ihrem Flu-Peptid IL-2 (Abb. 36E). Die Menge der IL-2-Sekretion variierte dabei jedoch stark in Abhängigkeit davon, ob die Jurkat-Zellen einen endogenen TCR besaßen oder ob dieser durch die TCR-TALEN ausgeschaltet war. Dabei konnte eine 14-fache Steigerung der IL-2-Sekretion durch den kompletten Knockout der endogenen TCR-Gene erreicht werden ($\alpha\beta$ -KO = 338,7 ± 71,6 pg/ml; kein KO = 24,0 ± 23,0 pg/ml). Diese Werte spiegeln höchstwahrscheinlich die höhere Frequenz und Expressionsstärke des transgenen Flu-TCR auf der Oberfläche dieser Zellen aufgrund der Abwesenheit des TCR-Mispairings wieder. Dies wird auch dadurch verdeutlicht, dass die Sekretionsstärke der Flu-TCR-transgenen Zellen nach dem Knockout der endogenen a- oder der endogenen β -Kette zwar auch deutlich über jener ohne jeglichem Knockout liegt (α -KO = 133,1 ± 32,0 pg/ml; β-KO = 82,8 ± 18,5 pg/ml; kein KO = 24,0 ± 23,0 pg/ml), jedoch ca. 3fach unter dem Wert für den kompletten Knockout. Dies liegt vermutlich daran, dass die endogene TCR-Kette, die nicht ausgeschaltet wurde, weiterhin in der Lage ist, sich mit der komplementären transgenen Kette zu paaren, und dadurch die Expression des transgenen TCR verringert.



Abb. 36: Transduktion von Jurkat-Zellen ohne endogenen TCR führt zu verstärkter Transgenexpression und verstärkten Effektorfunktionen. A. Schematische Übersicht der für eine komplette Umprogrammierung von T-Zellen benötigten Schritte: 1. Ausgangszelle mit endogenen TCR-Ketten, 2. TALEN-vermittelter TCR β -KO und Depletion von CD3^{pos}-Zellen, 3. Transduktion der Zellen mit transgener TCR β -Kette, 4. Sortierung von CD3^{pos}-Zellen, 5. TALEN-vermittelter TCR α -KO und Depletion von CD3^{pos}-Zellen, 5. TALEN-vermittelter TCR α -KO und Depletion von CD3^{pos}-Zellen, 6. Transduktion der Zellen mit transgener TCR α -Kette. Als Alternative Möglichkeit erfolgt die Transduktion mit den transgenen Flu-TCR α - und β -Ketten bereits nach dem Knockout von nur einer endogenen TCR-Kette (α oder β). **B.** Aufeinander folgende Depletion von CD3^{pos}-Zellen. **C.** Transduktion von Jurkat-Zellen mit bzw. ohne TCR β -Knockout (+ Depletion) mit transgenen Flu-TCR-Ketten und CD3-Antikörperfärbung der Zellen. **D.** Flu-Tetramer-Färbung von untransduzierten- und Flu-transduzierten Jurkat-Zellen mit bzw. ohne eine/beide endogenen TCR-Ketten. Die Prozentzahlen geben den Anteil von tetramerpositiven Zellen nach *Gating* auf die CD3^{pos}-Zellen an. **E.** Untransduzierte und Flu-transduzierte Jurkat-Zellen mit bzw. ohne endogenen TCR-Ketten. Die Prozentzahlen geben den Anteil von tetramerpositiver Zellen nach *Gating* auf die CD3^{pos}-Zellen an. **E.** Untransduzierte und Flu-transduzierte Jurkat-Zellen mit bzw. ohne endogenen TCR wurden mit Flu-antigenpräsentierenden T2-Zellen kokultiviert. Die IL-2-Sekretion wurde nach 20-stündiger Inkubation per IL-2-ELISA gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus zwei Versuchen. Für die statistische Analyse wurde die *One-way* ANOVA verwendet: ***p < 0,001.

3.4.6. TALEN-vermittelter TCR-Knockout in primären T-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die TCR-spezifischen TALEN in Jurkat-Zellen einen TCR-Knockout induzieren können und die Zellen ohne endogenen TCR erfolgreich mit dem transgenen Flu-TCR umprogrammiert werden konnten, wurde überprüft, ob dies auch in primären T-Lymphozyten erreichbar ist. Dazu wurden zu Anfang die TCRspezifischen TALEN in primären Zellen getestet. Bei der Wahl der TALEN-Transportmethode habe ich mich für die mRNA-Elektroporation entschieden, da diese in Jurkat-Zellen den TCR-Knockout sehr effizient und mit geringer Beeinflussung der Zellvitalität induzieren konnte (s. 3.4.3). Die optimalen Elektroporationsparameter für aktivierte primäre Zellen wurden erneut per eGFP-mRNA-Elektroporation getestet. Es stellte sich heraus, dass die Square Wave Elektroporation bei 300 V und 10 ms mit ~ 80% transfizierten Zellen und einer MFI von 2354 sehr effizient war. Darüber hinaus überlebten über 90% der primären Zellen diese Elektroporationsbedingungen. Mit einer etwas geringeren Zellvitalität von 79% eignete sich auch die Elektroporation bei 300 V und 2 x 8 ms für eine noch etwas effizientere mRNA-Elektroporation (~ 85% transfizierte Zellen, MFI 4170). Nach der Elektroporation wurden die Zellen für 24 h bei 32°C und anschließend bei 37°C kultiviert. Die Detektion des TCR-Knockouts erfolgte nach 3-4 Tagen durch TCR- und CD3-Antikörperfärbungen. Abb. 37A-C zeigt den durch ansteigende Mengen von TALEN-TCRa2-mRNA vermittelten TCRa-Knockout. Bereits nach der Elektroporation von 2 µg TALEN-mRNA war ein deutlicher TCR-Knockout von 21% detektierbar. Der Anteil primärer T-Zellen ohne TCR-Expression vergrößerte sich nach der Elektroporation von 5 µg auf 55,9% und von 10 µg auf 64,9%. Nach der Elektroporation von 20 µg (65,0% Knockout) und 40 µg TALEN-mRNA (62,8% Knockout) konnte kein weiterer Anstieg des TCR-Knockouts erreicht werden. Die folgenden Versuche wurden daraufhin mit 10 µg TALEN-mRNA durchgeführt. Die Quantifizierung des TCR-Knockouts mit der TALEN-TCRa2 ergab einen durchschnittlichen Knockout von 58 ± 15% (Abb. 37C). Die Anzahl primärer Zellen, die mit den Kontrollen (keine mRNA, nur linker bzw. rechter TALEN-TCRa2-Arm) elektroporiert wurden und keine CD3/TCR-Expression aufwiesen, lag dagegen lediglich bei etwa 5% (0 μ g mRNA = 5,6 ± 1,1%; TALEN-TCR α 2L = 3,3 ± 1,1%; TALEN-TCR α 2L = 3,4 ± 1,3%). Um zu zeigen, dass der Knockout des TCR permanent ist, wurden die elektroporierten Zellen über einen Zeitraum von 14 Tagen durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer TCR/CD3-Expression analysiert (Abb. 37D). Die Prozentzahl TCR-exprimierender und nichtexprimierender Zellen blieb über diesen Zeitraum sehr konstant. Für die Bestätigung des TCR-Knockouts auf molekularer Ebene wurde ein Endonukleaseassay (s. 2.2.15) durchgeführt (Abb. 37E) sowie die genomische DNA nach PCR-Amplifikation per Sequenzierung überprüft (Abb. 37F). In Abhängigkeit von der TALEN-vermittelten Mutationsfrequenz in den PCR-Fragmenten entstehen beim Endonukleaseassay Heteroduplexe, die durch eine Endonuklease geschnitten werden. Dadurch entstehen zusätzlich zu dem vollständigen 1600 bp großen Fragment, zwei zusätzliche Fragmente (1000 bp und 600 bp), die per Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden können. Abb. 37E zeigt den Endonukleaseassay der primären T-Zellen aus Abb. 37A. Dabei sind bei den TALEN-behandelten Proben die drei beschriebenen Fragmentgrößen deutlich zu erkennen. Die Stärke der 600 und 1000 bp großen Fragmente nimmt, in Übereinstimmung mit den im Durchflusszytometer gemessenen Werten, mit der Menge der verwendeten TALEN-mRNA bis 10 µg zu und bleibt dann in etwa konstant. Bei den unbehandelten Proben und den Proben, bei denen nur einer der TALEN-Arme elektroporiert wurde, ist dagegen lediglich das 1600 bp große Fragment zu erkennen. Die Sequenzierung der genomischen DNA bestätigte den erfolgreichen Knockout des endogenen TCRα-Locus in einem Teil der Zellen (Abb. 37E). Dabei konnte bei 9 von 17 Proben (53%) Nukleotid-Deletionen um die TALEN-Schnittstelle detektiert werden.



Abb. 37: Erfolgreicher Knockout des TCRa-Locus in primären T-Lymphozyten durch mRNA-Elektroporation. A. Durchflusszytometrische Analyse des TALEN-vermittelten TCR-Knockouts in primären T-Zellen nach Elektroporation von ansteigenden Mengen TALEN-TCRa2-mRNA. Dargestellt sind TCR-Anfärbungen der transfizierten Zellen 4 Tage nach der Elektroporation. Als Kontrolle dienten ohne mRNA-elektroporierte, sowie nur mit dem linken oder rechten TALEN-Arm elektroporierte Zellen. B. Histogrammdarstellung des TCR-Knockouts in primären Zellen mit 10 μg TALEN-TCRα2-mRNA (grau). Als Kontrolle dienten nur mit dem linken TALEN-Arm elektroporierte Zellen (ungefüllt) C. Quantifizierung des TCRα-Knockouts nach mRNA-Elektroporation von primären T-Lymphozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD der CD3/TCR-Anfärbungen von 6 unabhängigen Versuchen. Als Negativkontrollen dienten sowohl ohne RNA elektroporierte (schwarz), als auch nur mit einem der TALEN-Arme elektroporierte (weiß) primäre T-Zellen. Für die statistische Analyse wurde die One-way ANOVA verwendet: ***p < 0,001. D. Verfolgung des TALEN-vermittelten TCR-Knockouts über 14 Tage nach der Elektroporation. E. Endonukleaseassay zur Bestimmung des TCRa-Knockouts auf genomischer Ebene. Verwendet wurden die unter A. elektroporierten primären Zellen. F. Zur Überprüfung des TCRa-Knockouts per Sequenzierung wurde der DNA-Bereich des TCRa-Locus um die TALEN-Schnittstellen per PCR amplifiziert, das PCR-Produkt subkloniert und einzelne Klone sequenziert. Dargestellt sind die TALEN-induzierten Mutationen in 9 von 17 Klonen. Die TALEN-vermittelten Deletionen in der Seguenz sind grau dargestellt.

Nach dem erfolgreichen Knockout des TCRα-Locus in primären T-Lymphozyten wurde der mögliche Knockout des TCRβ-Locus überprüft. Die Elektroporation der aktivierten primären T-Zellen mit der TALEN-TCRβ1 führte ebenfalls zu einem sehr effektiven TCR-

Knockout (Abb. 38A-C). Dabei zeigte sich, ähnlich wie beim Knockout des TCRα-Locus, bereits nach der Elektroporation von 2 µg ein deutlicher Unterschied zu nicht elektroporierten Zellen (nicht gezeigt). Ansteigende mRNA Mengen führten zu einem vermehrten Anteil primärer T-Lymphozyten mit fehlender CD3/TCR-Expression auf der Zelloberfläche (Abb. 38A, 5 µg TCRβ-mRNA = 19,5% KO; 10 µg TCRβ-mRNA = 38.1% KO; 20 µg TCRβ-mRNA = 38,9% KO). Die Quantifizierung des TALEN-TCRβ-vermittelten TCR-Knockouts nach Elektroporation von 10 µg mRNA ergab einen durchschnittlich TCR-Knockout von 41,0 ± 17,6%. In den primären Zellen konnte damit ein höherer Knockout erreicht werden als in der Jurkat T-Zelllinie (37,4 ± 7,3%). Die mit den Kontrollen elektroporierten T-Lymphozyten wiesen erneut nur einen geringen Prozentsatz an CD3/TCR-negativen Zellen auf (0 µg mRNA = 3,4 ± 1,9%; TALEN-TCRβ1L = 2,8 ± 0,9%; TALEN-TCR β1R = 4,0 ± 0,4%). Der TCR-Knockout wurde erneut per Endonukleaseassay und DNA-Sequenzierung auf molekularer Ebene bestätigt (nicht gezeigt).



Abb. 38: Erfolgreicher Knockout des TCRβ-Locus in primären T-Lymphozyten durch mRNA-Elektroporation. A. Durchflusszytometrische Analyse des TALEN-vermittelten Knockouts des TCR in primären T-Zellen nach mRNA Elektroporation von ansteigenden Mengen TALEN-TCRβ1-mRNA. Dargestellt sind CD3-Anfärbungen der transfizierten Zellen 4 Tage nach der Elektroporation. Als Kontrolle dienten ohne mRNAelektroporierte (links), sowie nur mit dem linken (2. v. links) bzw. dem rechten TALEN-Arm (3. v. links) elektroporierte Zellen. B. Quantifizierung des TCRβ-Knockouts nach mRNA-Elektroporation von primären T-Lymphozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD der CD3- bzw. TCR-Anfärbungen von 6 unabhängigen Versuchen. Als Negativkontrollen dienten sowohl ohne RNA elektroporierte (grau), als auch nur mit einem der TALEN-Arme elektroporierte (weiß) primäre T-Zellen. Für die statistische Analyse wurde die *One-way* ANOVA verwendet: ***p < 0,001, **p < 0,01. C. Histogrammdarstellung des TCR-Knockouts in primären Zellen mit 10 μg TALEN-TCR-β1mRNA (dunkelgrau). Als Kontrolle dienten nur mit dem linken TALEN-Arm elektroporierte Zellen (ungefüllt)

3.4.7. Transduktion der primären T-Zellen ohne endogenen TCR mit influenzaspezifischen TCR-Ketten

Analog zu den in Jurkat-Zellen durchgeführten Analysen (s. 3.4.5), wurde auch in primären T-Lymphoyzten überprüft, ob die Kultivierung und Transduktion der Zellen nach dem Knockout der endogenen TCR-Genen möglich ist. Zur Überprüfung der Expansionsfähigkeit der Zellen ohne endogenen TCR wurden TALEN-unbehandelte und TALEN-behandelte T-Zellen mit IL-2 und CD3/CD28-Beads stimuliert. Die Zellexpansion wurde nach 7 Tagen per Zellzählung überprüft. Durch die Stimulation mit IL-2 konnte in dieser Zeit eine Expansion der Zellen um das ca. 3-4-fache erreicht werden, wobei die zu ~100% CD3-negativen Zellen ein etwas langsameres Wachstum zeigten (Kein KO = $3,9 \pm 1,5$ -fach; TALEN-Kontrolle = $4,5 \pm 1,9$ -fach; TALEN-KO = $3,9 \pm 0,9$ -fach; TALEN-KO (CD3⁺-depleted) = $3,4 \pm 0,6$ -fach). Überraschenderweise zeigten sowohl die CD3positiven Zellen, als auch die CD3-negativen Zellen nach Stimulation mit CD3/CD28-Beads eine deutliche Zellproliferation, die in 7 Tagen zu einer 15-20-fachen Expansion der Zellen führte. Diesmal zeigten die zu ~100% CD3-negativen Zellen die stärkste Expansion (Kein KO = 15,1 ± 7,9-fach; TALEN-Kontrolle = 16,8 ± 10,1-fach; TALEN-KO = 15,1 \pm 7,6-fach; TALEN-KO (CD3⁺-depleted) = 20,9 \pm 14,1). Um zu überprüfen, ob sich die Anteile an CD3⁺- und CD3⁻-Zellen während der Stimulation verändert haben, wurden die Zellen sowohl vor als auch nach der Stimulation auf ihre CD3-Oberflächenexpression analysiert. Es konnte keine signifikante Veränderung des Anteils CD3⁺- und CD3⁻Zellen detektiert werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass auch die CD3negativen primären T-Zellen durch CD3/CD28-Beads zur Proliferation angeregt werden können. Um das TCR-Mispairing komplett zu verhindern wurden in den primären T-Zellen sukzessive die endogenen TCR-Ketten per TCR-spezifischer TALEN ausgeschaltet und mit den transgenen Flu-TCR-Ketten ersetzt. Dazu wurde die in Jurkat-Zellen überprüfte Strategie verwendet (s. Abb. 36A). Es konnte gezeigt werden, dass es grundsätzlich möglich ist, primäre T-Lymphozyten mehrmals mit TALEN zu behandeln, die Zellen zu sortieren und zu transduzieren. Nach kompletter Umprogrammierung der primären Zellen wurde nach Anfärbung mit dem influenzaspezifischen Tetramer eine etwa 5-fache Steigerung der tetramerexprimierenden Zellen detektiert (Abb. 39C, 30.6% im Vergleich zu 6.2%). Nach dem Knockout von nur einer der beiden endogenen TCR-Ketten war dagegen nur ein minimaler Anstieg tetramerpositiver Zellen zu erkennen (Abb. 39C, 7,6% im Vergleich zu 6,2%), so dass man hier noch immer von einer hohen Anzahl an Fehlpaarungen ausgehen kann. Anschließend wurde überprüft, ob die verstärkte Transgenexpression zu einer Verstärkung der Effektorfunktionen der transgenen Zellen führt. Dazu wurden komplette umprogrammierte und nicht TALEN-

modifizierte Flu-transduzierte primäre T-Zellen mit Flu-antigenpräsentierenden T2-Zellen kokultiviert und die Sekretion von IFN- γ und IL-2 analysiert. Die Flu-transduzierten primären Zellen produzierten nach Kontakt zu ihrem spezifischen Antigen sowohl IL-2 als auch IFN- γ (Abb. 39D, E). Die Menge der Sekretion variierte dabei jedoch stark in Abhängigkeit davon, ob die Zellen einen endogenen TCR besaßen oder ob dieser durch die TCR-TALEN ausgeschaltet war. Dabei konnte eine 5-fache Steigerung der IFN- γ -Sekretion durch den kompletten Knockout der endogenen TCR-Gene erreicht werden (21029 ± 12884 pg/ml im Vergleich zu 4137 ± 1417 pg/ml). Die Sekretion von IL-2 wurde durch den kompletten Knockout der endogenen TCR-Gene um das 18-fache gesteigert (345,7 ± 218,8 pg/ml im Vergleich zu 19,3 ± 14,8 pg/ml). Auch diese Ergebnisse spiegeln wahrscheinlich die höhere Frequenz und Expressionsstärke des transgenen Flu-TCR auf diesen Zellen aufgrund des nicht mehr vorhandenen TCR-*Mispairings* wider.



Abb. 39: Transduktion von primären T-Zellen ohne endogene TCR-Ketten führt zu verstärkter Transgenexpression und verstärkten Effektorfunktionen. A. TALEN-TCR-behandelte und unbehandelte primäre T-Zellen wurden zur Überprüfung der Expansionsfähigkeit mit IL-2 bzw. mit CD3/CD28-Beads stimuliert und die Zellexpansion nach 7 Tagen per Trypanblau-Zellzählung überprüft. B. Überprüfung der Verteilung von CD3⁺-Zellen nach 7-tägiger Expansion mit IL-2 bzw. CD3/CD28-Beads von primären T-Zellen mit und ohne endogenen TCR. C. Flu-Tetramer-Färbung von untransduzierten- und Flu-transduzierten Jurkat-Zellen mit bzw. ohne endogene TCR-Ketten. Die Prozentzahlen geben den Anteil tetramerpositiver Zellen an. D, E. Untransduzierte und Flu-transduzierte Jurkat-Zellen mit oder ohne Knockout der endogenen TCR-Ketten wurden mit Flu-antigenpräsentierenden T2-Zellen kokultiviert. Die IFN- γ -Sekretion (D) sowie die IL-2-Sekretion (E) wurden nach 20-stündiger Inkubation per ELISA gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD aus zwei Versuchen. Für die statistischen Analysen wurde die *One-way* ANOVA verwendet: **p < 0,01.

4. DISKUSSION

Sowohl präklinische Modelle, als auch klinische Studien konnten in den letzten Jahren den überzeugenden Nachweis dafür erbringen, dass die Umprogrammierung von T-Lymphozyten durch das Einbringen spezifischer T-Zell-Rezeptoren ein effektiver Ansatz für die adoptive Immuntherapie unterschiedlichster maligner Erkrankungen ist^{40,47,48,102,103}. Zugleich lässt sich allerdings feststellen, dass die Techniken für die Identifikation und Klonierung geeigneter TCRs sowie ihre Transduktion in primäre T-Lymphozyten technisch anspruchvoll sind. Im Rahmen dieser Dissertation wurden zum einen potentiell CT-Antigen MAGE-C2-spezifische T-Zell-Rezeptoren als Zielantigene für die Immuntherapie identifiziert, isoliert und kloniert, und ihre Spezifität in T-Zellen überprüft. Zum anderen konnte ich in dieser Arbeit anhand eines Influenza-TCR-Modells weitere Aspekte des TCR-Gentransfers in primären T-Zellen optimieren. Diese Optimierungen führten zu einer Verstärkung der TCR-Oberflächenexpression und ermöglichten zudem die komplette Verhinderung des TCR-Mispairings.

4.1. MAGE-C2 als Zielstruktur der adoptiven Immuntherapie des Multiplen Myeloms

Beim Multiplen Myelom/Plasmozytom handelt sich um eine maligne Erkrankung ausdifferenzierter Plasmazellen mit eingeschränkten Therapiemöglichkeiten und schlechter Prognose⁶⁶. Aus diesem Grund werden neue Therapieansätze benötigt, wie beispielsweise die TCR-Gentherapie mit tumorspezifischen Antigenen. Das CT-Antigen MAGE C2 stellt ein attraktives Angriffsziel der adoptiven Immuntherapie beim Multiplen Myleom dar, da es als immunogen gilt und häufig von MM-Zellen exprimiert wird. Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass es, mit Ausnahme vom Hodengeweben, in gesundem MHC-exprimierendem Gewebe nicht vorliegt^{70,71,73,74,104}. Daher habe ich im ersten Teil der Arbeit den TCR aus potentiell MAGE-C2-spezifischen T-Lymphozyten von Myelompatienten isoliert, kloniert und charakterisiert. Nach Transduktion der identifizierten TCRs in T-Zellen zeigten diese in unterschiedlichen Assays allerdings keine spezifischen Effektorfunktionen auf ihr Antigen (s. Abb. 18). Daher muss davon ausgegangen werden, dass die identifizierten T-Zellklone und die daraus isolierten TCRs nicht MAGE-C2-spezifisch waren. Eine mögliche Ursache dafür könnte in der Art ihrer Isolierung liegen. Zur Anreicherung MAGE-C2-spezifischer T-Zellen aus Patentienzellen wurde das MAGE-C2-Protein in 37 sich überlappende kurze Peptide aufgeteilt, die Patientenzellen mit den künstlich hergestellten Peptiden stimuliert und proliferierende Zellen expandiert. Es ist denkbar, dass durch die künstliche Fragmentierung des Proteins keine natürlich vorkommenden immunogenen Bereiche entstanden sind, für die spezifische T-Zellen im Repertoire der Patienten vorhanden waren. Als Alternative zu den künstlich hergestellten Peptiden, könnte zur initialen Stimulation stattdessen das vollständige MAGE-C2-Protein in antigenpräsentierende Zellen eingebracht werden. In diesem Fall könnte die natürliche Prozessierung des Proteins zu immunogeneren Peptiden führen¹². Allerdings ist auch bei dieser Methode davon auszugehen, dass die Anzahl MAGE-spezifischer Zellen im peripheren Blut sehr gering ist, was ihre effektive Kultivierung und Expansion deutlich erschwert¹⁰⁵. Als Alternative zu der Isolation spezifischer Zellen aus dem peripheren Blut der Patienten bietet sich u.a. die Isolierung spezifischer T-Zellen aus transgenen Mäusen an, ein Ansatz den Theobald et al. erstmals erfolgreich zeigen konnten¹⁰⁶. Zudem könnte die Isolation hochavider Zellen restringierten T-Zellklonen von MHC-inkompatiblen allo-MHC Spendern aus erfolgen^{31,107,108}. Eine hohe Avidität ist ein wichtiges Kriterium von tumorspezifischen TCRs. In klinischen Studien konnten durch hochavide und -aktive TCRs bislang mehrfach Langzeitremissionen des Krankheitsverlaufs beobachtet werden^{47,48,109–111}. Allerdings wurde auch die Wichtigkeit des Sicherheitsaspektes hochavider TCR bei einigen dieser Studien deutlich. Viele heutzutage in der Immuntherapie verwendete Antigene kommen in geringer Dichte auch auf normalem Gewebe vor. Diese Antigene können durch hochavide TCRs erkannt werden und zu off-tumor/on-target Toxizitäten führen, die in einigen Fällen bereits zu tödlichen Komplikationen führten^{44,51,112-114}. Gemeinsam unterstreichen diese Studien die Wichtigkeit der Verwendung von Zielepitopen, die sich ausschließlich auf malignem Gewebe befinden. Als Zielantigene war in dieser Hinsicht lange Zeit die Familie der CT-Antigene sehr vielversprechend, da für viele Mitglieder keine Expression in MHC-exprimierenden gesunden Körperzellen detektierbar war⁶². Jedoch wurden kürzlich auch bei der Verwendung eines MAGE-A3spezifischen hochaviden TCR schwere off-tumor/on-target Toxizitäten beobachtet. Der TCR erkannte das verwandte MAGE-A12-Protein, das in einem kleinen Teil von Neuronen im Gehirn exprimiert wird⁵⁰. In Zukunft muss daher noch genauer analysiert werden, welche TCRs und welche Zielantigene verwendet werden können. Eine Grundlage dafür könnten die Genomsequenzierungen von Krebszellen bilden, die weitere Informationen über spezifische Mutationen liefern sollten, die ausschließlich in Tumorzellen vorkommen¹¹⁵.

4.1.1. Alternativen zur TCR-Gentherapie

Eine interessante Alternative zur TCR-Gentherapie ist die CAR-Immuntherapie. Dabei werden chimäre Antigen-Rezeptoren verwendet. Das Konzept der chimären Rezeptoren wurde bereits 1989 von Eshhar et al. erstmals vorgestellt¹¹⁶. CARs bestehen aus der Antigenbindungsdomäne eines hochaffinen monoklonalen Antikörpers als Einzelkette (scFv), an die unterschiedliche T-Zell-Signaldomänen gekoppelt werden^{117–119}. Die Verwendung von CARs zur Umprogrammierung von T-Zellen hat im Vergleich zur klassischen TCR-basierenden Immuntherapie sowohl Vor, als auch Nachteile. Da die extrazelluläre Antigenbindungsstelle bei CARs typischerweise von einem Antikörper stammt, unterliegen sie keiner Restriktion durch MHC-Moleküle und können daher in Patienten unabhängig von ihrem HLA-Typ verwendet werden^{117,119}. Somit könnten CARs als "off-the-shelf" Moleküle bei einer großen Anzahl von Patienten zum Einsatz kommen. Zusätzlich regulieren viele Tumore zur Umgehung der adaptiven Immunantwort die MHC-Moleküle herunter, so dass ein MHC-unabhängiger Ansatz auch in dieser Hinsicht einen Vorteil der CARs darstellt¹²⁰. Ein weiterer Vorteil der CARs besteht darin, dass es aufgrund der Einzelketten-Struktur nicht zum Problem des TCR-Mispairings kommen kann, das bei TCR-Ansätzen häufig zu einer verminderten Effektivität der eingebrachten TCRs führt¹¹⁹. Ein gleichzeitiger Nachteil, der aus der Antikörper-Antigenbindungstelle resultiert, ist die Limitation der damit verbundenen Zielantigene. Abweichend zu TCRs können CARs lediglich Oberflächenantigene erkennen¹⁰⁵. Viele Tumorantigene stammen jedoch aus intrazellulär vorkommenden Proteinen und nur eine sehr geringe Anzahl von Tumoroberflächenantigenen ist bislang bekannt¹⁰⁵. Andererseits könnten CARs neben Proteinen auch tumorspezifische Kohlenhydrate oder Glykolipide erkennen, allerdings sind auch hier spezifische Tumormoleküle bislang selten¹²⁰. Da es ist bei CARs um chimäre Moleküle handelt, die sowohl künstliche Verbindungsstellen als auch nichthumane Anteile in ihrer scFV-Domäne enthalten, könnten CAR-modifizierten Zellen theoretisch humorale und zelluläre Immunantworten auslösen¹⁰⁵. Die optimale Signaldomäne der chimären Rezeptoren (1., 2., 3. Generation) ist momentan Gegenstand vieler Diskussion und muss für das komplette Ausschöpfen der natürlich vorkommenden T-Zell-Effektoraktivität in Hinsicht auf die Persistenz, Proliferation, Signalstärke und Sicherheit der modifizierten Zellen weiter optimiert werden¹²¹. Aufgrund des Einsatzes vieler verschiedener Signaldomänen in unterschiedlichen klinischen Studien stellt sich ihr effektiver Vergleich bislang als schwierig dar¹²¹. Abgesehen davon lässt sich konstatieren, dass die ersten klinischen Studien mit CAR-modifizierten T-Zellen bislang vor allem bei hämatologische Erkrankungen äußerst vielversprechend

waren^{2,122,123}. Die Ergebnisse der Studien mit soliden Tumoren fielen dagegen eher bescheiden aus^{103,119,124,125}. Im Gegensatz zu hämatologischen Erkrankungen müssen die modifizierten Zellen bei Tumoren sowohl physische Barrieren als auch immunsuppressive Umgebungen überwinden, um die Tumorantigen zu erreichen^{103,121}. Es ist durchaus vorstellbar, dass in Zukunft aufgrund der unterschiedlichen Vor- und Nachteile der beiden Strategien, eine Kombination zu einer erfolgreichen Therapie führen könnte. Die weitere Optimierung vieler Aspekte wird dabei ein entscheidender Weg sein um die Erfolge der klinischen Anwendungen weiter zu verbessern. Dabei steht zum einen eine optimale Avidität und Affinität der modifizierten T-Zellen gegenüber ihrem Antigen, eine ausreichende Persistenz und Expansion der transgenen Zellen *in vivo,* sowie zum anderen der Sicherheitsaspekt der modifizierten Zellen im Vordergrund. Für viele dieser Aspekte ist ein hohes Oberfächenexpressionslevel des TCR (bzw. CAR) eine grundsätzliche Vorraussetzung. Daher stand in der vorliegenden Dissertation primär die Optimierung des Expressionslevels von TCR-Molekülen auf primären T-Zellen sowie die Verhinderung des TCR-*Mispairings* im Vordergrund.

4.2. Optimierungen des TCR-Gentransfers

Eine der Hauptprobleme beim TCR-Gentransfer ist die häufig nicht ausreichende Expression der eingebrachten TCR-Moleküle auf der Oberfläche von primären T-Zellen. Die Funktionsfähigkeit eines TCR ist allerdings wesentlich von diesem Expressionslevel abhängig¹²⁶. Dies konnte unter anderem anhand von Mausmodellen gezeigt werden, in denen kontrollierbare Mengen von TCR-Molekülen an der Oberfläche exprimiert wurden. Es zeigte sich, dass eine reduzierte Dichte an Oberflächen-TCR-Molekülen zu stark verminderten Effektorfunktionen führte¹²⁷. Um ein ausreichendes Expressionslevel transgener TCR-Moleküle zu erreichen, können verschiedene Modifikationen des viralen Vektors sowie der TCR-Sequenzen erfolgen. Zur Analyse der durchgeführten Modifikationen diente ein in dieser Arbeit identifizierter influenzaspezifischer CD8⁺ TCR. In den folgenden Abschnitten werden die Modifikationen diskutiert.

4.2.1. Optimierung der transgenen Expressionskassette

Die Anordnung der TCR-Ketten in viralen Transfervektoren kann großen Einfluss auf die Expressionsstärke des transgenen TCR haben. Die Herausforderung beim TCR-Transfer liegt dabei darin, dass der TCR erst nach Expression seiner beide Ketten, der TCRαund der TCRβ-Kette, gemeinsam mit CD3-Molekülen an die T-Zelloberfläche migrieren
kann¹¹. In der vorliegenden Arbeit wurden die identifizierten influenzaspezifischen TCRabzw. TCRβ-Ketten zum einen getrennt in 2 Vektoren kloniert und zum anderen über die 2A-Sequenz (2A) des porzinen Teschovirus in einem Vektor miteinander verknüpft. Dabei wurde die Funktionalität der Konfigurationen TCRα-2A-TCRβ und TCRβ-2A-TCRα überprüft (s. Abb. 20). Die Expression der TCR-Moleküle sowie die durch sie vermittelten Effektorfunktionen wurden anschließend direkt miteinander verglichen. Die Expression des Flu-TCR in der T-Zelllinie J76 konnte durch alle Vektorvarianten effizient vermittelt werden (s. Abb. 21). Zusätzlich konnte auch die Antigenspezifität der ursprünglichen T-Zellklone durch alle Vektorkonstrukte erfolgreich transferiert werden (s. Abb. 22). Im Bezug auf die Anordnung der Expressionskassette war deutlich erkennbar, dass die durch die 2A-Sequenz verbundenen Ketten in der Konfiguration β-2A-α die stärksten Effektorfunktionen vermittelten (s. Abb. 22). Die auf getrennten Vektoren transduzierten TCRα und β-Ketten vermittelten die schwächsten Effektorfunktionen. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit in der Literatur zu findenden Daten. Um einen optimalen Zusammenbau der CD3-Moleküle mit den TCR-Ketten zu gewährleisten, der für die TCR/CD3 Oberflächenexpression notwendig ist, ist eine äquimolare Expression beider TCR-Ketten von Vorteil¹²⁸. Dies macht deutlich warum die Kopplung der beiden TCR-Ketten über das 2A-Element vorteilhaft ist. Die 2A-Sequenz vermittelt durch ein "ribosomales Stottern" die Translation zweier getrennter Proteine aus einer mRNA, was zu einer nahezu stöchiometrischen Expression der beiden Proteine führt^{31,128-131}. Im Gegensatz dazu führt die Transduktion durch zwei unterschiedliche Vektoren aufgrund unterschiedlicher Transduktionseffizienzen zu einer ungleichen Expression der beiden TCR-Ketten. Die ungleiche Expression begünstigt in primären T-Zellen zudem die Wahrscheinlichkeit des TCR-Mispairings^{31,88,128}. Zusätzlich wird das Risiko einer Insertionsmutagenese bei der Transduktion zweier Vektoren durch vermehrte Vektorintegrationen in das Zellgenom erhöht ^{56,98,132}. Ein weiterer Vorteil der 2A-Sequenz ist zudem ihre geringe Größe (P2A, 22 AS), die es problemlos ermöglicht, auch mehr als zwei Gene in einem Vektor miteinander zu verbinden¹³³. Ein Nachteil des 2A-Prinzips besteht darin, dass ein großer Teil der 2A-Sequenz (21 AS) am C-Terminus des 5' kodierten Proteins fusioniert bleibt¹³⁰. Bislang gibt es allerdings keine Berichte über daraus resultierende Veränderungen des Proteins oder über Immunreaktionen gegen die virale Sequenz. Diese Fusion könnte jedoch eine Erklärung für die verstärkte Effektorfunktion durch die Konfiguration β -2AS- α sein¹²⁸. Es wurde beschrieben, dass die Struktur der TCRα-Kette weniger stabil im Vergleich zu der TCRβ-Kette ist¹⁴. Die Fusion des viralen Peptids an das intrazelluläre TCRa-Ende könnte dessen Stabilität weiter verschlechtern, was zu einer verminderten Oberflächenexpression führt¹²⁸. Als weitere Alternativen einer bicistronischen Konfiguration der TCR-Ketten in einem Vektor bieten sich chimäre bidirektionale Promotoren oder die **IRES-Sequenz** des Enzephalomyokarditis Virus an¹³⁴. Es ist beschrieben, dass diese Alternativen allerdings ebenfalls nicht zu einer äquimolaren Expression von zwei Genen führen, und im Fall der dualen Promotoren die Transgenexpression im Allgemeinen relativ schwach ist^{31,128,130,133,135,136} Die in dieser Arbeit verwendete 2A-Strategie der Expressionskassette scheint daher für eine optimale Expression der TCR-Ketten am besten geeignet zu sein.

4.2.2. Verwendung eines optimalen Transfervektors

Die Verwendung eines geeigneten Vektors für den effizienten Transfer der TCR-Gene ist ein weiterer wichtiger Aspekt des TCR-Gentransfers. In dieser Arbeit wurde sowohl ein lentiviraler Vektor der dritten Generation, als auch der für den TCR-Gentransfer bereits etablierte gammaretrovirale Vektor MP91^{92,137,138} verwendet. Für den Einsatz in primären T-Zellen wurde der lentivirale Vektor LeGO-iG2 zunächst optimiert. Im ursprünglichen Vektor wird die Expression des Transgens durch den SFFV-Promotor gesteuert⁹⁰. Dieser stammt aus der LTR-Region des Spleen Focus Forming Virus und hat sich hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen als starker Promotor bewährt¹³⁹. In anderen Zelltypen kann die Expression durch den SFFV-Promotor jedoch stark varriieren¹⁴⁰. Daher wurde er gegen den MPSV-Promotor des Myeloproliferative Sarcoma Virus und den MESV-Leader des Murine embryonic stem cell virus ausgetauscht, die für die Expression von Transgenen in T-Lymphozyten als geeignet gelten¹³⁷. Durch den Austausch konnte eine signifikant verbesserte Expression in T-Zelllinien und primären T-Lymphozyten erreicht werden (s. Abb. 24). Der direkte Vergleich des neuen lentiviralen LeGO-MP-Vektors mit dem gammaretroviralen MP91-Vektors zeigte die Überlegenheit des gammaretroviralen Vektors sowohl im Bezug auf die Transduktionseffizienz, als auch auf die Stärke der vermittelten Effektorfunktionen (s. Abb. 28)¹⁴¹. Dieses Resultat reflektiert wahrscheinlich die unterschiedlichen Fähigkeiten der beiden Vektoren, ausreichend hohe Level an TCR-Molekülen in primären T-Zellen zu exprimieren. Der gammaretrovirale Vektor besitzt dabei offensichtlich einen inhärenten Vorteil, der wahrscheinlich durch seine LTR-Konfiguration ermöglicht wird¹³⁷. Lentivirale Vektoren besitzen allerdings einige anderen Vorteile. Dazu gehört die Fähigkeit der lentiviralen Vektoren, auch minimal stimulierte oder unstimulierte Zellen transduzieren zu können¹³⁰. Wenig differenzierte oder naive T-Zellen scheinen ausdifferenzierten T-Lymphozyten in der adoptiven Immuntherapie, zumindest im Tiermodell, überlegen zu sein¹⁴². Ein weiteres Argument für die Verwendung von lentiviralen Vektoren könnte ihr abweichendes Integrationsmuster und der damit verbundenen eventuell verminderten Gefahr einer Toxizität durch sein^{143,144}. Insertionsmutagenese Gammaretrovirale LTR Vektoren integrieren vorzugsweise in der Nähe von Transkriptionsstartpunkten von Genen und können dabei über die LTR-Region die benachbarten Gene aktivieren, bei denen es sich im schlimmsten Fall um Onkogene handeln kann^{145,146}. In klinischen Anwendung sind nach der Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen mit gammaretroviralen Vektoren bereits schwere Nebenwirkungen aufgetreten, die durch eine Insertionsmutagenese ausgelöst wurden^{147,148}. Lentivirale Vektoren der 3. Generation integrieren bevorzugt innerhalb transkribierter Gene und zeigen keine Präferenz für den Transkriptionsstart oder andere regulatorische Bereiche^{34,149–151}. Momentan wird zwar angenommen, dass TCR-Gentherapie, reife T-Zellen, die Zielzellen der nur schwer durch Insertionsmutagenese transformierbar sind^{92,109}, allerdings kann ein Restrisiko trotz geringer Wahrscheinlichkeit nicht ausgeschlossen werden^{92,152}.

4.2.3. Probleme bei der Expression von transgenen TCRs in primären T-Lymphozyten

Die ektope Expression eines zusätzlichen TCRs in T-Lymphozyten, die bereits einen endogenen TCR besitzen, ist in mehrfacherr Hinsicht problematisch. Das TCR-Mispairing (s. 1.2.1) führt zu einer Verschlechterung der Expression des transgenen TCR und damit auch zu einer Verminderung der Funktionalität der transgenen T-Zellen^{96,153}. Zudem kann das Mispairing zur Entstehung neuer TCR mit unbekannter Spezifität führen. Schlimmstenfalls könnten sich die falsch gepaarten TCRs, da sie keiner thymischen Selektion in vivo ausgesetzt waren, als autoreaktiv erweisen und zu einer potentiell letalen Spender-gegen-Wirt Krankheit führen¹⁵³. Dieser Aspekt ist in Hinblick auf die klinische Anwendbarkeit des TCR-Gentransfers äußerst wichtig und wurde bereits im Mausmodell beobachtet⁵². Ein weiteres Problem durch den endogenen TCR stellt die Kompetition um die limitiert vorhandenen CD3-Moleküle dar, die für eine erfolgreiche Oberflächenexpression notwendig sind^{101,153}. Die Kompetition führt ebenfalls zu verringerten Expressionslevel und damit zu verschlechterten Effektorfunktionen der transgenen T-Zellen¹⁰¹. Im Einklang mit diesen Beobachtungen zeigten die Flutransduzierten Zellen trotz optimierten Vektors und optimierter Expressionskassette in primären T-Zellen keinerlei Effektorfunktionen nach Kontakt zu ihrem spezifischen Flu-M-Peptid. Um den ektopen TCR-Molekülen einen Vorteil gegenüber den endogenen TCR- Ketten zu ermöglichen, wurden bislang verschiedenen Modifikationen vorgeschlagen^{31,131}, von denen einige in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

4.2.3.1. Einfügen einer zusätzliche Disulfidbrücke

Für eine verbesserte Oberflächenexpression und Verminderung des TCR-Mispairings wurde eine zusätzliche Disulfidbrücke zwischen die C-Regionen der Flu-TCR-Ketten eingesetzt. Anschließend wurden der modifizierte TCR erneut in primären T-Zellen getestet. Im IFN-y-ELISA konnte ich eine im Vergleich zu den Kontrollzellen vermehrte, wenn auch moderate Sekretion von IFN-y durch den modifizierten TCR beobachten (s. Abb. 25). Bei der Sekretion von IL-2 wurde jedoch kein Unterschied zu den Kontrollzellen festgestellt. Daher ist davon auszugehen, dass die Oberflächenexpression durch die Cysteinmodifikationen in diesem Fall nicht wesentlich verbessert werden konnte. In der Literatur finden sich bezüglich der Nützlichkeit der Cysteinmodifikationen zum Einfügen einer weiteren Disulfidbrücke unterschiedliche Ansichten. Cohen et al. und weitere Wissenschaftler haben gezeigt, dass das Einfügen einer zusätzlichen Disulfidbrücke durchaus zu verbesserter Oberflächenexpression und Effektorfunktionen führen kann, und haben dies auf eine möglicherweise effektivere Paarung zwischen den modifizierten zurückgeführt^{96,154}. TCR-Ketten Andere Wissenschaftler hingegen haben, in Übereinstimmung mit meinen Beobachtungen, ebenfalls keine wesentlichen Verbesserungen der Effektorfunktionen durch Cysteinmodifikationen feststellen können¹⁵⁵. In den beschriebenen Fällen wurden allerdings unterschiedliche T-Zell-Rezeptoren verwendet. Es ist daher möglich, dass der Grad der durch die Cysteinmodifikationen erreichten Verbesserungen durch TCR-Strukturen bestimmt wird, die sich zwischen verschiedenen TCRs unterscheiden. Als Region kommt dabei vor allem die V-Regionen des TCR in Betracht^{153,155}. Es ist denkbar, dass die Paarung durch das Einfügen einer weiteren Disulfidbrücke für einige V-Regionen vorteilhaft ist, während sie bei TCRs mit anderen variablen Regionen keinen Einfluss hat.

4.2.3.2. Kodonoptimierung und Murinisierung

Nachdem die Cysteinmodifikation der Flu-TCR-Ketten nur zu einer geringfügigen Verbesserung der Effektorfunktionen geführt hatte, wurden als weitere Modifikationen eine Kodonoptimierung sowie eine Murinisierung der TCR-Ketten durchgeführt. Tatsächlich konnte ich nach dem Einfügen der beiden Modifikationen eine effiziente Oberflächenexpression des eingebrachten TCR in primären T-Lymphozyten nachweisen.

Zusätzlich reagierten die durch den TCR-Transfer umprogrammierten primären T-Zellen auf einen Kontakt mit ihrem spezifischen Flu-Peptid mit einer starken Effektorantwort und sekretierten große Mengen verschiedener Zytokine (s. Abb. 27). Damit konnte, zum ersten Mal, die erfolgreiche Generierung von aktiven anti-Flu Effektor T-Zellen durch TCR-Gentransfer gezeigt werden. Die erfolgreiche Generierung ist dabei wahrscheinlich auf einen additiven Effekt der Kodonoptimierung und Murinisierung zurückzuführen. Die Kodonoptimierung führt durch die Verwendung von weit verbreiteten Kodons sowie durch die Entfernung von Spleißstellen zu einer verstärkten und beschleunigten Translation der mRNA, was wiederum in einer Verbesserung der Expression der TCR-Ketten resultiert^{126,156,157}. Bezüglich der durchgeführten Murinisierung konnten Cohen et al. als Erste zeigen, dass ein murin-humaner Hybrid-TCR in humanen Zellen paradoxerweise besser funktioniert als ein rein humaner TCR¹⁵⁸. Es wird angenommen, dass dies an der besseren Stabilität der Bindung zwischen den murinen C-Regionen und den limitierten CD3-Molekülen liegt, die dadurch effizienter rekrutiert werden können¹⁵⁹. Zudem scheinen sich murinisierte TCRa- und TCRB-Ketten vermehrt miteinander zu verbinden, wodurch das Risiko des TCR-Mispairings deutlich reduziert und die Oberflächenexpression der transgenen TCRs weiter verbessert wird^{31,153}. Dass das TCR-Mispairing nicht komplett verhindert werden kann, lässt sich aus der spezifischen Tetramerfärbung schließen. Eine große Anzahl der primären Zellen zeigten nach Transduktion keine Expression des modifizierten Flu-TCR. Dies könnte zum einen die Tatsache widerspiegeln, dass die Zahl an TCR-Molekülen einen gewissen Schwellenwert überschreiten muss, bevor sie an die Oberfläche transportiert werden können¹³¹. Es ist gut möglich, dass das durch die Transduktion erreichte Expressionslevel für diesen Transport nicht ausreichte. Eine andere Erklärung liegt in dem von Heemskerk et al. postulierten Konzept¹⁶⁰. Dieses sagt aus, dass das Expressionslevel des eingebrachten TCR von der Stärke des endogenen TCR abhängt, wobei zwischen schwachen und starken T-Zell-Rezeptoren unterschieden wird. Entsprechend kann es zu einer unterschiedlichen Expression des gleichen transgenen TCR in unterschiedlichen T-Lymphozyten kommen¹⁶⁰. Die fehlende Flu-TCR Oberflächenexpression könnte andererseits auch an dem noch immer stattfindenden TCR-Mispairing liegen, das zwar durch die Murinisierung deutlich vermindert, aber nicht komplett verhindert werden kann. Zudem ist es denkbar, dass die murinisierten Rezeptorbereiche immunogen sein könnten, was besonders im Hinblick auf eine klinische Anwendung ungünstig wäre. Für eine verringerte Immunogenität konnten inzwischen die entscheidenden Aminosäuren in den konstanten Bereichen des murinen TCRs identifiziert werden, die für die Überlegenheit gegenüber dem humanen TCR verantwortlich sind. Damit

konnten minimal murinsierte C-Regionen generiert werden, in denen lediglich 4 Aminosäuren (TCRα) bzw. 5 Aminosäuren (TCRβ) aus der murinen C-Region übernommen wurden¹⁶¹. Jedoch lässt sich auch durch die minimale Murinisierung das Problem des verbleibenden TCR-*Mispairings* nicht lösen. Daher wurde als Lösungsansatz hierfür eine Strategie zum Knockout der endogenen TCR-Gene entwickelt, die im letzten Abschnitt diskutiert wird.

4.2.3.3. Weitere Modifikationen

Um eine hohe Oberflächenexpression von transgenen TCR-Molekülen zu erreichen, wurden weitere Modifikationen analysiert. Es wurde gezeigt, dass die Kotransduktion der limitierenden CD3-Molekülen zusammen mit dem TCR zu einer stark erhöhten Oberfläche führt¹⁰¹. Es ist allerdings nicht klar, ob es durch die reduzierten Kompetition um CD3-Moleküle zu einer vermehrten Expression falsch gepaarter TCRs kommt³¹. Eine andere Möglichkeit, um eine hohe Oberflächenexpression zu erreichen, indem das TCR-*Mispairing* umgangen wird, ist die Transduktion von γδ-T-Zellpopulationen¹³¹ ¹⁶². TCRγund δ -Ketten sich nicht in der Lage sich mit TCR α - und β -Ketten zu verbinden. Die funktionellen in vivo-Daten der modifizierten γδ-T-Zellen waren allerdings nicht überzeugend, so dass der Ansatz nicht weiter verfolgt wurde¹⁶³. Molekulare Änderungen an den TCR-Molekülen, die zu einer höheren Affinität führen, können ebenfalls erhöhte Oberflächenexpressionen zur Folge haben^{164,165}. Auch Veränderung in den C-Regionen zur Entfernung von N-Glykosilierungen können erhöhte Antigensensititvität bewirken¹⁶⁶. Eine interessante Möglichkeit um den benötigten Schwellenwert der TCR-Moleküle für eine Effektorantwort zu erniedrigen, ist die Verwendung von T-Zellpopulationen mit vordefinierter Spezifität. Dabei werden T-Zellen transduziert, die bereits spezifisch für z.B. CMV oder EBV sind, um bifunktionale Virus- und Tumor-Spezifitäten zu generieren^{167–169}. Dabei wurde gezeigt, dass die Erkennung der häufig vorkommenden viralen Antigene durch den endogenen TCR für den Erhalt der Funktion und Persistenz der Zellen vorteilhaft ist und zudem den beschriebenen Schwellenwert des transgenen TCR erniedrigt¹²¹. Zusätzlich ist das TCR-*Mispairing* bei diesem Ansatz aufgrund der Verwendung von monoklonalen Zellpopulationen zumindest eingeschränkt.

4.3. TALEN-vermittelter Knockout der endogenen TCR-Ketten

Der ultimative Weg zur Verhinderung des TCR-*Mispairings* besteht darin, die Expression des endogenen TCR durch Genomeditierung mit Hilfe von Designernukleasen

vollständig auszuschalten. Die Wirksamkeit dieses Ansatzes für den TCR-Gentransfer wurde bereits erfolgreich mit ZFN gezeigt^{170,171}. In der vorliegenden Arbeit habe ich TALE-Nukleasen für einen Knockout der beiden TCR Gene verwendet. Zunächst wurden geeignete Methoden für den Transport der TALEN und Kultivierungsbedingungen anhand des Reporterproteins eGFP in Jurkat-Zellen getestet und optimiert. Ziel war es, einen effizienten Transport bei gleichzeitig geringer Beeinträchtigung der Zellvitalität zu erreichen. Für alle 3 getesteten Transportmethoden, die nicht-virale Elektroporation von pDNA und mRNA sowie die virale Transduktion durch das lentivirale NRTLV-System⁹¹, konnten effiziente Protokolle entwickelt werden. Dabei war der Transfer des Reporterproteins durch die Elektroporation der Zellen mit ca. 90% (mRNA) und 80% (pDNA) effizienter als die Transduktion durch das NRTLV-System (~60%) (s. Abb. 30, Abb. 33 und Abb. 35). Bei der Elektroporation von pDNA kam es allerdings, im Vergleich zu den anderen beiden Methoden, zu einer wesentlich höheren Zytotoxizität (s. 3.4.3). Bei der Optimierung der Kultivierungsbedingungen habe ich festgestellt, dass eine transiente Hypothermie der mRNA-elektroporierten Zellen für einen Tag bei 32°C und die anschließende Kultivierung bei 37°C zu einer signif ikant erhöhten Expressionsstärke um mehr als 100% führte (s. Abb. 33). Ähnlich erhöhte Expressionsstärken durch transiente Hypothermie habe ich auch bei der Elektroporation von DNA sowie bei der lentiviralen Transduktion beobachtet. Nach erfolgreicher Identifizierung und Klonierung der TCRspezifischen TALEN-Paare wurden die optimierten Protokolle beim TCR-Knockout angewendet. Ich konnte für alle 3 Methoden, zum ersten Mal, einen effizienten Knockout sowohl der TCRα- als auch der TCRβ-Kette mit TALE-Nukleasen in Jurkat T-Zellen zeigen. Dabei war die Effizienz des Knockouts beim mRNA-basierenden TALEN-Transfer mit 59,7 \pm 4,0% (TCR α) und 37,4 \pm 7,3% (TCR β) am höchsten, gefolgt von der pDNA-Elektroporation mit 24,6 \pm 12,1% (TCR α) und 23,5 \pm 7,2% (TCR β). Etwas niedriger war der Knockout nach Transport der TALEN mit dem NRTLV-System (19%, TCR α). Es zeigte sich zudem erneut, dass die Jurkat-Zellen nach mRNA-Elektroporation und Transduktion eine deutlich höhere Zellvitalität aufwiesen als die Zellen nach pDNA-Elektroporation. Eine niedrige Zellvitalität nach Elektroporation von pDNA wurde ebenso von anderen Gruppen beobachtet^{172–175}. Es konnte inzwischen gezeigt werden, dass die immunstimulatorischen CpG-Motive in der pDNA für einen signifikanten Anteil dieser Toxizität sorgen, da die Motive einen weitaus höheren Anteil an unmethylierten Dinukleotiden besitzen als in normaler Säugetier-DNA üblich. Diese unmethylierten Motive werden von Toll-like Rezeptoren erkannt und führen so zu Veränderungen in der T-Zell-Biologie¹⁷⁶. Ein zusätzlicher Nachteil bei der pDNA-Elektroporation liegt darin, dass die DNA nach der Elektroporation zunächst in den Zellkern gelangen muss, um dort

zu mRNA transkribiert zu werden. Die Transkriptionseffizienz hängt dabei größtenteils vom verwendeten Promotor und zelltypspezifischen Transkriptionsfaktoren ab. Bei der Elektroporation von mRNA hingegen umgeht man diese Schritte, da die mRNA im Zytoplasma direkt zu Proteinen translatiert werden kann¹⁷³. Da es sich bei dem NRTLV-System ebenfalls um einen reinen Transport von RNA als kodierende Nukleinsäure handelt, erfolgt auch hier eine direkte Translation der mRNA im Zytoplasma⁹¹. Ein weiterer Vorteil der mRNA-Elektroporation ist, dass sie neben dem Transfer von Proteinen als sicherste Methode gilt, um eine permanente Transgenexpression auszuschließen. Ungeplante und zufällige Vektorinsertionen kommen beispielsweise bei der pDNA-Elektroporation häufig vor und können zu unerwünschten Genomveränderungen führen^{177–179}. Während der Proteintransfer für viele Zelltypen und insbesondere im Hinblick auf große Zellzahlen problematisch ist, konnten diese Herausforderungen für die mRNA-Elektroporation gemeistert werden^{173,180}. Da es sich beim transienten lentiviralen NRTLV-Systems ebenfalls um einen reinen Transport von mRNA handelt, sollte das System aufgrund der transienten Expression ähnlich sicher sein, wie eine mRNA-Elektroporation⁹¹. Ein Vorteil bei der Verwendung des NRTLV-Systems gegenüber einfachen Transfektionsmethoden ist unter anderem die Möglichkeit zur Pseudotypisierung der Viruspartikel, wodurch ein zelltypspezifischer Transport erreicht werden kann^{59,181,182}. Die von mir beobachtete Steigerung der Expressionsstärke allen verwendeten Transportmethoden nach transienten hypothermischen bei Kulturbedingungen, wurden auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet^{183,184}. Dabei wurde u.a. auch die Effizienz einer Zinkfingernuklease durch Hypothermie verbessert¹⁸⁵. Die erhöhte Expressionsstärke kann dabei mehrere Gründe haben. Zum einen ist es denkbar, dass es durch das eingeschränkte Wachstum der Zellen bei 32°C zu einer Akkumulation der mRNA/DNA und des translatierten Proteins kommt¹⁸⁶. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die geringere Temperatur zu einer verbesserten Stabilität der Moleküle führt.

Nach Adaptation des mRNA-Elektroporationsprotokolls an primäre T-Lymphozyten konnte auch hier erstmals ein signifikanter Knockout der endogenen TCR-Ketten induziert werden. Die Effizienz des Knockouts betrug 58 ± 15% (TCR α , s. Abb. 37) bzw. 41 ± 18 (TCR β , s. Abb. 38) und konnte zusätzlich auf genomischer Ebene bestätigt werden. Wie eingangs kurz erwähnt, konnten zwei andere Arbeitsgruppen ebenfalls einen Knockout der endogenen TCR-Loci durch die Verwendung von ZFN erreichen^{170,171}. Die TALEN-induzierte Effizienz des TCR-Knockouts, die in der vorliegenden Arbeit erreicht werden konnte, lag dabei deutlich über den in diesen Veröffentlichungen beschriebenen Werten von 9% bzw. 37% (TCR α) und 7% bzw. 15%

 $(TCR\beta)^{170,171}$. Es ist beschrieben, dass TALEN im Vergleich zu ZFN eine höhere Spezifität aufweisen und hinsichtlich der off-target-Toxizität, das Schneiden außerhalb der Zielsequenz, wesentlich sicherer sind^{84,85}. Die überlegenden TALEN-Knockout Werte könnten ein Indiz für die höhere Spezifität der TALEN sein. Die off-target-Aktivität ist insbesondere im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung von Bedeutung, da unerwünschte Genomveränderungen zu schweren Nebenwirkungen und Komplikationen führen können. Grundsätzlich stellt das fehlerhafte Einfügen von DNA-Strangbrüchen ein inhärentes Risiko von Designernukleasen dar. Das Risiko wird vor allem durch das Vorliegen großer Mengen der Nuklease oder durch ihre Expression über einen langen Zeitraum in der Zelle erhöht⁷⁵. Daher sind die verwendete mRNA-Elektroporation sowie das NRTLV-System, die für eine kurzfristige Expression der Nukleasen ohne genomische Insertion sorgen, besonders geeignet. Neben der hohen Spezifität haben die TALEN auch hinsichtlich der Möglichkeit zur Produktion im eigenen Labor, einen großen Vorteil gegenüber den ZFN¹⁸⁷. Ebenso wie die Meganukleasen, eine weitere Klasse möglicher Designernukleasen, sind ZFN aufgrund ihrer Kontextabhängigkeit, die bei TALEN nicht vorhanden ist, aufwendig und schwierig in Eigenproduktion herzustellen^{83,87}.

Vor Kurzem wurde eine weitere Alternative für die Genomeditierung zu den bislang Verfügbaren TALEN, ZFN und Meganukleasen vorgestellt. Dabei handelt es sich um das CRISPR/Cas-System (engl. clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR associated)^{188,189}. Die modifizierte Form des Systems benötigt lediglich eine ~20 bp kurze, zur Ziel-DNA komplementäre RNA, die die DNA für das Schneiden durch die Cas9-Nuklease markiert¹⁸⁹. Die Funktionalität des CRISPR/Cas-Systems konnte bereits u.a. in humanen Zelllinien, Mäusen, Zebrafischen und Pflanzen gezeigt werden^{190–193}. Der große Vorteil liegt dabei in der sehr einfachen und günstigen Möglichkeit zur Synthetisierung der kurzen RNA-Oligonukleotide. Somit lassen sich viele verschiedene RNAs in kurzer Zeit auf die Fähigkeit hinsichtlich der Induktion eines Knockout testen^{188,189,194}. Im Gegensatz dazu sind für die Herstellung eines TALEN-Paares etwa 2-3 Wochen Arbeitszeit und zusätzlich deutlich höhere Kosten einzuplanen. Ein weiterer Vorteil des CRISPR/Cas-Systems könnte das bereits demonstrierte simultane Schneiden von mehreren DNA-Zielseguenzen, das sog. Multiplexing sein^{189,190}. Dieser Aspekt ist hinsichtlich des simultanen Knockouts des TCRa- und TCRβ-Gens äußerst interessant. Allerdings bleibt aufgrund der wenigen Publikationen abzuwarten, ob die durch das CRISPR/CAS-System induzierten Schnittstellen spezifisch im Genom eingefügt werden, oder ob es, aufgrund der sehr kurzen RNAs, zu vermehrten off-target-Effekten kommt. Eine erste Veröffentlichung deutet bereits darauf hin, dass

das CRISPR/CAS-System zu erheblichen *off-target*-Mutationen in humanen Zellen führen kann¹⁹⁵. Weitere Analysen müssen jedoch folgen, um Klarheit hinsichtlich dieses Sachverhaltes zu erlangen.

4.4. Komplette Umprogrammierung von T-Zellen

Nach der erfolgreichen Induzierung des TCR-Knockouts in primären T-Zellen, konnte ich zeigen, dass sowohl die Transduktion und Sortierung der TCR-defizienten Zellen als auch ihre Kultivierung über längere Zeiträume möglich waren. Die Zellen ließen sich trotz Abwesenheit der CD3-Oberflächenmolekülen effizient mit CD3/CD28-Beads stimulieren. Anschließend konnte ich zeigen, dass der sukzessive Knockout der TCRa- und ß-Kette und die jeweils anschließende Transduktion mit den entsprechenden Flu-TCR-Ketten Umprogrammierung Spezifität der Zellen eine echte der erlaubten. Die umprogrammierten Zellen zeigten 5-fach höhere Spezifität gegenüber ihrem spezifischen Flu-Tetramer, sowie 5-18-fach verstärkte Effektorfunktionen nach Kontakt zu ihrem spezifischen Antigen. Diese Beobachtungen sind in Übereinstimmung mit den von Provasi et al. publizierten Daten, die nach kompletter Umprogrammierung von T-Zellen mit Hilfe von ZFN ebenfalls eine erhöhte Pentamerbindung und eine höhere Aktivität der modifizierten Zellen zeigen konnten¹⁷⁰. Zusätzlich wurde durch jene Arbeitsgruppe eine stark reduzierte Aktivität gegen nichtspezifische Ziele festgestellt, sowie die Langzeitstabilität der modifizierten Zellen im Mausmodell dokumentiert¹⁷⁰. Die verbesserten Expressions- und Aktivitätslevel resultieren aus der Abwesenheit der endogenen Ketten. Zudem werden die potentiellen Sicherheitsaspekte, die mit dem TCR-Mispairing verbunden sind, durch die Entfernung der endogenen TCR-Expression komplett überwunden. Da sowohl der Knockout als auch der Ersatz der TCR-Gene auf genomischer Ebene stattfinden, ist die neue Spezifität der Zellen stabil und vererbbar. Als Alternative zu den Designernukleasen für eine spezifische Herunterregulierung der endogenen TCR-Ketten wurde bislang die Expression von siRNA vorgeschlagen¹⁹⁶. Dieser Ansatz konnte zwar die endogene TCR-Expression reduzieren, jedoch das TCR-Mispairing nicht komplett eliminieren. Zusätzlich besteht bei dieser Methode die Notwendigkeit der permanenten Expression der siRNA-Moleküle, während bei den Designernukleasen eine einmalige Expression ausreichend ist^{171,196,197}.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sich TALE-Nukleasen inzwischen für viele Anwendungen der Genomeditierung als Mittel der Wahl erwiesen haben. Ich konnte zeigen, dass sie einen effizienten Knockout der endogenen TCR-Gene in primären T- Lymphozyten induzieren können und eine komplette Umprogrammierung der Zellen mit den transgenen TCR-Ketten möglich ist. Durch diesen Ansatz werden die Funktionalität der transduzierten Zellen deutlich erhöht und die Einschränkungen und Gefahren durch das TCR-*Mispairing* komplett beseitigt. Letzteres kann im Hinblick auf die Sicherheit des TCR-Gentransfers, vor allem in klinischen Anwendungen, in Zukunft von großem Nutzen sein.

4.5. Ausblick

Das CT-Antigen MAGE C2 stellt ein attraktives Ziel der adoptiven Immuntherapie des Multiplen Myleoms dar. Es wird häufig beim MM exprimiert und ist in gesundem MHCexprimierendem Gewebe nicht zu detektieren^{70,71,73,74,104}. In Folge der kürzlich aufgetretenen schweren Nebenwirkungen durch die *off-tumor*-Aktivität eines CTAspezifischen TCR⁵⁰ sollte durch ausführliche Analysen sichergestellt werden, dass weder die Expression von MAGE-C2, noch die von homologen Proteinen der CTA-Familie auf gesundem Gewebe stattfindet. Anschließend sollte der Fokus auf eine erfolgreiche Isolation von MAGE-C2 spezifischen Zellen gelegt werden. Dabei bietet sich als alternative Methode die Isolierung spezifischer T-Zellen aus transgenen Mäusen an¹⁰⁶. Dabei wäre es wünschenswert sowohl spezifische CD4⁺, als auch CD8⁺-Zellen zu isolieren.

Für die Strategie der kompletten Umprogrammierung der T-Zellen mit Hilfe von TALEN wäre eine Feinjustierung der einzelnen Schritte wünschenswert. Dabei könnte ein möglicher Fokus auf den simultanen Knockout des TCRa- und β -Locus liegen, wodurch viele Zwischenschritte wegfallen und die benötigte Zeit zur Umprogrammierung der Zellen wesentlich verkürzt werden könnte. Bei einem simultanen Knockout wäre zusätzlich die Entwicklung von neuen Methoden für eine Identifizierung der TCRa/ β -defizienten T-Zellen notwendig.

5. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APC	Antigenpräsentierende Zelle (antigen presenting cell)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
CAR	chimärer Antigen-Rezeptor
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CDR	complementarity determining regions
CMV	Cytomegalovirus
C-Region	konstante Region (<i>constant region</i>)
CRISPR/Cas	clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR associated
СТА	Cancer-Testis-Antigen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D-Region	Diversitätsregion
DSB	Doppelstrangbruch
E.coli	Escherichia coli
EBV	Ebstein-Barr-Virus
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELISPOT	Enzyme Linked Immuno Spot Assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
Flu	Influenza
Flu-M	Influenza Matrixprotein
Flu-NP	Influenza Nukleoprotein
FSC	Vorwäts-Streulich (forward scatter)
Galv	Gibbon ape leukemia virus
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HLA	humanes Leukozytenantigen
IFN	Interferon
IL2	Interleukin-2
IN	Integrase
IRES	Interne Ribosomeneintrittsstelle (internal ribosomal entry site)
ITAM	Immunoglobulin-Tyrosin-Aktivierungsmotiv
J-Region	verbindende Region (joining region)
kb	Kilobase
КО	Knockout

LAT	linker of activation of T cells
LCK	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LeGO	lentiviral gene ontology
LTR	lange endständige Sequenzwiederholung (long terminal repeat)
MCS	multiple cloning site
MESV	Murine embryonic stem cell virus
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major histocompatibility complex)
MHD	MAGE homology domain
MM	Multiples Myelom
MMLV	Moloney murine leukemia virus
MOI	Multiplizität der Infektion (Multiplicity of Infection)
MPSV	Myeloproliferative sarcoma virus
mRNA	messenger RNA
n.d.	nicht detektierbar
NHEJ	Nonhomologues End-Joining
NRTLV	nicht-revers-transkribierender lentiviraler Vektor
P2A	2A Sequence des porzinen Teschovirus-1
PBMCs	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells)
pDNA	Plasmid DNA
P=	
RAG	recombination-activating gene
RAG RLM-RACE- PCR	recombination-activating gene RNA Ligase mediated-rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction
RAG RLM-RACE- PCR RNA	recombination-activating gene RNA Ligase mediated-rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction Ribonukleinsäure
RAG RLM-RACE- PCR RNA RT	recombination-activating gene RNA Ligase mediated-rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction Ribonukleinsäure Raumtemperatur
RAG RLM-RACE- PCR RNA RT RT	recombination-activating gene RNA Ligase mediated-rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction Ribonukleinsäure Raumtemperatur reverse Transkription
RAG RLM-RACE- PCR RNA RT RT RVD	recombination-activating gene RNA Ligase mediated-rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction Ribonukleinsäure Raumtemperatur reverse Transkription Repeat variable diresidues
RAG RLM-RACE- PCR RNA RT RT RT RVD SD	recombination-activating gene RNA Ligase mediated-rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction Ribonukleinsäure Raumtemperatur reverse Transkription Repeat variable diresidues Standardabweichung
RAG RLM-RACE- PCR RNA RT RT RVD SD SFFV	recombination-activating gene RNA Ligase mediated-rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction Ribonukleinsäure Raumtemperatur reverse Transkription Repeat variable diresidues Standardabweichung Spleen focus forming virus
RAG RLM-RACE- PCR RNA RT RT RVD SD SFFV SpL	recombination-activating gene RNA Ligase mediated-rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction Ribonukleinsäure Raumtemperatur reverse Transkription <i>Repeat variable diresidues</i> Standardabweichung <i>Spleen focus forming virus</i> Spots pro Loch
RAG RLM-RACE- PCR RNA RT RT RVD SD SFFV SpL TAA	recombination-activating gene RNA Ligase mediated-rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction Ribonukleinsäure Raumtemperatur reverse Transkription Repeat variable diresidues Standardabweichung Spleen focus forming virus Spots pro Loch
RAG RLM-RACE- PCR RNA RT RT RVD SD SFFV SpL TAA TALEN	recombination-activating gene RNA Ligase mediated-rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction Ribonukleinsäure Raumtemperatur reverse Transkription Repeat variable diresidues Standardabweichung Spleen focus forming virus Spots pro Loch Tumorassoziiertes Antigen Transcription activator-like effector nucleases
RAG RLM-RACE- PCR RNA RT RT RVD SD SFFV SpL TAA TALEN TCR	recombination-activating gene RNA Ligase mediated-rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction Ribonukleinsäure Raumtemperatur reverse Transkription <i>Repeat variable diresidues</i> Standardabweichung Spleen focus forming virus Spots pro Loch Tumorassoziiertes Antigen Transcription activator-like effector nucleases T-Zell-Rezeptor (<i>T-cell receptor</i>)
RAG RLM-RACE- PCR RNA RT RT RVD SD SFFV SpL TAA TALEN TCR TIL	recombination-activating gene RNA Ligase mediated-rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction Ribonukleinsäure Raumtemperatur reverse Transkription Repeat variable diresidues Standardabweichung Spleen focus forming virus Spots pro Loch Tumorassoziiertes Antigen Transcription activator-like effector nucleases T-Zell-Rezeptor (<i>T-cell receptor</i>) tumorinfiltrierende Lymphozyten
RAG RLM-RACE- PCR RNA RT RT RVD SD SFFV SpL TAA TALEN TCR TIL ü.N.	recombination-activating gene RNA Ligase mediated-rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction Ribonukleinsäure Raumtemperatur reverse Transkription Repeat variable diresidues Standardabweichung Standardabweichung Spleen focus forming virus Spots pro Loch Tumorassoziiertes Antigen Transcription activator-like effector nucleases T-Zell-Rezeptor (<i>T-cell receptor</i>) tumorinfiltrierende Lymphozyten
RAG RLM-RACE- PCR RNA RT RT RVD SD SFFV SpL TAA TALEN TCR TIL ü.N. V-Region	recombination-activating gene RNA Ligase mediated-rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction Ribonukleinsäure Raumtemperatur reverse Transkription <i>Repeat variable diresidues</i> Standardabweichung Standardabweichung Spleen focus forming virus Spots pro Loch Tumorassoziiertes Antigen Transcription activator-like effector nucleases T-Zell-Rezeptor (<i>T-cell receptor</i>) tumorinfiltrierende Lymphozyten über Nacht
RAG RLM-RACE- PCR RNA RT RT RVD SD SFFV SpL TAA TALEN TCR TIL ü.N. V-Region VSVG	recombination-activating gene RNA Ligase mediated-rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction Ribonukleinsäure Raumtemperatur Raumtemperatur reverse Transkription <i>Repeat variable diresidues</i> Standardabweichung Standardabweichung Spleen focus forming virus Spots pro Loch Tumorassoziiertes Antigen Tumorassoziiertes Antigen Transcription activator-like effector nucleases T-Zell-Rezeptor (<i>T-cell receptor</i>) tumorinfiltrierende Lymphozyten über Nacht variable Region
RAG RLM-RACE- PCR RNA RT RT RVD SD SFFV SpL TAA TALEN TCR TIL ü.N. V-Region VSVG wPRE	recombination-activating gene RNA Ligase mediated-rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction Ribonukleinsäure Raumtemperatur reverse Transkription <i>Repeat variable diresidues</i> Standardabweichung Spleen focus forming virus Spots pro Loch Tumorassoziiertes Antigen <i>Transcription activator-like effector nucleases</i> T-Zell-Rezeptor (<i>T-cell receptor</i>) tumorinfiltrierende Lymphozyten über Nacht variable Region <i>Vesicular stomatitis virus</i> post-transcriptional regulatory element
RAG RLM-RACE- PCR RNA RT RT RVD SD SFFV SpL TAA TALEN TCR TIL ü.N. V-Region VSVG wPRE ZAP	recombination-activating gene RNA Ligase mediated-rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction Ribonukleinsäure Raumtemperatur reverse Transkription <i>Repeat variable diresidues</i> Standardabweichung Standardabweichung Spots pro Loch Spots pro Loch Tumorassoziiertes Antigen <i>Transcription activator-like effector nucleases</i> T-Zell-Rezeptor (<i>T-cell receptor</i>) tumorinfiltrierende Lymphozyten über Nacht variable Region <i>Vesicular stomatitis virus</i> post-transcriptional regulatory element Zeta-Kette assoziierte Proteinkinase

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1. Mak TW. The T cell antigen receptor: "The Hunting of the Snark". *European journal of immunology*. 2007;37:83–93.
- 2. Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp S a, Bagg A, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Science translational medicine*. 2011;3(95):95ra73.
- 3. Allison JP, Mcintyre BW, Bloch D. Tumor-specific antigen of murine T-Lymphoma defined with monoclonal antibody. *The Journal of Immunology*. 1982;129(5):2293–2300.
- 4. Meuer SC, Fitzgerald KA, Hussey RE, Hodgdon JC, Schlossman SF, Reinherz EL. Clonotypic structures involved in antigen-specific human T cell function. *The Journal of experimental medicine*. 1983;157(2):705–719.
- 5. Sim G, Yagüe J, Nelson J, Marrack P, Palmer E, Augustin A, et al. Primary structure of human T-cell receptor alpha-chain. *Nature*. 1984;312(5996):771–5.
- 6. Williams AF. The T-lymphocyte antigen receptor elusive no more. *Nature*. 1984;308:108–109.
- 7. Yanagi Y, Chan A, Chin B, Minden M, Mak T. Analysis of cDNA clones specific for human T cells and the alpha and beta chains of the T-cell receptor heterodimer from a human T-cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985;82(10):3430–4.
- 8. Yanagi Y, Yoshikai Y, Leggett K, Clark SP, Aleksander I, Mak TW. A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. *Nature*. 1984;308(5955):145–9.
- Hedrick SM, Cohen DI, Nielsen EA, Davis MM. Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature*. 1984;308:149 – 153.
- 10. Smith-Garvin JE, Koretzky G a, Jordan MS. T cell activation. *Annual review of immunology*. 2009;27:591–619.
- 11. Call ME, Pyrdol J, Wucherpfennig KW. Stoichiometry of the T-cell receptor-CD3 complex and key intermediates assembled in the endoplasmic reticulum. *The EMBO journal*. 2004;23(12):2348–57.
- 12. Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2004.
- 13. Bentley GA, Mariuzza RA. The structure of the cell antigen receptor. *Annual review of immunology*. 1996;14:563–90.
- 14. Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson I a. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annual review of immunology*. 2006;24:419–66.
- 15. Campbell KS, Bäckström T, Tiefenthaler G, Palmer E. CART: a conserved antigen receptor transmembrane motif. *Seminars in Immunology*. 1994;6(6):393–410.
- 16. Market E, Papavasiliou FN. V(D)J recombination and the evolution of the adaptive immune system. *PLOS Biology*. 2003;1(1):E16.
- 17. Fugmann SD, Lee a I, Shockett PE, Villey IJ, Schatz DG. The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annual review of immunology*. 2000;18:495–527.
- 18. Zinkernagel R., Doherty P. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*. 1974;248(450):701 702.
- 19. Rammensee HG, Friede T, Stevanoviíc S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*. 1995;41(4):178–228.
- 20. Van Bleek GM, Nathenson SG. The structure of the antigen-binding groove of major histocompatibility complex class I molecules determines specific selection of self-peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1991;88(24):11032–6.
- 21. Falk K, Rötzschke O, Stevanovié S, Jung G, Rammensee H-G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*. 1991;351:290 296.
- 22. Marrack P, Scott-Browne JP, Dai S, Gapin L, Kappler JW. Evolutionarily conserved amino acids that control TCR-MHC interaction. *Annual review of immunology*. 2008;26:171–203.
- 23. Acuto O, Di Bartolo V, Michel F. Tailoring T-cell receptor signals by proximal negative feedback mechanisms. *Nature reviews. Immunology.* 2008;8(9):699–712.

- 24. Brownlie RJ, Zamoyska R. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nature reviews. Immunology.* 2013;13(4):257–69.
- 25. Kim ST, Shin Y, Brazin K, Mallis RJ, Sun Z-YJ, Wagner G, et al. TCR Mechanobiology: Torques and Tunable Structures Linked to Early T Cell Signaling. *Frontiers in immunology*. 2012;3:
- 26. Xu C, Gagnon E, Call ME, Schnell JR, Charles D, Carman C V, et al. Regulation of T cell Receptor Activation by Dynamic Membrane Binding of the CD3ε Cytoplasmic Tyrosine-Based Motif. *Cell*. 2008;135(4):702–713.
- 27. Davis SJ, van der Merwe PA. The kinetic-segregation model: TCR triggering and beyond. *Nature immunology*. 2006;7(8):803–9.
- 28. James JR, Vale RD. Biophysical mechanism of T-cell receptor triggering in a reconstituted system. *Nature*. 2012;487(7405):64–9.
- 29. Deindl S, Kadlecek T a, Brdicka T, Cao X, Weiss A, Kuriyan J. Structural basis for the inhibition of tyrosine kinase activity of ZAP-70. *Cell*. 2007;129(4):735–46.
- 30. Barnes D, Loutit J. Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. *British medical journal*. 1956;2(4993):626–627.
- 31. Uttenthal BJ, Morris EC, Stauss HJ, Street RH, Nw L. Challenges in T cell receptor gene therapy. *The journal of gene medicine*. 2012;14(6):386–399.
- 32. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 1990;75(3):555–62.
- 33. Lorrie F, Odom JH, Githens H, Morse B, Sharma CS, August JR, et al. Remission of relapsed leukaemia during a graft-versus-host reaction reaction. *The Lancet.* 1978;312(8089):537–540.
- 34. Bobisse S, Zanovello P, Rosato A. T-cell receptor gene transfer by lentiviral vectors in adoptive cell therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2007;7(6):893–906.
- 35. Shi H, Liu L, Wang Z. Improving the efficacy and safety of engineered T cell therapy for cancer. *Cancer letters*. 2013;328(2):191–7.
- 36. Alter ELAW, Reenberg PHDG, Ilbert MARKJG. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *The New England journal of medicine*. 1995;333(16):1038–1044.
- 37. Rooney C, Smith C, Ng C, Loftin S, Li C, Krance R, et al. Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *The Lancet.* 1995;345:9–13.
- 38. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science (New York, N.Y.).* 2002;298(5594):850–4.
- 39. Rosenberg SA, John R, Yang JC, Topalian L, Douglas J, Jeffrey S, et al. Treatment of Patients With Metastatic Melanoma With Lymphocytes and Interleukin 2 Growth of TIL Cultures. *Journal of National Cancer Institute*. 1994;86(15):1159–1166.
- 40. Essand M, Loskog A. Genetically engineered T cells for the treatment of cancer. *Journal of internal medicine*. 2013;273(2):166–81.
- 41. Clay TM, Custer MC, Sachs J, Rosenberg SA, Nishimura MI, Hwu P. Efficient Transfer of a Tumor Antigen-Reactive TCR to Human Peripheral Blood Lymphocytes Confers Anti-Tumor Reactivity. *Journal Of Immunology*. 1999;163(1):507–513.
- 42. Morgan RA, Dudley ME, Yu YYL, Robbins PF, Theoret MR, John R, et al. Primary Human Lymphocytes Transduced with NY-ESO-1 Antigen-Specific TCR Genes Recognize and Kill Diverse Human Tumor Cell Lines. *Journal Of Immunology*. 2003;171(6):3287–3295.
- 43. Zhao Y, Zheng Z, Robbins PF, Hung T, Rosenberg SA, Morgan RA, et al. Primary human lymphocytes transduced with NY-ESO-1 antigen-specific TCR genes recognize and kill diverse human tumor cell lines. *Journal Of Immunology*. 2005;174(7):4415–4423.
- 44. Johnson L a, Morgan RA, Dudley ME, Cassard L, Yang JC, Hughes MS, et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood.* 2009;114(3):535–46.
- 45. Tsuji T, Yasukawa M, Matsuzaki J, Ohkuri T, Chamoto K, Wakita D, et al. Generation of tumor-specific, HLA class I-restricted human Th1 and Tc1 cells by cell engineering with tumor peptide-specific T-cell receptor genes. *Blood.* 2005;106(2):470–6.
- 46. Hillerdal V, Nilsson B, Carlsson B, Eriksson F, Essand M. T cells engineered with a T cell receptor against the prostate antigen TARP specifically kill HLA-A2+ prostate and breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(39):15877–81.

- 47. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*. 2006;314(5796):126–9.
- 48. Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, Dudley ME, et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(7):917–24.
- 49. Hunder NN, Wallen H, Cao J, Hendricks DW, Reilly JZ, Rodmyre R, et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *The New England journal of medicine*. 2008;358(25):2698–703.
- 50. Morgan RA, Chinnasamy N, Abate-daga D, Gros A, Robbins PF, Zheng Z, et al. Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *Journal of Immunotherapy*. 2013;36(2):133–151.
- 51. Parkhurst MR, Yang JC, Langan RC, Dudley ME, Nathan D-AN, Feldman S a, et al. T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2011;19(3):620–6.
- 52. Bendle GM, Linnemann C, Hooijkaas AI, Bies L, de Witte MA, Jorritsma A, et al. Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy. *Nature Medicine*. 2010;16(5):565–70, 1p following 570.
- 53. Nicholson E, Ghorashian S, Stauss H. Improving TCR Gene Therapy for Treatment of Haematological Malignancies. *Advances in hematology*. 2012;2012(404081):
- 54. Kootstra NA, Verma IM. Gene therapy with viral vectors. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2003;43:413–39.
- 55. Modrow S, Falke D, Truyen U. Molekulare Virologie. Spektrum Akademischer Verlag; 2002.
- 56. Stripecke R, Kasahara N. Lentiviral and Retroviral Vector Systems. *Cancer Drug Discovery: Gene Therapy for Cancer.* 2009;39–71.
- 57. Wei C, Gibson M, Spear PG, Scolnick EM. Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *Journal of virology*. 1981;39(3):935–945.
- 58. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *Journal of virology*. 1998;72(11):8463–71.
- 59. Cronin J, Zhang X, Reiser J. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Current gene therapy*. 2005;5(4):387–398.
- 60. Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature*. 2001;411(6835):380–4.
- 61. Chen Y. Identification of human tumor antigens by serological expression cloning: an online review on SEREX. *Cancer Immunotherapy*. 204AD;
- 62. Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth A a, Old LJ, Chen Y-T. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunological reviews*. 2002;188(3):22–32.
- 63. Kyle R, Rajkumar S. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*. 2009;23(1):3–9.
- 64. Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *The New England journal of medicine*. 2011;364(11):1046–60.
- 65. Kyle R a, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood*. 2008;111(6):2962–72.
- 66. Oranger A, Carbone C, Izzo M, Grano M. Cellular mechanisms of multiple myeloma bone disease. *Clinical & developmental immunology*. 2013;2013(289458):
- 67. Martinelli G, Terragna C, Zamagni E, Ronconi S, Tosi P, Lemoli RM, et al. Molecular remission after allogeneic or autologous transplantation of hematopoietic stem cells for multiple myeloma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2000;18(11):2273–81.
- 68. Koehne G, Giralt S. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma: curative but not the standard of care. *Current opinion in oncology*. 2012;24(6):720–726.
- 69. Corradini P, Voena C, Tarella C, Astolfi M, Ladetto M, Palumbo a, et al. Molecular and clinical remissions in multiple myeloma: role of autologous and allogeneic transplantation of hematopoietic cells. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 1999;17(1):208–15.

- 70. Lucas S, De Plaen E, Boon T. MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C2, and MAGE-C3: four new members of the MAGE family with tumor-specific expression. *International journal of cancer. Journal international du cancer.* 2000;87(1):55–60.
- 71. Güre AO, Stockert E, Arden KC, Boyer AD, Viars CS, Scanlan MJ, et al. CT10: a new cancer-testis (CT) antigen homologous to CT7 and the MAGE family, identified by representational-difference analysis. *International journal of cancer. Journal international du cancer.* 2000;85(5):726–32.
- 72. Xiao J, Chen H-S. Biological functions of melanoma-associated antigens. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2004;10(13):1849–53.
- 73. Pabst C, Zustin J, Jacobsen F, Luetkens T, Kröger N, Schilling G, et al. Expression and prognostic relevance of MAGE-C1/CT7 and MAGE-C2/CT10 in osteolytic lesions of patients with multiple myeloma. *Experimental and molecular pathology*. 2010;89(2):175–81.
- 74. Atanackovic D, Luetkens T, Hildebrandt Y, Arfsten J, Bartels K, Horn C, et al. Longitudinal analysis and prognostic effect of cancer-testis antigen expression in multiple myeloma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2009;15(4):1343–52.
- 75. Gaj T, Gersbach CA, lii CFB. ZFN , TALEN , and CRISPR / Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*. 2013;31(7):397–405.
- 76. Segal DJ, Meckler JF. Genome Engineering at the Dawn of the Golden Age. *Annual review of genomics and human genetics*. 2013;
- 77. Voytas DF. Plant Genome Engineering with Sequence-Specific Nucleases. *Annual review of plant biology*. 2013;64:327–350.
- 78. Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Jeffrey C, Choi VM, et al. Knockout rats produced using designed zinc finger nucleases. *Science*. 2010;325(5939):2009–2011.
- 79. Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKelver RC, Moehle E a, Worden SE, et al. Precise genome modification in the crop species Zea mays using zinc-finger nucleases. *Nature*. 2009;459(7245):437–41.
- 80. Townsend JA, Wright DA, Winfrey RJ, Fu F, Maeder ML, Joung JK, et al. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature*. 2009;459(7245):442–445.
- 81. Tadepally HD, Burger G, Aubry M. Evolution of C2H2-zinc finger genes and subfamilies in mammals: species-specific duplication and loss of clusters, genes and effector domains. *BMC evolutionary biology*. 2008;8(176):
- 82. Isalan M, Klug A, Choo Y. Comprehensive DNA Recognition through Concerted Interactions from Adjacent Zinc Fingers. *Biochemistry*. 1998;37(35):12026–33.
- 83. Road H, Kingdom U. Synergy between adjacent zinc fingers in sequence-specific DNA recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(11):5617–5621.
- 84. Gabriel R, Lombardo A, Arens A, Miller JC, Genovese P, Kaeppel C, et al. An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nature biotechnology*. 2011;29(9):816–23.
- 85. Händel E-M, Cathomen T. Zinc-finger nuclease based genome surgery: it's all about specificity. *Current gene therapy*. 2011;11(1):28–37.
- 86. J. M, Moscou J, Bogdanove AJ. A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science*. 2009;326(5959):1501.
- 87. Sanjana NE, Cong L, Zhou Y, Cunniff MM, Feng G, Zhang F. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nature protocols*. 2012;7(1):171–92.
- 88. Sommermeyer D, Neudorfer J, Weinhold M, Leisegang M, Engels B, Noessner E, et al. Designer T cells by T cell receptor replacement. *European Journal of Immunology*. 2006;36(11):3052–9.
- 89. Lusso P, Cocchi F, Balotta C, Markham PD, Louie a, Farci P, et al. Growth of macrophage-tropic and primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in a unique CD4+ T-cell clone (PM1): failure to downregulate CD4 and to interfere with cell-line-tropic HIV-1. *Journal of virology*. 1995;69(6):3712–20.
- 90. Weber K, Bartsch U, Stocking C, Fehse B. A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Molecular Therapy*. 2008;16(4):698–706.
- 91. Mock U. Neue lentivirale Vektoren für die HIV-Gentherapie. 2013;122.
- 92. Newrzela S, Cornils K, Li Z, Baum C, Brugman MH, Meyer J, et al. Resistance of mature T cells to oncogene transformation. *Blood*. 2008;112(6):2278–2286.

- 93. Voelkel C, Galla M, Maetzig T, Warlich E, Kuehle J, Zychlinski D, et al. Protein transduction from retroviral Gag precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(17):7805–10.
- 94. Beyer WR, Westphal M, Ostertag W, Laer D Von. Oncoretrovirus and Lentivirus Vectors Pseudotyped with Lymphocytic Choriomeningitis Virus Glycoprotein: Generation, Concentration, and Broad Host Range. *Journal of virology*. 2002;76(3):1488–1495.
- 95. Arnheim N, Erlich H. Polymerase chain reaction strategy. *Annual review of biochemistry*. 1992;61:131–56.
- Cohen CJ, Li YF, El-Gamil M, Robbins PF, Rosenberg SA, Morgan RA. Enhanced antitumor activity of T cells engineered to express T-cell receptors with a second disulfide bond. *Cancer Research*. 2007;67(8):3898–903.
- 97. Doyle EL, Booher NJ, Standage DS, Voytas DF, Brendel VP, Vandyk JK, et al. TAL Effector-Nucleotide Targeter (TALE-NT) 2.0: tools for TAL effector design and target prediction. *Nucleic acids research*. 2012;40(Web Server issue):W117–22.
- Kustikova OS, Wahlers A, Kuhlcke K, Stahle B, Zander AR, Baum C, et al. Dose finding with retroviral vectors: correlation of retroviral vector copy numbers in single cells with gene transfer efficiency in a cell population. *Blood*. 2003;102(12):3934–7.
- 99. Lee H, Lee Y, Kim H, Kim Y, Kim J, Jeon S, et al. Retronectin enhances lentivirus-mediated gene delivery into hematopoietic progenitor cells. *Biologicals*. 2009;37(4):203–209.
- 100. Hanenberg H, Xiao X, Dilloo D, Hashino K, Kato I, Williams D. Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nature Medicine*. 1996;2(8):876–82.
- 101. Ahmadi M, King JW, Xue S-A, Voisine C, Holler A, Wright GP, et al. CD3 limits the efficacy of TCR gene therapy in vivo. *Blood*. 2011;118(13):3528–3537.
- 102. Curran KJ, Pegram HJ, Brentjens RJ. Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: current understanding and future directions. *The journal of gene medicine*. 2012;14:405–415.
- 103. Han EQ, Li X-L, Wang C-R, Li T-F, Han S-Y. Chimeric antigen receptor-engineered T cells for cancer immunotherapy: progress and challenges. *Journal of hematology & oncology*. 2013;6(1):47.
- 104. Condomines M, Hose D, Raynaud P, Hundemer M, De Vos J, Baudard M, et al. Cancer/testis genes in multiple myeloma: expression patterns and prognosis value determined by microarray analysis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950).* 2007;178(5):3307–15.
- 105. Kalos M. Muscle CARs and TcRs: turbo-charged technologies for the (T cell) masses. *Cancer immunology, immunotherapy: Cll.* 2012;61(1):127–35.
- 106. Theobald M, Biggs J, Dittmer D, Levine a J, Sherman L a. Targeting p53 as a general tumor antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(26):11993–7.
- 107. Sadovnikova E, Jopling L a, Soo KS, Stauss HJ. Generation of human tumor-reactive cytotoxic T cells against peptides presented by non-self HLA class I molecules. *European journal of immunology*. 1998;28(1):193–200.
- 108. Amir AL, van der Steen DM, van Loenen MM, Hagedoorn RS, de Boer R, Kester MDG, et al. PRAMEspecific Allo-HLA-restricted T cells with potent antitumor reactivity useful for therapeutic T-cell receptor gene transfer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(17):5615–25.
- 109. Scholler J, Brady TL, Binder-Scholl G, Hwang W-T, Plesa G, Hege KM, et al. Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells. *Science translational medicine*. 2012;4(132):132ra53.
- 110. Kochenderfer J, Rosenberg S. Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2013;10:267–276.
- 111. Rosenberg S a, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(13):4550–7.
- 112. Brentjens R, Yeh R, Bernal Y, Riviere I, Sadelain M. Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2010;18(4):666–8.
- 113. Morgan R a, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg S a. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2010;18(4):843–51.

- 114. Lamers CHJ, Sleijfer S, Vulto AG, Kruit WHJ, Kliffen M, Debets R, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2006;24(13):e20–2.
- 115. Pleasance ED, Cheetham RK, Stephens PJ, McBride DJ, Humphray SJ, Greenman CD, et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature*. 2010;463(7278):191–6.
- 116. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1989;86(24):10024–8.
- 117. Cartellieri M, Bachmann M, Feldmann A, Bippes C, Stamova S, Wehner R, et al. Chimeric antigen receptor-engineered T cells for immunotherapy of cancer. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2010;2010:956304.
- 118. Büning H, Uckert W, Cichutek K, Hawkins RE, Abken H. Do CARs need a driver's license? Adoptive cell therapy with chimeric antigen receptor-redirected T cells has caused serious adverse events. *Human gene therapy*. 2010;21(9):1039–42.
- 119. Kershaw MH, Westwood J a, Darcy PK. Gene-engineered T cells for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer.* 2013;13(8):525–41.
- 120. Dotti CAR and G. Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Engineered Lymphocytes for Cancer Therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2012;11(7):855–873.
- 121. Marr L, Gilham D, Campbell J, Fraser A. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: double trouble for tumours: bi-functional and redirected T cells as effective cancer immunotherapies. *Clinical and experimental immunology*. 2012;167(2):216–25.
- 122. Brentjens RJ, Rivière I, Park JH, Davila ML, Wang X, Stefanski J, et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood.* 2011;118(18):4817–28.
- 123. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2011;365(8):725–33.
- 124. Park JR, Digiusto DL, Slovak M, Wright C, Naranjo A, Wagner J, et al. Adoptive Transfer of Chimeric Antigen Receptor Re-directed Cytolytic T Lymphocyte Clones in Patients with Neuroblastoma. *The american society of gene therapy.* 2007;15(4):825–833.
- 125. Lamers C, Sleijfer S, van Steenbergen S, van Elzakker P, van Krimpen B, Groot C, et al. Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma With CAIX CAR-engineered T cells: Clinical Evaluation and Management of On-target Toxicity. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2013;21(4):904–12.
- 126. Zhang L, Morgan R a. Genetic engineering with T cell receptors. *Advanced drug delivery reviews*. 2012;64(8):756–62.
- 127. Labrecque N, Whitfield LS, Obst R, Waltzinger C, Benoist C, Mathis D. How much TCR does a T cell need? *Immunity*. 2001;15(1):71–82.
- 128. Leisegang M, Engels B, Meyerhuber P, Kieback E, Sommermeyer D, Xue S-A, et al. Enhanced functionality of T cell receptor-redirected T cells is defined by the transgene cassette. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2008;86(5):573–83.
- 129. Szymczak AL, Workman CJ, Wang Y, Vignali KM, Dilioglou S, Vanin EF, et al. Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single "self-cleaving" 2A peptide-based retroviral vector. *Nature biotechnology*. 2004;22(5):589–94.
- 130. Jones S, Peng PD, Yang S, Hsu C, Cohen CJ, Zhao Y, et al. Lentiviral vector design for optimal T cell receptor gene expression in the transduction of peripheral blood lymphocytes and tumor-infiltrating lymphocytes. *Human Gene Therapy*. 2009;640(June):630–640.
- 131. Govers C, Sebestyén Z, Coccoris M, Willemsen RA, Debets R. T cell receptor gene therapy: strategies for optimizing transgenic TCR pairing. *Trends in Molecular Medicine*. 2010;16(2):77–87.
- 132. Liebert MA, Baum C, Kustikova O, Modlich UTE, Li Z, Fehse B. Mutagenesis and Oncogenesis by Chromosomal Insertion of Gene Transfer Vectors. 2006;263(March):253–263.
- 133. Sequences P, Thiry I, Vandeputte C, Vets S, Deroose C, Bormans G. Highly Efficient Multicistronic Lentiviral Vectors. *Human Gene Therapy*. 2009;860(August):845–860.
- 134. Amendola M, Venneri MA, Biffi A, Vigna E, Naldini L. Coordinate dual-gene transgenesis by lentiviral vectors carrying synthetic bidirectional promoters. *Nature biotechnology*. 2005;23(1):108–16.

- 135. Mizuguchi H, Xu Z, Ishii-Watabe A, Uchida E, Hayakawa T. IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2000;1(4):376–82.
- 136. Osti D, Marras E, Ceriani I, Grassini G, Rubino T, Viganò D, et al. Comparative analysis of molecular strategies attenuating positional effects in lentiviral vectors carrying multiple genes. *Journal of virological methods*. 2006;136(1-2):93–101.
- 137. Engels B, Cam H, Schüler T, Indraccolo S, Gladow M, Baum C, et al. Retroviral vectors for high-level transgene expression in T lymphocytes. *Human Gene Therapy*. 2003;14(12):1155–68.
- 138. Engels B, Noessner E, Frankenberger B, Blankenstein T, Schendel DJ, Uckert W. Redirecting human T lymphocytes toward renal cell carcinoma specificity by retroviral transfer of T cell receptor genes. *Human Gene Therapy*. 2005;16(7):799–810.
- 139. Baum C, Hegewisch-Becker S, Eckert HG, Stocking C, Ostertag W. Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance (mdr-1) gene in early hematopoietic cells. *Journal of Virology*. 1995;69(12):7541–7.
- 140. Weber K, Thomaschewski M, Benten D, Fehse B. RGB marking with lentiviral vectors for multicolor clonal cell tracking. *Nature Protocols*. 2012;5(4):839–849.
- 141. Berdien B, Reinhard H, Meyer S, Spöck S, Kröger N, Atanackovic D, et al. Influenza virus-specific TCRtransduced T cells as a model for adoptive immunotherapy. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2013;9(6):1–12.
- 142. Yang S, Rosenberg S a, Morgan R a. Clinical-scale lentiviral vector transduction of PBL for TCR gene therapy and potential for expression in less-differentiated cells. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997).* 2008;31(9):830–9.
- 143. Beard BC, Dickerson D, Beebe K, Gooch C, Fletcher J, Okbinoglu T, et al. Comparison of HIV-derived lentiviral and MLV-based gammaretroviral vector integration sites in primate repopulating cells. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2007;15(7):1356–65.
- 144. Modlich U, Baum C. Preventing and exploiting the oncogenic potential of integrating gene vectors. *Journal of clinical investigation*. 2009;119(4):755–758.
- 145. Baum C, Düllmann J, Li Z, Fehse B, Meyer J, Williams D a, et al. Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood*. 2003;101(6):2099–114.
- 146. Wu X, Li Y, Crise B, Burgess S. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science*. 2003;300(5626):1749–51.
- 147. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(9):3132–42.
- 148. Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K, Bartholomae C, Hubank M, Kempski H, et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(9):3143–50.
- 149. Wu X, Burgess SM. Integration target site selection for retroviruses and transposable elements. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 2004;61(19-20):2588–96.
- 150. Schröder ARW, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell.* 2002;110(4):521–9.
- 151. Park F. Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? *Physiological genomics*. 2007;31(2):159–73.
- 152. Heinrich T, Rengstl B, Muik A, Petkova M, Schmid F, Wistinghausen R, et al. Mature T-cell Lymphomagenesis Induced by Retroviral Insertional Activation of Janus Kinase 1. *Molecular Therapy*. 2013;21(6):1160–8.
- 153. Thomas S, Stauss HJ, Morris EC. Molecular immunology lessons from therapeutic T-cell receptor gene transfer. *Immunology*. 2010;129(2):170–7.
- 154. Kuball J, Dossett ML, Wolfl M, Ho WY, Voss R-H, Fowler C, et al. Facilitating matched pairing and expression of TCR chains introduced into human T cells. *Blood.* 2007;109(6):2331–8.
- 155. Thomas S, Xue S, Cesco-gaspere M, José ES, Hart DP, Wong V, et al. Targeting the Wilms Tumor Antigen 1 by TCR Gene Transfer: TCR Variants Improve Tetramer Binding but Not the Function of Gene Modified Human T Cells. *Journal Of Immunology*. 2012;179(9):5803–5810.
- 156. Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*. 2004;22(7):346–353.

- 157. Scholten KBJ, Kramer D, Kueter EWM, Graf M, Schoedl T, Meijer CJLM, et al. Codon modification of T cell receptors allows enhanced functional expression in transgenic human T cells. *Clinical immunology* (*Orlando, Fla.*). 2006;119(2):135–45.
- 158. Cohen CJ, Zhao Y, Zheng Z, Rosenberg SA, Morgan RA. Enhanced Antitumor Activity of Murine-Human Hybrid T-Cell Receptor (TCR) in Human Lymphocytes Is Associated with Improved Pairing and TCR/CD3 Stability. *Cancer Research*. 2006;66(17):8878–8886.
- 159. Bialer G, Horovitz-Fried M, Ya'acobi S, Morgan R a, Cohen CJ. Selected murine residues endow human TCR with enhanced tumor recognition. *Journal of Immunology*. 2010;184(11):6232–41.
- 160. Heemskerk MHM, Hagedoorn RS, van der Hoorn MAWG, van der Veken LT, Hoogeboom M, Kester MGD, et al. Efficiency of T-cell receptor expression in dual-specific T cells is controlled by the intrinsic qualities of the TCR chains within the TCR-CD3 complex. *Blood*. 2007;109(1):235–43.
- 161. Sommermeyer D, Uckert W. Minimal amino acid exchange in human TCR constant regions fosters improved function of TCR gene-modified T cells. *Journal of Immunology*. 2010;184(11):6223–31.
- 162. Van der Veken LT, Hagedoorn RS, van Loenen MM, Willemze R, Falkenburg JHF, Heemskerk MHM. $\alpha \beta$ T-cell receptor engineered $\gamma \delta$ T cells mediate effective antileukemic reactivity. *Cancer research*. 2006;66(6):3331–7.
- 163. Veken LT Van Der, Coccoris M, Swart E, Falkenburg F, Schumacher TN, Mirjam HM, et al. Functional Effector Cells without Mixed TCR Dimers In Vivo 1. *The Journal of Immunology*. 2013;182(1):164–170.
- 164. Li Y, Moysey R, Molloy PE, Vuidepot A-L, Mahon T, Baston E, et al. Directed evolution of human T-cell receptors with picomolar affinities by phage display. *Nature biotechnology*. 2005;23(3):349–54.
- 165. Dunn SM, Rizkallah PJ, Baston E, Mahon T, Cameron B, Moysey R, et al. Directed evolution of human T cell receptor CDR2 residues by phage display dramatically enhances affinity for cognate peptide-MHC without increasing apparent cross-reactivity. *Protein Science: A publication of protein society.* 2006;15(4):710–721.
- 166. Kuball J, Hauptrock B, Malina V, Antunes E, Voss R-H, Wolfl M, et al. Increasing functional avidity of TCR-redirected T cells by removing defined N-glycosylation sites in the TCR constant domain. *The Journal of experimental medicine*. 2009;206(2):463–75.
- 167. Rossig C, Bollard C, Nuchtern J, Rooney C, Brenner M. Epstein-Barr virus-specific human T lymphocytes expressing antitumor chimeric T-cell receptors: potential for improved immunotherapy. *Blood.* 2002;99(6):2009–2016.
- 168. Van Loenen MM, Hagedoorn RS, Kester MGD, Hoogeboom M, Willemze R, Falkenburg JHF, et al. Kinetic preservation of dual specificity of coprogrammed minor histocompatibility antigen-reactive virusspecific T cells. *Cancer research*. 2009;69(5):2034–41.
- 169. Murphy A, Westwood J, Brown L, Teng M, Moeller M, Xu Y, et al. Antitumor activity of dual-specific T cells and influenza virus. *Cancer gene therapy*. 2007;14(5):499–508.
- 170. Provasi E, Genovese P, Lombardo A, Magnani Z, Liu P-Q, Reik A, et al. Editing T cell specificity towards leukemia by zinc finger nucleases and lentiviral gene transfer. *Nature medicine*. 2012;18(5):807–15.
- 171. Torikai H, Reik A, Liu P-Q, Zhou Y, Zhang L, Maiti S, et al. A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR. *Blood*. 2012;119(24):5697–705.
- 172. Cell P, Line U, Shimokawa T, Okumura K, Ra C. DNA induces apoptosis in electroporated human promonocytic cell line U937. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;270(1):94–99.
- 173. Zhao Y, Zheng Z, Cohen CJ, Gattinoni L, Palmer DC, Restifo NP, et al. High-efficiency transfection of primary human and mouse T lymphocytes using RNA electroporation. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2006;13(1):151–9.
- 174. Ebert O, Finke S, Salahi a, Herrmann M, Trojaneck B, Lefterova P, et al. Lymphocyte apoptosis: induction by gene transfer techniques. *Gene therapy*. 1997;4(4):296–302.
- 175. Bell M, Huntoon C, Graham D, McKean D. The analysis of costimulatory receptor signaling cascades in normal T lymphocytes using in vitro gene transfer and reporter gene analysis. *Nature medicine*. 2001;7(10):1155–8.
- 176. Zhao H, Hemmi H, Akira S, Cheng SH, Scheule RK, Yew NS. Contribution of Toll-like Receptor 9 Signaling to the Acute Inflammatory Response to Nonviral Vectors. *Molecular Therapy*. 2004;9(2):241–248.
- 177. Morgan WF, Day JP. The Introduction of Proteins into Mammalian Cells by Electroporation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.).* 1995;48:63–71.

- 178. Gehl J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta physiologica Scandinavica*. 2003;177(4):437–47.
- 179. Wang Z, Troilo PJ, Wang X, Griffiths TG, Pacchione SJ, Barnum a B, et al. Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene therapy*. 2004;11(8):711–21.
- Van Driessche A, Ponsaerts P, Van Bockstaele DR, Van Tendeloo VFI, Berneman ZN. Messenger RNA electroporation: an efficient tool in immunotherapy and stem cell research. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society.* 2005;43(4):213–6.
- 181. Cannon JR, Sew T, Montero L, Burton EA, Greenamyre T. Pseudotype-dependent lentiviral transduction of astrocytes or neurons in the rat substantia nigra. *Experimental neurology*. 2012;228(1):41–52.
- 182. Pfeifer C, Himmel A, Geiger J, Aneja M, Rudolph C. Efficient, specific and targeted delivery of genes to the lung. *Therapeutic delivery*. 2010;1(1):133–48.
- 183. Chen Z-L, Wu B-C, Liu H, Liu X-M, Huang P-T. Temperature shift as a process optimization step for the production of pro-urokinase by a recombinant Chinese hamster ovary cell line in high-density perfusion culture. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2004;97(4):239–43.
- 184. Sunley K, Tharmalingam T, Butler M. CHO Cells Adapted to Hypothermic Growth Produce High Yields of Recombinant b-Interferon. *Biotechnology progress*. 2008;24(4):898–906.
- 185. Doyon Y, Choi VM, Xia DF, Vo TD, Gregory PD, Holmes MC. Transient cold shock enhances zinc-finger nuclease-mediated gene disruption. *Nature Publishing Group*. 2010;7(6):459–460.
- 186. Rao P, Engelberg J. Hela cells: effects of temperature on the life cycle. Science. 1965;148(3673):1092-4.
- 187. Webb S. Genome editing goes global. *BioTechniques*. 2011;51(6):371–3.
- 188. Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna J a. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*. 2012;482(7385):331–8.
- 189. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna J a, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.).* 2012;337(6096):816–21.
- 190. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*. 2013;339(6121):819–23.
- 191. Feng Z, Zhang B, Ding W, Liu X, Yang D-L, Wei P, et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell research*. 2013;1–4.
- 192. Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology*. 2013;31(3):227–9.
- 193. DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, Rios X, Aach J, Church GM. Genome engineering in Saccharomyces cerevisiae using CRISPR-Cas systems. *Nucleic acids research*. 2013;41(7):4336–43.
- 194. Hsu PD, Scott D a, Weinstein J a, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature biotechnology*. 2013;(July):1–8.
- 195. Fu Y, Foden J a, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*. 2013;
- 196. Okamoto S, Mineno J, Ikeda H, Fujiwara H, Yasukawa M, Shiku H, et al. Improved expression and reactivity of transduced tumor-specific TCRs in human lymphocytes by specific silencing of endogenous TCR. *Cancer research*. 2009;69(23):9003–11.
- 197. Mittal V. Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nature reviews. Genetics.* 2004;5(5):355–65.

7. ANHANG

7.1. Kodonoptimierte muFlu-Sequenz

Dargestellt ist die kodonoptimierte und murinisierte Sequenz des influenzaspezifischen TCR muFlu (5' \rightarrow 3'):

GCGATCGCGAATTCGCCACCATGAGCAACCAGGTGCTGTGCTGCGGGGTGCTGTGTCTGCTGGGCGCCAAT ACCGTGGATGGCGGCATCACCCAGAGCCCCAAGTACCTGTTCCGGAAAGAGGGCCAGAACGTGACCCTGA GATCTACTACAGCCAGATCGTGAACGACTTCCAGAAGGGCGACATTGCCGAGGGCTACAGCGTGTCCAGAG AGAAGAAAGAGTCCTTCCCACTGACCGTGACCAGCGCCCCAGAAGAACCCCCACCGCCTTCTACCTGTGCGCC AGCAGCATCAGAAGCAGCTACGAGCAGTACTTCGGCCCTGGCACCCGGCTGACAGTGACCGAGGACCTGA GAAATGTGACCCCCCCAAGGTGTCCCTGTTCGAGCCTAGCAAGGCCGAGATCGCCAACAAGCAGAAAGCC ACCCTCGTGTGCCTGGCCAGAGGCTTCTTCCCCGACCACGTGGAACTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGA GGTGCACAGCGGCGTGTCCACCGATCCCCAGGCCTACAAAGAGAGCAACTACAGCTACTGCCTGAGCAGCA GACTGCGGGTGTCCGCCACCTTCTGGCACAACCCCCGGAACCACTTCAGATGCCAGGTGCAGTTTCACGGC CTGAGCGAAGAGGACAAGTGGCCCGAGGGCAGCCCTAAGCCCGTGACCCAGAATATCTCTGCCGAAGCCT GGGGCAGAGCCGACTGTGGCATTACCAGCGCCAGCTACCATCAGGGCGTGCTGAGCGCCACCATCCTGTA CGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCTGGCCTGGTGCTGATGGCCATGGTCA AGAAGAAGAACAGCGGCGGCGGCGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAACAGGCCGGCGACGTGGAAGAGAA CCCTGGCCCTATGGAAACCCTGCTGGGAGTGTCCCTCGTGATCCTGTGGCTGCAGCTGGGCTAGAGTGAACA GCCAGCAGGGCGAGGAAGATCCTCAGGCCCTGAGCATCCAGGAAGGCGAGAACGCCACAATGAACTGCAG CTACAAGACCAGCATCAACAACCTGCAGTGGTACAGGCAGAACTCCGGCAGAGGACTGGTGCACCTGATCC TGATCCGGTCCAACGAGAGAGAGAAGCACAGCGGACGCCTGAGAGTGACCCTGGACACCTCCAAGAAGTCC AGCTCCCTGCTGATCACCGCCAGCAGAGCCGCCGATACCGCCTCCTACTTCTGTGCCACAGATGGCGGCGG AGGCAGCCAGGGCAATCTGATCTTTGGCAAGGGCACCAAGCTGAGCGTGAAGCCCAACATCCAGAACCCCG AGCCCGCCGTGTACCAGCTGAAGGACCCTAGAAGCCAGGACAGCACCCTGTGCCTGTTCACCGACTTCGAC TCCCAGATCAACGTGCCCAAGACCATGGAAAGCGGCACCTTCATCACCGACAAGACCGTGCTGGACATGAA GGCCATGGACAGCAAGAGCAACGGCGCCATTGCCTGGTCCAACCAGACCAGCTTCACATGCCAGGACATCT TCAAAGAGACAAACGCCACCTACCCCAGCAGCGACGTGCCCTGTGATGCCACCCTGACCGAGAAGTCCTTC GAGACAGACATGAACCTGAATTTCCAGAACCTGTCCGTGATGGGCCTGAGAATCCTGCTGCTGAAGGTGGC CGGCTTCAATCTGCTGATGACACTGCGGCTGTGGTCCAGCTGAGCGGCCGC

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

B. Berdien

Hamburg, August 2013

Belinda Berdien