

**Untersuchung der Expression des
CD44-Glykoproteins bei
gynäkologischen Tumoren und
Entwicklung eines
Gentherapieansatzes mit
rekombinanten zytotoxischen T-Zellen
(rCTL)**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

vorgelegt
von
Bettina Durst
aus Wuppertal

Düsseldorf, 2000

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Gynäkologische Karzinome, Risikofaktoren und Karzinogenese	1
1.2 CD44-Glykoproteine	2
1.2.1 Liganden der CD44-Proteine	4
1.2.2 Funktionen der CD44-Protein	5
1.2.3 CD44-Expression in Tumoren und korrespondierenden Normalgeweben	7
1.2.4 Expressionsregulation des CD44-Gens	9
1.3 Spezifische zytotoxische T-Lymphozyten in der Gentherapie	9
1.3.1 Alternative Strategien für die Therapie von Tumoren	9
1.3.2 Tumorimmunogenität und „Immune-escape“-Mechanismus	11
1.3.3 Antigenpräsentation durch den MHC-Komplex	12
1.3.4 Antigenerkennung und Signaltransduktion durch den TCR/CD3-Komplex	13
1.3.5 Kostimulatorische Signale bei der T-Zellaktivierung	14
1.3.6 Mechanismen der Zytolyse	16
1.3.6.1 Exozytose zytolytischer Vesikel und Wirkung von Perforin und Granzymen	16
1.3.6.2 Fas/FasL-induzierte Apoptose	17
1.3.7 Die minimale antigenerkennende Einheit	18
1.3.8 Aufgabenstellung	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Zellkultur	20
2.1.2 Enzyme	21
2.2 Methoden	21
2.2.1 Zellkultur, Zellkulturexperimente und Isolierung primärer T-Zellen	21
2.2.1.1 Zelllinien und Kulturbedingungen	21
2.2.1.2 Stimulationsexperimente	23
2.2.1.3 Zellproliferationstest (MTT)	23
2.2.1.4 Isolierung von primären T-Zellen aus Mausmilzen	24
2.2.1.5 Rosettingtest	24
2.2.1.6 Zytotoxizitätstest	24
2.2.2 RNA und DNA-Analytik	25
2.2.2.1 RNA-Extraktion aus Zelllinien	25
2.2.2.2 RNA-Extraktion aus Gewebe	26
2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurenlösungen	26
2.2.2.4 cDNA-Synthese	26
2.2.2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
2.2.2.6 Analyse der PCR-Produkte mittels automatischen DNA-Sequenzer (A.L.F.)	28
2.2.2.7 Analyse von DNA in der Agarose-Gelelektrophorese	29
2.2.2.8 Alkalischer Southern-Blot	29
2.2.2.9 Hybridisierung	29

2.2.3 Vektorklonierung	31
2.2.3.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	31
2.2.3.2 Dephosphorylierung von Vektoren	31
2.2.3.3 Elution von DNA-Proben aus Agarosegel	31
2.2.3.4 Ligation von DNA	32
2.2.3.5 Präparation kompetenter Zellen	32
2.2.3.6 Elektroporation	32
2.2.3.7 Isolierung von Plasmid DNA („Mini-Präp“)	32
2.2.3.8 Aufreinigung von Plasmid-DNA durch Säulen	33
2.2.4 Retrovirale Arbeiten und Transfektion von Säugerzellen	33
2.2.4.1 Elektroporation von Säugerzellen	33
2.2.4.2 Transfektion der Verpackungszellen durch FuGENE™-Transfection-Reagenz	33
2.2.4.3 Isolation von Klonen durch Trypsin-Agarose-Technik	34
2.2.4.4 Virusproduktion und Ernte	
2.2.4.5 Retrovirale Titerbestimmung mit NIH/3T3 Fibroblasten	34
2.2.4.6 Infektion der T-Zellen mit retroviralem Überstand	34
2.2.4.7 Retrovirale Infektion der T-Zellen durch Kokultivierung mit Ω E-Verpackungszellen	35
2.2.4.8 Isolierung von T-Zellklonen durch Verdünnen	35
2.2.5 Protein-Analytik	35
2.2.5.1 Immunhistochemische Untersuchungen	35
2.2.5.2 Durchflusszytometrische Messung der Oberflächenantigene	36
2.2.6 Adoptive Immunisierung von Nacktmäusen mit den gentechnologisch modifizierten T-Zellen	37
3. Ergebnisse	38
3.1 Untersuchung der CD44-Expression in gynäkologischen Tumoren	38
3.1.1 CD44-Expression in Endometriumkarzinomen und endometrialen Normalgeweben	38
3.1.1.1 IHC-Analyse der CD44-Expression im Endometrium und Endometriumkarzinom	39
3.1.1.2 Southern-Blot-Analyse der endometrialen Normalgewebe und der Karzinome	40
3.1.2 CD44-Expression in gynäkologischen Karzinomzelllinien	43
3.1.3 CD44-Spleißmuster in Endometrium- und Brustkrebszelllinien	45
3.1.4 Quantitative Bestimmung der CD44-Expression in verschiedenen Zelllinien	46
3.1.5 Abhängigkeit der CD44-Expression von verschiedenen Kulturbedingungen und 17β -Estradiol	47
3.1.6 Abhängigkeit der CD44-Expression von verschiedenen Konfluenzdichten der Zellen	48
3.1.7 CD44-Spleißmuster in Endometriumkarzinom-Zelllinien in Abhängigkeit von Hormonen, Hormonantagonisten und Cytokinen	49
3.1.7.1 CD44-Expression der RL95-2-	

Endometriumkarzinom-Zelllinie	49
3.1.7.2 CD44-Expression der Endometriumkarzinom-Zelllinie HEC-1-A, KLE und An3 CA	53
3.2 Gentechnologische Modifikation von T-Zellen gegen CD44v7/8- und CD44v6-exprimierenden Tumorzellen	55
3.2.1 Klonierung des Fusionsgens kodierend für den chimären scFv(VFF17): α : ζ - und scFv(VFF18): α : ζ -Rezeptor	55
3.2.2 Insertion der cDNA des c-myc-Epitops in das cDNA-Konstrukt des chimären Rezeptors	56
3.2.3 Retroviraler Gentransfer des scFv(VFF17): y : a : ζ -Fusionsgens in die Verpackungszelllinien	60
3.2.4 Transduktion zytotoxischer T-Zellen mit dem chimären Rezeptorgen	61
3.2.4.1 Stimulation der T-Zell-Proliferation für die Optimierung der retroviralen Transduktion	62
3.2.4.2 Transduktion des scFv(VFF17): y : a : z -Fusionsgens in die CI96-T-Zellen und Oberflächenexpression des chimären Rezeptors	63
3.2.4.3 Retroviraler Gentransfer des scFv(VFF18): y : a : z -Fusionsgens	66
3.2.5 Antigenspezifität der gentechnologisch modifizierten CTL-Zelllinie	68
3.2.5.1 Bindung von CI96VFF17cyYZ-Zellen an CD44v7/8-positive Zielzellen	68
3.2.5.2 <i>In vitro</i> Zytotoxizität der CI96VFF17cyYZ-Zellen	69
3.2.5.3 Therapie Tumor-tragender Nacktmäuse durch adoptive Immunisierung mit Hilfe von CI96(VFF17)cyYZ-Zellen	73
3.2.6 Isolierung von primären T-Zellen aus Mausmilzen und retrovirale Transduktion des scFv(VFF17): y : α : ζ -Fusionsgens in primäre T-Zellen	74
3.2.7 Zytotoxizität der transfizierten primären T-Zellen	76
4. Diskussion	77
4.1 CD44-Expression im Endometriumkarzinom und im Normalgewebe	77
4.2 Beeinflussung der CD44-Expression durch Hormone und Hormonantagonisten	79
4.3 Tumorthherapie mit rekombinanten T-Zellen	81
4.4 Chimäre Rezeptoren und rekombinante T-Zellen	83
4.5 In vivo Reaktivität von rekombinanten T-Zellen	86
5.6 Die Infektion von primären T-Zellen	88
5. Zusammenfassung	90
6. Literatur	91
7. Anhang	104
7.1 Abkürzungsverzeichnis	104
7.2 Danksagung	107
7.3. Erklärung	108

Einleitung

1.1 Gynäkologische Karzinome, Risikofaktoren und Karzinogenese

Krebserkrankungen stellen nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die Haupttodesursache der Bevölkerung der westlichen Welt dar. Bei Frauen sind die gynäkologischen Tumore die häufigsten bösartigen Erkrankungen und derzeit erkranken nach Angaben des Statistischen Bundesamtes in Deutschland jährlich ca. 42000 Frauen an Brustkrebs (Mammakarzinom), ca. 10500 an Gebärmutterschleimhautkrebs (Endometriumkarzinom) und etwa 7700 an Eierstockkrebs (Ovarialkarzinom).

Für die unterschiedlichen gynäkologischen Karzinome sind verschiedene Risikofaktoren bekannt. So wird das Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken durch Rauchen, fehlende körperliche Aktivität, frühe Menarche/späte Menopause und familiäre Prädisposition erhöht. Eine singuläre Östrogen-Substitution im Rahmen einer Hormonersatztherapie, die für eine Risikoreduktion von postmenopausalen Erkrankungen eingesetzt wird, hingegen erhöht das Risiko an einem Endometriumkarzinom zu erkranken. Ebenso führt eine Behandlung mit Tamoxifen, einem Östrogen-Antagonisten, welcher bei der Hormontherapie von Brustkrebs eingesetzt wird, zu einer Risikoerhöhung für die Entstehung eines Endometriumkarzinoms (Rabe et al., 1999, Grady et al., 1995, ACOG Committee Opinion, 1996).

Die Entwicklung einer gesunden Zelle über eine zunächst lokal wachsende Tumorzelle und später zur metastasierenden Tumorzelle ist die phänotypische Konsequenz der sukzessiven Anhäufung von genetischen Defekten (Cho und Vogelstein, 1992) und bildet die Grundlage für das Mehrschritt-Modell der Karzinogenese. Die genetischen Veränderungen von Proto-Onkogenen (z.B. *c-myc*, *ras*) oder von Tumorsuppressorgenen (*BRCA1/2*, *p53*) fördern die Zellproliferation und führen zum Verlust der Zellzykluskontrolle. Auch defekte autokrin oder parakrine gesteuerte Signalketten können ein ungehemmtes Zellwachstum auslösen. Beim Endometriumkarzinomen treten z.B. Mutationen des *k-ras*-Proto-Onkogens, des Tumorsuppressorgens *p53*, sowie der DNA-Reparaturgene (*MSH*, *MLH1*), Überexpression/Amplifikation des *c-myc*-Proto-Onkogens, aberrante Estrogen- und Progesteronrezeptoren bzw. Rezeptorverlust auf (Dallenbach-Hellwig, 1985, Berchuck und Boyd, 1995).

Das ungehemmte Wachstum der Tumorzelle sowie die Fähigkeit der Metastasenbildung ist nicht nur durch die Immortalisierung der Tumorzelle begründet. Für die Metastasierung von Tumorzellen ist es nötig, dass sich einzelne Tumorzellen aus dem Tumor herauslösen und die Basalmembran durchdringen. Für diesen Prozess ist die Aktivierung von Matrix-Proteasen (z. B. Matrix-Metalloproteinasen reguliert durch uPA, PAI 1/2 und TIMP 1/2) und die Veränderung der zellulären Adhäsionseigenschaften, die durch z.B. E-Cadherin, Integrine und Hyaluronatrezeptoren (CD44 und RHAMM) vermittelt werden, erforderlich (Sherman et al., 1996, Reuning et al., 1998, Fieber et al., 1999). Proteine, die an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert sind (z.B. Ezrin, Radixin, Moesin) und mit Zytoskelettproteinen interagieren, vermitteln die Zellbewegung und die Ausbildung von Pseudopodien (Sherman et al., 1996). Nach Durchdringung der endothelialen Basalmembran der Blut- und Lymphgefäße werden die Tumorzellen durch den Flüssigkeitsstrom im Körper verteilt. Das Eindringen in neue Gewebe erfolgt durch Proteasen und Adhäsionsmoleküle, die die Verankerung der Tumorzelle erlauben. Die Ausbildung größerer Metastasen

macht die Versorgung durch das Blutgefäßsystem erforderlich. Die Sekretion von Angiogenesefaktoren (z.B. VEGF) durch die Tumorzellen regt die Ausbildung neuer Blutgefäße an (Fidler et al., 1990, Blood und Zetter, 1990).

Das Wissen um die intra- und extrazellulären tumorbiologischen Abläufe ermöglicht die Nutzung bestimmter Faktoren (z.B. ER-Bestimmung) zur exakten Prognose oder auch individualisierten Therapie (z.B. Antiöstrogen-Behandlung). Der Stellenwert des CD44-Hyaluronsäure-Rezeptor ist bei verschiedenen gynäkologischen Karzinomen noch unklar und ist daher Ausgangspunkt verschiedener Analysen. Die Charakterisierung der CD44-Oberflächenexpression auf Tumorzellen ermöglicht die Erarbeitung eines Gentherapieansatzes mit rekombinanten zytotoxischen T-Zellen.

1.2 CD44-Glykoproteine

CD44 repräsentiert eine Familie von Glykoproteinen, die an der Zelloberfläche exprimiert werden. CD44-Proteine wurden zuerst als Gehirn-Granulozyten-T-Lymphozyten Antigen beschrieben (Dalchau et al., 1980) und mit Bezeichnungen wie Pgp-1 (für phagocytic glycoprotein-1), Ly-24, ECM-III (für extracellular matrix receptor type III) p80, p85, H-CAM (für homing cell adhesion molecule) oder Hermes- und HUTCH-1 Antigen benannt, bevor durch strukturelle Homologien, Kreuzreaktionen von Antikörpern und Sequenzierung gezeigt wurde, dass es sich um Mitglieder der selben Proteinfamilie handelte (Naor et al., 1997).

Die genomische Organisation der CD44-Proteine wurde durch Screatton und Mitarbeiter (1992, 1993) beschrieben. Sie werden von einem Gen kodiert, dass beim Menschen auf Chromosom 11p13 liegt. Es umfasst mehr als 50 kb und setzt sich aus 20 Exons zusammen. Die kleinste CD44-Isoform wird als CD44-Standardform (CD44s) bezeichnet und wird von 9 Exons kodiert, den Exons 1-5, 16-18, 19 oder 20. Alle dazwischen liegenden Exons können durch alternatives Spleißen eliminiert werden.

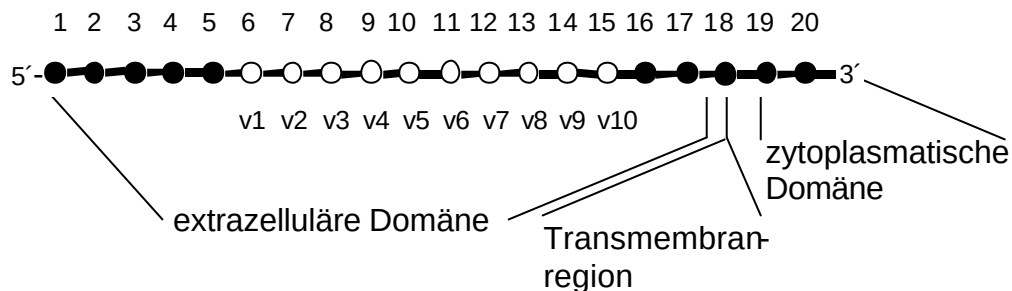


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der CD44-Exonstruktur

CD44-Proteine setzen sich aus einem extrazellulären Bereich, einer Transmembranregion und einer intrazellulären Domäne zusammen.

Der extrazelluläre Bereich des Proteins wird von den Exons 1-5, 16 und 17 im CD44-Standardprotein und bei den varianten CD44-Isoformen noch durch zusätzliche Exons (6-15) kodiert, die auch mit v1-v10 bezeichnet werden. Diese varianten Exons kodieren die variablen Domänen der CD44-Proteine. Sie können in den unterschiedlichsten Kombinationen auftreten, so dass eine Vielzahl an varianten CD44-Isoformen (CD44v1-v10) existiert (Brown et al., 1991, Dougherty et al., 1991, Cooper et al., 1992, He et al., 1992, Jackson et al., 1992, Screatton et al., 1992). Das Exon v1 enthält beim Menschen ein Stopcodon. Es entsteht durch eine Transition (G nach A) an Position 55, so dass keine Isoformen, die das variante Exon 1 enthalten, generiert werden (Screatton et al., 1993). Dadurch sind

zwei unterschiedliche Exon-Nummerierungen, die 19 oder 20 Exons zugrunde legen, entstanden.

Das Exon 18 kodiert die Transmembranregion und den kurzen Arm der zytoplasmatischen Domäne, die aus 3 Aminosäuren besteht. Der kurze zytoplasmatische Teil resultiert durch Expression des Exons 19, in dessen Sequenz eine A-T reiche Region vermutlich zu einer mRNA-Instabilität führt. Häufiger kommt es jedoch zur Expression des Exons 20, so dass ein längerer, 70 Aminosäuren umfassender, zytoplasmatischer Teil generiert wird.

CD44-Standardproteine werden ubiquitär exprimiert (Flanagan et al., 1989, Lesley et al., 1993), während variante CD44-Isoformen im Normalgewebe wesentlich seltener vertreten sind. Sie werden z.B. als epitheliale Form (CD44v8-10) in Epithelien (Mackay et al., 1994) und als Maximalvariante (CD44v3-v10) in Keratinozyten (Hofmann et al., 1991) nachgewiesen.

Im Serum treten mit Konzentrationen von 0,5 µg/ml beim Menschen (Dachau et al., 1980, Lesley et al., 1993) und 2 µg/ml bei der Maus (Katoh et al., 1994) weitere, lösliche Formen der CD44-Moleküle auf. Bei autoimmun erkrankten Mäusen und bei Tumor-tragenden Mäusen kann die Serumkonzentration von löslichen CD44-Proteinen bis zu 10 µg/ml ansteigen. Sie entstehen vermutlich durch enzymatische Spaltung des CD44-Proteins. So kodiert Exon v10 ein Arginin-Dipeptid, dass ein Motiv für trypsin-ähnliche Proteasen darstellt (Dougherty et al., 1991, Screaton et al., 1993). Dem löslichen CD44 fehlt demzufolge der zytoplasmatische Anteil.

Die Variabilität dieser Familie beruht weiterhin auf zahlreichen posttranslationalen Modifikationen. So können im humanen CD44-Standardprotein sechs potentielle N-gebundene Carbohydratbindungen und sieben potentielle O-gebundene Carbohydratbindungen durch Glykosylierung geknüpft werden (Goldstein et al., 1989). Außerdem treten vier Serin-Glycin-Motive in der extrazellulären Domäne auf, die durch die Glykosaminoglykane, Heparansulfate oder Chondroitinsulfate modifiziert werden können. Insertion von Domänen, die von den varianten Exons kodiert werden, können zu vier zusätzlichen potentiellen N-Glykosylierungen und zahlreichen potentiellen O-Glykosylierungen führen. Außerdem wird ein weiteres Serin-Glycin-Motiv für eine potentielle Glykosaminoglykanaddition eingeführt (Screaton et al., 1993, Bennett et al., 1995a).

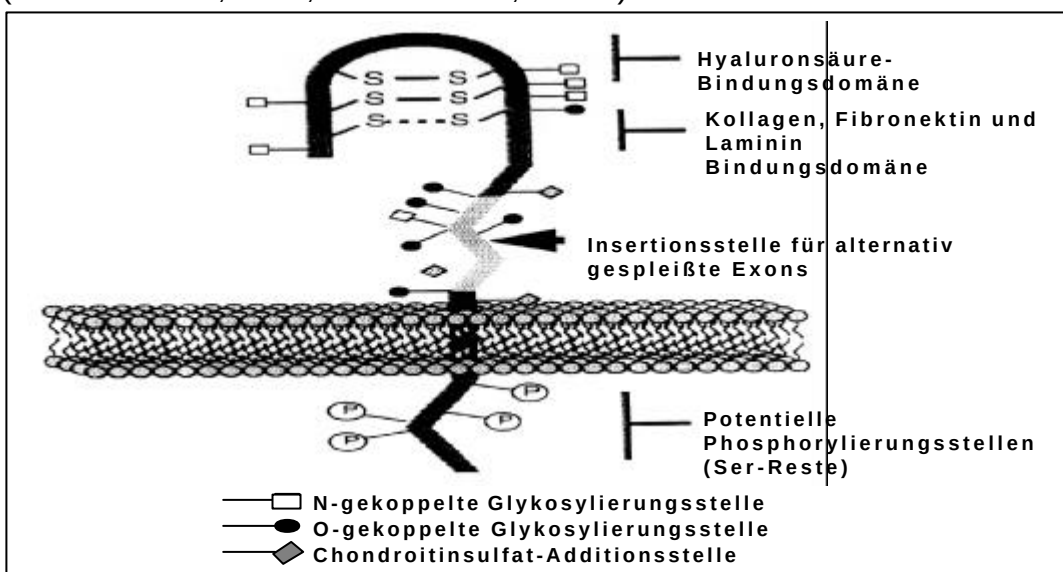


Abb.1.2: Schematische Darstellung eines CD44v-Moleküls (nach Sherman et al., 1994) mit integrierten varianten Exons und möglichen posttranslationalen Modifikationen

Der zytoplasmatische Teil wird durch Proteinkinase C-vermittelte Phosphorylierung (Kalomiris und Bourguignon, 1989, Bourguignon et al., 1992), Palmitoylierung und GTP-Bindung (Lokeshwar und Bourguignon, 1992, Galluzzo et al., 1995) modifiziert.

Diese posttranslationalen Modifikationen führen zu den unterschiedlichsten Molekulargewichten der CD44-Proteine. Das CD44-Standardprotein besitzt ein errechnetes Molekulargewicht von 37 kDa (Goldstein et al., 1989, Zhou et al., 1989, Screaton et al., 1993), zeigt im SDS-Gel aber durch N- und O-Glykosylierungen sowie Phosphorylierung Molekulargewichte von 85-95 kDa (Zhou et al., 1989). Durch Glykosaminoglykanaddition (Heparansulfat oder Chondroitinsulfat) kann das Molekulargewicht auf 180-220 kDa ansteigen (Tanaka et al., 1993, Stamenkovic et al., 1989, 1991). Diese posttranslationalen Modifikationen führen nicht nur zu unterschiedlichen Molekulargewichten der CD44-Proteine, sondern beeinflussen auch ihre Liganden-Spezifität und Eigenschaften.

1.2.1 Liganden der CD44-Proteine

Sequenz-Homologien zu Hyaluronsäure-Rezeptoren sowie die spezifische Bindung löslicher und an Platten gebundener Hyaluronsäure (HA) zeigen, dass es sich bei den CD44-Proteinen um Hyaluronsäure-Rezeptoren handelt (Goldstein et al., 1989, Stamenkovic et al., 1989). Hyaluronsäure setzt sich aus wiederholenden Disaccharideinheiten (D-Glukuronsäure [1- β -3], N-Acetyl-D-Glukosamin [1- β -4]) zusammen. Hyaluronsäure ist eine Hauptkomponente der extrazellulären Matrix und oft mit verschiedenen Proteinen verbunden. Sie bildet ein komplexes Netzwerk und ist verantwortlich für die Erhaltung des intrazellulären Spaltes (Toole, 1990). Hyaluronsäure wird von Fibroblasten (Teder et al., 1995), Chondrozyten (Mason et al., 1989) und mesothelialen Zellen (Honda et al., 1991) synthetisiert. Bei der Regulation der Zell-Zell-Adhäsion und räumlichen Orientierung, Migration, Wachstum und Differenzierung von Zellen spielt Hyaluronsäure eine wichtige Rolle (Laurent und Faser, 1992). Außerdem besitzt sie Funktionen bei der Wundheilung, bei Endzündungen, bei der Gewebeerneuerung und Morphogenese (West et al., 1985, Weigel et al., 1989, Laurent und Faser, 1992) und unterstützt die Migration von invasiven Tumoren (Toole et al., 1979). Einige Tumore synthetisieren HA und setzen sie frei (Turley und Tretiak, 1985), während andere die HA-Produktion der umliegenden Fibroblasten stimulieren (Knudson et al., 1984).

Die extrazelluläre Domäne der CD44-Proteine bindet jedoch noch weitere Komponenten der extrazellulären Matrix wie Kollagen Typ I und IV (Carter und Wayner, 1988, Lokeshwar und Bourguignon, 1991, Jalkanen und Jalkanen, 1992, Bartolazzi et al., 1994), Fibronectin (Jalkanen und Jalkanen, 1992, Bartolazzi et al., 1994), Laminin (Jalkanen und Jalkanen, 1992), Serglycin (Toyama-Sorimachi und Miyasaka, 1994) und Chondroitinsulfate (Aruffo et al., 1990, Sy et al., 1991, Peach et al., 1993). Die intrazelluläre CD44-Domäne interagiert weiterhin mit Komponenten des Cytoskeletts wie Aktin, Ankyrin oder Mitgliedern der Ezrin-Radixin-Moesin-(ERM)-Familie (Lacy und Underhill, 1987, Kalomiris und Bourguignon, 1989, Bourguignon et al., 1991, 1992, 1993, Lokeshwar und Bourguignon, 1991, 1992, Lokeshwar et al., 1994, Tsukrita et al., 1994). Die Proteine der ERM-Familie gehören zur Gruppe der Aktin-bindenden-Proteine und es ist möglich, dass einige dieser Proteine CD44-Moleküle mit dem Signaltransduktionsweg verbinden (Sherman et al., 1996).

1.2.2 Funktionen der CD44-Proteine

Entsprechend der zahlreichen Liganden besitzen CD44-Proteine die unterschiedlichsten Funktionen. Es zeigte sich, dass CD44-Proteine als „Lymphozyten-homing-Rezeptor“ agieren, da sie neben verschiedenen anderen Molekülen, wie L-Selektin, diverse Integrine oder CD31, die Adhäsion von Lymphozyten an spezialisierten Endothelzellen in den HEV (high endothelial venules) vermitteln und den Übertritt der Lymphozyten aus dem Blutgefäßsystem in sekundäre lymphoide Gewebe erlauben (Camp et al., 1993, Jalkanen et al., 1987, Pals et al., 1989). Sie spielen weiterhin eine Rolle bei dem „homing“ von Vorläuferzellen und der Lymphopoese (Miyake et al., 1990, Kincade et al., 1993), sowie bei der Aktivierung von Lymphozyten (Arch et al., 1992, Galandini et al., 1993, 1994 a,b). Eine Stimulation von Makrophagen mit CD44-spezifischen Antikörpern kann zu einer Zytokinausschüttung von TNF, IL-1 und MCSF führen (Webb et al., 1990, Gruber et al., 1992).

Sie sind außerdem in Prozesse wie die Zelladhäsion und Migration (Thomas et al., 1992, Lazaar et al., 1994), der Bindung an die extrazelluläre Matrix (Jalkanen und Jalkanen, 1992, Sherman et al., 1994), sowie an entwicklungsbiologischen Vorgängen und Differenzierungen (Sretanvan et al., 1994, Sherman et al., 1996) beteiligt.

CD44-Proteine können außerdem chemotaktische Faktoren oder Wachstumsfaktoren (Tanaka et al., 1993, Bennett et al., 1995) präsentieren. So können z.B. CD44-Isoformen, die das variante Exon 3 enthalten, Heparansulfat binden über welches sie wiederum den bFGF-(basic-fibroblast growth)-Faktor und den HB-EG-(heparin-binding epidermal growth)-Faktor binden.

Der CD44-Rezeptor ist auch am intrazellulären Abbau von Hyaluronsäure beteiligt. Durch Anti-CD44mAb können sowohl die Oberflächenadhäsion, die Endocytose als auch der Abbau der Hyaluronsäure gehemmt werden (Hua et al., 1993, Culty et al., 1992, 1994).

Die Tumorbilogie begann sich für CD44-Proteine zu interessieren, als man einen kausalen Zusammenhang zwischen der Expression bestimmter varianter CD44-Isoformen und den metastatischen Eigenschaften von Pankreas-Adenokarzinomzellen fand. Matzku und Mitarbeiter charakterisierten 1983 Bsp73, ein spontanes Pankreas-Adenokarzinom der Ratte. Durch serielle Transplantation von Tumorgewebe gelang die Selektion zweier Tumorzelllinien (AS und ASML), die sich in ihrem spontanem Metastasierungsverhalten unterschieden. Die subkutane Injektion von AS in syngene Tiere führte zur Entwicklung eines lokal wachsenden Tumors ohne metastatisches Potential, während die andere Zelllinie ASML zahlreiche Lymphknoten und hämatogene Fernmetastasen ausbildete. Durch den monoklonalen Antikörper mAk1.1ASML, der selektiv die metastatische Tumorzelllinie erkennt, wurde aus einer bakteriellen Expressionsbank der metastasierenden ASML-Zelllinie, die cDNA für ein um 162 AS längeres als das bis dahin bekannte CD44-Standard-Genprodukt isoliert (Günthert et al., 1991). Es stellte sich heraus, dass es sich um die CD44v4-v7-Variante handelte und dass der monoklonale Antikörper 1.1ASML gegen das CD44v6-Epitop gerichtet war. Die nicht metastasierende AS-Zelllinie enthielt nur die CD44-Standardform und reagierte demzufolge nicht mit dem 1.1ASML-Antikörper.

Zwei Versuchsansätze konnten den kausalen Zusammenhang zwischen der CD44-Expression bestimmter CD44-Varianten und dem metastatischen Potential der Tumorzelllinie beweisen. Erstens konnte durch Transduktion von CD44v4-v7 und CD44v6-v7 cDNA in die nicht metastasierende AS-Tumorzelllinie diese in eine *in vivo* metastasierende Zelllinie umgewandelt werden (Rudy et al., 1993). Zweitens konnte der monoklonale Antikörper 1.1ASML das metastatische

Potential der ASML-Zellen und der mit CD44v4-v7- bzw. CD44v6-v7-cDNA transduzierten AS-Zellen hemmen (Seiter et al., 1993). Die Überexpression der CD44-Standardform in AS-Zellen konnte den metastatischen Phänotyp nicht induzieren (Rudy et al., 1993).

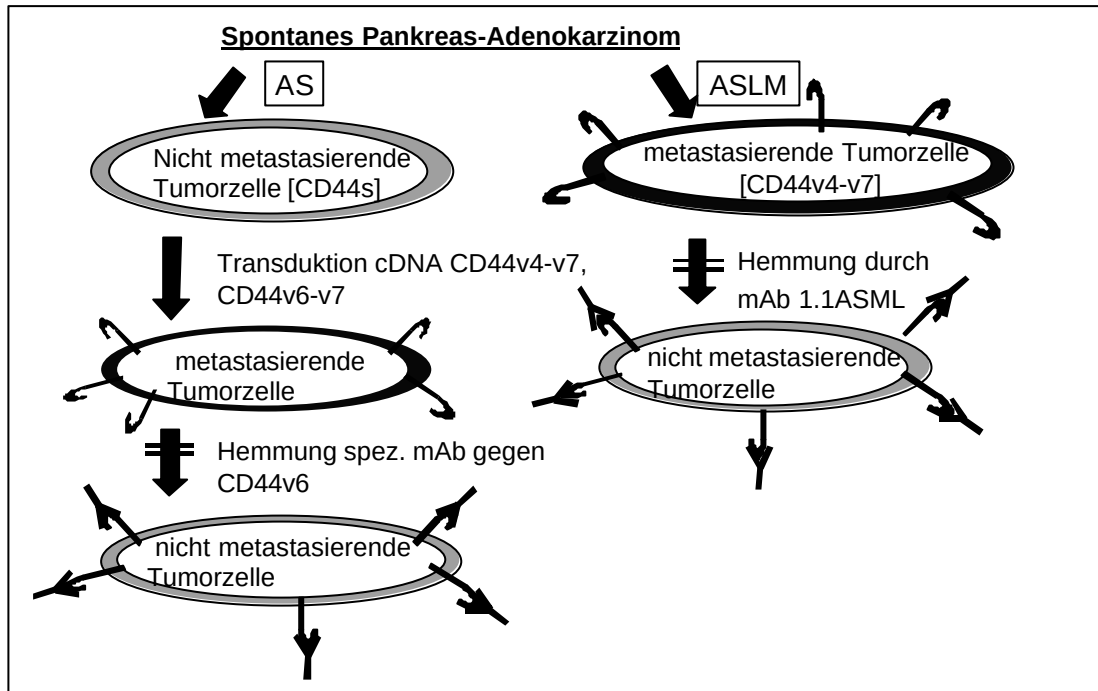


Abb.1.3 Schematische Darstellung des Metastasierungsverhaltens der Adenokarzinom-Zelllinien AS+ ASLM und der Zusammenhang des Metastasierungsverhaltens mit der CD44 Expression.

Diese Daten zeigen, dass die Expression bestimmter CD44-Varianten bei BSp73-Pankreas-Adenokarzinom nötig ist und ausreicht, um metastatische Fähigkeiten hervorzurufen.

Interessanterweise exprimieren aktivierte Lymphozyten kurzzeitig eine CD44-Isoform, die das Variante Exon 6 enthält. Nur aktivierte Lymphozyten sind in der Lage, migratorische Eigenschaften auszuprägen. Die Aktivierung der Lymphozyten durch antigene Stimulation kann durch monoklonale Antikörper gegen das CD44v6-kodierte Epitop stark inhibiert werden (Herrlich et al., 1993, Koopmann et al., 1993). Das Wanderungsverhalten metastasierender Tumorzellen gleicht dem aktivierter Lymphozyten, so dass man eine Lymphozytenmimikry der Tumorzelle diskutiert (Herrlich et al., 1993). Für Namalwa-Zellen (B-Zelllymphomazellen), die mit cDNA transfiziert wurden, welche Exon CD44v3 in Kombination mit anderen varianten Exons kodiert, konnte gezeigt werden, dass sie das Knochenmark schneller als Zellen ohne v3-enhaltende Isoformen infiltrieren (Bartolazzi et al., 1995).

Transfektion von anderen Tumorzelllinien mit CD44v-cDNA zeigte jedoch, dass nicht in allen Tumorzellen eine Metastasierung induziert werden kann. CD44-Isoformen scheinen somit nicht alleine für die Metastasierung verantwortlich zu sein, sondern es müssen noch andere Faktoren eine Rolle spielen (Sy et al., 1991, Bartolazzi et al., 1995).

Es wurden nun zahlreiche Tumore auf Zusammenhänge zwischen der CD44-Expression und der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten, sowie der Tumorprogression untersucht.

1.2.3 CD44-Expression in Tumoren und korrespondierenden Normalgeweben

Non-Hodgkin-Lymphom

Bei gesunden Lymphozyten wurden nur kurzzeitig nach ihrer Aktivierung eine Expression des varianten Exons 6 (Arch et al., 1992, Koopmann et al., 1993) bzw. die kombinierte Expression von CD44v3- und CD44v6-enthaltende Isoformen nachgewiesen (Stauder et al., 1995). Ansonsten exprimierten sie nur die CD44-Standardform (Terpe et al., 1994).

Bei Non-Hodgkin-Lymphomen korrelierte die Tumorprogression mit der CD44v-Expression der malignen Lymphomzellen (Pals et al., 1989, Stamenkovic et al., 1989, Koopman et al., 1993, Jalkanen et al., 1990). Aggressive Lymphome zeigten im Vergleich zu weniger aggressiven Lymphomen eine erhöhte CD44v-Expression (Koopman et al., 1993, Terpe et al., 1994, Stauder et al., 1995). Patienten mit Tumoren, die positiv für das variante Exon 6 waren, lebten kürzer als Patienten mit CD44v6-negativen Tumoren (Ristamäki et al., 1995, Stauder et al., 1995). Die multivariante Analyse zeigte, dass die Expression des varianten Exons 6 in den Tumoren ein unabhängiger Prognose-Parameter darstellte (Stauder et al., 1995).

Kolorektalkarzinom

In der normalen Kolonmucosa trat eine CD44-Expression in der proliferativen Zone der Drüsen auf. In den anderen Bereichen fand man nahezu keine CD44-Standardexpression und variante Isoformen wurde nicht detektiert (Abbasi et al., 1993, Heider et al., 1993, Wielenga et al., 1993). Bei primären malignen Kolorektaltumoren wurden CD44s- und CD44v-Proteine bei wenigstens 50% der Patienten exprimiert und bei allen Patienten in den Lungen-, Leber- und Lymphknotenmetastasen nachgewiesen (Matsumura und Tarin, 1992, Heider et al., 1993, Wielenga et al., 1993, Orzechowski et al., 1995, Suh et al., 1995). Die Überlebensdauer der Patienten mit Tumoren, die die epitheliale CD44-Isoform (CD44v8-v10) (Yamaguchi et al., 1996) oder CD44v6-Isoform (Mulder et al., 1994) exprimierten, war kürzer als bei Patienten mit Tumoren, die negativ für die entsprechenden Isoformen waren.

Die Korrelation der Überlebensdauer und der CD44v6-Expression wurden jedoch von einer anderen Gruppe nicht bestätigt (Koretz et al., 1995). Auch Gotley et al. (1996) konnte mittels RT-PCR und monoklonalen Antikörpern keine individuellen CD44 varianten Exons, die mit der Progression des Kolorektalkarzinoms assoziiert waren, zeigen und stellten den Zusammenhang zwischen der CD44v-Expression und den Tumorstadien des Kolonkarzinoms wieder in Frage.

Mammakarzinom

In einer Untersuchung von 130 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom, 12 lokalen Rezidiven und 18 Lymphknotenmetastasen konnte eine Korrelation zwischen der CD44v5- und CD44v6-Expression und einer kürzeren Überlebensdauer der Patienten gefunden werden, wobei CD44v6 als unabhängiger prognostischer Faktor identifiziert wurde (Kaufmann et al., 1995). Tempfer und Mitarbeiter (1996) zeigten bei 115 Patientinnen, dass die Expression von CD44v5, v6 und v7/8 im Tumor mit einer schlechten Prognose einhergeht.

In einer anderen Studie mit 227 Patientinnen wurden jedoch keine signifikante Korrelation zwischen der CD44v-Expression und der Überlebensdauer der Patientinnen gefunden. Es konnte jedoch eine Korrelation zwischen der CD44v-Expression und dem Differenzierungsgrad beobachtet werden (Friedrichs et al., 1995). Eine neuere Studie, bei der Tumore von 237 nodal-negativen und 230 nodal-positiven Patienten untersucht wurden, zeigte bei >65% der

Mammakarzinomzellen eine CD44v6-Expression. Im Gegensatz hierzu exprimierten in normalem Brustgewebe nur Myoepithelzellen variante CD44-Isoformen (Sinn et al., 1995, Dall et al., 1995, Iida und Bourguignon, 1995, Kaufmann et al., 1995). Die CD44v6-Expression war bei nodal-negativen Patientinnen sogar mit einer signifikant besseren Prognose assoziiert. Bei nodal-positiven Patientinnen ließ sich jedoch kein Zusammenhang finden. Die Hälfte der Tumorproben exprimierte CD44v9 und CD44v7/8 und in 39% konnte CD44v10 nachgewiesen werden. CD44v7/8 und CD44v10 waren jedoch prognostisch irrelevant. Weiterhin zeigten die Karzinome im Vergleich zum Normalgewebe mehrere und größere Isoformen, einschließlich der Maximalvariante (CD44v2-CD44v10). Die CD44v-Expression korrelierte mit dem Differenzierungsgrad, nicht jedoch mit der Prognose (Foekens et al., 1999).

Zervixkarzinome

Im normalem Epithel der uterinen Zervix war die Expression varianter CD44-Epitope auf proliferative Basalzellen und spinale Zellen beschränkt (Dall et al., 1994). Zervixkarzinome zeigten jedoch verschiedene CD44-Isoformen. Mittels RT-PCR wurden bei den Tumorproben verschiedene größere CD44v-Transkripte, einschließlich der Maximalvariante detektiert (Dall et al., 1994). Die Expression des varianten Exons 6 korrelierte signifikant mit dem Auftreten von Metastasen in den Lymphknoten des Beckens, mit einer hohen Wahrscheinlichkeit einer Invasion in Blut- und Lymphbahnen und mit einem kurzen Überleben (Kainz et al., 1995a). Das CD44v7/8-Epitop ließ sich im gesunden Plattenepithel der Portio uteri nur in geringe Mengen bzw. gar nicht detektieren. Im Verlauf der Zervixkarzinogenese nahm die Expression dieser Epitops jedoch zu (Dall et al., 1994, Kainz et al., 1995 a,b) und korrelierte mit einem kürzerem Überleben (Kainz et al., 1995a).

Ovarialkarzinome

Die IHC-Untersuchungen von 44 Ovarialkarzinomen mit einem polyklonalem Serum, das gegen CD44v3-v10-Epitope gerichtet war, zeigte bei 75% eine Reaktion mit den Tumorzellen. Das Rezidiv-freie Überleben der Patientinnen mit CD44v-positiven Tumoren war signifikant kürzer als das der Patientinnen mit CD44v-negativen Tumoren. Betrachtete man jedoch das Gesamtüberleben, so zeigte sich keine statistische Signifikanz. Bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung (Stadium III und IV) ist sowohl das rezidivfreie Intervall, wie auch die Gesamt-Überlebensdauer bei CD44-positiven Tumoren kürzer als bei CD44-negativen Tumoren (Uhl-Steidl et al., 1995). Eine andere Studie mit 31 Patientinnen konnte jedoch keine Korrelation zwischen der CD44s und CD44v-Expression und der Prognose der Erkrankung zeigen (Cannistra et al., 1995). Interessanterweise ergaben Untersuchungen an Ovarialkarzinomzelllinien, dass das CD44-Standardprotein und das Onkoprotein p185(Her2) kombiniert exprimiert wurden und kovalent über Disulfidbrücken verbunden waren (Bourguignon et al., 1997). Weiterhin konnte Hyaluronsäure eine CD44s-assoziierte-p185(Her2)-Tyrosinkinaseaktivität stimulieren, die verglichen zu den nicht transduzierten Kontrollzellen zu einem verstärktem Wachstum der Ovarialkarzinomzelllinien führte. Eine Repression der p185(Her2)-Expression durch Transfektion des Adenovirus-5E1A-Gens führte zu einer reduzierten CD44-Expression und einer reduzierten CD44s-vermittelten Zelladhäsion durch Hyaluronsäure. Die CD44s-p185(Her2)-Interaktion ist somit funktionell gekoppelt und biosynthetisch reguliert. Die Überexpression und Amplifikation des *HER2*-Gens ist bei Ovarialkarzinomen wie auch bei vielen anderen Karzinomen mit einer verkürzten Überlebensdauer der Patientinnen korreliert (Berchuck et al., 1990, Hung et al., 1992). Es wird

angenommen, dass der „cross-talk“ zwischen den beiden Proteinen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Ovarialkarzinoms spielt (Bourguignon et al., 1997).

1.2.4 Expressionsregulation des CD44-Gens

Die Transfektion der Onkogene *ras* oder *src* in Fibroblasten oder epitheliale Zellen der intestinalen Drüse zeigten, dass die CD44-Expression durch aktivierte *ras*- oder *src*-Gene induziert werden kann (Hofmann et al., 1993, Jamal et al., 1994, Kogerman et al., 1996). Bei transient transfizierten Fibroblasten, aber nicht in den intestinalen Epithelzellen, kam es zu einem erhöhten transkriptionellen CD44s-Spiegel und zum Auftreten von alternativ gespleißter CD44mRNA sowie der Produktion varianter CD44-Proteine, so dass eine Überexpression von Ras in diesen Zellen sowohl die CD44-Promotoraktivität wie auch die Spleißkontrollmaschinerie beeinflusste. Bei einer transienten Ras-Überexpression nahm die CD44v/totalCD44-Ratio zu, sie blieb jedoch bei stabil transfizierten Zellen unverändert (Hofmann et al., 1993). Die induzierte CD44-Expression durch eine Ras-Überexpression ist von der AP-1-Bindungsstelle auf Position –110 des CD44-Promotors abhängig. Die AP-1-Aktivität ist hormonsensitiv. Sie nimmt durch Estradiol zu und wird durch Anti-Östrogene inhibiert (Webb et al., 1999, Philipps et al., 1993). AP-1 besteht z.B. aus den Oncogenprodukten Jun und Fos und vermittelt vermutlich die Ras-induzierte Aktivierung des CD44-Promotors. Somit führt die Ras-Synthese unter Kontrolle des Hormon-induzierbaren Promotors zur erhöhten Aktivität des CD44-Promotors und stört transient die Spleißkontrolle (Hofmann et al., 1993).

Die Ras-Aktivierung ist in die Karzinogenese des Endometriumkarzinoms verwickelt (Enomoto et al., 1991) und ist vermutlich für die invasiven und metastatischen Eigenschaften verantwortlich (Greig et al., 1991, Marshal et al., 1991). Aktiviertes Ras kontrolliert Proteasen und Metalloproteinasen (Denhardt et al., 1987, Garbisa et al., 1987) sowie pleiotroph einige Gene, deren Produkte in maligne Prozesse wie Zellproliferation eingebunden sind (Filmus et al., 1992, 1993, 1994, Zhao und Buick, 1993). Das *CD44*-Gen, dessen Produkte ebenfalls in potentielle maligne Prozesse involviert sind, kann somit auch in die Liste der Ras-induzierten Gene eingefügt werden.

1.3 Spezifische zytotoxische T-Lymphozyten in der Gentherapie

1.3.1 Alternative Strategien für die Therapie von Tumoren

Die Molekularbiologie legte durch neue Erkenntnisse über die Tumorbologie sowie durch die Möglichkeit der genetischen Modifikation einer Zelle den Grundstein für neue Strategien der Krebstherapie.

Es wird versucht, durch gezielte genetische Manipulationen der Tumorzellen den Tumor zu bekämpfen. So kann z. B. additiv ein neues Gen eingeführt werden, welches im Falle der Suizidgentherapie indirekt über sein Expressionsprodukt zum Zelltod führt. Ein pharmakologisch inaktives Präparat (z. B. Ganciclovir) wird mit Hilfe des neu exprimierten Genprodukts (z.B. Herpes-simple-Virus-Tymidinkinase) in eine toxische Form (Ganciclovir-Triphosphat) umgewandelt. Ein Problem dieser Therapie ist die fehlende Tumorzellspezifität, um gesundes Gewebe möglichst unbeschädigt zu erhalten, sowie auftretende Resistenzen gegen die Toxine, die die Tumorzelle abtöten sollen.

Weiterhin können durch eingeführte Gene defekte Gene (z.B. das Tumorsuppressorgen *p53* (Runnebaum et al., 1995)) ersetzt werden oder aber

überexprimierte (z.B. *Nmyc*) durch Antisense-DNA (Whitesell et al., 1991) oder Ribozymverfahren supprimiert werden. In vielen dieser therapeutischen Ansätze ist die Erreichbarkeit aller Tumorzellen insbesondere bei größeren Tumoren problematisch. Obwohl durch den sogenannten Bystandereffekt auch häufig Nachbarzellen der transfizierten Tumorzelle abgetötet werden können, ist eine vollständige Eliminierung aller Tumorzellen selten möglich. Darüber hinaus wirken sich die Therapien meist nur lokal auf den Primärtumor aus, während die Metastasen und Rezidive unbeeinflusst bleiben.

Ein hoffnungsvolles Konzept beinhaltet die Verbesserung und Unterstützung des körpereigenen Immunsystems, welches bei zahlreichen Malignomen leider nur unzureichend durch den Tumor stimuliert wird und somit keine ausreichende antitumoralen Effekte zeigt.

Man unterscheidet die aktive, passive und adoptive Tumor-Immuntherapie. Bei der aktiven Immuntherapie geht man von einer Stimulation des Immunsystems durch z.B. Zytokine oder Tumorstoffe aus. Eine erhöhte unspezifische Reaktivität gegen Tumorzell-assoziierte-Antigene kann durch systemische Gabe von Zytokinen erzielt werden. Eine Vielzahl klinischer Studien, bei denen z.B. hohe Dosen an IL-2 den Patienten verabreicht wurden, zeigten jedoch nur einen limitierten therapeutischen Nutzen für die Tumorkranken (Hersh und Taylor, 1991, Parkinson et al., 1990).

Eine andere Möglichkeit, das Immunsystem zu stimulieren, stellt die *ex-vivo* Transfektion von Zytokin-cDNA (z.B. IL-2, IL-4, IL-7, γ -IFN, TNF- α , GM-CSF) in autologe Tumorzellen mit Reinjektion oder die direkte *in vivo* Transfektion des Tumors dar. Durch diese Verfahren soll über das Anlocken und die Stimulation von natürlichen Killerzellen und T-Lymphozyten eine spezifische Tumoralabwehr induziert werden. Gleichzeitig sollen die toxischen Nebeneffekte systemischer Zytokingaben vermieden werden (Hock et al., 1993, Dranoff et al., 1993, Vieweg und Gilboa, 1995, Zhang et al., 1996, Meazza et al., 1996).

Durch Vakzination mit Tumor-Antigenen kann ebenfalls eine spezifische Stimulation erreicht werden. Z.B. wurden HLA-A1-positiven Melanompatienten das HLA-A1-präsentierte Peptid EVDPIGHLY, welches vom *MAGE-3*-Gen kodiert wird, verabreicht. Es zeigte sich bei drei von 12 Patienten eine Regression, ohne dass eine Toxizität der Therapie beobachtet wurde (Marchand et al., 1995).

Die passive Immuntherapie verwendet Vermittler mit anti-Tumor-Reaktivität z.B. Antikörper. Antitumorale monoklonale Antikörper werden bereits in einer Reihe von klinischen Studien eingesetzt. Die postoperative Behandlung mit 17-1A Antikörper von 99 Patienten mit Dukes' C Kolorektalkarzinomen zeigte im Vergleich zu 90 unbehandelten Patienten ein signifikant längeres, Rezidiv-freies Überleben der Patienten und ein signifikant selteneres Auftreten von Fernmetastasen (Riethmüller et al., 1998).

Eine Verbesserung des Effektes von Antikörpern mit einer geringeren Immunogenität wird durch von den Antikörpern abgeleitete bifunktionale Fusionsproteine erreicht, die eine single chain-(scFv)-Antikörperfragment und eine toxische Effektorfunktion enthalten.

So wird Rituximab, ein monoklonaler Antikörper für die Behandlung von non-Hodkin's Lymphomen (NHL), bereits getestet (Übersicht Grillo-Lopez et al., 1999). Dieser chimäre Maus/human-Antikörper enthält einen humanen Immunoglobulin-G1-kappa-Antikörper und eine murine variable Region, die von einem anti-CD20-Antikörper isoliert wird. Er vermittelt die Komplement-abhängige Zellyse und die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität. In einer Multizenterstudie mit 166 Patienten sprachen 48% auf die Therapie an, von diesen zeigten 6% eine komplette Remission (McLaughlin et al., 1998).

Antikörper können jedoch solide Tumore nur unzureichend durchdringen (Jain, 1994), um dieses Problem zu umgehen greift man bei der adoptive Immuntherapie auf Immuneffektorzellen zurück, da diese in der Lage sind den Tumor zu durchdringen. Als Effektorzellen können Tumor-spezifische aktivierte T-Lymphozyten, nichtspezifische natürliche Killerzellen und Makrophagen dienen. Mule und Kollegen beschrieben 1984 die Fähigkeit von Lymphokin-aktivierten-Killer-(LAK)-Zellen bei Mäusen, eine Regression der Tumormetastasierung zu erzielen. In klinischen Studien konnte ein antitumoraler Effekt in 20-30% der Patienten, die auf eine konventionelle Therapie nicht ansprachen, erreicht werden (Rosenberg et al., 1987, 1985). Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL's) können Tumorzellen mit 60-100-fach höherer Effizienz lysieren als LAK's. Diese TIL's werden direkt aus dem Tumor isoliert. Ihre Gewinnung erfolgt über die Kultivierung der Zellsuspension des Tumorgewebes in Anwesenheit von IL-2. Nach einer Woche ist der Großteil des Tumorgewebes eliminiert und die lymphoiden Zellen, die ursprünglich weniger als 5% der Zellpopulation ausmachten, sind zur größten Zellpopulation herangewachsen. Diese Zellen können *in vitro* spezifisch Tumorzellen erkennen. TIL's supprimieren LAKs und setzen Interleukine frei (Charkabarty et al., 1991).

T-Lymphozyten benötigen für die Antigenerkennung die Prozessierung und Antigenpräsentation durch Antigenpräsentierende Zellen (APC). Die spezifische Antigenerkennung führt zur Klonselektion der T-Zellen mit einer individuellen TCR-(T-Zellrezeptor)-Expression. Es wurden Strategien entwickelt, APC's und T-Zellen zu modifizieren und für ein definiertes Tumor-Antigen zu spezifizieren. Dendritische Zellen (DC) wurden bereits bei der Behandlung von malignen Erkrankungen wie Lymphomen (Hsu et al., 1996) und Melanomen getestet (Nestle et al., 1998). Es wurden z.B. 100 HLA-A2-positive Prostatakarzinom-Patienten mit DC's behandelt, die mit Peptiden-abgeleitet vom Prostata-spezifischen-Membran-Antigen (PSMA) gepulst waren. Die Behandlung zeigte bei 30% ein klinisches Ansprechen und bei 3 Patienten eine komplette Remission (Murphy et al., 1998). Die Modifikation von T-Zellen zur spezifischen Tumorantigenerkennung bei gynäkologischen Tumoren war Ziel dieser Arbeit. Bei dieser Strategie setzt man genetisch modifizierte CTL's ein, die MHC-unabhängig Tumorzellen erkennen und eine vorherbestimmte Spezifität besitzen. Dafür wurden chimäre Rezeptoren entwickelt, bei denen eine extrazelluläre Erkennungsdomäne (scFv-Fragment) mit einer Signaltransduktionseinheit fusioniert wird. Die Quervernetzung des chimären Rezeptors durch einen extrazellulären Liganden löst frühe und späte Signaltransduktionen aus, die sich nicht von denen unterscheiden lassen, die bei der Verbindung des TCR/CD3-Komplexes entstehen (Irving und Weiss, 1991). Über die Klonierung solcher chimären Rezeptorgene und den Transfer in T-Zellen sollte eine Antigen-spezifische zytotoxische Immunantwort generiert werden.

1.3.2 Tumorimmunogenität und „Immune-escape“-Mechanismus

Die fehlende Eliminierung von malignen Zellen durch das Immunsystem ist ein grundlegendes Problem bei der Tumorentstehung. Dieses Phänomen beruht auf unterschiedliche Tumoreigenschaften. Zum einem sind viele Tumor-assoziierte Proteine nicht ausreichend immunogen, da sie bereits in normalen Zellen exprimiert werden und eine Toleranz des Immunsystems gegen Selbstpeptide besteht wie z.B. epidermale Wachstumsfaktorrezeptoren aus der Familie der Tyrosinkinasen, wie ErbB-2/Her-2 und ErbB-3/Her-3 (Hynes, 1993).

Selbst immunogene Tumore können über „immune-escape“-Mechanismen der Immunabwehr entkommen. So können die Antigene durch Substanzen wie z.B. Sialomucin maskiert sein und so nicht mehr von Antikörpern oder dem T-

Zellrezeptor erkannt werden. Die Antigene können weiterhin abgespalten werden (Antigen-Shedding), so dass es zur Blockierung der Antikörper und Effektor-T-Zellen kommt.

Häufig tritt ein Verlust von Antigenen durch Defekte im Antigenprozessierungsapparat (Cromme et al., 1994 a, b, Restifo et al., 1991, 1993) und/oder des MHC-Komplexes (Tanaka et al., 1988, Wang et al., 1993, Branch et al., 1995) auf. Den Tumorzellen fehlt oft auch die Expression von kostimulatorischen Molekülen wie B7-1 (CD80) oder B7-2 (CD86), die durch Interaktion mit dem entsprechenden Rezeptor (CD28) bzw. CTLA-4 auf der T-Zelloberfläche das Kosignal für die T-Zellaktivierung liefern (Chen et al., 1993 Yang et al., 1995). Tumorzellen können auch immunsupprimierende Faktoren sezernieren z.B. Prostaglandine und TGF- β (Kehrl et al., 1986, Lee et al., 1987, Arteaga et al., 1993). Einige dieser immunsuppressiven Faktoren wie TGF- β stimulieren autokrin das Wachstum der Tumorzellen (Ridley et al., 1989), ebenso wie andere von den Tumorzellen sezernierte Faktoren z. B. VEGF und EGF die zur autokrinen Stimulation des Tumorwachstums beitragen (Altenschmidt et al., 1997). Eine schlechte Zugänglichkeit erschwert bei großen Tumoren zusätzlich die Zytolyse der Tumorzellen durch das Immunsystem.

Durch eine reduzierte Fas-Expression (Strand et al., 1996) oder durch Abgabe von löslichem Fas, welches den Fas-Liganden auf der T-Zelle blockiert, können sich Tumorzellen vor der Lyse durch CTL's schützen, da die Fas/FasL-vermittelte Zytolyse nicht stattfinden kann (Casano et al., 1995, Owen-Schaub et al., 1995).

Einige Tumore können sogar durch die Expression des FasL die Apoptose der T-Zellen hervorrufen und sich durch Zerstörung der CTL's vor deren Angriff schützen (Kume et al., 1999, Solary et al., 1998, Zeytun et al., 1997).

1.3.3 Antigenpräsentation durch den MHC-Komplex

Im Rahmen der zellvermittelten Immunreaktion spielen T-Zellen eine zentrale Rolle. Sie sind wesentlich für die Entwicklung der Immunität gegen Viren, Bakterien und Pilze verantwortlich. Um eine durch T-Zellen vermittelte Immunität zu erlangen, bedarf es einer adäquaten Antigenpräsentation und der Aktivierung antigenreaktiver T-Effektorzellen. Die Aktivierung der Effektorzellen wird durch T-Helferzellen reguliert. Aktivierte T-Zellen produzieren Lymphokine, die entweder das Wachstum und die Differenzierung von T-(und B)-Zellen beeinflussen oder die phagozytären und bakteriziden Eigenschaften von Makrophagen induzieren bzw. verändern. Die Antigenpräsentation übernehmen spezielle Antigen-präsentierende Zellen (APC), zu denen die dendritischen Zellen, die Makrophagen der sekundären Lymphoidorgane, die Langerhans-Zellen der Haut und aktivierte B-Zellen gehören. Die Präsentation von Antigenen erfolgt durch den MHC-(major histocompatibility complex)-Komplex (Übersicht siehe Engelhard, 1994).

Alle kernhaltigen Zellen exprimieren in unterschiedlichem Maße Klasse-I-MHC-Antigene, die endogen in den Zellen synthetisierte Antigene binden (z. B. Viruspeptide von virusinfizierten Zellen). Die endogenen Peptide entstehen durch Proteinabbau durch das Proteasom und werden durch TAP 1 und 2 (transporter associated with antigen processing) aus dem Cytoplasma in das ER transportiert oder direkt bei der Synthese durch das Signalpeptid in das endoplasmatische Retikulum (ER) geleitet (Übersicht siehe Römisch, 1994). Die Bindung endogener Peptide im ER an die schwere MHC-Klasse-I-Kette führt zur Konformationsänderung dieses Moleküls, welches die Bindung mit dem β_2 -Mikroglobulin zulässt (Übersicht siehe Williams und Watts, 1995). Das Peptid stabilisiert die Wechselwirkung der Ketten, so dass der Komplex über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert werden kann.

Klasse-II-MHC-Antigene sind konstitutiv nur auf APCs exprimiert. Sie bestehen aus zwei nicht kovalent assoziierten Ketten (α und β) und binden exogene Fremdanigene. Die exogenen Proteine werden durch Endozytose aufgenommen und nach der Ansäuerung des Endosoms durch Proteasen abgebaut. Der im ER synthetisierte MHC-Klasse-II-Komplex enthält noch eine invariante Kette, welche die Peptidbindungsstelle blockiert, um eine frühzeitige Beladung des Komplexes mit Peptiden zu verhindern (Germain, 1994, Übersicht siehe Williams und Watts, 1995). Diese invariante Kette wird im späten Endosom von Proteasen abgebaut, so dass sie antigene Peptide binden können und der Komplex mit dem Endosom zur Zelloberfläche gelangt.

1.3.4 Antigenerkennung und Signaltransduktion durch den TCR/CD3-Komplex

Der TCR/CD3-Komplex besteht aus mindestens sechs verschiedenen Transmembranproteinen. Die Erkennung und Bindung antigener Peptide, die durch MHC-Moleküle präsentiert werden, erfolgt durch das TCR-Heterodimer, welches zu der Immunglobulin-Superfamilie gehört. Es setzt sich aus zwei polymorphen, disulfidgepaarten Ketten zusammen. Die große Mehrzahl der rezirkulierenden T-Zellen (>95%) exprimieren einen TCR, der eine α - (40-50 kDa) und eine β - (35-47 kDa)-Kette enthält und nur eine Minorität (5%) exprimieren einen TCR, der sich aus einer γ - und δ -Kette zusammensetzt. Die TCR kodierenden Gene sind getrennt angeordnet und setzen sich aus V (Variable)-, J (Joining)-, D (Diversity)- und C (Constant)-Gensegmenten zusammen. Um ein funktionelles Gen zu bilden, müssen daher während der Reifung der T-Zellen die genomischen Gensegmente rearrangiert werden. Rein rechnerisch ergeben sich durch unterschiedliche (Re)kombinationsmöglichkeiten beim Mensch ca. 1×10^7 verschiedene α/β -TCR-Heterodimere. Hinzu kommen zusätzliche Mechanismen zur Erweiterung der möglichen Diversität z.B. durch ungenaue Verbindung zwischen den Segmenten. Dies geschieht durch Deletion von randständigen Nukleotiden oder durch Addition von zusätzlichen Nukleotiden. Durch diese Diversität können die TCRs wie Immunglobuline eine große Anzahl verschiedener Epitope erkennen.

Diese α/β -(γ/δ)-TCR-Heterodimere sind durch nicht kovalente Wechselwirkungen mit den invarianten Ketten des CD3-Komplexes verbunden. Der CD3-Komplex setzt sich aus den CD3 γ -, CD3 δ -, CD3 ϵ -, und CD3 ζ -Untereinheiten zusammen. Die CD3 ζ -Kette kann auch durch das alternative Spleißprodukt η ersetzt werden und über Disulfidbrücken Homodimere oder Heterodimere mit anderen Mitgliedern der Familie der CD3 ζ -Ketten (η , Fc ϵ R η) bilden (Jin et al., 1990, Orloff et al., 1990). Der TCR/CD3-Komplex wird u.a. durch Ionenbindung basischer transmembranärer Aminosäuren der TCR-Ketten und sauren Aminosäuren der γ -, δ -, ϵ -CD3-Ketten stabilisiert.

Funktionell werden dem CD3-Komplex zwei Aufgaben zugewiesen. Einmal ist die Verfügbarkeit der Einzelkomponenten Voraussetzung für Ausschleusung eines funktionellen TCR/CD3-Komplexes zur Zellmembran (Bonifacio et al., 1990). Zum anderen vermittelt der CD3-Komplex die Weiterleitung der im Rahmen der Antigenerkennung von α/β -(γ/δ)TCR gebildeten Signale, die dann die intrazelluläre T-Zell-Aktivierung einleiten (Weiss und Littman, 1994).

Die untereinander homologen γ -, δ - und ϵ -CD3-Ketten besitzen eine zytoplasmatische Domäne von einer Länge zwischen 40 und 80 Aminosäuren, während die ζ -Kette 113 cytoplasmatische Aminosäuren besitzt (Weissman et al., 1988). Die Untereinheiten enthalten für die Signaltransduktion ein konserviertes

Motiv welches als ITAM (immunoreceptor tyrosin-based activation motif) bezeichnet wird. Es wird von paarigen Tyrosinen und Leucinen, YxxL(X)₆₋₈-YxxL gebildet (im Einbuchstaben-Aminosäurencode, x steht für eine beliebige Aminosäure, Reth, 1989). γ -, δ - und ϵ -CD3 enthalten je eine ITAM-Sequenz wohingegen die ζ -Kette drei ITAM's enthält (Howe und Weiss, 1995). ITAMs sind auch in anderen signaltransduzierenden Ketten anderer lymphoider Rezeptoren, wie dem B-Zell-Antigenrezeptor und dem Fc-Rezeptor auf Makrophagen, Mastzellen und B-Zellen enthalten.

Zwei Familien zytoplasmatischer Tyrosinkinasen sind in die frühen Schritte der TCR-Signaltransduktion eingebunden, die Familie der Src-Kinasen, Lck und Fyn, sowie die Familie der Syk-Kinasen, Syk und ZAP-70 (ZAP-70 für ζ -assoziiertes Protein mit 70 kDa Molekulargewicht). Nach der Rezeptorbindung sammelt sich die Lck-Kinase, welche mit den CD4- und CD8-Korezeptoren assoziiert ist, in der Nähe der ITAM's des TCR/CD3-Komplexes an und fördert die Lck-vermittelte Phosphorylierung der CD3 ζ -Tyrosine. Diese phosphorylierten ITAM's dienen als Bindungsstelle für die Kinasen aus der Syk-Familie (Übersicht, Chu et al., 1998).

Dual-phosphorylierte ITAMs ziehen Kinasen aus der ZAP-70/Syk-Familie durch ihre SH2 (Src-homology domain)-Sequenz an. Vergleiche der Kristallstrukturen der ZAP-70- und Syk-Tandem-SH2-Sequenzen, die phosphorylierte ITAM's bindet, zeigen Unterschiede in der Art und Weise, wie sie an den Rezeptor binden. Die SH2-Sequenz des Syk bildet zwei unabhängige Bindungstaschen für die zwei Phosphotyrosine (Futterer et al., 1998), während ZAP-70 die Bindungstasche für die Phosphotyrosine kooperativ formt (Hatada et al., 1995). Die Assoziation der Sky-Tadem-SH2-Sequenz an phosphorylierte ITAM's stimuliert die Auto-phosphorylierung der Syk-Kinase, wodurch deren Aktivität erhöht wird (Rowely et al., 1995, Shiue et al., 1995, Furlong et al., 1997). ZAP-70 benötigt neben Autophosphorylierung (Neumeister et al., 1995) Lck für die Phosphorylierung seiner Tyrosine im Aktivierungsloop (Visco et al., 2000, Chang et al., 1995).

Die aktivierten Kinasen sind in der Lage, Substrate wie Cbl (Deckert et al., 1998), SLP-76 (SH2-containing leukocyte protein 76, Wardenburg et al., 1996), Vav (Wu et al., 1997, Deckert et al., 1996), γ -Phospholipase C (PLC γ , Law et al., 1996) und LAT (linker für activation of T-cells, Zhang et al., 1998) zu phosphorylieren. Diese Signaltransduktions-Ereignisse resultieren in der Aktivierung der Calcium/Calcineurin- und Ras-vermittelten Signalwege, die letztlich zur Differenzierung, Proliferation und Aktivierung der T-Zellen führen (Übersicht Weiss und Littman, 1994).

Ein Aktivierungsweg der ZAP-70/Syk-Kinasen führt über die phosphorylierte und damit aktivierte Phospholipase C zur Bildung von second messenger- Molekülen. Sie katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃). IP₃ ist für die rasche Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus intrazellulären Speichern (endoplasmatischem Retikulum) verantwortlich (Übersicht Lee und Rhee, 1995, Clapham, 1995). Der erhöhte Ca²⁺-Spiegel bewirkt die Öffnung von Ionenkanälen und durch Exozytose die Freisetzung von Granula, welches u.a. Perforin und Granzyme enthält. DAG aktiviert vorübergehend eine Phospholipid-abhängige-Kinase, die Proteinkinase C (PKC), welche wiederum Serin- und Threoninreste vieler Zielproteine phosphoryliert.

1.3.5 Kostimulatorische Signale bei der T-Zellaktivierung

Neben der spezifischen Antigenerkennung durch die α/β -(γ/δ)-TCR-Heterodimere, ist ein zweites, Antigen-unabhängiges kostimulatorisches Signal durch die

Bindung akzessorischer Moleküle (Korezeptoren und Adhäsionsmoleküle) zwischen den interagierenden Zellen für eine T-Zellaktivierung erforderlich. Diese kostimulatorischen Signale sind mitverantwortlich für die unterschiedlichen Antworten, die durch eine TCR-Stimulation resultieren können, z.B. die immunologische Toleranz gegen körpereigene Antigene. Für diese Toleranz wird den T-Zellen von den antigenpräsentierenden Zellen (APC) ein Antigen ohne einen Kostimulator präsentiert. Die T-Zellen überleben und reagieren bei einer späteren Präsentation des Antigens durch eine APC nicht mehr auf das Antigen. Diese funktionelle Inaktivierung ohne den Zelltod wird als klonale Anergie bezeichnet und ist mit der klonalen Deletion durch Apoptose für die immunologische Toleranz gegen Selbstantigene verantwortlich.

Ein wichtiges kostimulatorisches Signal wird durch die Interaktion von CD28 bzw. CTL-4 und B7 vermittelt (Übersicht McAdam et al., 1998). Zu den B7-positiven Zellen gehören alle APC und einige Tumorzellen. Die Präsentation von Fremd-Antigenen durch APC's und dem durch die B7-CD28-Interaktion vermittelten Kosignal führt zur klonalen Expansion der T-Zellen, Lymphokinsekretion (eingeschlossen IL-2), erhöhten Expression von Wachstumsfaktorrezeptoren (eingeschlossen der α - und β -Kette der IL-2-Rezeptoren), Hochregulation der anti-apoptotischen Proteine (wie bcl-xL) und der Effektorfunktion (Harlan et al., 1995, Thompson, 1995). Eine Präsentation von körpereigenen Antigenen durch somatische Zellen führt wegen fehlender B7-Expression hingegen primär zur Inaktivierung der T-Zellen.

Die CD4- und CD8-Korezeptoren werden auf verschiedenen T-Zellpopulation exprimiert. Sie besitzen zwei Funktionen bei der T-Zellaktivierung. Zum einen stabilisieren sie die TCR-Peptid-MHC-Interaktion (Garcia et al., 1996) und zum anderen bringen sie die Lck-Kinase in Kontakt mit dem TCR, um eine initiale Phosphorylierung einzuleiten (Weiss und Littman, 1994). Der CD4-Rezeptor bindet an die β -Kette des Klasse-II-MHC-Moleküls (König et al., 1992), während der CD8-Rezeptor an die schwere Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls (Salter et al., 1990) bindet. CD8-positive T-Zellen repräsentieren die zytotoxischen T-Zellen (CTLs). CD4-positive T-Zellklone werden in zwei Typen unterteilt (Mosmann und Sad, 1996). Die TH₁-Zellen (inflammatorische T-Helferzellen) fördern die polyklonale, jedoch nicht die antigenspezifische B-Zell-Antwort. Die TH₁-Differenzierung führt zur Produktion von IL-2, γ -IFN und β -TNF, welches Makrophagen aktiviert. Sie besitzen weiterhin zytotoxische Eigenschaften und supprimieren die Immunglobulinproduktion. Das produzierte IL-2 stellt einen wichtigen Wachstumsfaktor für CD4⁺- und CD8⁺-CTL's dar. Die TH₂-Zellen unterstützen die polyklonale wie auch die spezifische B-Zell-Antwort durch Sezernierung von IL-4, IL-5 und IL-10 und repräsentieren die klassischen T-Helferzellen.

Eine bessere Bindung der T-Zellen an die APC's wird durch Adhäsionsmoleküle erzielt. Zu diesen Adhäsionsmolekül-Liganden-Interaktionen gehören die CD2/LFA-3 (Lymphozytenfunktion assoziiertes Antigen-3) und die ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1)/LFA-1-Interaktion, wobei CD2 und LFA-1 auf den T-Zellen exprimiert werden. Durch monomorphe Adhäsionsmolekül-Liganden-Interaktion (CD2/LFA-3, ICAM-1/LFA-1), die zur Zell-Zell-Interaktion führt und die durch selektive Interaktion (CD4/MHC-Klasse II, CD8/MHC-Klasse I) verstärkt wird, kann der TCR, selbst bei niedriger Affinität, an das Peptidantigen binden. Somit wird das Ausmaß der T-Zell-Aktivierung neben spezifischer TCR-Antigen-Interaktion zusätzlich durch monomorphe Rezeptor-Liganden-Interaktion beeinflusst.

1.3.6 Mechanismen der Zytolyse

Die Zytolyse von Zielzellen durch CTLs verläuft durch eine Ca^{2+} -abhängige Sekretion zytolytischer Vesikel, bei der Granula in den intrazellulären Spalt freigesetzt werden, sowie durch eine Ca^{2+} -unabhängige Interaktion von FasL (Fas Ligand) auf der T-Zelle, die zur Quervernetzung des Fas-(APO-1/CD95)-Rezeptors auf der Zielzelle und so zur Lyse der Zielzelle führt. Die Lyse folgt dem Prinzip des programmierten Zelltodes (Apoptose). Die Apoptose zeichnet sich auf morphologischer Ebene durch Schrumpfung der Zelle, Chromatin-Kondensation, Auflösung des Kerns und zelluläre Fragmentation in apoptotische Körperchen aus (Kerr et al., 1972, Wyllie., 1980). Biochemisch kommt es u. a. zum Zusammenbruch des Membranpotentials der Mitochondrien, Neuverteilung der Membranlipide, Aktivierung intrazellulärer Proteasen (Caspasen), proteolytischer Spaltung von bestimmten Proteinen und zur DNA-Fragmentation (Übersicht siehe Schneider und Tschopp, 2000).

1.3.6.1 Exozytose zytolytischer Vesikel und Wirkung von Perforin und Granzymen

Zytotoxische Lymphozyten enthalten zahlreiche zytoplasmatische lysosomen-ähnliche Vesikel, die mit sekretorischen Proteinen gefüllt sind. Nach Bindung der Zielzelle und ihre Aktivierung kommt es zur Ca^{2+} -abhängigen Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran und zur Sekretion des Vesikelinhaltes. Die Granula enthält u.a. perforierende Proteine (PFP, Perforine) und Serin-Proteasen (Granzyme). Außerdem können weitere Faktoren, die die Lyse der Zielzelle begünstigen, wie z.B. der Tumornekrosefaktor α , Leukalexin und Lymphotoxine (LT oder TNF β) in der Granula enthalten sein (Tian et al., 1991, Lui et al., 1987). Perforin ist ein monomeres, porenbildendes 66-70 kDa großes Protein, das mit der lytischen Komponente (C9) verwandt ist und nur in Lymphozyten exprimiert wird (Lowrey et al., 1989). In Anwesenheit von Ca^{2+} binden die Perforinmonomere an die Membran und integrieren in die Membran der Zielzelle. Dort polymerisieren sie zu transmembranären Kanälen mit einem Durchmesser von 5-20 nm. Die Poren sind so klein, dass nur kleine Moleküle wie ATP und K^+ -Ionen sie passieren können und das intrazelluläre Gleichgewicht stören. Der Tod der Zielzellen wird innerhalb von 30 Sekunden eingeleitet. Er kommt vermutlich durch osmotischen Stress und dem Einstrom letaler extrazellulärer Moleküle zustande. Die Lebensfähigkeit der CTL's selbst wird bei diesem Mechanismus nicht beeinträchtigt. Der Selbstschutz der T-Zelle vor der Zytolyse ist nicht ganz geklärt, benötigt jedoch keine intrazellulären Komponenten und scheint vor allem durch Inhibition der Porenbildung in der Plasmamembran zustande zu kommen. Dafür verantwortlich gemacht wird das Protektin, welches die Insertion und/oder Polymerisation der Perforinmoleküle verhindert (Jiang et al., 1990). Außerdem scheint eine Membranreparatur durch Abspaltung und Endozytose der Perforinporen aufzutreten (Scolding et al., 1990). Perforin alleine kann in der Zielzelle keine DNA-Fragmentierung, die für den Zelltod durch Killerlymphozyten charakteristisch ist, erzielen. Der Porenbildung ist die Wirkung der Granzyme nachgeschaltet, die in der Zielzelle eine DNA-Fragmentierung induziert und damit die Apoptose besiegelt. Granzyme gehören zu den granulären Proteasen. Zwei Mitglieder dieser Familie sind Granzym A und Granzym B. Die Transfektion von cDNA, die Perforin- und Granzym A- oder B kodiert, in RBL-Zellen (Shiver et al., 1992, Nakajima und Henkart, 1994) konnte eine Lyse der Zielzelle und eine DNA-Fragmentation erzielen, während die alleinige Transfektion von Perforin- oder Granzym-cDNA

dazu nicht in der Lage war (Shiver und Henkart, 1991). Granzym B ist für eine schnelle Einleitung der Apoptose wichtig (Heusel et al., 1994), während Granzym A keine primäre Rolle spielt (Ebnet et al., 1995). Granzym B gelangt über Poren oder über eine spezifische Endozytose in die Zelle, wobei Perforin für den Vesikel-gebundenen Transfer des Granzym B ins Cytosol wichtig ist (Froelich et al., 1995). Die Granzyme induzieren z.B. die Tyrosinphosphorylierung der Mitose-regulierenden $p34^{cdc2}$ -Kinase, die dadurch vorzeitig aktiviert wird und so zu einer „mitotischen Katastrophe“ führt (Shi et al., 1996). Ein weiterer Mechanismus, durch den Granzyme den Zelltod einleiten können, stellt die Aktivierung der ICE/CED3-(interleukin-1 β converting enzyme/C. elegans cell death protein) ähnlichen Proteasen (Caspasen) dar. Alle Caspasen bis auf Caspase 1 und 2 stellen Substrate für Granzym B dar, welches ein (evt. Procaspase 10) oder mehrere Procaspasen proteolytisch spaltet und dadurch aktiviert wird. Dieses führt zur Aktivierung der Caspase-Kaskade (siehe 1.3.6.2), die zum programmierten Zelltod der Zielzelle führt (Übersicht siehe Froelich et al., 1998).

1.3.6.2 Fas/FasL-induzierte Apoptose

Der Fas-Ligand (FasL) ist ein 40 kDa Typ II Transmembranprotein, das die Apoptose durch Quervernetzen des Fas-Proteins auf den Zielzellen vermittelt. Der FasL wird vor allem auf aktivierten T-Zellen exprimiert und proteolytisch durch Metalloproteasen von der Membran zu einer löslichen Form abgespalten. Dieser lösliche FasL kann Trimere bilden, die wie der membranständige FasL, das Fas-Protein quervernetzen und dadurch eine Apoptose in Fas-sensitiven Zellen hervorruft.

Der „Todesrezeptor“ Fas gehört zu der TNF (tumour necrose factor)/NGF (nerve growth factor)-Rezeptor-Familie. Er enthält wie alle Mitglieder dieser Familie eine Cystein-reiche Region in der extrazellulären Domäne und trägt weiterhin wie der TNF-Rezeptor-1 eine „Todesdomäne“, die für ein Apoptose-Signal benötigt wird. Die Aktivierung des Fas erfolgt durch Bindung von FasL oder trimerelem löslichem FasL an den Fas-Rezeptor. Dies führt zur Assoziation der „Todesdomäne“ des Fas-Rezeptors mit dem Adaptermolekül FADD (Fas-associated death domain protein) und der Effektor-Protease FLICE (FADD-like ICE/MORT-1-associated Ced3 homologue, Caspase-8) (Muzio et al., 1996). Die Verbindung dieses Signalkomplexes führt zur Aktivierung der weiteren Caspase-Kaskade.

Die Caspase-(Cysteiny) aspartate-specific protease)-Familie besteht aus Cysteinproteasen, die ihr Substrat an der Carboxylseite eines spezifischen Aspartatrestes spalten (Thornberry und Lazebnik, 1998). Sie werden durch proteolytische Spaltung aus ihren inaktiven Vorläufern (Zymogene) aktiviert. Die Caspasen werden in zwei Gruppen unterteilt. Die Klasse-I-Caspasen (z.B. Caspase-2,-8,-9 und -10), die auch als Initiator- oder upstream-Caspasen bezeichnet werden, führen nach Rezeptorligation zur Anziehung von spezifischen „Todesadapterproteinen“ (z.B. FADD). Die Caspasen der Klasse-I enthalten eine lange amino-terminale Prodomäne, die eine spezifische Protein-Protein-Interaktionsdomäne enthält, welche die Oligomerisation der Procaspase mit den assistierenden Adaptorproteinen vermittelt. Es kommt zu einer hohen lokalen Procaspase-Konzentration, die für eine autokatalytische Prozessierung der Procaspasen nötig ist (Kumar und Colussi, 1999). Die aktivierten Caspasen der Klasse-I können nun durch proteolytische Spaltung die Caspasen der Klasse-II aktivieren, die auch als Effektor- oder downstream-Caspasen bekannt sind. Zu ihnen gehören z.B. Caspase-3,-6 und -7, die dann proteolytisch zelluläre Proteine spalten, die letztlich die apoptotische Morphologie der Zelle und des Kerns hervorrufen.

1.3.7 Die minimale antigenerkennende Einheit

Antikörper setzen sich aus vier Polypeptidketten zusammen, zwei schweren (H(heavy)-Ketten, Molekulargewicht 50 und 70 kDa) und zwei leichten (L-Ketten, ca. 25 kDa). Die H- und L-Ketten sind durch intra- und intermolekulare Disulfidbrücken und Protein-Protein-Wechselwirkungen stabilisiert. Die Ketten enthalten einen konstanten Teil (C-Region), der innerhalb einer Ig-Subklasse identisch ist und einen variablen Anteil (V-Region), der die Antigenbindung ermöglicht. Die variable Region enthält drei hypervariable Bereiche, die CDRs (complementarity-determining regions), und vier dazwischenliegende Peptidsegmente, die „framework-regions“ (FR; Rahmenregionen), welche eine geringere Variabilität aufweisen. Röntgenstrukturanalysen zeigten, dass die variable Region drei Schleifen bildet, die je ein hypervariables Segment tragen. Die variablen Regionen der leichten und schweren Kette sind so gefaltet, dass sie in räumliche Nähe zueinander kommen und dadurch die Oberflächenstruktur für die Antigenbindung herstellen. Das kleinste Fragment, das eine intakte Bindungsstelle enthält, wird Fv-Fragment genannt. Es enthält ein Heterodimer der nicht kovalent miteinander verbundenen variablen Domänen der leichten und der schweren Kette. Durch rekombinante DNA-Technologie können solche Fv-Fragmente hergestellt werden. Bei den scFv(single-chain-Fv)-Fragmente sind die variablen Domänen der schweren und der leichten Kette über einen flexiblen Peptidlinker miteinander verbunden. Dieser Peptidlinker bildet selber keine geordnete Sekundärstruktur aus und interferiert nicht mit der Domänenfaltung des Fv-Fragments, so dass eine Tertiärstruktur, die der parentalen Antigenbindungsregion entspricht, ausgebildet werden kann. Viele dieser scFv-Fragmente behalten die Affinität und Spezifität der Antigenbindung des parentalen Antikörpers.

1.3.8 Aufgabenstellung

Für Pankreas-Adenokarzinomzellen der Ratte konnte der Zusammenhang zwischen der Expression bestimmter varianter CD44-Isoformen und ihrem metastatischen Potential gezeigt werden. Außerdem ist bei humanen Malignomen die Expression varianter CD44-Isoformen mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium assoziiert. Über das Endometriumkarzinom liegen bisher noch widersprüchliche Daten über die CD44v-Expression vor. In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob es im Rahmen der Karzinogenese zu quantitativen und qualitativen Änderungen der CD44v-Expression kommt. Dafür sollte die CD44-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene im normalen Endometrium und in Endometrium-Karzinomen untersucht werden.

Im normalem Endometriumgewebe konnte bei verschiedenen Phasen des Menstruationszyklus eine veränderte CD44v-Expression beobachtet werden, die außerdem mit der Expression des Östrogenrezeptors korreliert, so dass eine hormonabhängige CD44-Expression im Endometrium diskutiert wird. Daten, die einen direkten Zusammenhang von Hormonen auf die CD44-Expression im Endometrium zeigen liegen bisher noch nicht vor. Die Klärung funktioneller Zusammenhänge zwischen der CD44v-Expression und verschiedenen Zytokinen (G-CSF, γ -INF und α -INF), Hormonen (Östradiol, Progesteron) und Hormonantagonisten (Tamoxifen und Hydroxytamoxifen), die von klinischer Relevanz sind, sollten unter standardisierten Bedingungen an Endometrium-Karzinom-Zelllinien erfolgen.

Die häufige Expression der CD44v6- bzw. CD44v7/8-Isoformen beim Zervix- und Mammakarzinom, sowie die fehlende Expression dieser varianten Isoformen in allen lebenswichtigen Organen war die Grundlage für die Entwicklung einer selektive Immuntherapie durch gentechnologisch modifizierte zytotoxische T-Lymphozyten (CTL's), die spezifisch CD44v6- bzw. CD44v7/8-exprimierende Tumorzellen erkennen und lysieren. Mit dieser Zielsetzung sollte durch retrovirale Transfektion von CTL's die Expression chimärer Rezeptoren erreicht werden, die ein scFv-Fragment, eine CD8 α -hinge-Region und die TCR- ζ -Kette beinhalten. In die für diese Fusionsproteine codierende Genkassette sollte zusätzlich eine c-myc-Sequenz (c-myc-tag) eingesetzt werden, um den Nachweis der chimären Rezeptoren an der Zelloberfläche der T-Zellen durch FACS-Analysen zu ermöglichen. Das c-myc-Markerantigen diene weiterhin der direkten und schnellen Überprüfung der durch eine retrovirale Infektion primärer T-Lymphozyten erreichten Transduktionseffizienz. Dies ermöglicht den Einsatz von primären T-Zellen, die aufgrund einer begrenzten Lebensfähigkeit nicht selektioniert werden können, sondern direkt nach der Transfektion gegen Tumorzellen eingesetzt werden sollten.

Die *in vitro* und *in vivo* Funktionalität des chimären Rezeptors, sowie die Spezifität der Lyse von CD44v6- und CD44v7/8-positiven Zellen sollte zunächst mit einer CTL-Zelllinie überprüft werden.

Darauf aufbauend sollte die retrovirale Transfektion primärer CTL's ausgearbeitet und bezüglich der Proliferation der CTL's und der maximal erreichbaren retroviralen Transferrate optimiert werden. Die CD44v6- bzw. CD44v7/8-spezifische Zytotoxizität sollte an CD44v6- bzw. CD44v7/8-positiven Tumorzelllinien charakterisiert werden. In Tierversuchen (Mausmodell) sollten die *in vivo* Zytotoxizität der rekombinanten primären CTL's gegenüber xenotransplantierten CD44v6- bzw. CD44v7/8-positiven Tumoren getestet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

Medien

DMEM (1 g/l Glucose)	Gibco BRL
DMEM ohne Phenolrot (1 g/l Glucose)	Gibco BRL
DMEM (4,5 g /l Glucose)	Gibco BRL
DMEM/Nutrien Mix F12 (1:1)	Gibco BRL
DMEM/Nutrien Mix F12 (1:1) ohne Phenolrot	Gibco BRL
RPMI	PAA

Zusätze/Agenzien

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
EDTA (2g/l)	Sigma
FCS (fetal calf serum)	Sigma
Fungizone® (250µg/ml Amphotericin)	Gibco BRL
Geneticin® (G-418 Sulfat)	Gibco BRL
Gentamycin (50 mg/ml)	Gibco BRL
HAT-Supplement (5x)	Gibco BRL
(5 mmol/l Hypoxanthin, 20 µmol/l Aminopterin, 0,8 mmol/l Thymidin)	
HEPES Puffer 1 mol/l	Sigma
HT-Supplement (5x)	Gibco BRL
(5 mmol/l Hypoxanthin, 0,8 mmol/l Thymidin)	
Hypoxanthin	Sigma
Insulin Actrapid HM	Novo Nordisk Pharma GmbH
MEM 100x Vitamin-Lösung	Gibco BRL
(NaCl, D-Ca Panthothenat, Cholinchlorid, Folsäure, i-Inositol, Nikotinamid, Pyridoxal/HCl, Riboflavin und Thiamin/HCl)	
2-Mercapthoethanol, 50 mmol/l (1000x),	Gibco BRL
Mycophenolsäure	Calbiochem
Penicillin/Streptomycin-Glutamin (100x)	Gibco BRL
Phoshat-gepufferte Saline (PBS):	
ohne Ca ²⁺ , ohne Mg ²⁺	Seromed
Serum vom neugeborenen Kalb	Gibco BRL
(NCS; new born calf serum)	
Trypsin/EDTA: 0,5 g/l Trypsin; 0,2g/l EDTA	Gibco BRL
Xanthin	Sigma

Hormone, Zytokine und Mitogene

Concanavalin A (ConA)	Boehringer, Mannheim
Cycloheximid	Sigma
G-CSF (Granulocyte colony stimulating factor)	Rhône-Poulence
4-Hydroxy-Tamoxifen	Sigma
α-Interferon (α-IFN)	Calbiochem
γ-Interferon (γ-IFN)	R&D System
17β-Östradiol	ICN

Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma
Phytohemagglutinin (PHA)	Biochrom KG
Proleukin	Chiron
Progesteron	ICN

2.1.2 Enzyme

MuLv-Reverse Transkriptase (RT)	Pharmacia, Biotech
Phosphatase, alkalische	Boehringer, Mannheim
RNasin	Promega
T4-DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Pharmacia, Biotech

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur, Zellkulturexperimente und Isolierung primärer T-Zellen

2.2.1.1 Zelllinien und Kulturbedingungen

Alle Zelllinien werden in befeuchteter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Materialien für die Zellkultur werden durch Autoklavieren oder Filtrieren sterilisiert.

Zelllinien

AN3 CA (ATCC HTB 111)

J. Dawe et al. isolierten 1964 die metastatischen Zellen aus den Lymphknoten einer hormonbehandelten 55 Jahre alten Frau, mit einem undifferenzierten, kleinzelligen Adenokarzinom des Endometriums. Diese Zelllinie wird in DMEM, 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) Vitaminlösung, 2 mmol/l L-Glutamin und 1% (v/v) Antibiotikum/Antimykotikum kultiviert.

Ca Ski (ATCC CRL-7951)

Diese epidermoide Zelllinie wurde aus einer Metastase eines Zervixkarzinom isoliert. Die Zelllinie wird in RPMI-1640, 10 % (v/v) FCS, 1,5 µg/ml Fungizone und 50 µg/ml Gentamycin kultiviert.

Cl96

Diese zytotoxische T-Zelllinie stammt aus der C57Bl/6 Maus (H-2K^b, Marcucci et al., 1981, Eichmann et al., 1991) mit einer H-2K^d-restingierten Spezifität für die Mastozytom-Zelllinie P815 (H-2K^d). Sie wird in DMEM, 10% (v/v) FCS, 2 mmol/l L-Glutamin, 10 mmol/l HEPES, 0,05 mmol/l β-Mercapthoethanol, 1,5 µg/ml Fungizone, 50 µg/ml Gentamycin, und 500 IE/ml Proleukin kultiviert.

HaCat

Diese immortalisierte Keratinozytenzelllinie wurde von Boukamp et al. (1988) als eine spontan transformierte humane epitheliale Zelllinie aus der adulten Haut etabliert. Sie wird in DMEM, 10% (v/v) FCS, 2 mmol/l L-Glutamin, 50 µg/ml Gentamycin, 1,5 µg/ml Fungizone und 10 mmol/l HEPES kultiviert.

HEC-1-A (ATCC HTB 112)

Diese epitheliale Zelllinie wurde aus einer Patientin mit einem Grad 1A Adenokarzinom isoliert. Die Kultivierung erfolgt in DMEM, 10% (v/v) FCS, 2 mmol/l L-Glutamin und 1% (v/v) Antibiotikum/Antimykotikum.

HPK??

Diese humane epitheliale Zelllinie ist durch HPV 16 (humanes Papillomavirus Typ 16) immortalisiert (Shermann et al., 1992). Kulturmedium siehe HaCat-Zelllinie.

KLE (ATCC CRL 1622)

Bei KLE handelte es sich um eine epitheliale Zelllinie, die aus einem schlecht differenzierten Adenokarzinom des Endometriums einer 64 Jahre alten Frau isoliert wurde. Sie wird in DMEM/F-12 (1:1), 10% (v/v) FCS, 2 mmol/l L-Glutamin und 1% (v/v) Antibiotikum/Antimykotikum kultiviert.

ME-180 (ATCC HTB-33)

Diese Linie stammt aus einem hoch invasiven squamösem Zervixkarzinom und enthält DNA des humanen Papillomavirus (HPV). Sie wird in McCoy's-5A-Medium mit 10 % (v/v) FCS, 1,5 µg/ml Fungizone und 50 µg/ml Gentamycin kultiviert.

NIH/3T3 (ATCC CRL 1658)

Es handelt sich um eine murine embryonale Fibroblastenlinie, die in DMEM mit 4,5 g/l Glucose, 10% (v/v) FCS, 1,5 µg/ml Fungizone und 50 µg/ml Gentamycin kultiviert wird.

P815 (ATCC TIB 64)

Diese Mastozytomazellen wurden aus einem DBA/2 Maustumor kultiviert. Sie dienen als Zielzellen für die Cl96-Zelllinie und werden in DMEM, 10% (v/v) FCS, 2 mmol/l L-Glutamin und 10 mmol/l HEPES kultiviert.

PA317 (ATCC CRL 9078)

Diese murine amphotrophe Verpackungszelllinie (Miller und Buttimore, 1986) wurde von NIH/3T3- Zellen durch Kotransfektion mit der Retrovirusverpackungskonstrukt-DNA (pPAM3) und dem Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase-(TK)-Gen hergeleitet. Sie werden in DMEM mit 4,5 g/l Glucose und 10% (v/v) NC kultiviert. Die Vorselektion für Zellen, die ihre Verpackungsfunktion behalten, erfolgt mit HAT-enthaltendem Medium (0,5 mmol/l Hypoxanthin, 2 µmol/l Aminopterin, 80 µmol/l Thymidin). Die Zellen werden anschließend in HT-enthaltendem Medium (0,5 mmol/l Hypoxanthin, 80 µmol/l Thymidin) weiter kultiviert.

ΩE

Murine ecotrophe Verpackungszelllinie für Retroviren (Morgenstern und Land, 1990). ΩE-Zellen werden in DMEM mit 4,5 g/l Glucose und 10% (v/v) NC kultiviert. Für die Vorselektion auf die stabile Integration des Verpackungsvektors, der das gpt-(Xanthin-Guanine-Phosphoribosyltransferase)-Gen enthält, wird die Zelllinie einige Passagen mit HXM-enthaltendem Medium (15 µg/ml Hypoxanthin, 250 µg/ml Xanthin, 25 µg/ml Mycophenolsäure) kultiviert.

RL95-2 (ATCC CRL 1671)

Diese epitheliale Zelllinie wurde aus einem mäßig differenzierten adenosquamosen Karzinom des Endometriums einer 65 Jahre alten Frau isoliert. RL92-2-Zellen besitzen sowohl einen cytoplasmatischen als auch einen nukleären Östrogenrezeptor. Sie werden in DMEM/F-12 (1:1), 10% (v/v) FCS, 10 mmol/l HEPES, 5 mmol/l Insulin, 2 mmol/l L-Glutamin und 1%(v/v) Antibiotikum/Antimykotikum kultiviert.

SiHa (ATCC HTB-35)

Aus einer 55 Jahre alten Patientin mit einem squamösen Zervixkarzinom wurde diese Zelllinie isoliert. Kulturmedium siehe HaCat-Zelllinie.

Kultivierung der Zellen

Konfluente Kulturen adhärend wachsender Zellen werden durch eine 0,05 % (w/v) Trypsin/0,02 % (w/v) EDTA-Lösung abgelöst, während in Suspension wachsende Zellen durch gründliches Abspülen des Bodens der Gewebekulturflasche geerntet

werden. Durch Zentrifugation (5 min, 1200 Upm) werden die Zellen sedimentiert, die Zellzahl bestimmt und dann ihrem Wachstum entsprechend gesplittet.

Kryokonservierung von Zellen

Die sedimentierten Zellen (ca. 5×10^6 Zellen) werden in Einfriermedium (90% (v/v) Kulturmedium oder FCS, 10% (v/v) DMSO) resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und über Nacht bei -80°C eingefroren. Die Langzeitaufbewahrung erfolgt dann in flüssigem Stickstoff.

Die Zellen werden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Um ihnen den Ausgleich des osmotischen Druckes zu ermöglichen, wird unter Schütteln vorsichtig das Kulturmedium hinzugegeben.

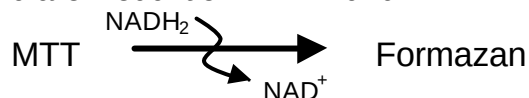
2.2.1.2 Stimulationsexperimente

Die Zellen werden vor Versuchsbeginn 2 Passagen in Phenolrot-freiem Medium kultiviert, um die östrogene Wirkung des Phenolrots auszuschließen (van der Burg et al., 1988, Vicard et al., 1988)

Pro Loch werden $2,5 \times 10^5$ Zellen in eine 6-Loch-Platte ausgesät. Es wurden drei Kontrollgruppen verwendet, die entsprechend ihrem FCS-Gehalt des Mediums bezeichnet wurden. Die erste Kontrolle (+/+) wurde über den gesamten Versuchszeitraum in Medium mit FCS kultiviert und repräsentierte die unter normalen Kulturbedingungen wachsenden Zellen. Die zweite Kontrollgruppe (-/-) wurde entsprechend mit Medium ohne FCS kultiviert und stellte für die Hormonbehandlung die unbehandelte Kontrollgruppe dar. Die dritte Kontrollgruppe (-/+) wurde 48 h mit Medium ohne FCS vorinkubiert und erhielt dann zum Zeitpunkt 0 h für eine maximale Stimulation Medium mit FCS. Die Zellen für die Behandlung mit Zytokinen und Hormonen wurden 48 h in Medium ohne FCS kultiviert, um die im FCS enthaltenden Faktoren (Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen) den Zellen zu entziehen. Zu Versuchsbeginn wurde es dann durch Medium, das die zu untersuchenden Agenzien enthielt, ausgetauscht. Den Kontrollen wurde entsprechend das Lösemittel Ethanol 0,1% (v/v) hinzugegeben. Zu den entsprechenden Zeitwerten (in der Regel 1 h, 4 h, 12 h, 24 h und 48 h) wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mittels TRIzol™ lysiert und anschließend erfolgte die RNA-Extraktion.

2.2.1.3 Zellproliferationstest (MTT)

Dieser nicht radioaktive Test basiert auf die Umsetzung des gelben Tetrazoliums Salzes MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid) zu rotem Formazan durch metabolisch aktive Zellen. An dieser Umsetzung ist das Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System beteiligt, außerdem ist für zelluläre Reduktion NADH und NADPH verantwortlich.



Die Umsetzung von MTT zu Formazan kann spektrometrisch quantifiziert werden. In einem Vorversuch ist die Zellzahl zu ermitteln, die für eine ausreichende MTT-Umsetzung nötig ist. Die Zellen werden in 100 μl Medium in 96-Lochplatten ausgesät, welches das Proliferation-stimulierende-Agenz (z.B. Proleukin) enthält. Die Zellen werden dann 48-96 h inkubiert und anschließend mit 10 μl MTT-Reagenz (5 mg/ml 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid in PBS) versetzt. Nach 4 h Inkubation im Inkubator (37°C , 5% (v/v) CO_2) wird 100 μl der Farbauflösungslösung (10% (w/v) SDS, in 0,01 mol/l HCl) hinzu pipettiert.

Die Platte wird dann erneut im Inkubator über Nacht inkubiert und anschließend die Absorption bei 580 nm und bei einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen.

2.2.1.4 Isolierung von primären T-Zellen aus Mausmilzen

Für die Isolierung der T-Zellen wird eine Spritze (Säulenvolumen= 10 ml) mit 1,2 g gut gezupfter Nylonwolle (Du Pont Biotechnology Systems) gefüllt und autoklaviert. Sie wird mit 50 ml PBS und anschließend mit 10 ml 5% (v/v) FCS in PBS gespült. Die Absättigung von unspezifischen Bindungen erfolgt durch Inkubation mit 5% (v/v) FCS in PBS für mindestens 1 h bei 37°C.

Die Mäuse (weiblich, balb/c, Charles River, Sulzfeld) werden durch Genickbruch getötet und die Milzen entnommen. Um die Milzzellen vom groben Bindegewebe zu trennen, werden sie in PBS durch ein Metallsieb (Porengröße $\varnothing = 100 \mu\text{m}$) gedrückt und homogenisiert. Nach einer Zentrifugation (alle Zentrifugationsschritte: 5 min, 1000 Upm) werden die Erythrozyten durch eine Inkubation (4 min.) mit 3 ml Lyse-Puffer lysiert. Die Reaktion wird durch 10 ml PBS und anschließender Zentrifugation gestoppt. Nach erfolgreicher Lyse der Erythrozyten sollte das Pellet möglichst weiß sein. Die Zellen werden auf die Säule gegeben und dann 45 Minuten bei 37°C inkubiert, um die Bindung der geladenen Zellen (vor allem Makrophagen und B-Zellen) an die Nylonwolle zu ermöglichen (Coligan et al., 1993). Die Zellen werden dann mit 15 ml CI96-T-Zellmedium von der Säule eluiert und zentrifugiert. Für die Transfektion werden T-Zellen aus 2 Milzen pro 12-Lochplatte (ca. 2×10^7 T-Zellen) benötigt.

Lysispuffer:

1g Tris, 4,28g NH_4Cl , 0,08g NaHCO_3 , pH 7,2 ad 500ml Aqua dest.

2.2.1.5 Rosettingtest

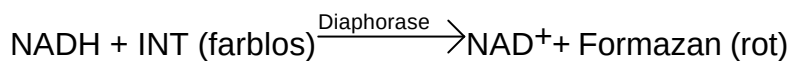
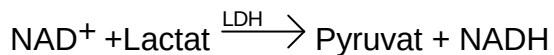
Die Bindungskapazität der gentechnologisch veränderten T-Zellen an die Antigen-tragende Zielzelle wird durch einen Rosettingtest überprüft. Stabile Transfektanten und Wildtypzellen der T-Zelllinie CI96 (1×10^6 Zellen/ml) werden zu den Zielzellen (HPK??), die mit 50-70% Konfluenz in 6-Lochplatten wachsen, gegeben. Die Platte wird 10 Minuten bei 37°C inkubiert, zentrifugiert (800 g, für 3 min) und dann 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen werden 15 mal mit 3% (v/v) FCS in PBS gewaschen, um alle nicht spezifisch gebundenen T-Zellen abzuwaschen, bevor sie mit 1 ml einer 0,1% (w/v) Ethylviolettlösung angefärbt werden.

2.2.1.6 Zytotoxizitätstest

Die Detektion und Quantifizierung, der durch die gentechnologisch veränderten cytotoxischen T-Lymphozyten hervorgerufenen Zelllyse, wird mittels eines Zytotoxizitätstest (Promega) ermittelt. Sie basiert auf der kolorimetrischen Quantifizierung der Lactat-Dehydrogenase (LDH), die aus dem Cytosol der lysierten Zellen freigesetzt wird. Die gentechnologisch veränderten T-Zellen werden vor dem Versuch über eine Passage in G418-freiem Medium kultiviert. Die benötigte Zielzellzahl für eine ausreichende LDH-Freisetzung wurde in Vorversuchen ermittelt und betrug für alle verwendeten Zelllinien 10^4 Zellen pro Vertiefung.

Die Effektorzellen werden in einer 1:2 Verdünnungsserie (je 6 Löcher) in einer 96 Loch-U-förmigen Mikrotiterplatte ausgesät (Endvolumen 100 μl /Loch). Zu je drei

Löchern der verschiedenen Verdünnungen der Effektorzellen werden die Zielzellen hinzu gegeben (10^4 Zellen/100 μ l; EXP). Die spontane LDH-Freisetzung der Effektorzellen jedes Verdünnungsschrittes wird, für die Korrektur des ermittelten Absorptionswertes, bei einem entsprechenden Zielzell/Effektorzell-Verhältnis in Abwesenheit der Zielzellen ermittelt (EFZ). Weiterhin ist die spontane LDH-Freisetzung der Zielzellen (SFZ) und die maximale LDH-Freisetzung der Zielzellen (MFZ), die durch Zelllyse mittels 20 μ l einer 9% (v/v) Triton-X-100-Lösung hervorgerufen wird, sowie die LDH-Aktivität des Mediums mit (VCC) und ohne Triton-X-100 (CMB), zu ermitteln. Nach 4 h bzw. 6 h im CO_2 -Inkubator werden die Zellen zentrifugiert, 50 μ l der Überstände für die LDH-Messung abgehoben und in eine Mikrotiterplatte überführt. Ihnen werden 50 μ l eines Farbreagens, welches NAD^+ , Lactat Iodotetrazodiumchlorid (INT) und Diaphorase enthält zugegeben. Dabei finden folgende Reaktionen statt:



Diese Umsetzung dauert je nach LDH-Konzentration 20-30 Minuten. Sie muss lichtgeschützt stattfinden und wird mit 50 μ l einer 1mol/l (v/v) Essigsäure gestoppt. Die Absorption wird bei einer Wellenlänge von 490 nm mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm in einem ELISA-Platten-Photometer (Anthos ht ??) detektiert.

Der Absorptionswert der maximalen LDH-Freisetzung der Zielzellen wird durch die LDH-Aktivität des Mediums mit Triton-X-100 (VCC) korrigiert, alle anderen Absorptionswerte durch die LDH-Aktivität, die von dem Medium allein hervorgerufen wird (CMB). Die spezifische Zelllyse kann durch folgende Formel berechnet werden.

$$\% \text{ spez. Zelllyse} = \frac{(\text{EXP} - \text{SFE} - \text{SFZ})}{(\text{MFZ} - \text{SFZ})}$$

2.2.2 RNA und DNA-Analytik

2.2.2.1 RNA-Extraktion aus Zelllinien

Die Verwendung des TrizolTM Reagenz (Gibco BRL) beruht auf einer Weiterentwicklung der Einschnitt-RNA-Isolierung nach Chomczynski und Sacchi (1987). Es handelt sich um eine gebrauchsfertige, monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisoithiocyanat, die während des Homogenisierens und der Lyse der Zellen die Integrität der RNA schützt, obwohl die Zellen und ihre Organellen zerstört werden.

Die bei -80°C gelagerten Proben werden 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe zu ermöglichen. Die Proben werden mit 200 μ l Chloroform gemischt, 15 s geschüttelt und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zentrifugation (12000 Upm, 4°C , 15 min) wird die wässrige Oberphase mit 500 μ l Isopropanol versetzt. Die RNA wird durch Inkubation (10 min) der Proben und anschließende Zentrifugation (12000 Upm, 4°C , 10 min) präzipitiert. Anschließend wird mit 75 % (v/v) Ethanol gewaschen, im Thermoblock getrocknet, die DNA in DEPC behandelten Aqua dest.

aufgenommen und nach photometrischer Konzentrationsbestimmung bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 RNA-Extraktion aus Gewebe

Das bei -80°C gelagerte Gewebe werden grob mit dem Skalpell zerkleinert und nach Abkühlung im flüssigem Stickstoff mit einem Mikrodismembrator (1 Minute 2000 Upm) zerkleinert. Es wird dann in 1 ml TlzoI™ Reagenz homogenisiert. Die Extraktion der RNA erfolgt dann wie unter 2.2.2.1 beschrieben.

2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurenlösungen

Zur genauen Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wird die Absorption von UV-Strahlen der Wellenlänge 260 und 280 nm durch die Nukleinsäurelösung im Spektralphotometer (Spektrometer Bio UV/VIS, Perkin-Elmer) gemessen. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ beträgt bei einer Wellenlänge von 260 nm für RNA und einzelsträngige DNA 25 cm²/mg, für doppelsträngige DNA 20 cm²/mg und für Oligonukleotide 30 cm²/mg. Die Konzentration der RNA errechnet sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz: $c = E \times 1/\epsilon \times 1/d \Rightarrow OD_{260nm} \times VF \times 0,04 = \text{mg RNA/ml}$ (VF= Verdünnungsfaktor).

Das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm ist ein Indikator für die Reinheit der Nukleinsäure und liegt bei optimaler Reinheit der DNA bei 1,8 und bei 2,0 bei RNA.

2.2.2.4 cDNA-Synthese

Nach Denaturierung der RNA (1 µg oder 5 µg, 5 min, 90°C, dann Abkühlung auf Eis) erfolgt die Transkription unter Verwendung unspezifischer Random-Primer und MuLv-Reverse Transkriptase (RT) im Thermo-Cycler (MWG Biotech; 25°C, 10 min, 42°C, 45 min, 95°C, 5 min). Der 20 µl-Reaktionsansatz enthält folgende Komponenten: 1x PCR-Puffer [50 mmol/l KCl; 1,5 mmol/l MgCl₂ und 10 mmol/l Tris/HCl; pH 9,0], 7,5 mmol/l MgCl₂, 0,1 mg/ml BSA (RNase/DNase-Free, Pharmacia), 15 mmol/l DTT, 1 mmol/l dNTPs, 1U/µl RNasin®, 1 nmol/µg RNA Oligo-d (T)15 und 9,5 U MuLv-RT.

2.2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktion wird in 50 µl-Ansätzen durchgeführt und enthält 5 µl (1:5 Verdünnung) der cDNA, 1x PCR-Reaktionspuffer [500 mmol/l KCl, 15 mmol/l MgCl₂, 100 mmol/l Tris/HCl, 50% (v/v) Glycerol, pH 9,0], dNTP's, 5' und 3' Primer (Interaktiva, Pharmacia) und Taq-Polymerase. 2,5 U der Taq-Polymerase [in 50 mmol/l Tris/HCl, 0,1 mmol/l EDTA, 5 mmol/l DTT, 50% (v/v) Glycerol, pH 7,5] wird als „HOT-Start“ während der Denaturierung der DNA hinzu gegeben.

Alle PCR Reaktion beginnen mit einer Denaturierung bei 94°C (10 min) und werden mit einer Inkubation von 8 Minuten bei 72°C beendet.

Überprüfung der cDNA-Qualität

Die cDNA-Quantität wurde durch Amplifikation der DNA des β -Aktin-Gens oder des GAPDH-Gens überprüft. Die β -Aktin-Primer umfassen eine 206 bp große Intronsequenz, so dass bei Amplifikation der genomischen DNA ein Transkript aus 652 bp entsteht. Durch Amplifikation der cDNA entsteht ein 446 bp großes Fragment, so dass die Zusammensetzung der Probe an genomischer DNA und cDNA abgeschätzt werden kann.

Für die GAPDH-PCR werden 0,8 µmol/l (40 pmol) der 5' und 3' Primer und 250 µmol/ dNTP's, für die β-Aktin-PCR je 0,4 µmol/l (20 pmol) der Primer und 150 µmol/l dNTP's eingesetzt.

Gen		Sequenz	Position in der cDNA
GAPDH	5' :	5'-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAACG	339-362
	3' :	5'-GGCAGAGATGATGACCCTTTTGGC	8-29
β-Aktin	5' :	5'-AGAGATGGCCACGGCTGCTT	1142-1161
	3' :	5'-ATTTGCGGTGGACGATGG	716-735

GAPDH-PCR-Bedingungen:			β-Aktin PCR-Bedingungen:		
Denaturierung:	94°C	1 min	Denaturierung:	94°C	1 min
Annealing:	60°C	1 min	Anneling:	62°C	1 min
Polymerasereaktion:	72°C	1 min	Polymerasereaktion:	72°C	1 min
Zyklenanzahl:	27		Zyklenanzahl:	27	

CD44s-PCR

Die Primer (0,2 µmol/l), die bei der CD44s-PCR verwendet werden, sind komplementär zu den flankierenden Bereichen der varianten Region im Standard, so dass alle CD44-Transkripte (CD44v+CD44s) amplifiziert werden. Das CD44-Standard-Transkript umfasst 445 bp, die Varianten sind entsprechend der zusätzlich amplifizierten Exons größer. Das größte mögliche CD44-Transkript, welches alle varianten Exons enthält (CD44v2-v10, Maximalvariante), umfasst 1588 bp. Für die PCR werden dNTPs mit einer Konzentration von 125 µmol/l eingesetzt.

Gen		Primersequenz	Position
CD44s+v	5' :	5'-CAGACCTGCCCAATGCCTTTGATGGACC	513-540
	3' :	5'-CAAAGCCAAGGCCAAGAGGGATGC	934-958

PCR-Bedingungen :		
Denaturierung:	94°C	1 min
Anneling:	59°C	1 min
Polymerasereaktion:	72°C	2 min 30s
Zyklenanzahl:	35	

Nachweis der Transkription des chimären Rezeptors durch PCR

Die Primer (0,8 µmol/l) sind so gewählt, dass der 5'Primer in der c-myc-Region und der 3'Primer im Bereich der Zeta-Kette bindet und ein 276 bp Transkript amplifiziert wird. Für die PCR werden dNTPs mit einer Konzentration von 250 µmol/l eingesetzt.

Bereich des chimären Rezeptor		Primersequenz
c-myc-Region Zeta-Kette	5' :	5'-TCTCCGAAGAAGATCTGAACC
	3' :	5'-AGGGCTGTGATGATGACTCC

PCR-Bedingungen :		
Denaturierung:	94°C	1 min
Anneling:	62°C	1 min
Polymerasereaktion:	72°C	1 min
Zyklenanzahl:	29	

Quantitative PCR zur Bestimmung der CD44-Genexpression

In einem Multiplex-Ansatz wird die CD44-Gesamtexpression im Vergleich zum *GAPDH*-Referenzgen, welches ubiquitär in jedem Gewebe gleich stark exprimiert wird, ermittelt. Für die Quantifizierung der Amplifikationsprodukte durch einen DNA-Sequenzierer ist je ein Primer der Primerpaare am 5'-Enden Cy5-(Fluorescein)-markiert. Die CD44-Primer sind so gewählt, dass Exons (Exon 4, Position 432-453 und Exon 5, Position 690-669), die Bereiche der extrazellulären Domäne kodieren, welche in allen CD44-Isoformen enthalten sind, amplifiziert werden.

2 µl des 1:5 verdünnten Erststrang-cDNA-Synthese-Ansatzes werden in Gegenwart von 50 mmol/l KCl, 1,5 mmol/l MgCl₂ und 10 mmol/l Tris/HCl (pH 9,0), 600 µmol/l dNTPs, je 150 µmol/l der Primer und 2,5 U DNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50 µl amplifiziert. Die Amplifikation des CD44-Transkripts erfolgt über 30 Zyklen (94 °C, 1 min, 61 °C, 1 min, 61 °C, 1 min, 72 °C, 8 min), während die Amplifikation des *GAPDH*-Transkripts über 27 Zyklen erfolgt, die nach der Primer-drop-in Methode nach dem 3 Zyklus, dem Reaktionsansatz hinzugegeben werden.

Gen	Sequenz	Fragmentlänge (bp)
GAPDH	5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3' * 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'	195
CD44	5'-GCCCAATGCCTTTGATGGACC-3' * 5'-GCAGGGATTCTGTCTGTGCTG-3'	257

*-Cy5-Markierung

2.2.2.6 Analyse der PCR-Produkte mittels automatischen DNA-Sequenzierer(A.L.F.)

Die Fluoreszenz-markierten DNA-Fragmente (Cy5-markiert) werden in einem vertikalem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch einen Helium-Neon-Laser des DNA-Sequenzierer (A.L.F., Pharmacia, Biotech) angeregt. Die Detektion der emittierten Strahlung erfolgt bei einer Wellenlänge von 632,8 nm durch Photodioden senkrecht zur Achse des Lasers.

Die gemessene Strahlung wird durch die EDV erfasst und kann mit Hilfe des Programms „Fragment Manager“ (Pharmacia, Biotech) zur Quantifizierung des entsprechenden PCR-Fragments genutzt werden.

Gelzusammensetzung:

9 ml Monomerenlösung [29% (w/v) Acrylamid, 1% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid]

25,2 g Harnstoff

1 Spatellöffel Amberlite (Ionenaustauscher)

6 ml 6x TBE [0,53 mol/l Tris, 0,53 mol/l Borsäure, 0,015 mol/l EDTA, pH 8,0]

0,2 ml 10 % (w/v) APS

40 µl TEMED

A.L.F.- Probenpuffer

100 ml Formamid

600 µg Dextranblau

4 ml 20 mmol/l EDTA, pH 8,3

Elektrophoresebedingungen:

Max. Spannung 1500 V

Max. Stromstärke: 34 mA

Max. Leistung: 38 W

Temperatur: 40°C

Laufpuffer:

0,6x TBE [53 mmol/l Tris, 53 mmol/l Borsäure, 1,5 mmol/l EDTA, pH 8,0]

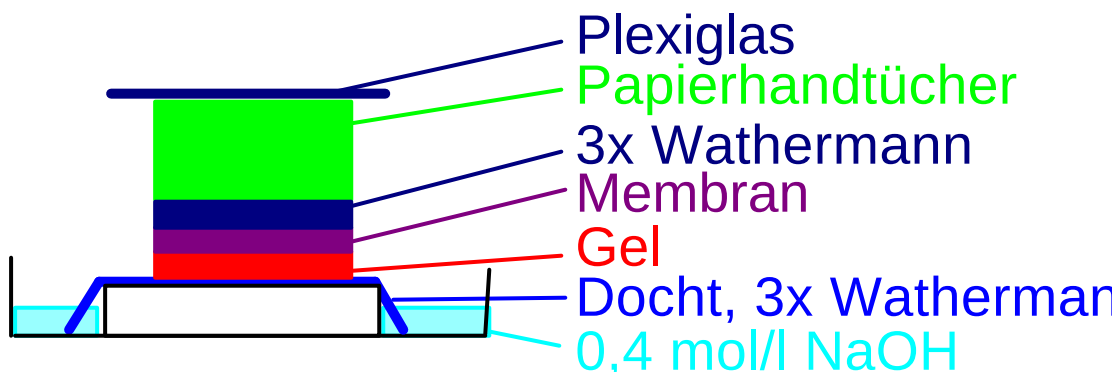
2.2.2.7 Analyse von DNA in der Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente werden 1-2 % (w/v) Agarosegele verwendet. Die Agarose wird in TBE-Puffer [89 mmol/l Tris, 89 mmol/l Borsäure, 2 mmol/l EDTA, pH 8,0] in der Mikrowelle durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlung auf ca. 60°C in eine Flachbett-Gelapparatur (Gibco BRL) gegossen. Die DNA-Proben werden im Verhältnis 1:2 mit Probenpuffer [7 mol/l Harnstoff, 40 % (v/v) Glycerin, 50 mmol/l EDTA, 10 mmol/l Tris, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau] versetzt und in die Geltaschen transferiert. Als Laufpuffer dient TBE-Puffer. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Stromstärke von 20-100 V. Anschließend werden die Gele 30 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) inkubiert. Die DNA kann aufgrund des intercalierenden Ethidiumbromids durch UV-Bestrahlung visualisiert werden.

2.2.2.8 Alkalischer Southern-Blot

Der Vorteil des alkalischen Southern Blot gegenüber dem klassischen Southern Blot ist, dass keine Vorbehandlung des Gels für die Depurinierung, Denaturierung und Neutralisation nötig ist, da die Schritte während des alkalischen Transfers erfolgen (Chomczynski und Quasba, 1984, Reed und Mann, 1985).

Für den Transfer der DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Boehringer, Mannheim) wird 0,4 mol/l NaOH als Laufpuffer verwendet. Der Laufpuffer wird durch auftretende Kapillarkräfte aus dem Vorratsgefäß gesogen (siehe Abbildung).



Nach dem Transfer (über Nacht) wird die Membran mit 2x SSC [0,3 mol/l NaCl, 0,03 mol/l Natriumcitrat] neutralisiert und durch Erhitzen auf 120°C die DNA mit der Membran vernetzt.

2.2.2.9 Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgt mit einem nicht-radioaktiven DIG-System, bei dem Digoxigenin-gelabelte Sonden verwendet werden. Diese Sonden werden unter Gebrauch von DIG-11-dUTPs in einer PCR-Reaktion hergestellt. Die an die DNA-Transkripte gebundenen Sonden können dann mit einem Anti-DIG-alkalische-Phosphatase-gekoppeltem Antikörper und anschließender Umsetzung von NBT/BCIP in einen blauen Farbkomplex detektiert werden.

Die Sonden werden mit dem „PCR DIG-Proben Synthese Kit“ (Boehringer, Mannheim) hergestellt. Als DNA-Template für die PCR-Amplifikation der verschiedenen CD44v-Exon-spezifischen Sonden dient 1 µg (5 µl) eines aufgereinigten Plasmids (pT7T3-S), in welches CD44v3-v10 kloniert wurde. In der PCR-Reaktion werden DIG-markierte und unmarkierte dUTP im Verhältnis 1:1 eingesetzt, die PCR-Bedingungen und Primer für die Amplifikation der Exon-spezifischen Sonden sind in der Tabelle zusammengefasst.

Primer (nach Hofmann et al., 1991):

Gen		Sequenz	Position
CD44v3	5' : 3' :	5'-GCAGGCTGGGAGCCAAATGGAGAA 5'-ATCTTCATCATCATCAATGCCTGA	24-54 81-110
CD44v6	5' : 3' :	5'-ATCCAGGCAACTCCTAGTAGTACA 5'-TGTCCCTGTTGTCTGAATGGGAGTC	357-383 456-482
CD44v8	5' : 3' :	5'-ATGGACTCCAGTCATAGTACAACG 5'-GTTGTCATTGAAAGAGGTCCTGTC	621-647 692-718
CD44v10	5' : 3' :	5'-TGATAAGGAACGATTGACATTAGA 5'-TAGGAATGATGTACAGGTGGAAG	812-838 987-1013

PCR-Bedingungen:

Substanz	Volumen [µl]	PCR-Bedingungen:		
H ₂ O	26,25	Denaturierung:	94°C	1 min
10x Reaktionspuffer	5	Anneling:	59°C	1 min
5' Primer	4,0 (40 pMol)	Polymerasereaktion:	72°C	30 s (v3,v6), 1 min (v10)
3' Primer	4,0 (40 pMol)	Zyklenanzahl:	25	
dNTP's	5,0 (200 µMol)			
Template DNA	5,0 (1 µg)			
Enzym-Mix	0,75 (2,6 U)			

Die PCR-Produkte werden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Je 4 Banden à 10 µl werden ausgeschnitten und die DNA-Fragmente aus dem Gel unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) eluiert.

Nach der Elution (2.2.3.3) werden 4x 30 µl Eluat (Sondenkonzentration von 5-25 ng/ml) in 20 ml Hybridisierungspuffer (DIG Easy Hyb, Boehringer Mannheim) aufgenommen.

Hybridisierung und Farbreaktion

Für Hybridisierung werden verschiedene Fertiglösungen der Firma Boehringer, Mannheim verwendet (DIG Easy Hyb, DIG Wasch und Block Puffer Set und NBT/BCIP ready to use Tabletten), da mit ihnen die geringsten Hintergrundreaktionen beobachtet wurden.

Die einzelnen Hybridisierungsschritte erfolgen unter Rotation in Hybridisierungsröhrchen im Shake´N´Stack-Inkubator (Hybaid). Alle Angaben für die Hybridisierung beziehen sich auf 100 cm² Membranfläche.

Die Nylonmembran mit den vernetzten DNA-Fragmenten wird mit 50 ml 2x SSC bei 68°C für 10 Minuten inkubiert. Die Membran wird mit 20 ml Hybridisierungspuffer (DIG Easy Hyb) 1-2 h bei 69°C prähybridisiert. Für die Hybridisierung wird die Sonde bei 95°C (10 min) denaturiert und dann mit der Membran über Nacht bei 68°C inkubiert.

Die Membran wird mit 50 ml 0,1% SDS in 2x SSC, mit 0,1% (w/v) SDS in 0,1x SSC und dann mit Waschpuffer bei Raumtemperatur gewaschen. Vor der Antikörperreaktion wird die Membran durch Inkubation (30 min) mit 100 ml Blockierlösung vorbereitet und dann mit 20 ml Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragment (150 mU/ml in Blockierlösung) inkubiert. Die Membran wird erneut zweimal mit Waschpuffer gewaschen und mit 20 ml Detektionspuffer für 2 Minuten äquilibriert. Bei der Farbreaktion wird NBT/BCIP durch die alkalische Phosphatase zu einem

blauem Farbkomplex umgesetzt. Die Farbreaktion wird durch Zugabe von Aqua dest. gestoppt.

Nach Dokumentation der Farbreaktion (HP Scanjet IIP) wird der Farbniederschlag durch Inkubation mit N,N-Dimethylformamid bei 60°C entfernt. Die Membran wird mit Aqua dest. gewaschen und die Sonde bei 37°C durch die Striplösung entfernt. Anschließend wird die Membran mit SSC neutralisiert und steht nun für weitere Hybridisierungsreaktion zur Verfügung.

2x SSC:

0,3 mol/l NaCl, 0,03 mol/l Natriumcitrat

0,1x SSC:

0,15 mol/l NaCl, 1,5 mmol/l Natriumcitrat

Maleinsäurepuffer:

0,1 mol/l Maleinsäure, 0,15 NaCl, pH7,5

Blockierlösung:

1% (v/v) Blockierreagenz in Maleinsäurepuffer

Waschpuffer:

0,3% (v/v) Tween® in Maleinsäure-Puffer

Detektionspuffer:

0,1mol/l Tris/HCl, 0,1mol/l NaCl, 0,05 mol/l MgCl, pH 9,5

Farbreagenz:

0,4 mg/ml Nitroblautetrazoliumchorid (NBT), 0,19 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-inolyl-Phosphat, ToluidinSalz (BCIP), 100 mmol/l Tris/HCl 50 mmol/l MgSO₄

Striplösung:

0,2 mol/l NaOH, 0,1 (v/v) SDS

2.2.3 Vektorklonierung

2.2.3.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die Spaltungen werden in den von den Herstellern angegebenen Pufferlösungen in 20 µl Gesamtvolumen durchgeführt. In der Regel werden 2 U Enzym pro µg DNA eingesetzt und 2 h bei 37°C inkubiert.

2.2.3.2 Dephosphorylierung von Vektoren

Die Abspaltung der 5' Phosphatreste der Vektoren erfolgt durch Zugabe von 1 µl (= 15 U) alkalischer Phosphatase (1 h bei 37°C) nach Abschluss des Restriktionsverdaus, um ihre Religation zu vermeiden.

2.2.3.3 Elution von DNA-Proben aus Agarosegel

Das gewünschte PCR-Fragment wird nach Ethidiumbromidfärbung durch eine schwache Aufsichtbestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Die Elution erfolgt mittels des QIAquick-Gel-Extraktions-Kits (Qiagen), welches eine pH-Wert abhängige DNA-Bindung an eine Silikagelmembran ausnutzt.

Die DNA wird dabei bei hoher Salzkonzentration und einem pH-Wert ≤7,5 an eine Silika-Membran gebunden. Dafür werden 3 Gelvolumen Puffer QG (Zusammensetzung der Puffer von Hersteller nicht angegeben) zu den Gelstücken gegeben und 10 Minuten bei 50°C inkubiert. Der Lösung wird dann ein Gelvolumen Isopropanol hinzugefügt, bevor sie auf die Silikagelmembran übertragen wird. Nach kurzer Zentrifugation (13000 Upm, 1 min) wird die Säule mit 750 µl Puffer PE gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Elution erfolgt bei

niedrigen Salzkonzentrationen durch pH-Wert-Änderung (pH 8,5) mit 30 µl Elutionspuffer.

2.2.3.4 Ligation von DNA

DNA-Fragmente, die in einer Ligrationsreaktion verwendet werden sollen, werden durch Elution aus dem Agarosegel gereinigt. Die Fragmente werden in einem 20 µl-Ligationsansatz zu unterschiedlichen Anteilen vermischt, das Konzentrationsverhältnis von Vektor zu Insert sollte zwischen 1:2 und 1:20 liegen. Zu ihnen werden weiterhin 2 µl 10x Puffer und 1 U der T4-DNA-Ligase gegeben. Der Ansatz wird 2 h bei RT inkubiert und anschließend die Ligase durch 10 Minuten Inkubation bei 60°C inaktiviert. 1-4 µl Ligationsansatz werden dann in 40 µl E.coli- Bakterien (DH5αF) transformiert.

2.2.3.5 Präparation kompetenter Zellen

Eine 50 ml-Kultur des E.coli-Stammes (DH5α, Hanahan, 1983) wird bei 37°C herangezogen bis die Bakteriensuspension eine OD₆₀₀ von ca. 600 erreicht hat. Die Kultur wird im Eisbad abgekühlt und die Bakterien durch Zentrifugation (4000 g, 10 min, 4°C) sedimentiert. Die Bakterien werden zweimal mit kaltem Aqua dest. (500 ml, 250 ml) und einmal mit 10 ml kalten 10 % (v/v) Glycerin gewaschen. Anschließend werden die Bakterien 1,5 ml 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen. Die Lagerung erfolgt bei -80°C in 40 µl Aliquots.

2.2.3.6 Elektroporation

Die kompetenten Zellen werden auf Eis mit 1 µg des Plasmid bzw. 5 µl des Ligationsansatzes gemischt. Die Elektroporation erfolgt bei 2,5 kV, 250 µF, 200 Ω und einer Zeitkonstanten von ca. 4,0 (GenePulser, Bio-Rad). Nach erfolgtem Puls werden die Zellen in 1 ml LB-Medium suspendiert. Sie werden dann 1 h bei 37°C geschüttelt, abzentrifugiert und anschließend auf LB-Amp-Platten (2% (w/v) Agar) ausplattiert und über Nacht bei 37°C herangezogen (Wirth, 1989).

LB-Medium

1 % (w/v) Trypan
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
0,5 % (w/v) NaCl

2.2.3.7 Isolierung von Plasmid DNA („Mini-Präp“)

Ampicillin-resistente Bakterienkolonien werden in einer 2 ml Übernachtskultur (50 mg/ml Ampicillin) bei 37°C unter Schütteln herangezogen. 1,5 ml dieser Kultur werden in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Bakterien durch Zentrifugation (800 Upm, 5 min) sedimentiert. Der Überstand wird abgehoben und die Zellen in 100 µl Glukoselösung (50 mmol/l Glucose, 10 mmol/l EDTA und 25 mmol/l Tris/HCl, pH 8,0) aufgenommen. Die Zellen werden vorsichtig mit 200 µl Lysispuffer (0,2 mol/l NaOH, 1 % (w/v) SDS) gemischt, bis die Lösung klar ist und 5 Minuten inkubiert. Anschließend werden die Proben mit 150 µl kalter Kaliumacetat-Lösung (5 mmol/l Kaliumacetat, pH 4,8) vermischt, bis die Proteine ausfallen, 10 Minuten auf Eis inkubiert und die chromosomale DNA gemeinsam mit unlöslichen Zellbestandteilen durch Zentrifugation (10000 Upm, 15 min) sedimentiert. Der Überstand wird abgehoben, mit 96% (v/v) Ethanol versetzt, 30 Minuten bei -20°C präzipitiert und durch Zentrifugation (10000 Upm, 10 min)

sedimentiert. Das DNA-Pellet wird mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in 30 µl TE-Puffer (1 mol/l Tris, 0,1 mol/l EDTA, pH 8,0) aufgenommen.

2.2.3.8 Aufreinigung von Plasmid-DNA durch Säulen

Für die Elektroporation wird die Plasmid-DNA mittels GFX Micro-Plasmid-Prep-Kit (Amersham Pharmacia, Biotech) aufgereinigt. 1,5 ml einer 2 ml Übernachtskultur werden in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Bakterien durch Zentrifugation (800 Upm, 5 min) sedimentiert. Der Überstand wird abgehoben und die Zellen in 150 µl Lösung ? (400 µg/ml RNase ?; 10 mmol/l EDTA und 100 mmol/l Tris/HCl, pH 7,5) suspendiert. Die Zellen werden vorsichtig mit 150 µl Lösung ?? (1 mol/l NaOH; 5,3 % (w/v) SDS) lysiert. Anschließend werden die Proben mit 300 µl Lösung ??? (enthält Acetat und Chaotrope, genaue Zusammensetzung von Hersteller nicht angegeben) neutralisiert und durch Zentrifugation (10000 Upm, 15 min.) pelletiert. Der Überstand wird auf die GFX-Säule übertragen und 1 Minute bei RT inkubiert, um die Plasmid-DNA-Bindung an der Glasfiebermatrix zu ermöglichen. Die Säule wird 30 Sekunden bei 12000 Upm zentrifugiert mit 300 µl Lösung ??? und anschließend mit 400 µl Waschpuffer (Tris-EDTA-Puffer in 80 % (v/v) Ethanol) gespült. Die Plasmid-DNA wird durch 100 µl TE-Puffer (1 mol/l Tris; 0,1 mol/l EDTA, pH 8,0), mit anschließender Zentrifugation eluiert.

2.2.4 Retrovirale Arbeiten und Transfektion von Säugerzellen

2.2.4.1 Elektroporation von Säugerzellen

Die trypsinisierten Zellen werden einmal mit Kulturmedium und einmal mit PBS gewaschen. Dann wird die Zellzahl auf $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Von aufgereinigten Vektor-DNA (2.2.3.8) werden 10-30 µg (= 30 µl) in eine Elektroporationsküvette vorgelegt und langsam mit 400 µl der Zellsuspension vermischt. Die Elektroporation erfolgt bei Raumtemperatur in einem Bio-Rad-Genpulser mit Kapazitätserweiterungseinheit. Für alle Pulse wurde eine Kapazität von 500 µF gewählt und die Initialspannung (V_0) betrug 300 V.

Die Küvette wird dann 2 x mit je 1 ml Medium ausgespült und die Zellen in eine Schale mit 10 cm Durchmesser, die 8 ml nichtselektives Medium enthält, ausgesät. Aus dieser Schale wird 1 ml in eine weiter 8 ml Medium enthaltende Schale überführt, um bei einer hohen Transformationsrate einzelne Klone ernten zu können. Nach 24 h erfolgt die Selektion mit selektiven Medium, welches 1 mg/ml G418 enthält. Wenn die Nährstoffe verbraucht sind (Farbumschlag von rot nach gelb), wird das Medium nach 5-7 Tagen ersetzt. Resistente Klone erscheinen nach 10-14 Tagen.

2.2.4.2 Transfektion der Verpackungszellen durch FuGENE™-Transfection-Reagenz

Bei dem FuGENE™-Transfection Reagenz (Boehringer, Mannheim) handelt es sich um ein nicht-liposomale Form eines Transfektions-Reagenz. Die Zusammensetzung wird von Hersteller jedoch nicht angegeben. Für die Transfektion werden 3×10^5 Verpackungszellen in 2 ml in eine 6 Lochplatten ausgesät, die nach 24 h eine Konfluenz von 50-70% erreichen. 3 µl FuGENE Reagenz werden mit 97 µl Serum-freiem Medium gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Lipidkomplexbildung zu gewährleisten. Das Gemisch wird tropfenweise zu 1 µg Vektor-DNA gegeben, sachte angetippt und 15

Minuten inkubiert. Anschließend wird das DNA/Lipid-Gemisch tropfenweise zu den Zellen gegeben und durch Schwenken verteilt. Nach 24 h wird das Medium durch selektives Medium (1 mg/ml G418) ersetzt.

2.2.4.3 Isolation von Klonen durch Trypsin-Agarose-Technik

Nach 14 Tagen Selektion sind die einzelnen Zellklone, die das Neomycinresistenzgen stabil integriert haben, auf etwa 50-500 Zellen pro Cluster herangewachsen. Die einzelnen Klone werden bei Ansicht im Umkehrmikroskop gekennzeichnet und nach Entfernung des Mediums und einmal mit PBS gewaschen. Eine sterile 3% (v/v) Agar/PBS-Lösung wird bei 100°C verflüssigt. Von dieser Lösung werden 2 ml mit 4 ml Trypsin/EDTA-Lösung (ca. 20°C) vermischt und sofort auf die Zellen gegeben. Die Zellen werden durch Trypsin/EDTA abgelöst und gelangen in den schnell erstarrenden Agar. Mit dem Skalpell werden nun die gekennzeichneten Bereiche, in denen sich einzelne Klone befinden ausgeschnitten und in die mit Medium gefüllten Vertiefungen einer 24-Loch-Platte überführt. Die Zellen lösen sich teilweise aus dem Agar und wachsen zu einzelnen Klonen heran, deren retrovirale Titer bestimmt werden.

2.2.4.4 Virusproduktion und Ernte

Selektionierte Virus-produzierende Zellen werden in Schalen (10 cm) zu 50% Konfluenz (in Medium ohne G418) ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert. Danach wird das Medium erneuert. Nach 24-48 h wird der Kulturüberstand abgenommen und für die Entfernung im Medium schwimmender Zellen durch eine 0,2 µm Membran filtriert. Der Überstand kann nun für die Infektion von NIH/3T3-oder T-Zellen verwendet werden

2.2.4.5 Retrovirale Titerbestimmung mit NIH/3T3 Fibroblasten

Die Bestimmung des retroviralen Titers erfolgt anhand der Übertragung des Neomycinresistenzgens auf NIH/3T3 Zellen. 2×10^4 NIH/3T3 Zellen werden in 2 ml Medium in eine 6-Lochplatte pipettiert. Am 2. Tage erfolgt die Infektion durch Zugabe von 100 µl eines 1:10-1:1000 verdünnten viralen Überstand und 4 µg/ml Polybren (Hexadimethrinbromid). Nach 5 h wird das Medium erneuert und die Zellen 2 Tage mit normalem Medium inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit 1 mg/ml G418 enthaltendem Medium selektioniert. Das Selektionsmedium wird nach 4 Tagen erneuert, die nicht infizierte Selektionskontrolle darf keine Zellen mehr enthalten. Die Zellen werden mit PBS gewaschen, mit einer 3% (v/v) Formaldehyd/PBS-Lösung fixiert und getrocknet. Durch Färbung (15 min) mit 1 ml Kristallviolett (1 mg/ml in PBS) und anschließendem Waschen mit Wasser werden die Zellen sichtbar gemacht. Die Anzahl der resistenten Kolonien wird ausgezählt. Von jeder Probe wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Virustiter werden als cfu/ml (Cluster Forming units pro ml) angegeben und berechnen sich nach folgender Formel: $\text{cfu/ml} = \text{ermittelte Clusterzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} / \text{Volumen [ml]}$. Die Klone mit den höchsten retroviralen Titern (ca. 1×10^5) werden für die Infektion der T-Zellen verwendet.

2.2.4.6 Infektion der T-Zellen mit retroviralem Überstand

1×10^6 CI96-T-Zellen werden mit Infektionsmedium, das zu gleichen Teilen Kulturüberstand der Verpackungszelllinie und frisches CI96-Medium, sowie 1000 U/ml Proleukin und 2 µg/ml Polybren enthält, für 24 h in einer 6-Lochplatte inkubiert. Die Zellen werden dann abzentrifugiert und in Selektions-Medium (800

µg/ml G418) aufgenommen. In der Selektionskontrolle sind nach ca. 8 Tagen alle Zellen abgestorben.

2.2.4.7 Retrovirale Infektion der T-Zellen durch Kokultivierung mit WE-Verpackungszellen

Ein infektiöser Klon der transfizierten Ω E-Verpackungszellen wird 24 h ohne G418 kultiviert und dann geerntet. In eine 12 Loch-Platte werden in 6 Löcher je 1×10^5 Ω E-Zellen in 500 µl Ω E-Medium pipettiert (Transfektionsgruppe). In die andere Hälfte wird nur Medium vorgelegt (nicht transfizierte Kontrollgruppe).

Pro Loch werden 500 µl der primären T-Zellen (ca. $1,6 \times 10^6$) oder CI96-T-Zellen (5×10^5) zu den Verpackungszellen gegeben. Das CI96-T-Zellmedium enthält für eine effiziente Transfektion zusätzlich folgende Agenzien: Proleukin 1000 U/ml, 9 µg/ml Polybrene und für die primären T-Zellen noch zusätzlich 5 µg/ml PHA. Nach 48 h Inkubation bei 37°C werden die T-Zellen vorsichtig abgespült und abgehoben. In der FACS-Analyse wird dann die Transfektionseffizienz überprüft und ein Teil der CI96-T-Zellen in Medium mit 800 µg/ml G418 selektioniert.

2.2.4.8 Isolierung von T-Zellklonen durch Verdünnen

Die durch Kokultivierung infizierten CI96-T-Zellen werden 48 h mit Medium ohne G418 kultiviert. Der Überstand wird vorsichtig abgehoben, um adhärente evtl. noch vorhandenen Verpackungszellen von den T-Zellen abzutrennen. Die CI96-T-Zellen werden nach der Zentrifugation in Selektions-Medium (800 µg/ml G418) aufgenommen und die Konzentrationen auf 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. Es werden je 100 µl in eine 96 Lochplatte pipettiert, nach 5 Tagen erhalten die Zellen 100 µl frisches Selektionsmedium, werden expandiert und nach Absterben der Selektionskontrolle (Wildtyp CI96) einer Expressionsanalyse des chimären Rezeptors unterzogen.

2.2.5 Protein-Analytik

2.2.5.1 Immunhistochemische Untersuchungen

Vorbereitung von Zelllinien für IHC-Untersuchungen

In Quadripermschalen werden auf sterilen Objektträgern 1×10^6 Zellen in 3 ml Medium ausgesät. Bei Erreichen einer Konfluenz von 70% werden die Zellen mit 12,3% (v/v) Formaldehyd/PBS-Lösung (15 min) auf dem Objektträger fixiert. Nach Waschen mit PBS (5 min) werden die Zellen durch Inkubation in Methanol (-20°C, 5 min) und Aceton (-20°C, 1 min) und erneut Waschen mit PBS auf die Färbung vorbereitet. Die Objektträger mit den Zellen können in Aufbewahrungsmedium [250 ml PBS, 42,8 g Sucrose, 0,33 g MgCl_2 , 250 ml Glycerin) nun ca. 6 Monate bei -20°C gelagert werden.

Immunhistochemische Analyse von Gefrierschnitten und Zelllinien

Gefrierschnitte von Gewebe (5 µm Dicke) werden mit Methanol (-20°C, 5 min) und Aceton (-20°C, 1 min) fixiert und mit PBS gewaschen. Die endogenen Peroxidasen der Gefrierschnitte und Zelllinien werden durch ein 1:33 H_2O_2 /Methanol-Gemisch gehemmt. Nach dem Waschen mit PBS (2x) werden unspezifische Bindungen durch Normalserum von Pferd (1:30 in PBS, 10 min) blockiert und erneut mit PBS gewaschen. Der Primär-Antikörper wird über Nacht auf dem Objektträger inkubiert. Für den Nachweis der verschiedenen CD44 Varianten wurden folgend Antikörper verwendet: CD44v6 (VFF18, 5 µg/ml),

CD44v7/8 (VFF17, 10 µg/ml), CD44v10 (VFF16, 1:200, 5 µg/ml) und ein CD44-Standard-Antikörper (SFF2, 10 µg/ml), der gegen eine Domäne, die in allen CD44 Isoformen auftritt gerichtet ist (alle Antikörper von Bender Med Systems). Überschüssiger Antikörper wird mit PBS abgewaschen, der Biotin-konjugierte-sekundäre-Anti-Maus-Antikörper (1:200; DAKO) 30 Minuten mit den Geweben und Zellen inkubiert und erneut mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgt ein Inkubation mit dem Streptavidin-Biotin-Merrettich-Peroxidase-Komplex (ABC-Kit, Vector Laboratories). Nach dem Waschen mit PBS erfolgt die Substratumsetzung des 3,3'-Diaminobenzidins (DAB Peroxidase Substrate Tablet Set, Sigma) durch die Peroxidase. Überschüssiges Substrat wird erneut herunter gewaschen. Es folgt die Kerngegenfärbung nach Mayer mit Hämalaun. Danach werden die Objektträger 1 Minute mit Aqua dest. und 5 Minuten und fließendem Leitungswasser gespült. Die Einbettung des Schnitts bzw. der Zellen erfolgt dann mit Aquamount.

2.2.5.2 Durchflusszytometrische Messung der Oberflächenantigene

In Suspension wachsende Zellen werden durch gründliches Abspülen des Kulturflaschenbodens geerntet; adhärend wachsende Zellen werden mit einer EDTA/PBS-Lösung (2g/l) abgelöst und zentrifugiert (5 min, 1000 Upm). 5×10^5 lebende Zellen werden in FACS-Puffer [3% (v/v) FCS in PBS] im FACS-Röhrchen resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wird abgehoben und die Zellen 15 Minuten auf Eis mit 5 µg/ 50 µl-FACS-Puffer des Primärantikörpers inkubiert. Nicht-gebundener Antikörper wird durch Waschen mit FACS-Puffer entfernt. Proben mit unmarkiertem Antikörper werden mit 50 µl FITC-markiertem Sekundärantikörper (1:100) 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift werden die Zellen, die mit dem Anti-c-myc-Antikörper bzw. mit dem Isotyp-Kontroll-Antikörper für die Expressionsanalyse des chimären Rezeptors behandelt werden, 10 Minuten mit 50 µl Propidiumiodidlösung (1 µg/ml) inkubiert, um tote Zellen anzufärben. Durch die Messung der lebenden Zellen werden Kreuzreaktionen des Antikörpers mit murinem intrazellulärem c-myc-Protein ausgeschlossen. Alle nicht-Propidiumiodid-gefärbten-Zellen werden mit 300 µl einer 0,5% (v/v) Formaldehydlösung fixiert. Die Propidiumiodid-gefärbten Zellen werden erneut gewaschen und dann in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen.

Antigen	Antikörper Klon	Isotyp	Bezugsquelle	Kopplung
Sekundär-Ak Anti Maus-IgG	Polyklonal	Kaninchen	Dianova	FITC
Isotypkontroll-Ak	107,3	IgG1,κ	Pharmingen	-
Isotypkontroll-Ak	MOPC-21	IgG1,κ	Pharmingen	-
c-myc	9E10	IgG1,κ	Calbiochem	-
CD44v7/8	VFF-17	IgG2b	Bender Med Systems	-/FITC
CD44v6	VFF-18	IgG2b	Bender Med Systems	-
CD8	KT15	IgG2a	Immunotech	FITC
CD4	KT6	IgG2a	Immunotech	PE
Fas	DX2	IgG1,κ	Pharmingen	FITC

Die durchflußzytometrische Analyse erfolgte in einem Epics Elite Cytometer. Zur graphischen Darstellung und Auswertung der Daten wurde WinMDI 2.8 (Windows multiple document interface flow cytometry application) verwendet.

2.2.6 Adoptive Immunisierung von Nacktmäusen mit den gentechnologisch modifizierten T-Zellen

Den BALB/c Nacktmäusen (10-12 Wochen, weiblich, Charles River, Sulzfeld) werden subkutan 4×10^5 lebende ME-180-Zellen in beide Flankenseiten injiziert. Bei einer Tumorgroße von 30-50 mm³ beginnt die Behandlung der Tiere. Die T-Zellen werden geerntet, zentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen bevor sie in PBS aufgenommen werden. Die Behandlung der Tiere erfolgt über 7 Tage. Dafür werden den Tieren je 130 µl PBS oder CI96-Wildtyp mit 1×10^5 Proleukin oder 1×10^6 gentechnologisch modifizierten CI96-Zellen mit 1×10^5 Proleukin (Endvolumen 130 µl) intratumorale injiziert. Die Tumorgroße wird mit der Schieblehre (Mitutoyo) über 20 Tage gemessen und nach der Formel: Länge x (Breite)² x 0,5 (Arteaga et al., 1993) berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung der CD44-Expression in gynäkologischen Tumoren

3.1.1 CD44-Expression in Endometriumkarzinomen und endometrialen Normalgeweben

Eine Voraussetzung für die Entwicklung gentechnologisch modifizierter T-Zellen zur Zytolyse CD44-exprimierender Tumorzellen war die Charakterisierung der Expression des CD44-Antigens in gynäkologischen Tumoren.

Mögliche Unterschiede in der CD44-Expression zwischen Tumoren und Normalgeweben, wie sie für das Mamma- und Zervixkarzinom bereits gezeigt wurden, sollten im normalen Endometrium und in Endometriumkarzinomen immunhistochemisch (IHC) sowie durch Southern-Blot-Analysen untersucht werden. Die IHC-Untersuchungen wurden mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern durchgeführt: dem SFF2-Antikörper, der gegen eine extrazelluläre Domäne gerichtet ist, die in allen CD44-Proteinen auftritt, sowie Antikörper, die mit Epitopen der varianten CD44-Region (VFF7 mit CD44v6, VFF17 mit CD44v7/8 und VFF16 mit CD44v10) reagieren (Abbildung 3.1).

In vielen Tumoren werden durch alternatives Spleißen verschiedene CD44-Isoformen exprimiert. Um Information über die varianten CD44-Isoformen zu erhalten, wurde das CD44-Spleißmuster mittels Southern-Blot-Analysen von Endometriumkarzinomen und korrespondierendem Normalgewebe untersucht. Die CD44-Transkripte wurden nach Southern-Blot mit Exon-spezifischen Proben gegen die Exons v3, v6, v8 und v10 hybridisiert und durch eine alkalische Phosphatase-vermittelte Farbreaktion detektiert.

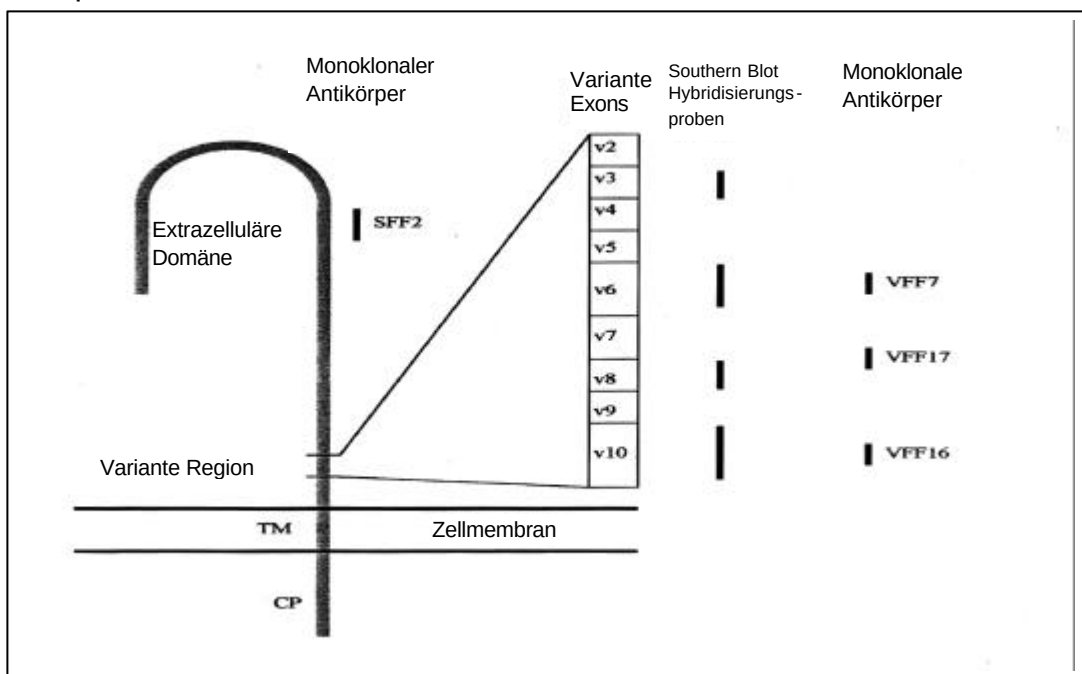


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der CD44v2-v10-Isoform mit den Epitopen, die von den verwendeten monoklonalen Antikörpern erkannt werden, sowie den varianten Exons, die in der Southern-Blot-Analyse nachgewiesen werden.

3.1.1.1 IHC-Analyse der CD44-Expression im Endometrium und Endometriumkarzinom

Gefrierschnitte von 10 Normalgeweben postmenopausaler Frauen und 14 Endometriumkarzinomen wurden immunhistochemisch untersucht.

Die Abbildung 3.2 und Tabelle 3.1 zeigen die Ergebnisse der IHC der Normalgewebe und Tumorproben mit den verschiedenen Antikörpern gegen alle CD44-Isoformen, sowie CD44v6-, CD44v7/8- und CD44v10-Proteine.

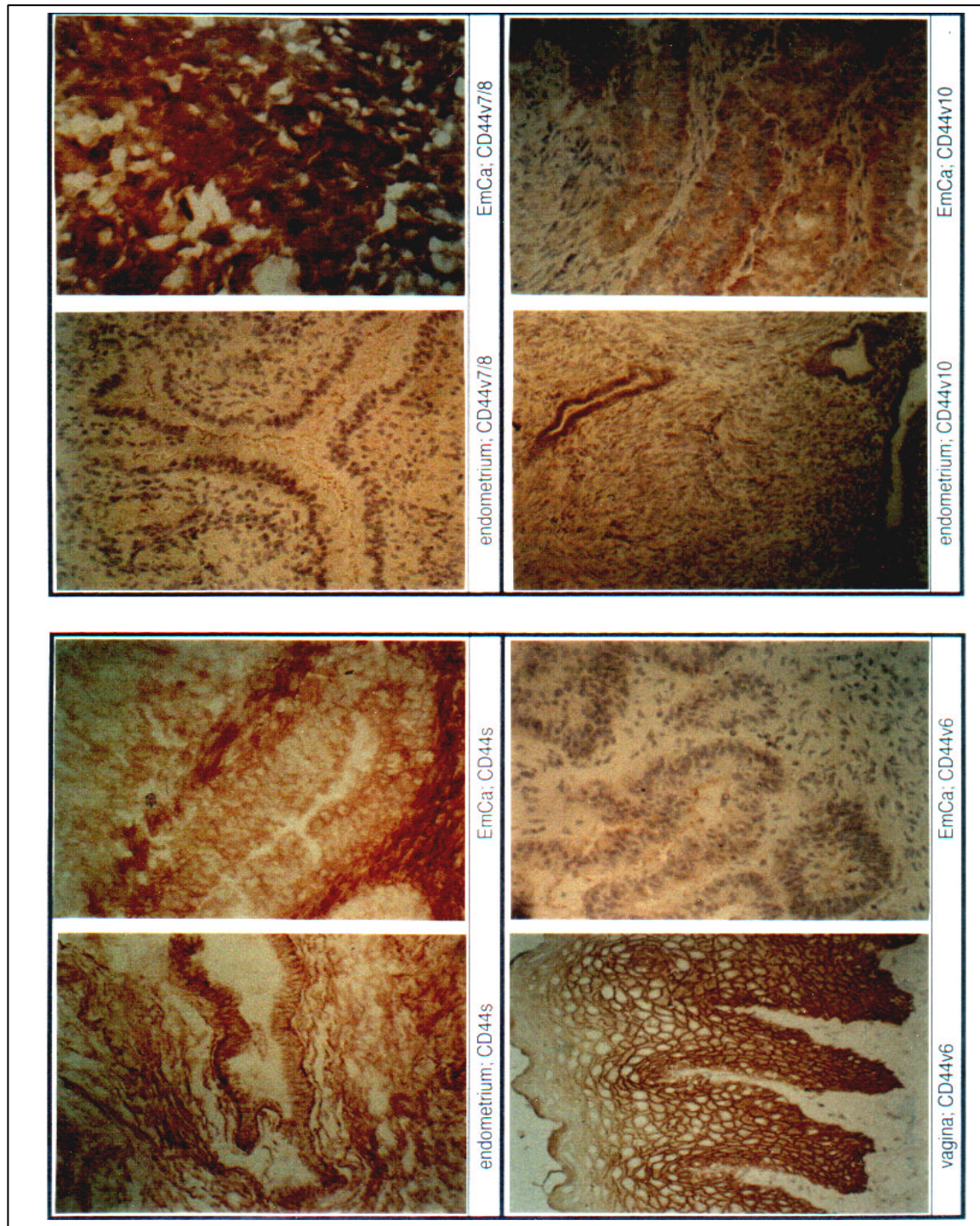


Abb.3.2: Immunhistochemischer Nachweis der CD44-Expression im normalen Endometrium und in Endometriumkarzinomen. Die Analysen mit den Antikörpern gegen die CD44-Proteine und CD44v6-, CD44v7/8- sowie CD44v10-Isoformen für das Normalgewebe sind den entsprechenden Analysen der Endometriumkarzinome gegenübergestellt.

Insgesamt konnte bei allen der 10 untersuchten postmenopausalen Normalgewebe auf den Epithel- und Stromazellen eine starke Oberflächen-Expression des CD44-Proteins (mAb SFF2) nachgewiesen werden. Intensive Signale der CD44-Färbung wurden vor allem auf der Zelloberfläche der basalen Membranseite der Drüsenzellen beobachtet, während auf ihrer luminalen Seite ein geringeres Signal auftrat.

Variante CD44-Isoformen wurden im Normalgewebe nur selten nachgewiesen. Bei zwei Proben ließen sich sowohl CD44v6-, CD44v7/8- und CD44v10-Isoformen nachweisen, während eine weitere Probe nur die Expression des CD44v10-Epitops zeigte (Tabelle 3.1). Aufgrund einer geringen CD44v6-Expression im normalen Endometrium wurde als Positivkontrolle ein Gefrierschnitt der Vagina verwendet, bei dem sich eine starke CD44v6-Expression des Plattenepitheliums darstellen ließ.

CD44-Epitope Monoklonale Antikörper	Normales Endometrium		Endometrium- karzinom	
	Positive/Total	Prozent [%]	Positive/Total	Prozent [%]
CD44 (SFF2)	10/10	100	14/14	100
CD44v6 (VFF7)	2/10	20	4/14	29
CD44v7/8 (VFF17)	2/10	20	9/14	64
CD44v10 (VFF16)	3/10	30	11/14	79

Tab. 3.1: Immunhistochemische Analyse der CD44-Epitop-Expression in normalem Endometrium (10 Proben) und in Endometriumkarzinomen (14 Proben).

Alle Karzinome zeigten eine starke CD44-Expression, welche homogen über die gesamte Zelloberfläche verteilt war. Die CD44v6-Expression war schwächer und wurde nur bei 4 von 14 Tumorproben detektiert. CD44v6-positive Proben zeigten eine schwache lokale Färbung einiger Tumorbereiche. Der Tumor aus Abb.3.2 zeigte keine CD44v6-Expression.

Im Gegensatz zum Normalgewebe wurden jedoch die CD44v7/8- und CD44v10-Epitope häufiger und intensiver auf der Zelloberfläche exprimiert. Neun von vierzehn untersuchten Tumoren zeigten eine CD44v7/8-Expression und elf von insgesamt vierzehn eine CD44v10-Expression. Bei den in Abbildung 3.2 dargestellten gut differenzierten Endometrium-Karzinomzellen, die drüsige Strukturen bildeten, trat eine mittelstarke Färbung mit dem CD44v10-Antikörper auf. Auf der luminalen Zelloberfläche dieser drüsigen Strukturen wurde nur eine geringere CD44v10-Expression detektiert.

Die IHC-Analyse konnte somit eine zunehmende CD44v-Expression bei den Tumoren zeigen, ohne dass jedoch die CD44v6-Expression erhöht war.

3.1.1.2 Southern-Blot-Analyse der endometrialen Normalgewebe und der Karzinome

Die immunhistochemischen Untersuchungen konnten nur Informationen über die Expression einzelner Epitope geben und lieferten keine Aussage über die auftretenden Exon-Kombinationen der alternativ gespleißten CD44-mRNA. Daher

wurde aus drei prämenopausalen Normalgeweben und zehn Karzinomproben mRNA isoliert. Nach reverser Transkription erfolgte die Amplifikation aller auftretenden CD44-Transkripte durch Verwendung von Primern, die in den flankierenden Bereichen der varianten CD44-Region ansetzen. Die Amplifikationsprodukte umfassten Größen von 445 bp für die Standardform bis zu 1588 bp für die Maximalvariante (CD44v2-v10).

Die Größen der einzelnen Exons und einiger wichtiger Isoformen mit den korrespondierenden Größen ihrer PCR-Produkte sind in Tabelle 3.2 aufgezeigt.

CD44-Isoform	Größe des PCR-Fragments [bp]	Größe des varianten Exons
CD44s	445	-
CD44v2	574	129
CD44v3	571	126
CD44v4	559	114
CD44v5	562	117
CD44v6	574	129
CD44v7	577	132
CD44v8	547	102
CD44v9	535	90
CD44v10	649	204
CD44v2-v10	1588	1143
CD44v8-v10	841	396

Tab. 3.2: Größen der verschiedenen varianten CD44-Exons und einiger CD44-Isoformen

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte und Transfer der PCR-Produkte durch Southern-Blot auf eine Nylonmembran wurde die Hybridisierung mit Exon-spezifischen Sonden gegen die Exons CD44v3, CD44v6, CD44v8 und CD44v10 durchgeführt.

Für die Kontrolle der cDNA-Qualität diente die PCR des ubiquitär exprimierten *GAPDH*-Gens, die zum Teil Unterschiede der cDNA-Qualität der Proben aufzeichnete, die bei der Beurteilung der CD44-Expression berücksichtigt werden müssen (Abbildung 3.3). Die Ethidiumbromidfärbung der im Agarosegel aufgetrennten CD44-PCR-Produkte zeigte, dass im Normalgewebe wie in den Tumoren entsprechend den Ergebnissen der IHC die CD44-Standardform exprimiert wurde. Es zeigte weiterhin, dass die Expression der varianten Isoformen übereinstimmend zu den IHC-Untersuchungen bei den Normalgeweben im Vergleich zu den Tumoren geringer war.

Die Untersuchungen der exprimierten Transkripte durch Sonden gegen CD44v3, CD44v8 und CD44v10 ergab eine schwache Expression einiger varianter Isoformen im Normalgewebe. CD44v6 wurde bei den untersuchten Normalgeweben nicht detektiert. In einer Probe (Spur 3) konnte z.B. eine Variante nachgewiesen werden, die sowohl mit der Sonde gegen CD44v8 wie gegen CD44v10 detektiert wurde und bei der es sich höchstwahrscheinlich um die epitheliale CD44-Isoform (CD44v8-v10) handelte. Im Vergleich zum Normalgewebe zeigten die Tumore eine erhöhte CD44v-Expression vor allem der varianten Exons CD44v3, CD44v8 und CD44v10 und ein komplexeres Spleißmuster. Es traten insbesondere viel hochmolekulargewichtige Transkripte auf, eingeschlossen der Maximalvarianten (CD44v2-v10, 1588 bp). Die stärkere Expression von CD44v8- und CD44v10-Transkripten bei den Tumoren im Vergleich zu CD44v6-Transkripten deckte sich gut mit den Ergebnissen der IHC-Untersuchungen. Die Spleißmuster, der CD44v8- und CD44v10-enhaltenden

Transkripte waren bei den verschiedenen Tumorproben untereinander recht ähnlich, während sich die Spleißmuster der Transkripte, die die Exons CD44v3 und CD44v6 enthielten sich voneinander unterschieden.

Einige Varianten traten in allen Karzinomproben außer den Spuren 8+11 auf: die epitheliale CD44-Isoform (841bp) und ein ca. 950 bp großes v3-enhaltendes Transkript. Häufig vertreten war weiterhin ein ca. 1050 bp großes v6-enhaltendes Transkript.

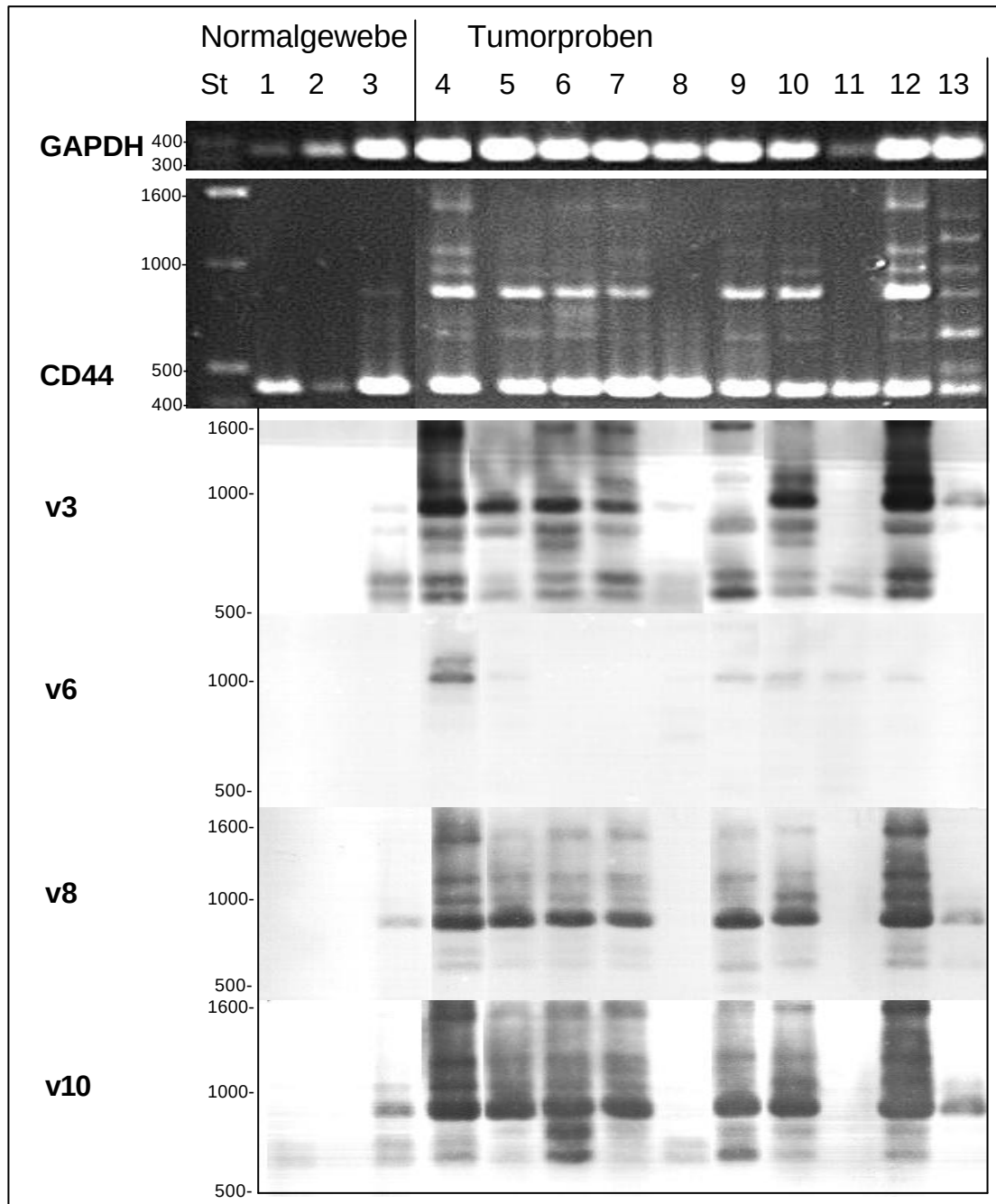


Abb. 3.3: Auftrennung der Ethidiumbromid-gefärbten GAPDH- und CD44-PCR-Produkte im Agarosegel (oben) und Southern-Blot-Analyse der CD44-PCR-Produkte durch Hybridisierung mit Exon-spezifischen Proben gegen die Exons v3, v6, v8 und v10.

Spuren 1-3: prämenopausales Normalgewebe

Spuren 4-7: gut-mäßig differenzierte endometroide- und Adenokarzinome, Spur 9: schlecht differenziertes Adenokarzinom, Spur 10 +11: glanduläres-papilläres Adenokarzinom ersten Grades, Spur 12+13: glanduläres-papilläres Adenokarzinom dritten Grades.

St= Größenstandard

Abhängig vom Differenzierungsgrad der Karzinome traten keine Auffälligkeiten in der CD44v-Expression auf. Nur das glandulär-papilläre Adenokarzinom (Grad 3) in Spur 13 unterschied sich im CD44v-Spleißmuster von den anderen Tumoren. Ein positiver Zusammenhang zwischen der CD44v6-Expression und einer myometrialen und vaskulären Invasion wurde von Yorishima et al. (1997) berichtet. Die Tumore 4, 7, 8 und 11 zeigten ein invasives Wachstum in das Myometrium und der Tumor 12 in das Rektum. Die Tumore 8 und 11 exprimieren vor allem die CD44-Standardform und nur wenige variante CD44-Isoformen, während die anderen invasiven Karzinome sich nicht von den Spleißmustern der anderen Tumore unterschieden. Ein positiver Zusammenhang zwischen der CD44v6-Expression und der myometrialen Invasion konnte somit nicht gefunden werden.

3.1.2 CD44-Expression in gynäkologischen Karzinomzelllinien

Die Ermittlung der Antigenspezifität und Zytotoxizität gentechnologisch veränderter T-Zellen erfordert Tumorzelllinien, welche CD44v7/8- und CD44v6-Epitope exprimieren. Deshalb wurde ihre Expression in einer Reihe gynäkologischer Karzinomzelllinien und zweier Keratinozytenzelllinien (als positiv-Kontrolle) sowohl mittels IHC wie durch FACS-Analyse untersucht (Tabelle 3.3).

Zelllinie	Herkunft	VFF17		VFF18	
		IHC	FACS	IHC	FACS
Ishikawa	Endometriumkarzinom	-	(+)	++	++
RL95-2	Endometriumkarzinom	+	+	++	0
HEC-1-A	Endometriumkarzinom	-	0	+	0
MCF7	Mammakarzinom	+	0	++	0
SK-BR-3	Mammakarzinom	+	0	+	0
BT-20	Mammakarzinom	+	0	0	0
ZR-75-1	Mammakarzinom	-	0	0	0
T-47D	Mammakarzinom	+	0	0	0
SKOV-3	Ovarialkarzinom	-	0	-	0
Hey	Ovarialkarzinom	-	0	0	0
ME-180	Zervixkarzinom	++	++	0	0
Ca Ski	Zervixkarzinom	++	+	0	0
SiHa	Zervixkarzinom	++	+	+	+
HPKII	Keratinozyten	++	++	0	0
HaCat	Keratinozyten	++	+++	0	+++

Tab. 3.3: Immunhistochemischer Nachweis und FACS-Analyse des CD44v7/8-Epitops durch den monoklonalen VFF17-Antikörper und des CD44v6-Epitops durch den monoklonalen VFF18-Antikörper. Die Symbole repräsentieren unterschiedliche Expressionen, die nach Anzahl der positiven Zellen und der Expressionsstärke bewertet wurden: - negativ, + schwache, ++ mittlere, +++ starke Expression, 0 nicht untersucht.

Die Bewertung der CD44-Expressionen erfolgte nach Anzahl der positiven Zellen und Stärke der Expression. Vergleiche der Beurteilung der CD44-Expression durch visuelle Einschätzung der IHC-Färbungen zeigten die gleichen Resultate wie die FACS-Analysen. Sieben von dreizehn untersuchten Tumorzelllinien exprimierten CD44v7/8-Isoformen und sechs von sieben untersuchten Tumorzelllinien exprimierten Isoformen, die CD44v6 enthielten. Alle untersuchten Zervixkarzinom-Zelllinien, vier von fünf Mammakarzinom-Zelllinien, eine der drei

Endometriumkarzinom-Zelllinien und keine der beiden untersuchten Ovarialkarzinom-Zelllinie exprimierten das CD44v7/8-Epitop. In allen untersuchten Zervixkarzinom-Zelllinien konnte eine deutliche CD44v7/8-Expression nachgewiesen werden. Die CD44-Expression einzelner Zellen einer Zelllinie war zum Teil recht heterogen.

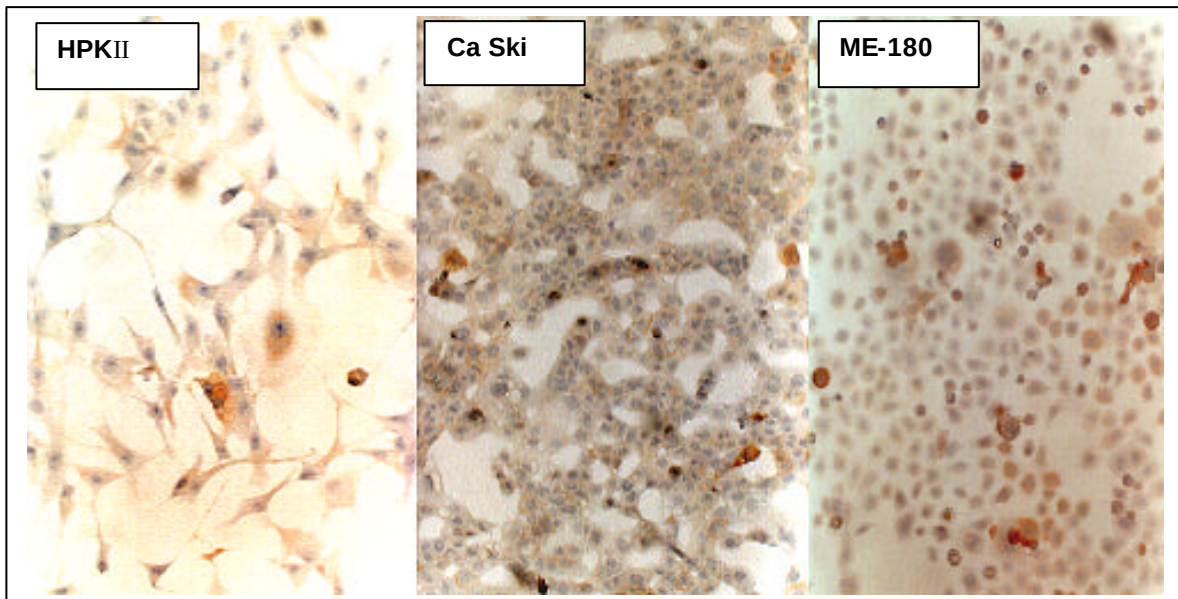


Abb. 3.4: IHC-Färbung verschiedener Zelllinien HPK-II (Keratinocyten), CaSki und ME-180 (Zervixkarzinomzelllinien) mit dem monoklonalen VFF17-Antikörper gegen das CD44v7/8-Epitop.

Abbildung 3.4 zeigt die IHC-Anfärbung exemplarisch für drei Zelllinien (HPKII, Ca Ski und ME-180) mit dem monoklonalen VFF17-Antikörper gegen das CD44v7/8-Epitop. Es wurde eine gleichförmige Färbung der Zellmembran beobachtet, bezüglich der Intensität der Färbung bzw. des Gehaltes an CD44v7/8- und CD44v6-Protein waren die Zellen jedoch heterogen.

Die CD44v7/8-Expression der Keratinocyten-Zelllinie HPKII trat bei vielen Zellen relativ schwach auf. Nur einzelne Zellen zeigten eine starke Expression dieses Epitops. Bei den dargestellten Karzinomzelllinien (Ca Ski und ME-180) exprimierten mehr als die Hälfte das CD44v7/8-Epitop relativ schwach. Es ließen sich jedoch auch bei diesen Zelllinien insbesondere bei ME-180 einige Zellen stark anfärben.

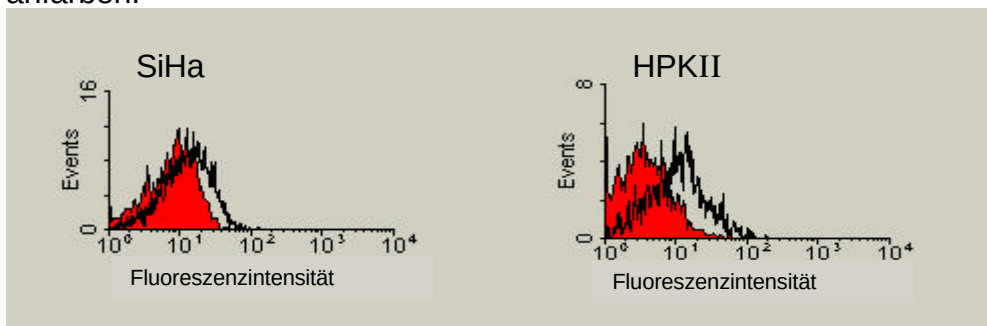


Abb. 3.5: FACS-Analyse der CD44v7/8-Expression. Die ausgefüllten Histogramme repräsentieren die Kontrollfärbung mit einem Isotyp-Antikörper, während die nicht ausgefüllten Histogramme die Färbung mit dem VFF17-Antikörper, der gegen ein von Exon CD44v7 und CD44v8 kodiertes Epitop gerichtet ist, darstellen (X-Achse: relative Zellzahl; Y-Achse: Fluoreszenzintensitäten).

In der FACS-Analyse lässt sich die Expressionsstärke des CD44v7/8-Epitops anhand der relativen Fluoreszenzverschiebung der VFF17(CD44v7/8)-Antikörperfärbung abschätzen. Die exemplarisch in Abbildung 3.5. dargestellten Zelllinien machen deutlich, dass die Zelllinie SiHa weniger CD44v7/8-Antigen als die HPKII-Zelllinie exprimierte.

Die häufige und ausreichend starke Expression der untersuchten Varianten bei den Tumorzelllinien zeigten, dass CD44v7/8- und CD44v6-Isoformen geeignete Antigene für eine Therapie durch gentechnologisch modifizierte T-Zellen darstellen könnten.

3.1.3 CD44-Spleißmuster in Endometrium- und Brustkrebszelllinien

Es wurden verschiedene Endometrium- (RL95-2, HEC-1-A, AN3 CA und KLE) und Brustkrebszelllinien (MCF7 und SK-BR-3) mit unterschiedlichem Östrogenrezeptor (ER)-Status auf ihre CD44v-Expression untersucht. Bei MCF7 und RL95-2 handelte es sich um ER-positive Zelllinien, während die anderen vier Zelllinien ER-negativ waren. Die CD44-PCR-Produkte wurden im Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt (Abbildung 3.5). Die Brustkrebszelllinien und drei der Endometriumkarzinomzelllinien exprimierten die CD44-Standardform (445 bp). Es wurden weiterhin wie bei den Karzinomen verschiedene variante CD44-Isoformen im Agarosegel sichtbar. Nur in AN3 CA-Zellen konnte weder eine CD44s- noch eine CD44v-Expression detektiert werden.

Die Southern-Blot-Analysen mit Exon-spezifischen Sonden gegen die Exons CD44v3, CD44v6, CD44v8 und CD44v10 zeigten, dass korrespondierend zu den Endometriumkarzinomen bei den Zelllinien viele variante CD44-Isoformen und vor allem Transkripte mit mehr als vier varianten Exons auftraten. Die Maximalvariante ließ sich in allen Zelllinien bis auf KLE nachweisen.

Einige der in diesen Zelllinien exprimierten Transkripte konnten in den Karzinomen ebenfalls nachgewiesen werden: die epitheliale CD44-Isoform (CD44v8-v10, 841 bp), das ca. 950 bp große v3-enhaltende Transkript und das 1050 bp große v6-enhaltende Transkript.

Die beiden Brustkrebszelllinien zeigten wie die Endometriumkarzinome, dass die Exons CD44v8 und CD44v10 in allen Isoformen coexprimiert wurden, während Exon v3- und v6-enhaltende Transkripte in allen Zelllinien unterschiedliche Expressionsmuster besaßen.

Vergleicht man das Verhältnis der CD44-Standard-Expression und der Varianten-Expression, so traten abhängig von dem ER-Status keine unterschiedlichen Verteilungen auf. Es konnten auch keine Auffälligkeiten des Spleißmusters abhängig von ER-Status gefunden werden.

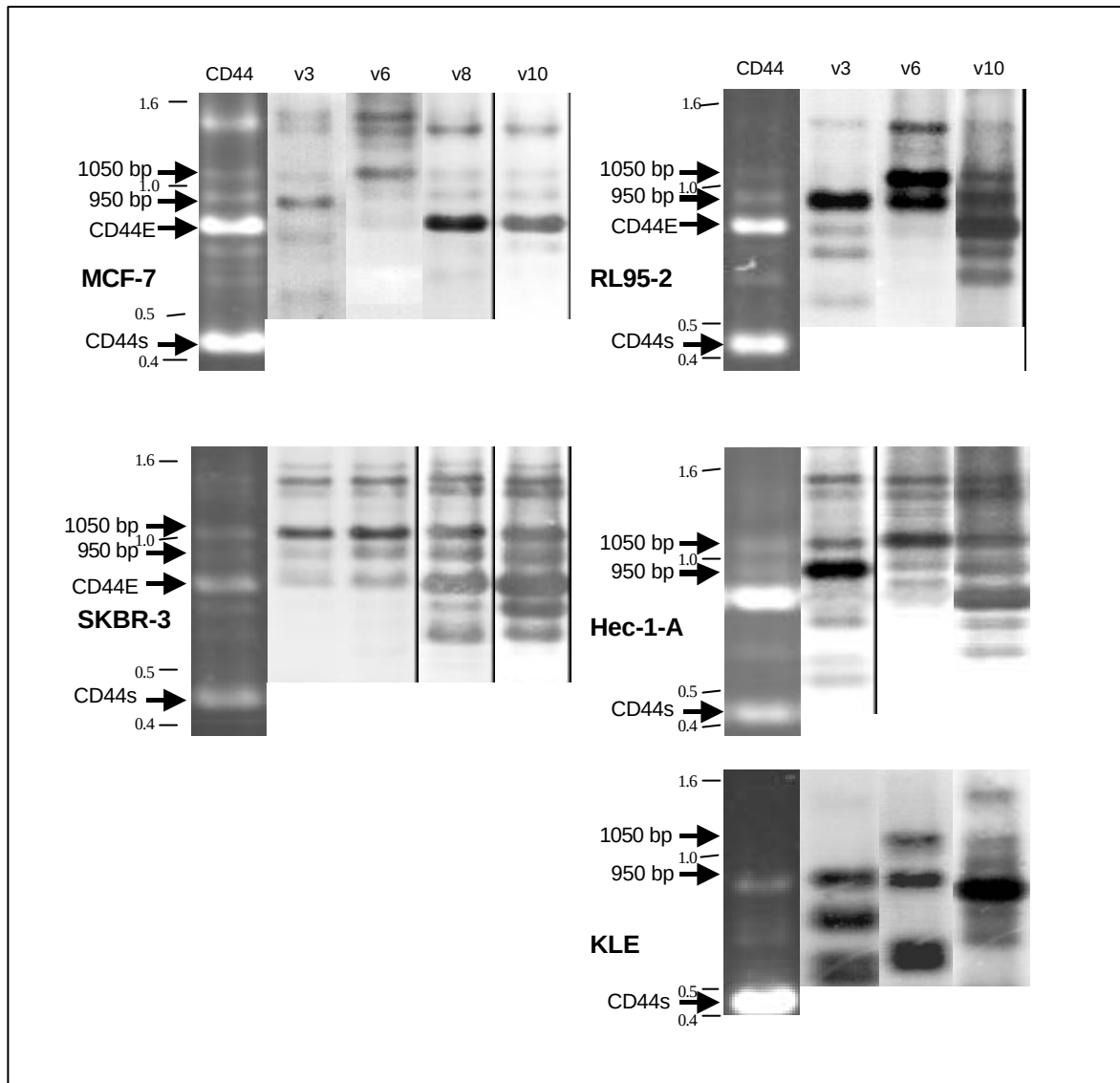


Abb. 3.5: CD44-Expressionsmuster in verschiedenen Brust- (MCF7 und SK-BR-3) und Endometriumkarzinom-Zelllinien (RL95-2, Hec-1-A und KLE). Darstellung der im Agarosegel aufgetrennten CD44-Transkripte und Southern-Blot-Analyse mit den Exon-spezifischen Sonden gegen die Exons CD44v3, CD44v6, CD44v8 und CD44v10.

Die Pfeile markieren das CD44-Standard-Fragment (CD44s), das epitheliale Fragment (CD44E), das 950 bp große v3-enhaltende PCR-Produkt und das 1050 bp große v6-enhaltende PCR-Produkt. Der Größenstandard ist in kbp angegeben.

3.1.4 Quantitative Bestimmung der CD44-Expression in verschiedenen Zelllinien

Die CD44- Gesamtexpression der Zelllinien wurde mittels quantitativer PCR bestimmt. Für diese PCR wurden fluoreszenz-markierte Primer so ausgewählt, dass eine Region (Position 432-690) der extrazellulären Domäne amplifiziert wurde, die in allen CD44-Isoformen (CD44s und CD44v) auftrat. In einer Duplex-PCR erfolgte die gleichzeitige Amplifikation des *GAPDH*-Gens als Referenzprodukt, so dass nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Detektion der Fluoreszenzsignale im DNA-Sequenzier eine Quantifizierung der CD44-Expression möglich war (Abbildung 3.6). Die ER-positiven Zelllinien (RL95-2 und MCF7) zeigten eine 1,8- bis 14- höhere CD44-Expression als die ER-negativen CD44-exprimierenden Zelllinie (SK-BR-3, HEC-1-A, KLE). Für die An3 CA-Zelllinie lies sich auch durch diese PCR keine CD44-Expression nachweisen.

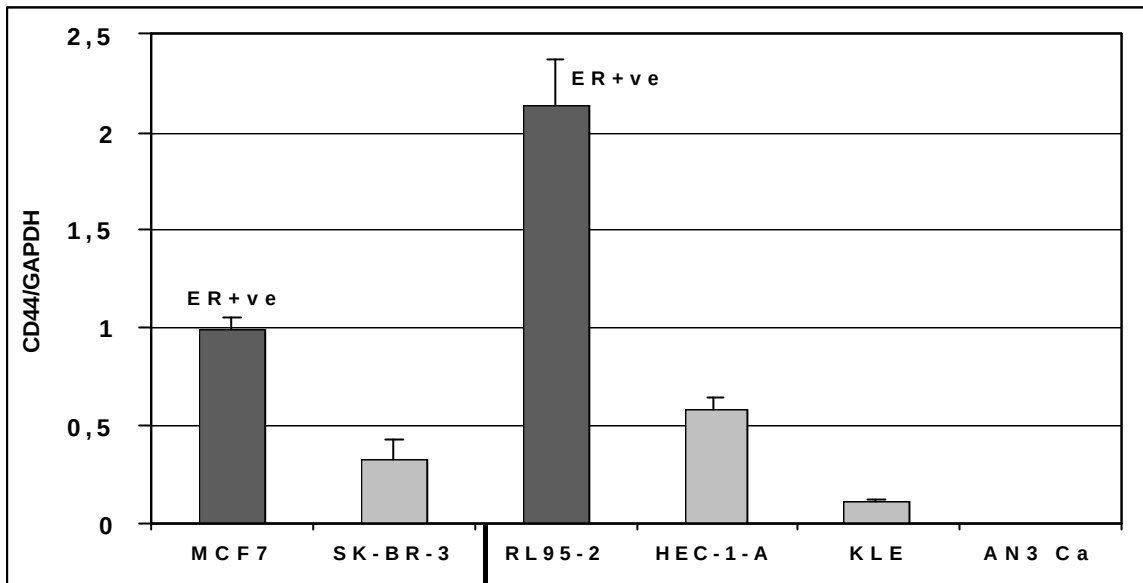


Abb. 3.6: Darstellung der CD44-Expression in Endometrium- (RL95-2, HEC-1-A, KLE, AN3 CA) und Brustkrebszelllinien (MCF7, SK-BR-3) abhängig vom ER-Status. Nach der RT-PCR wurden die CD44-PCR-Produkte, welche in allen CD44-Transkripten auftreten (Position 432-846), in einer quantitativen PCR mit *GAPDH* als Referenzgen amplifiziert. Die fluoreszenz-markierten PCR-Produkte wurden im DNA-Sequenzier aufgetrennt und quantifiziert. Das Diagramm zeigt die Ratio der Signale der CD44-PCR-Produkte zu denen der *GAPDH*-PCR-Produkte bei den verschiedenen Zelllinien. Die Balken repräsentieren die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

3.1.5 Abhängigkeit der CD44-Expression von verschiedenen Kulturbedingungen und 17 β -Estradiol

Die unterschiedliche CD44-Expression der Zelllinien abhängig vom ER-Status könnte ein Hinweis für eine Östrogen-Abhängigkeit der CD44-Expression darstellen. Deshalb wurde der Einfluss von 17 β -Estradiol auf die CD44-Expression in ER-positiven Zellen (RL95-2) analysiert.

Die RL95-2-Zellen wurden über verschiedene Zeiträume mit 17 β -Estradiol (10^{-8} mol/l) inkubiert. Zwei Kontrollgruppen sollten die CD44-Expression unter verschiedenen Kultur-Bedingungen überprüft. Die Zellen der ersten Kontrollgruppe wurde 48 h in Medium ohne FCS kultiviert und erhielten dann zum Versuchsbeginn (Zeitpunkt = 0h) Medium mit FCS. Die Zellen der zweiten Kontrollgruppe wurden zu Versuchsbeginn weiterhin mit Medium ohne FCS kultiviert (Alle Kontrollgruppen enthielten zum Zeitpunkt 0h Medium mit 0,1% (v/v) Ethanol, welches das Lösemittel der Hormone darstellte). Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0h, 1h, 4h, 12h, 24h und 48h) durch TIZOLTM lysiert, ihre mRNA isoliert und nach RT-PCR der quantitativen CD44-PCR unterzogen.

Das Verhältnis des Fluoreszenz-Signals der CD44-Amplifikationsprodukte zu dem *GAPDH*-Signal wurde berechnet und der Wert der Kontrolle, die ohne FCS kultiviert wurde zum Zeitpunkt 0h als 100%-Wert festgelegt (Abbildung 3.7).

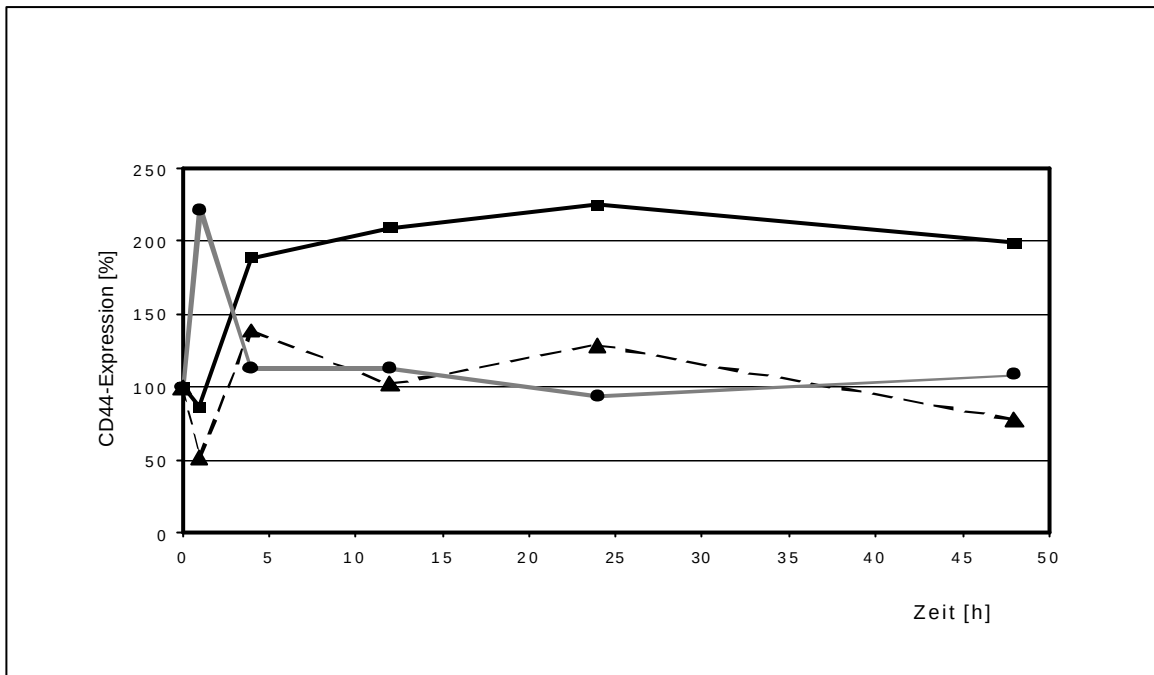


Abb. 3.7: Darstellung der CD44-Expression in RL95-2 Zellen kultiviert in Medium ohne FCS (-λ-), mit FCS (-v-) und mit 17β-Estradiol (-σ-). Die Fluoreszenz-markierten CD44- und GAPDH-Produkte der quantitativen PCR wurden in einem DNA-Sequenzierer aufgetrennt und quantifiziert. Die Ratio der CD44- zur GAPDH- Expression wurde berechnet. Als 100%-Wert diente die Ratio der CD44 und GAPDH-Signale von RL95-2-Zellen zum Zeitpunkt 0h, die ohne FCS kultiviert worden waren.

Eine Kultivierung der RL95-2-Zellen in Medium mit FCS führte nach 4 Stunden zu einer 1,4-fach erhöhten CD44-Expression verglichen mit RL95-2-Zellen, die durchgängig in Medium ohne FCS kultiviert worden waren. Nach 12 Stunden trat eine verdoppelte CD44-Expression der in Medium mit FCS kultivierten Zellen auf, die über den untersuchten Zeitraum von 48h erhalten blieb. Der Zusatz von 17β-Estradiol zu dem Medium ohne FCS konnte nur sehr kurz (1h) eine CD44-Expressionserhöhung bewirken. Diese Verstärkung der CD44-Expression war bereits nach vier Stunden wieder auf das Niveau der Zellen, die in Medium ohne FCS kultiviert wurden, herabgesunken.

3.1.6 Abhängigkeit der CD44-Expression von verschiedenen Konfluenzdichten der Zellen

Der Zusatz von 17β-Estradiol zum Medium ist in der Lage, die Proliferation von ER-positiven Endometriumkarzinom-Zelllinien zu erhöhen (Anzai et al., 1989). Die Kultivierung der RL95-2-Zellen in Medium mit oder ohne FCS sowie 17β-Estradiol kann somit zu einer unterschiedlichen Proliferation der Zellen führen und damit zu unterschiedlich dicht bewachsenen Kulturflaschen. Es ist vorstellbar, dass eine Abhängigkeit der Expression des CD44-Adhäsionsmoleküls zum Ausmaß der Zell-Zell-Kontakte besteht. Dies könnte die Veränderungen der CD44-Expression im Stimulationsexperiment erklären. Aus diesem Grunde wurde die CD44-Expression in Abhängigkeit von der Zellzahl/Loch in zwei Östrogenrezeptor (ER)- positiven (RL95-2 und MCF7) und Östrogenrezeptor- negativen Zelllinien (SK-BR-3) untersucht (Abbildung 3.8). Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Zellzahlen ausgesät, nach 24h geerntet und die cDNA der quantitativen CD44-PCR unterzogen.

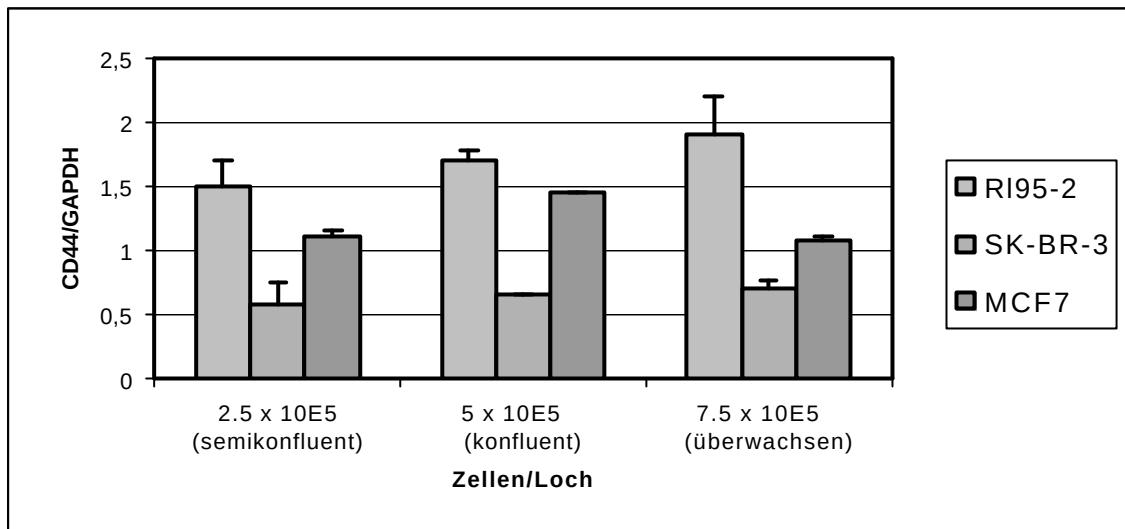


Abb. 3.8: Die CD44-Expression in zwei ER-positiven (RL95-2, MCF7) und einer ER-negativen Zelllinie (SK-BR-3) bei unterschiedlichen Zelldichten bzw. Konfluenz. Die Ratios der Fluoreszenzsignale der CD44- und GAPDH-Produkte der quantitativen PCR von verschiedenen Zelllinien mit unterschiedlicher Zelldichte sind im Diagramm dargestellt. Die Balken repräsentieren die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Die CD44-Expression der zwei Brustkrebszelllinien SK-BR-3 und MCF7 sowie der Endometriumkarzinom-Zelllinie RL95-2 blieb bei verschiedenen Zelldichten unverändert. Die erhöhte CD44-Expression bei Kultivierung von RL95-2-Zellen in Medium mit FCS im Vergleich zu Medium ohne FCS kann somit nicht durch unterschiedliche Proliferation bzw. Zelldichte der Zellen begründet sein.

3.1.7 CD44-Spleißmuster in Endometriumkarzinom-Zelllinien in Abhängigkeit von Hormonen, Hormonantagonisten und Cytokinen

Durch Behandlung mit Hormonen und Hormonantagonisten kann das Risiko, an Krebs zu erkranken, erhöht werden. Andererseits werden Östrogenantagonisten für die Behandlung von Brustkrebs eingesetzt. Zwischen der CD44- und der Östrogen- und Progesteronrezeptor-Expression tritt in dem hormoninduzierten Zyklus des Endometriums eine Korrelation auf, ohne dass bisher ein direkter Beweis für einen Einfluss von Hormonen auf die CD44-Expression gezeigt wurde. Es ist möglich, dass eine Abhängigkeit des alternativen Spleißens von der Höhe der CD44-Gesamtexpression besteht und so die erhöhte CD44-Gesamtexpression durch Kultivierung der Zellen in Medium mit FCS und 17β -Estradiol zu einem veränderten alternativen Spleißen der CD44-mRNA führt. Dadurch könnten Isoformen generiert werden, die veränderte Eigenschaften der Tumorzellen hervorrufen, wie dies für die CD44v6-Isoform bei den Pankreasadenokarzinom-Zelllinien AS und ASML mit verschiedenen metastatischen Eigenschaften gezeigt werden konnte (Günthert et al., 1991).

Der Einfluss von Hormonen, Hormonantagonisten und Cytokinen auf die CD44-Expression wurde in einer ER-positiven (RL95-2) und drei ER-negativen (HEC-1-A, KLE, AN3 CA) Zelllinien untersucht.

3.1.7.1 CD44-Expression der RL95-2-Endometriumkarzinom-Zelllinie

Im ersten Stimulationsexperiment wurden als Kontrollen RL95-2-Zellen über den gesamten Versuchszeitraum in Medium mit FCS und in Medium ohne FCS

kultiviert. In den Parallelansätzen wurden nach 48 h Vorinkubation in Medium ohne FCS die Zellen mit den Hormonen 17 β -Estradiol (10^{-8} mol/l) und Progesteron (10^{-6} mol/l), sowie den Östrogenantagonisten Tamoxifen (10^{-6} mol/l) und Hydroxytamoxifen (10^{-6} mol/l) inkubiert.

Die RL95-2-Zellen wurden bei den Zeitwerten 0h, 4h, 21h, 24h, 48h durch TizolTM lysiert, mRNA isoliert und nach RT-Reaktion erfolgte die Amplifikation des CD44-Gens. Die Überprüfung der cDNA-Quantität durch die GAPDH-PCR zeigte geringe Unterschiede (Abbildung 3.9).

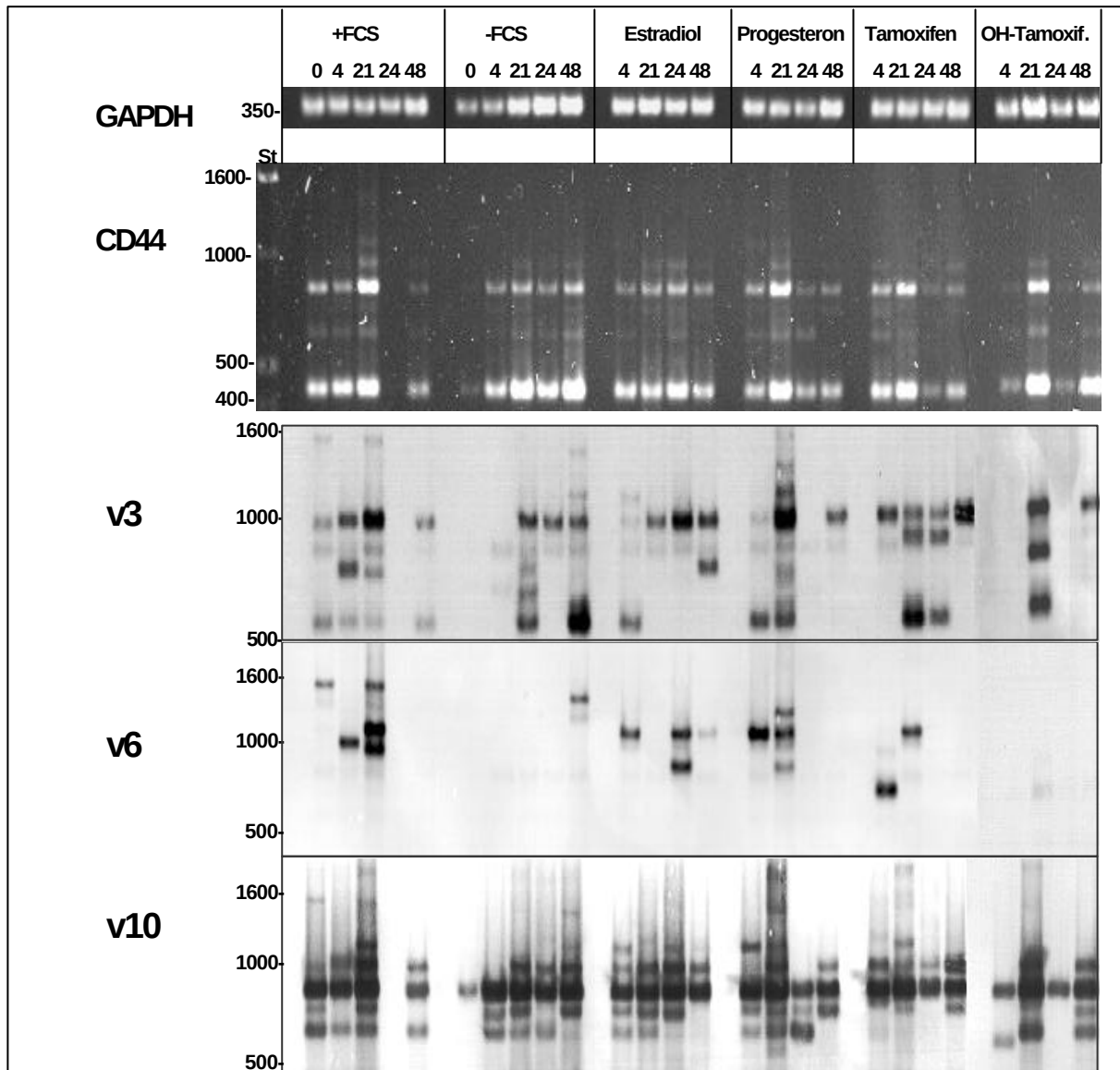


Abb. 3.9: Southern-Blot-Analyse des Stimulationsexperiments der RL95-2-Zellen. Die Zellen wurden für die Kontrolle der CD44-Expression in Medium mit (+FCS) und ohne FCS (-FCS) kultiviert. Die mit 17 β -Estradiol (10^{-8} mol/l) und Progesteron (10^{-6} mol/l), Tamoxifen (10^{-6} mol/l) und Hydroxytamoxifen (10^{-6} mol/l) behandelten Zellen wurden zuvor 48 h in Medium ohne FCS kultiviert und erhielten zum Zeitpunkt 0h Medium ohne FCS mit den entsprechenden Hormonen und Hormonantagonisten. Die Qualität der cDNA wurde durch eine GAPDH-PCR überprüft. Die CD44-PCR-Produkte wurden im Agarosegel aufgetrennt und durch alkalischen Southern Blot auf eine Nylonmembran übertragen. Der Nachweis der verschiedenen CD44-Transkripte erfolgt mit spezifischen Exonsonden gegen CD44v3, CD44v6, CD44v8 und CD44v10. St = Größenstandard (bp).

Die Auftrennung der CD44-PCR-Produkte im Agarosegel machte die Expression der CD44-Standardform und varianter CD44-Isoformen sichtbar. Mangelhafte CD44-PCR-Amplifikation und damit nicht interpretierbare Bandenmuster beruhten

größtenteils auf unterschiedliche cDNA-Quantität. So waren z.B. bei den Kontrollzellen nach 0h und 4h eine geringere GAPDH- und CD44-Amplifikation zu beobachten als bei den anderen Zeitwerten. Bei der Kontrolle kam es nach 24 h zu einem Ausfall der CD44-PCR, bei dem es sich jedoch um einen experimentellen Fehler handelte, da sich bei der Reproduktion CD44-PCR-Amplifikationsprodukte darstellen ließen.

Die Southern-Blot-Analyse zeigte, dass Transkripte mit dem varianten Exon 10 in allen Gruppen recht konstant exprimiert wurden, während v3- und v6-enhaltende Transkripte bereits in den Kontrollgruppen variabel exprimiert wurden. Die mit 17 β -Estradiol, Progesteron, Tamoxifen und Hydroxytamoxifen inkubierten Zellen zeigten ebenso wie die Kontrollen zu verschiedenen Zeitpunkten eine verschieden starke CD44v3- und CD44v6-Expression, ohne dass auffällige Unterschiede im Bandenmuster zu beobachten waren.

Die Variabilität der CD44v3- und v6-enhaltenden Transkripte führte zu der Frage, wodurch diese Expressionsveränderungen zustande kam. Möglicherweise beeinflusst eine *de novo* Synthese von Proteinen die CD44-Expression bzw. das alternative Spleißen und führte so zu der Variabilität der CD44v3- und CD44v6-Transkripte. Es wäre außerdem z.B. möglich, dass 17 β -Estradiol die Synthese von Transkriptionsfaktoren induziert und so indirekt die CD44-Expression beeinflusst. Um dies zu klären, wurde ein weiteres Stimulationsexperiment mit RL95-2-Zellen durchgeführt, bei dem zusätzlich zu den beiden verwendeten Kontrollgruppen eine Kontrollgruppe untersucht wurde, die 48h in Medium ohne FCS kultiviert wurde und dann zum Zeitpunkt Null in Medium mit FCS umgesetzt wurde. Die im FCS enthaltenden Hormone und Cytokine sollten nach der Hungerperiode zu einer maximalen Stimulation der Zellen führen. Die anderen Gruppen wurden nach 48 h Vorinkubation in Medium ohne FCS mit dem Hormon 17 β -Estradiol (10^{-8} mol/l) und dem Östrogenantagonist Tamoxifen (10^{-6} mol/l) inkubiert. Außerdem wurde einer Gruppe gleichzeitig mit 17 β -Estradiol (10^{-8} mol/l) und Cykloheximid (100mg/ml) ein Proteinbiosynthesehemmer inkubiert, um eine *de novo* Synthese von Proteinen zu verhindern.

Die Zellen wurden nach 0h, 1h, 4h, 12 h, 24h und 48 h Inkubation geerntet. Die im Agarosegel aufgetrennten CD44-PCR-Produkte ließen die CD44-Standardexpression und ein gleiches Muster an varianten CD44-Transkripten entsprechend den Proben des ersten Stimulationsexperiments erkennen (Abbildung 3. 10). So wurden CD44v8- und CD44v10-enhaltende Transkripte konstanter als CD44v3- und CD44v6-enhaltende Transkripte exprimiert. Es traten bei den einzelnen Zeitwerten auch hier einige PCR-bedingte Ausfälle auf. Durch Reproduktion der CD44-PCR dieser Proben konnten jedoch CD44-PCR-Produkte amplifiziert werden, die keine Unterschiede im Bandenmuster zu den anderen Zeitwerten zeigten.

Die Southern-Blot-Analyse konnte darstellen, dass auch in diesem Experiment CD44v10-enhaltende Transkripte in allen Gruppen konstant exprimiert wurden. Das zusätzlich untersuchte variante Exon v8 zeigte wie CD44v10 eine konstante Expression, wobei beide Expressionsmuster Ähnlichkeiten aufwiesen. Die epitheliale CD44-Isoform wurde in allen Proben konstant exprimiert. Erneut wurden CD44v3- und CD44v6-enhaltende Transkripte variabel exprimiert. So wurde ein ca. 750 bp großes CD44v3-Transkript in allen Kontrollgruppen zu verschiedenen Zeitwerten unterschiedlich stark exprimiert. Es ist bei RL95-2-Zellen, die in Medium ohne FCS kultiviert wurden nach 24 h nicht nachweisbar, kann aber nach 48 h detektiert werden.

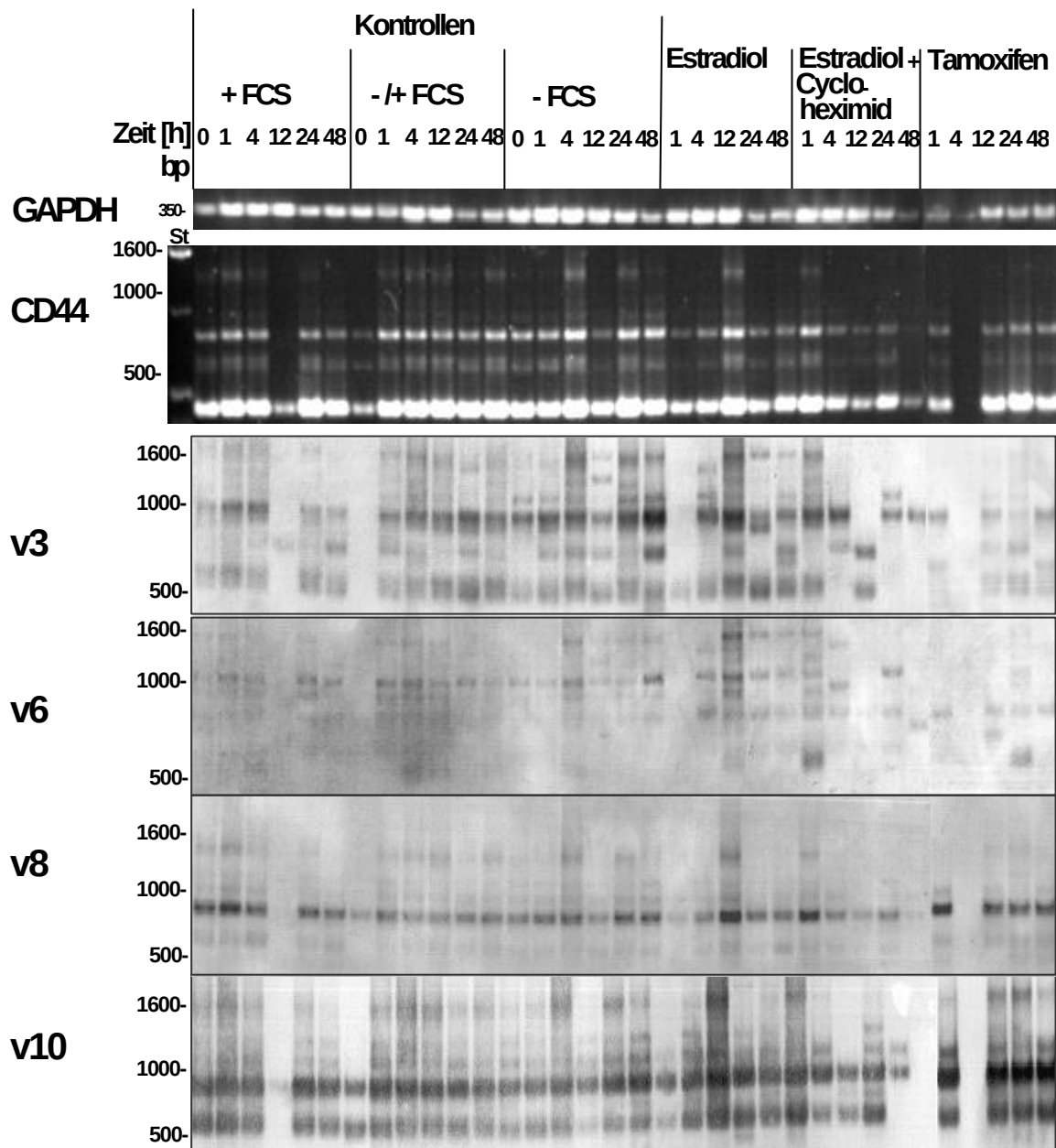


Abb.3.10: Southern-Blot-Analyse des Stimulationsexperimentes mit RL95-2-Zellen. Die Kontrollgruppen wurden mit FCS (+FCS) und ohne FCS (-FCS) kultiviert. Außerdem wurden Zellen 48h ohne FCS kultiviert und erhielten bei Versuchsbeginn (0h) Medium mit FCS (+/-). Die (anti-)hormonstimulierten Zellen wurden 48h ohne FCS kultiviert und erhielten dann Medium mit 17β -Estradiol (10^{-8} mol/l), 17β -Estradiol (10^{-8} mol/l) in Kombination mit Cycloheximid (100 μ g/ml) und Tamoxifen (10^{-6} mol/l).

Das in den Tumorproben und bei den anderen Zelllinien exprimierte 950 bp-große CD44v3-enhaltende Transkript wurde in allen Proben mit ausreichender Menge an CD44-PCR-Produkten gefunden mit Ausnahmen der Zellen (12h-Wert), die mit 17β -Estradiol und Cycloheximid inkubiert wurden. Das ebenfalls häufig beobachtete 1050 bp große CD44v6-Transkript wurde schwächer exprimiert. Es konnte bei den meisten Proben, die mit Tamoxifen (1h, 4h, 12h und 48h) und 17β -Estradiol in Kombination mit Cycloheximid (4h, 12h und 48h) inkubiert wurden nicht detektiert werden. Die Beurteilung von Veränderungen der CD44v-Expression bei niedrig exprimierten Isoformen war jedoch recht schwierig, da bei einer geringeren Amplifikation des CD44-Gens die Nachweisgrenze dieser Isoformen durch die Exon-spezifischen Sonden erreicht werden kann.

Es konnte auch durch das Zufügen von FCS nach einer Inkubation der Zellen in Medium ohne FCS keine auffällige Veränderung des CD44-Spleißmusters aufgezeigt werden. Eine Inkubation mit 17 β -Estradiol, Tamoxifen und 17 β -Estradiol mit Cykloheximid führte zu keiner deutlichen Auffälligkeit bezüglich des Expressionsmusters der CD44v-Isoformen. Veränderungen in der CD44-Expression traten bei schwächer exprimierten Isoformen bereits in den Kontrollgruppen auf, so dass sich die geringen Expressionsunterschiede in den mit Substanzen behandelten Zellen nicht auf Substanz-Effekte zurückführen lassen.

3.1.7.2 CD44-Expression der Endometriumkarzinom-Zelllinien HEC-1-A, KLE und An3 CA

Mackay und Mitarbeiter (1994) zeigten durch Behandlung mit γ -IFN von zwei Myelomonocytischen-, einer Lungenkarzinom-, einer Kolon- und einer Keratinozyten-Zelllinie eine Erhöhung der CD44v6-Expression. Zytokine werden bei der Therapie von Tumoren eingesetzt, so wird z.B. α -IFN bereits bei einer Monotherapie von kutanen T-Zell-Lymphomen (Peter und Pichler, 1996) und renalen Karzinomen (Atzpodien et al., 1999) mit objektivem Ansprechen eingesetzt. G-CSF wird therapeutisch für die Mobilisation von peripheren Blutstammzellen bei Patienten mit Chemotherapie angewandt, induziert jedoch die Proliferation von Ovarialkarzinomzellen (Spinner et al., 1995).

Aufgrund dieser Zusammenhänge zwischen der Zytokin-Behandlung und der CD44-Expression wurde bei der Östrogenrezeptor-negativen Zelllinie HEC-1-A, die zahlreiche variante CD44-Isoformen exprimierte, nicht nur der Einfluss der Hormone 17 β -Estradiol (10^{-8} mol/l) und Progesteron (10^{-6} mol/l), sowie den Östrogenantagonisten, Tamoxifen (10^{-6} mol/l) und Hydroxytamoxifen (10^{-6} mol/l) auf die CD44-Expression überprüft, sondern auch ein möglicher Effekt von Zytokinen [G-CSF (250 U/ml und 500 U/ml), γ -IFN (250 U/ml) und α -IFN (250 U/ml)] auf das CD44-Spleißmuster analysiert. Als Kontrollen wurden HEC-1-A-Zellen in Medium mit FCS bzw. in Medium ohne FCS kultiviert. Für die Behandlung mit den verschiedenen Agenzien wurden die Zellen erneut 48h in Medium ohne FCS kultiviert und enthielten zum Zeitpunkt 0h Medium ohne FCS, das die entsprechenden Agenzien enthielt. Die Zellen wurden nach 1h, 6h, 12h, 24h und 48h geerntet. Die Aufbereitung der Proben erfolgte wie in den anderen Stimulationsexperimenten.

Diese Zelllinie exprimierte viele variante CD44-Isoformen und vor allen hochmolekulargewichtige Isoformen wie z.B. die Maximalvariante. Es zeigte sich auch bei dieser Zelllinie eine sehr konstante CD44v10-Expression, während schwächer exprimierte CD44v3- und CD44v6-enthaltende Isoformen bereits in den Kontrollgruppen variabler exprimiert wurden. Das 1050 bp große CD44v6-enthaltende Transkript und das 950 bp große v3-enthaltende Transkript wurden jeweils stark und in allen Versuchsansätzen konstant exprimiert. Weder durch die verwendeten Hormone und Hormonantagonisten noch durch die Zytokine konnten deutliche Veränderungen der CD44v-Expression erzielt werden.

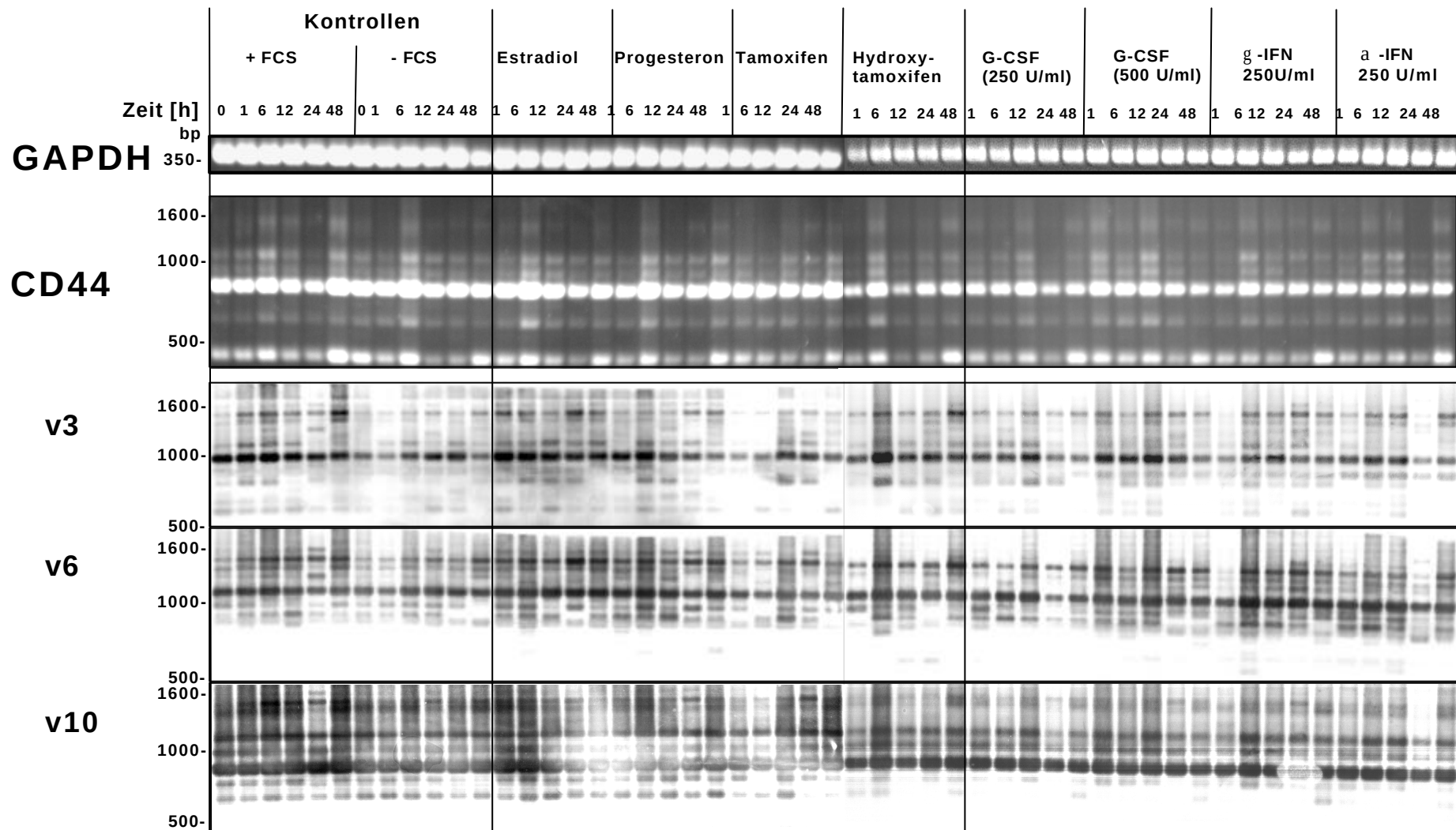


Abb. 3.11: Southern-Blot-Analyse des Stimulationsexperimentes mit der Östrogenrezeptor-negativen Hec-1-A-Zelllinie .

Die KLE-Zelllinie zeigte in den Kontrollgruppen bereits so große Heterogenität, dass keine Schlüsse durch die Behandlung mit 17 β -Estradiol, Progesteron, Tamoxifen und Hydroxytamoxifen gezogen werden konnten (nicht gezeigt). Bei der Östrogenrezeptor-negativen An3 CA-Zelllinie konnte durch die Behandlung der Zellen mit 17 β -Estradiol, Progesteron und Hydroxytamoxifen keine Induktion der CD44-Expression erreicht werden (nicht gezeigt).

Es ließ sich somit in keiner der untersuchten Zelllinie RL95-2, HEC-1-A, KLE und AN3 CA signifikante Veränderungen im CD44-Speißmuster durch die eingesetzten Hormone, Hormonantagonisten und Zytokine erzielen. Durch Kultivierung von RL95-2-Zellen in Medium mit FCS oder 17 β -Estradiol konnte die gesamte CD44-Expression erhöht werden. Diese Veränderung der CD44-Expression ist nicht durch unterschiedliche Zelldichten nach dem Stimulationsexperiment begründet. Die erhöhte CD44-Gesamtexpression führte nicht zu einer veränderten CD44v-Expression und besitzt somit keinerlei Einfluss auf das alternative Spleißen der CD44mRNA.

3.2 Gentechnologische Modifikation von T-Zellen gegen CD44v7/8- und CD44v6-exprimierenden Tumorzellen

3.2.1 Klonierung des Fusionsgens kodierend für den chimären scFv(VFF17):a:z- und scFv(VFF18):a:z- Rezeptor

Die Untersuchungen der Endometriumkarzinome zeigten, dass die CD44v7/8-Isoformen häufig exprimiert wurden. CD44v6-Isoformen konnten bei den Endometriumkarzinomen im Gegensatz zu den untersuchten Tumorzelllinien und anderen Tumoren, wie z.B. Brustkrebs nur selten nachgewiesen werden. Beide CD44-Varianten können als Oberflächenzielantigene für eine Bekämpfung von Tumorzellen durch gentechnologisch modifizierte T-Zellen verwendet werden. Dafür wurden scFv(single-chain Fv)-Antikörperfragmente, die von den Antikörpern gegen humane CD44v6- und CD44v7/8-Epitope abgeleitet sind, mit der Effektorfunktion der T-Zellen kombiniert. Die verwendeten scFv-Fragmente wurden abgeleitet vom monoklonalen VFF18-Antikörper, der gegen das CD44v6-Epitop gerichtet ist, bzw. dem monoklonalen VFF17-Antikörper, der spezifisch das von den Exons v7 und v8 kodierte Übergangsepitop erkennt. Aus früheren Vorarbeiten (Hekele et al., 1996, Dall et al., 1997) existierten bereits Vektoren, die chimäre Rezeptoren kodieren und wie folgt hergestellt worden sind: Zunächst wurde aus VFF17- und VFF18-produzierenden Hybridomazelllinien (Bender, Wien) Gesamt-mRNA isoliert. Für die cDNA Erststrang-Synthese der variablen Domäne der schweren Kette wurden Primer verwendet, die komplementär zur Position 121 bis 143 (Nummerierung nach Honjo et al., 1979) der mRNA der konstanten Region der murinen Immunoglobulin γ 1-Kette waren. Für die variable Domäne der leichten Kette wurden Primer eingesetzt, die komplementär zur Position 3 bis 27 (Nummerierung nach Hamlyn et al., 1978) der mRNA der konstanten Region der murinen κ -Kette (leichte Kette) waren. Die PCR-Amplifikation der cDNA's, die für die variablen Domänen der schweren und leichten Kette kodierten, wurden dann mit 5'-Primern, homolog zu Sequenzen des J-Segments und mit 3'-Primern, die homolog zu Sequenzen des konservierten N-terminalen Bereichs waren, durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide enthielten Restriktionsschnittstellen, wodurch die amplifizierten cDNA's der variablen Domäne der schweren und der leichten Kette in ein modifiziertes

pBlueskript KS⁺-Plasmid, das pWW152-Plasmid (Wels et al., 1995), kloniert werden konnten. Dieses pWW152-Plasmid enthielt eine Sequenz, die ein 15 Aminosäuren langes Verbindungspeptid (GGGS)₃ kodierte. Bei diesem Klonierungsschritt erfolgte die Verbindung der variablen Domäne der schweren Kette über den flexiblen Peptidlinker mit der variablen Domäne der leichten Kette. Der flexible Peptidlinker bildet selber keine geordneten Strukturen aus, so dass eine Domänenfaltung des Fv-Fragments, die der parentalen Antigenbindungsdomäne entspricht, stattfinden kann und so scFv-Fragmente mit einer Spezifität gegen CD44v7/8- und CD44v6-Proteine erstellt werden konnten. Für den späteren Transport des chimären Rezeptors zum endoplasmatischen Retikulum und letztendlich dann zur Membranoberfläche wurde vor der Insertion des scFv-Gens in den pWW152-Vektor noch ein cDNA-Fragment, welches ein Signalpeptid (SP) einer schweren Immunoglobulinkette kodiert, in den Vektor ligiert.

Die klonierten scFv-Gene mussten nun noch mit dem Gen der ζ -Kette des TCR/CD3-Komplexes der Signaltransduktionseinheit verbunden werden. Dafür wurde eine verkürzte cDNA der murinen ζ -Kette, in der die kodierenden Sequenzen für die 27 N-terminale Aminosäuren der nicht-prozessierten ζ -Ketten deletiert sind (Nummerierung nach Weissman et al., 1988), in einen pGEM-1-Vektor (Promega, Madison, WI, USA) inseriert. Vor diese cDNA der ζ -Kette wurde noch die Gensequenz der murinen CD8 α -hinge-Region einer schweren Immunoglobulinkette (Nukleotidposition 519-698, Nummerierung nach Zamoyska et al., 1985) kloniert. Für die CD8 α -hinge-Region wurde gezeigt, dass sie für eine effiziente Antigenbindung nötig ist, da sie den Abstand des scFv-Fragments zur Membranoberfläche vergrößert. Vor die CD8 α -hinge-cDNA wurde anschließend die Signalpeptid und scFv-Fragment kodierende cDNA inseriert.

Das entstandene Plasmid pGem[scFv(VFF17 oder VFF18):a:z] enthielt die cDNA, welche das scFv (VFF17 oder VFF18), die CD8 α -hinge-Region und die ζ -Kette des TCR/CD3-Komplexes kodierte, im selben Leseraster.

3.2.2 Insertion der cDNA des c-myc-Epitops in das cDNA-Konstrukt des chimären Rezeptors

Ein c-myc-Marker sollte für eine schnelle Überprüfung von erzielten Transduktionseffizienzen bei der retroviralen Infektionen von T-Zellen und zur Überprüfung der Oberflächenexpression des chimären Rezeptors in die extrazelluläre Domäne des chimären Rezeptors inseriert werden. Die direkte Überprüfung der erzielten Transduktionseffizienzen ist vor allem für die Infektion von primären T-Zellen wichtig, da diese *in vitro* nur eine limitierte Lebensdauer besitzen und eine Resistenzgen-Selektion sich negativ auf ihre biologische Aktivität auswirken könnte. Eine schnelle und methodisch einfache Überprüfung einer erfolgreichen Transduktion der primären T-Zellen ist auch für eine spätere klinische Anwendung unbedingt notwendig. Durch das in der extrazellulären Domäne des chimären Rezeptors inserierte c-myc-Epitop wurde mittels c-myc-spezifischem Antikörper die quantitative Bestimmung der Oberflächenexpression des chimären Rezeptors und der Ermittlung der Transduktionseffizienzen im Durchflusszytometer ermöglicht. Für die FACS-Analyse wurde ein monoklonaler c-myc-Antikörper (Klon 9E10) verwendet, der die Aminosäuresequenz EQKLISEEDL des c-myc-Epitops erkennt. Das c-myc-Epitop sollte zwischen das scFv-Fragment und die CD8 α -hinge Region inseriert werden, um möglichst nicht die Eigenschaften des chimären Rezeptors zu verändern. Der schematische

Aufbau dieses chimären Rezeptors und der Nachweis des c-myc-Markers ist in Abbildung 3.12 dargestellt.

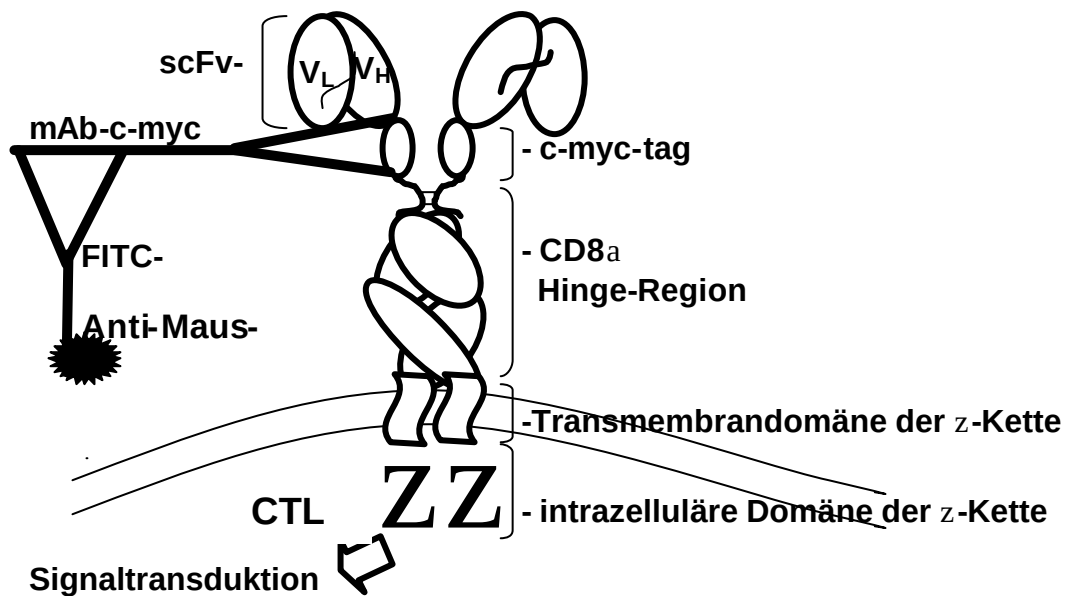


Abb. 3.12: Schematische Darstellung des chimären, homodimeren Rezeptorproteins und des Expressionsnachweises durch einen c-myc-Antikörper. Das chimäre Rezeptorprotein enthielt für eine spezifische Antigenerkennung ein scFv(single chain Fc)-Fragment, welches von den parentalen Antikörpern gegen CD44v7/8- oder CD44v6-Epitope abgeleitet war und sich zusammensetzte aus der VH (variablen Domäne der schweren Kette), die über den flexiblen Peptidlinker mit der VL (variablen Domäne der leichten Kette) verbunden war. Das c-myc-Epitop (c-myc-tag) diente zur Expressionsanalyse des chimären Rezeptors auf der T-Zelloberfläche. Es konnte durch einen spezifischen c-myc-Antikörper, der seinerseits durch ein FITC-markiertes Kaninchen Anti-Maus-IgG nachgewiesen wurde, ermittelt werden. Das in der FACS-Analyse gemessene Fluoreszenzsignal ermöglichte den Expressionsnachweis des chimären Rezeptors. Der Rezeptor enthielt außerdem die CD8 α -hinge-Region, welche den Abstand des scFv-Fragments zur Zellmembran vergrößerte und dadurch eine effiziente Antigenbindung ermöglichte. Die ζ -Kette des TCR initiierte nach Antigenbindung die Signaltransduktion.

Das c-myc-Epitop konnte aus einem pGem [y:a:z]-Vektor verwendet werden, der freundlicherweise von Winfried Wels zur Verfügung gestellt wurde. Der Vektor enthielt außer der Sequenz, die den c-myc-Marker (y) kodierte, dieselben Sequenzen, die für die α -CD8-hinge Region (a) und die ζ -Kette (z) kodierten, wie der unter 3.2.1 beschriebenen pGem[scFv(VFF17 oder VFF18):a:z].

Aus dem pGem[scFv(VFF17 oder VFF18):a:z] wurde das *HindIII/XbaI* geschnittene SP-scFv-Fragment isoliert und in den *HindIII/XbaI* geöffneten pGem[y:a:z] ligiert, so dass das fertige cDNA-Fragment, welches den chimären Rezeptor kodierte, im selben Leseraster im pGem[scFv(VFF17 oder VFF18):y:a:z] vorlag. Das Fusionsgen enthielt somit Sequenzen, die das Signalpeptid einer schweren Immunglobulinkette, das scFv-Fragment gegen das CD44v7/8- oder CD44v6-Epitop, den c-myc-Marker, die CD8 α -hinge-Region und die ζ -Kette kodierten.

Das komplette Fusionsgen wurde gelelektrophoretisch gereinigt und in die *EcoRI*-Schnittstelle des retroviralen pL-X-SN-Vektor ligiert.

Der retrovirale Vektor pL-X-SN auf Basis des Moloney Maus Leukämie Virus (MoMuLV) erlaubt die Transkription des inserierten cDNA-Fragments durch Kontrolle des Moloney Maus Sarkom Virus (MoMuSV)-5'LTR-Promotors. Der Vektor enthält außerdem ein Neomycinresistenzgen, welches von einem frühen SV40-Promotor kontrolliert wird. Das bakterielle Transposon *Tn5 Neo^r*, das die

Aminoglykosid-3-Phosphotransferase II kodiert, dient der späteren Selektion stabiler Transfektanten. Die Zellen werden nach der Transduktion in Medium inkubiert, welches das Neomycin-Analogon Geneticin®-Sulfat (G418) enthält. G418 interagiert mit den 80S-Ribosomen eukaryotischer Zellen und blockiert die Proteinbiosynthese in höheren Zellen, wodurch diese getötet werden. Transfektanten sind durch die Aminoglykosid-3-Phosphotransferase in der Lage, G418 an den unterschiedlichsten Stellen durch Phosphorylierung zu inaktivieren. Der Vektor enthält außerdem ein internes Verpackungssignal sowie terminale LTR's, welche die Voraussetzung für die Verpackung des Plasmids in retrovirale Partikel sind. Für die bakterielle Plasmidamplifikations- und Ampicillinresistenz-Funktionen besitzt der Vektor eine pBR-22-Basis.

Die richtige Orientierung des Fusionsgens wurde durch enzymatische Spaltung in verschiedene Fragmente durch Restriktionsendonukleasen überprüft.

Abbildung 3.13 zeigt die schematische Darstellung des pL[scFv(VFF17):y:a:z]SN.

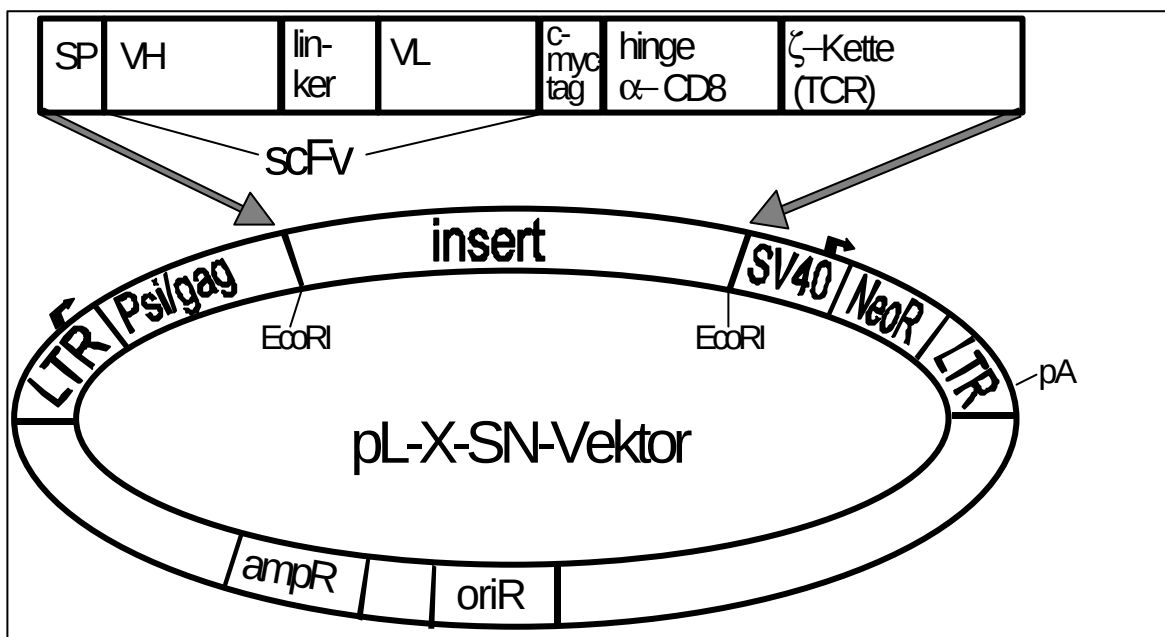


Abb.3.13: Schematische Darstellung des retroviralen pL-X-SN-Vektors mit dem inserierten Fusionsgen des chimären Rezeptors (pL[scFv(VFF17 oder VFF18):y:a:z]SN.

Komponenten des Fusionsgens: SP = Signalpeptid der schweren Kette eines Immunglobulins, das scFv(= single chain Fc)-Fragment, das c-myc-tag (= c-myc-Marker), die CD8α-hinge-Region und die ζ-Kette des TCR/CD3-Komplexes. Die Transkription des Fusionsgens wurde vom Promotor des 5'LTRs des Moloney Maus Sarkom Virus (MoMuSV) kontrolliert. Das Verpackungssignal (=ψ) diente dem Einbau des Plasmid in die retrovirale Hülle. Für die biologische Sicherheit ist das gag-ATG-Sartkodon in ein TAG-Stopkodon ausgetauscht worden. Der Vektor enthielt außerdem das Neomycin-Resistenzgen (*NeoR*) dessen Transkription durch den frühen SV40-Promotor kontrolliert wurde. Das pA-Signal im 3'-LTR des MoMuLV (Moloney Maus Leukämie Virus) ermöglichte die Polyadenylierung. Der bakterielle Replikationsstartpunkt (*oriR*) und das β-Lactamase-Gen (*ampR*) stellten Sequenzen aus pBR-322-Basis dar. Die Transkriptionsstartpunkte sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Die Nukleotide und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des chimären Rezeptors, kodiert durch den pL[scFv(VFF17):y:a:z]SN-Vektor, sind in Abbildung 3.14 dargestellt.

CCG <u>G AA TTC</u> GCC ACC		
^{EcoRI} ATG GAC TGG ATC TGG CGC ATC CTC TTC CTC GTC GGC GCT GCT ACC GGC GCT CAT TCT CAG	60	SP
M* D W I W R I L F L V G A A T G A H S Q	20	
GTA CAA <u>CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAG CTT GTG AGG CCA GGG GCG TTA GTC AAG TTG TCC</u>	120	
V Q L Q Q S G A E L V R P G A L V K L S	40	
TGC AAA TCT TCT GGC TTC AAC ATT AAA GAC TAC TAT ATG CAC TGG GTG AAA CAG AGG CCT	180	
C K S S G F N I <u>K D Y Y M H</u> W V K Q R P	60	
^{VH CDR} GAA CAG GGC CTG GAG TGG ATT GGA TGG ATT GAT CCT GAG AAT GGT GAT TCT ATA TAT GAC	240	
E Q G L E W I G W I D P E N G D S I Y D	80	
^{VH CDR 2} CCG AAG TTC CAG GGC AAG GCC AGT ATA ATA GTC GAC ACA TCC TCT AAC ACA ACC TAC CTG	300	
<u>P K F Q G</u> K A S I I V D T S S N T T Y L	100	
CAG CTC ACC AGC CTG ACA TCT GAG GAC ACT GCC GTC TAT TAC TGT GCT AGA TCC TTT GCT	360	
Q L T S L T S E D T A V Y Y C A R <u>S F A</u>	120	
TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTT TCC TCT GGC GGT GGC GGT TCT GGT GGC GGT	420	
<u>Y W G Q G T T V</u> T V S S <u>G G G G S G G G</u>	140	
^{VH CDR 3} GGC TCC GGC GGT GGC GGT TCT GAC ATC CAG CTG ACA CAG TCT GCA CTC ACT TTG TCG GTT	480	
<u>G S G G G G S</u> D I Q L T Q S A L T L S V	160	
GCC ATT GGA CAA CCA GCC TCC ATC TCT TGC AAG TCA AGT CAG AGC CTC TTA GAT AGT GAT	540	
A I G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D	180	
^{Vk CDR 1} GGA AAG ACA TAT TTG AAT TGG TTG TTA CAG AGG CCA GGC CAG TCT CCA AAG CGC CTA ATC	600	
G K T Y L N W L L Q R P G Q S P K R L I	200	
TAT CTG GTG TCT AAA CTG GAC TCT GGA GTC CCT GAC AGG TTC ACT GGC AGT GGA TCA GGG	660	
Y L V S K L D S G V P D R F T G S G S G	220	
^{Vk CDR 3} ACA GAT TTC ACA CTG AAA ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT TTG GGA GTT TAT TAT TGC	720	
T D F T L K I S R V E A E D L G V Y Y C	240	
TGT CAA GGT ACA CAT TTT CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGC ACA AAG CTG GAG ATC AAA GCT	780	
C Q G T H F P Y T F G G G T K L E I K A	260	
^{Vk CDR 3} <u>CTA GAA</u> CAG AAA CTG ATC TCC GAA GAA GAT CTG AAC CTA GAG ATC AGC AAC TCG GTG ATG	840	
L <u>E Q K L I S E E D L N L E I S N S V M</u>	280	
^{XbaI} TAC TTC AGT TCT GTC GTG CCA GTC CTT CAG AAA GTG AAC TCT ACT ACT ACC AAG CCA GTG	900	
Y F S S V V P V L Q K V N S T T T K P V	300	
CTG CGA ACT CCC TCA CCT GTG CAC CCT ACC GGG ACA TCT CAG CCC CAG AGA CCA GAA GAT	960	
L R T P S P V H P T G T S Q P Q R P E D	320	
TGT CGG CCC CGT GGC TCA GTG AAG GGG ACC GGA TTG GAC TTG CTA GAG GAT CCC AAA CTC	1020	
C R P R C S V K G T G L D L L E D P K L	340	
TGC TAC TTG CTA GAT GGA ATC CTC TTC ATC TAC GGA GTC ATC ATC ACA GCC CTG TAC CTG	1080	
<u>C Y L L D G I L F I Y G V I I T A L Y L</u>	360	
^{Transmembrandomäne} AGA GCA AAA TTC AGC AGG AGT GCA GAG ACT GCT GCC AAC CTG CAG GAC CCC AAC CAG CTC	1140	
R A K F S R S A E T A A N L Q D P N Q L	380	
TAC AAT GAG CTC AAT CTA GGG CGA AGA GAG GAA TAT GAC GTC TTG GAG AAG AAG CGG GCT	1200	
Y N E L N L G R R E E Y D V L E K K R A	400	
CGG GAT CCA GAG ATG GGA GGC AAA CAG CAG AGG AGG AGG AAC CCC CAG GAA GGC GTA TAC	1260	
R D P E M G G K Q Q R R R N P Q E G V Y	420	
AAT GCA CTG CAG AAA GAC AAG ATG GCA GAA GCC TAC AGT GAG ATC GGC ACA AAA GGC GAG	1320	
N A L Q K D K M A E A Y S E I G T K G E	440	
AGG CGG AGA GGC AAG GGG CAC GAT GGC CTT TAC CAG GGT CTC AGC ACT GCC ACC AAG GAC	1380	
R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D	460	
ACC TAT GAT GCC CTG CAT ATG CAG ACC CTG GCC CCT CGC TAA CA G CCA GGG CAT TTC TCC	1440	
T Y D A L H M Q T L A P R * Q P G H F S	473	
CTC ACG GGC AGA TCC CCG GGT ACC GAG CTC G AA TTC		
L T G R S P G T E L E F		
^{EcoRI}		

c-myc
C
D
8
α
|
ζ

Abb.3.14: Nukleotidsequenzen und davon abgeleitete Aminosäuresequenz des *scFv(VFF17):y:a:z*-Fusionsgens. SP: Position 1-57, *scFv*-Fragment (VFF17): Position 66-773, c-myc-Marker: Position 784-816, hinge-Region: Position 823-999, ζ-Kette: Position 1009-1419. Die abgeleitete Aminosäuresequenz der hypervariablen Bereiche (CDR= complementary determining region) in der variablen Domäne der schweren und der leichten Kette des VFF17-Antikörpers und die Transmembrandomäne der ζ-Kette sind unterstrichen. Die verwendete *XbaI* und *EcoRI*-Schnittstellen sind angegeben. Die *HindIII*-Schnittstelle geht bei der Klonierung des Fusionsgens aus dem pGem[*scFv(VFF17):a:z*] in den pL-X-SN-Vektor verloren.

3.2.3 Retroviraler Gentransfer des *scFv(VFF17)y:a:z*-Fusionsgens in die Verpackungszelllinien

Die ecotrope Verpackungszelllinie Ω E wurde durch das FuGENETM-Transfektions-Reagenz (Boehringer, Mannheim) oder durch Elektroporation mit dem pL[scFv(VFF17):y:a:z]SN-Plasmid transfiziert. In dieser Zelllinie werden die Gag und Pol-Proteine sowie die Env-Proteine über zwei verschiedene stabil integrierte Gen-Konstrukte zur Verfügung gestellt, so dass die Bildung replikationskompetenter Retroviren verhindert wird. Stabil transfizierte Ω E-Zellen (Ω E(VFF17)cyYZ) wurden durch Kultivierung in Medium mit G418 selektioniert. Es wurden zunächst eine Mischpopulation der Ω E(VFF17)cyYZ -Zellen für die Infektion der PA317-Zelllinie isoliert. Die PA317-Zelllinie produziert das amphotrophe Env-Genprodukt und ist nach der Infektion in der Lage, humane Zellen zu infizieren. Weiterhin wurden einzelne Klone der infizierten Ω E- und PA317-Zelllinie für die direkte Infektion der T-Zellen isoliert. Die Virustiter der infizierten Ω E- und PA317-Klone wurde anhand der Übertragung des Neomycinresistenzgens in murine NIH/3T3-Fibroblasten durch Auswertung der Anzahl G418-resistenter Kolonien in der Monolayerkultur bestimmt und lagen zwischen 10^3 und 10^5 CFU/ml (Cluster forming units = Anzahl G418 resistenter Kolonien/ml viralen Kulturüberstandes).

Die Expression des chimären Rezeptors wurde bei infizierten NIH/3T3-Fibroblasten (NIH/3T3(VFF17)cyYZ) mit Hilfe der FACS-Analyse überprüft. Die transfizierten NIH/3T3-Fibroblasten (Mischpopulation) wurden durch Kultivierung in Medium mit G418 auf stabile Transfektanten selektioniert. Die transfizierten NIH/3T3(VFF17)cyYZ-Zellen und nicht transfizierte NIH/3T3-Zellen wurden mit einem c-myc-Antikörper und mit einem Kontroll-Antikörper gleichen Isotyps, aber irrelevanter Spezifität (Isotyp-Kontrolle) inkubiert. Das Ergebnis der Analyse im Durchflusszytometer ist in Abbildung 3. 15 dargestellt. Das dunkle Histogramm repräsentiert die Färbung der NIH/3T3-Fibroblasten mit einem Isotyp-Kontroll-Antikörper (IgG₁ κ). Nicht transfizierte NIH/3T3-Fibroblasten zeigten bei der Inkubation mit dem c-myc-Antikörper keine Verschiebung des Histogramms (gestrichelte Linie). Es traten somit keine unspezifischen Reaktionen des c-myc-Antikörpers auf. Bei der FACS-Analyse der NIH/3T3(VFF17)cyYZ-Fibroblasten (Histogramm mit durchgezogene Linie), die mit dem c-myc-Antikörper inkubiert wurden konnte eine deutliche Verschiebung des Histogramms im Vergleich zur Isotyp-Kontrollreaktion gemessen werden. Diese Zellen exprimierten somit den chimären Rezeptor auf der Zelloberfläche.

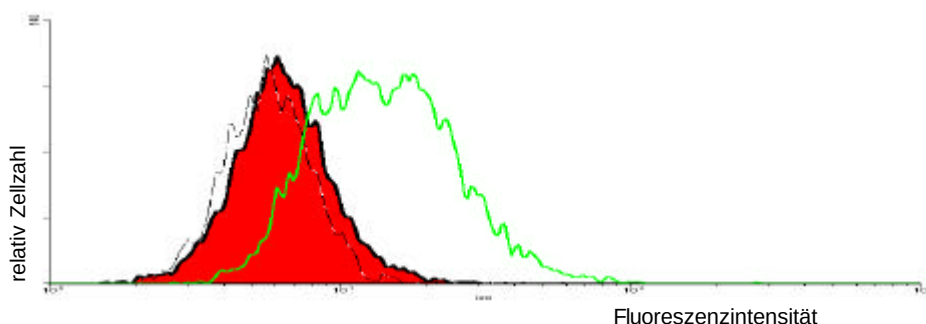


Abb. 3.15: FACS-Analyse der transfizierten (durchgezogene Linie) und nichttransfizierten NIH/3T3-Fibroblasten (gestrichelte Linie) nach Inkubation der Zellen mit dem c-myc-Antikörper (nicht ausgefülltes Histogramm) und dem IgG₁ κ -Isotyp-Kontroll-Antikörper (ausgefülltes Histogramm). In den Diagrammen ist die relative Zellzahl (x-Achse) gegen die Fluoreszenzintensität (y-Achse, logarithmischer Maßstab) aufgetragen.

Das Histogramm der NIH/3T3(VFF17)cyYZ-Fibroblasten verlief über eine große Bandbreite was für unterschiedliche Expressionsstärken des chimären Rezeptors innerhalb der Zellpopulation spricht.

3.2.4 Transduktion zytotoxischer T-Zellen mit dem chimären Rezeptorgen

Ω E- und PA317-Klone mit hohen Virustitern wurden für die weiteren Infektionen der T-Zellen verwendet. Die CI96-T-Zelllinie konnte durch wiederholte Infektion an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit dem retroviralen Überstand der PA317-Zellen nicht erfolgreich transfiziert werden. Bei der Infektion der CI96-T-Zellen mit retroviralem Überstand der infizierten Ω E-Klone wurden nur wenige Zellen transfiziert. In der Literatur wurde mit dieser Methode auch nur von sehr geringen Transferraten von unter 5% berichtet (Di Ianni et al., 1999). Die Infektion von primären T-Zellen mit dem Ziel einer späteren klinisch-effektiven Anwendung erforderte jedoch höhere Transferraten. Altenschmidt et al. (1996) konnten durch eine Kokultivierungsmethode gute Transferraten erzielen. Bei dieser Methode wurden die T-Zellen für die Infektion mit einem infizierten Ω E-Klon kokultiviert. Abbildung 3.16 zeigt die schematische Darstellung der experimentellen Vorgehensweisen. Zunächst wurde die Methode der Kokultivierung an CI96-T-Zellen getestet. Die Zellen wurden nach der Infektion in Medium mit G418 auf stabil transfizierte Zellen selektioniert und einzelne Klone, die mit CI96(VFF17)cyYZ bzw. CI96(VFF18)cyYZ bezeichnet wurden, isoliert. Bei einer erfolgreichen Infektion der T-Zellen sollten mit dieser Methode primäre T-Zellen, die aus Mausmilzen isoliert wurden, infiziert und als Mischpopulation weiterverwendet werden.

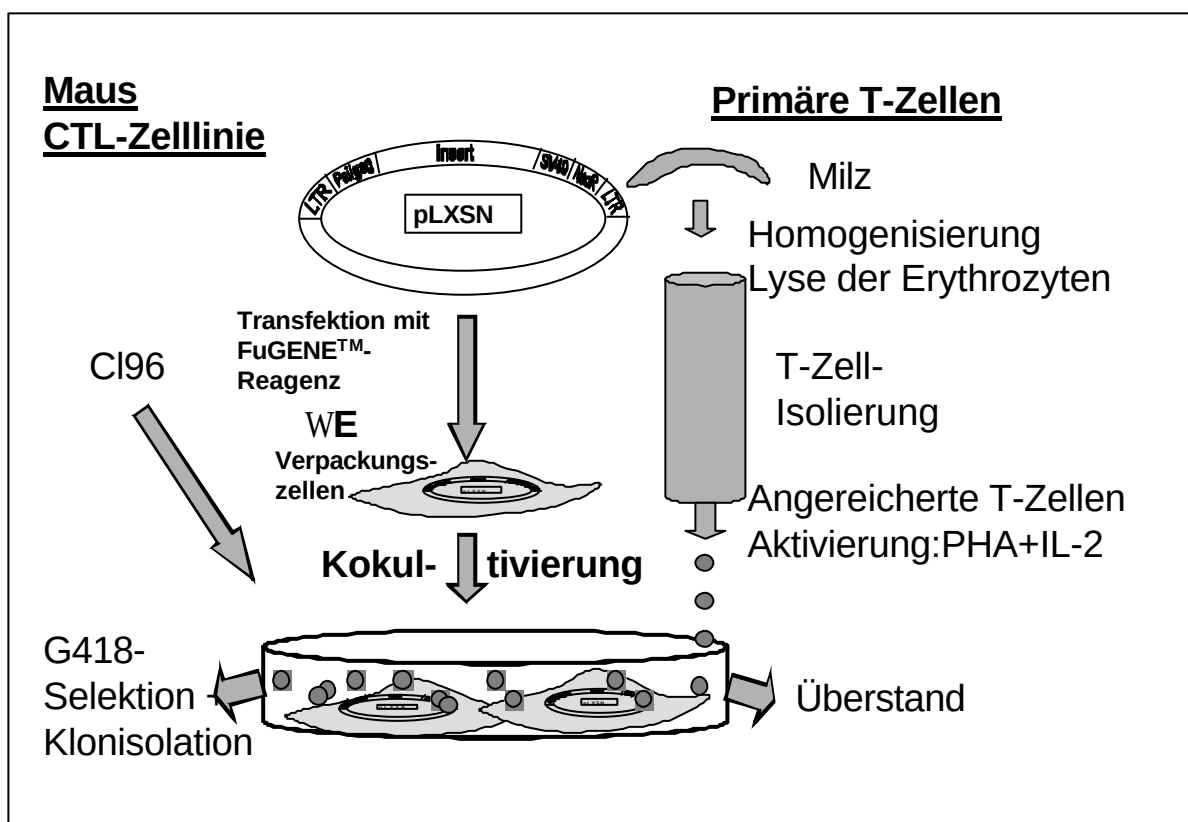


Abb. 3.16: Schematische Darstellung der experimentellen Vorgehensweise der Infektion von CI96-T-Zellen und primären T-Zellen durch die Kokultivierung mit transfizierten Ω E(VFF17)cyYZ-Klonen.

3.2.4.1 Stimulation der T-Zell-Proliferation für die Optimierung der retroviren Transduktion

Retroviren infizieren nur mitotisch aktive Zellen, deswegen können T-Zellen, die eine geringe Zellzyklusrate besitzen, schwer retroviral infiziert werden. Für eine gute Transfereffizienz wurde die optimale Proliferation der T-Zellen in einem MTT-Proliferationstest ermittelt. Bei diesem Test setzen metabolisch aktive Zellen das Tetrazoliumsalz MTT zu rotem Formazan um, welches photometrisch quantifiziert werden kann. Die Stimulation der Proliferation erfolgte an $2,5 \times 10^4$ CI96-T-Zellen pro Ansatz durch Proleukin® und PHA (Phytohämagglutinin) über 48h. Proleukin® (= Aldesleukin) ist ein künstlich hergestelltes Protein, das Interleukin-2 ähnlich ist und die gleiche biologische Aktivität besitzt.

Die Inkubation der T-Zellen mit verschiedenen Proleukin®-Konzentrationen (300 IE/ml -1000 IE/ml) zeigte das die Proliferation der T-Zellen bis zu einer Proleukin®-Konzentration von 1000 IE/ml kontinuierlich anstieg, ohne ein Plateau zu erreichen.

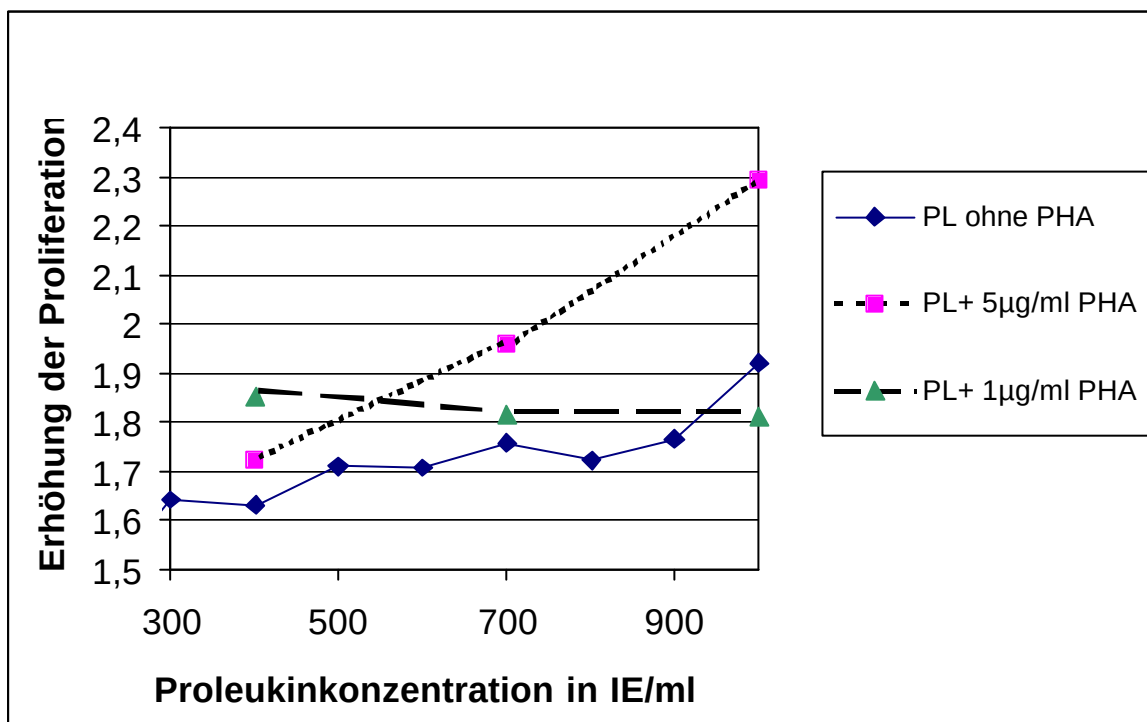


Abb. 3.17: Stimulation der Proliferation von CI96-T-Zellen durch verschiedene Proleukin®-Konzentrationen (300 IE/ml - 1000 IE/ml), sowie durch 1000 IE/ml Proleukin® in Kombination mit 1 µg/ml bzw. 5 µg/ml PHA. Im MTT-Test wurde die Farbumsetzung des MTT's durch metabolisch aktive Zellen zu rotem Formazan durch Messung der Extinktion bei 580 nm ermittelt. Die ermittelten Extinktion sind direkt proportional zur Zellzahl, so dass sie auf die Farbumsetzung der nur in T-Zellmedium kultivierten CI96-Zellen bezogen wurden.

Eine Inkubation der T-Zellen in Medium mit 1 µg/ml PHA führte zu einer 1,8-fachen Stimulation der Proliferation verglichen zur Kultivierung der T-Zellen in T-Zellmedium ohne PHA und Proleukin®. Diese erhöhte Proliferation war unabhängig von der Proleukin®-Konzentration (300 IE/ml, 700 IE/ml und 1000 IE/ml). Im Vergleich zu den T-Zellen, die nur in T-Zellmedium kultiviert wurden, konnte die Proliferation durch 5 µg/ml PHA im Medium in Kombination mit 400 IE/ml Proleukin® 1,7-fach, mit 700 IE/ml Proleukin® 2-fach und mit 1000 IE/ml Proleukin® 2,3-fach erhöht werden. Die höchste Proliferationsrate der CI96-T-

Zellen wurde somit durch Inkubation mit 1000 IE/ml Proleukin® und 5 µg/ml PHA erzielt.

Für die Optimierung der retroviralen Transfektion von primären T-Zellen wurde die Stimulation der Proliferation durch Proleukin®, PHA, ConcanavalinA (ConA) und Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) untersucht. $5,6 \times 10^6$ aus Mausmilzen isolierte primäre T-Zellen wurden pro Ansatz im MTT-Proliferationstest eingesetzt. Zunächst wurden die Zellen mit verschiedenen Proleukin®-Konzentrationen (500 IE/ml, 750 IE/ml und 1000 IE/ml) inkubiert (Abbildung 3.18)

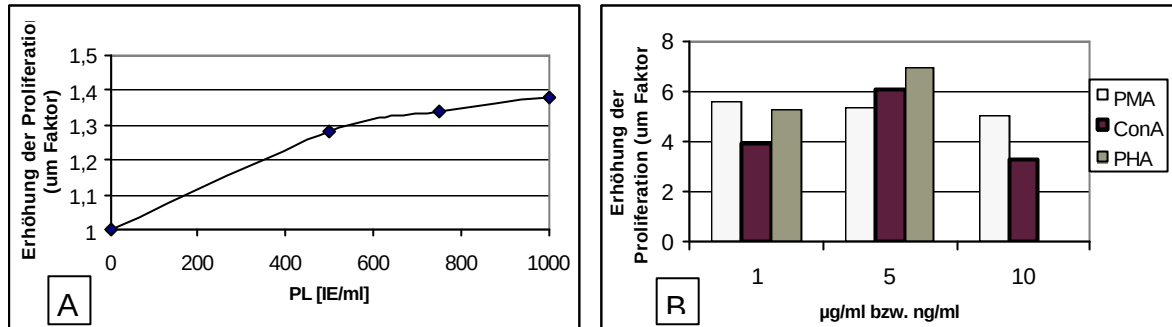


Abb.3.18: Erhöhung der Proliferation von primären T-Zellen durch Inkubation der Zellen in Medium mit verschiedenen Proleukin®-Konzentrationen (500 IE/ml, 750 IE/ml und 1000 IE/ml, A) oder in Medium mit 1000 IE/ml Proleukin® in Kombination mit PHA (1 µg/ml und 5 µg/ml) und ConA (1, 5, 10 ng/ml) sowie PMA (1, 5, 10 ng/ml) im Vergleich zur Proliferation von Zellen, die nur in T-Zellmedium kultiviert wurden.

Die Proliferation der Zellen wurde durch 500 IE/ml Proleukin® im Vergleich zu Medium ohne Proleukin® 1,3-fach verstärkt. Eine Erhöhung der Proleukinkonzentration (750 IE/ml und 1000 IE/ml) konnte die Proliferation der primären T-Zellen nur gering verstärken (1,34- und 1,38-fach).

Da Lektine durch indirekte TCR-Vernetzung potente Stimulatoren der T-Zellproliferation darstellen, sollte eine höhere Stimulation der Proliferation durch 1000 IE/ml Proleukin® in Kombination mit PHA (1 µg/ml und 5 µg/ml) und ConA 1, 5, 10 ng/ml, sowie mit PMA (1, 5, 10 ng/ml) erzielt werden. Die Agenzien führten alle zu einer deutlich höheren Proliferation der T-Zellen. PMA konnte in allen eingesetzten Konzentrationen (1, 5, 10 ng/ml) eine ca. 5-fache Erhöhung der Proliferation erzielen. Durch 1 ng/ml ConA wurde die Proliferation 3,9-fach erhöht und lies sich durch Erhöhung der Konzentration auf 5 ng/ml verstärken (6-fach). Eine weitere Konzentrationserhöhung führte jedoch nur noch zu einer 3,3-fachen Verstärkung, vermutlich durch Erreichen einer toxischen Konzentration. Mit 1 µg/ml PHA wurde bereits eine 5,3-fache Proliferationssteigerung erzielt, die sich durch eine Konzentrationserhöhung (5 µg/ml) auf eine 6,3-fache Steigerung erhöhen ließ. Die beste Proliferation der primären T-Zellen und der CI96-Zellen konnte somit durch Wachstum in Medium mit 5 µg/ml PHA zusammen mit 1000 IE/ml Proleukin® erreicht werden, so dass die Proliferation der T-Zellen für die retrovirale Infektion durch diese Agenzien stimuliert wurde.

3.2.4.2 Transduktion des scFv(VFF17):y:a :z-Fusionsgens in die CI96-T-Zellen und Oberflächenexpression des chimären Rezeptors

Die CI96-T-Zellen wurden durch Inkubation mit ΩE(VFF17)cyYZ-Klonen in Anwesenheit von Proleukin® 1000 U/ml, 9 µg/ml Polybren und 5 µg/ml PHA infiziert. Das Polykation Polybren neutralisiert die negative Ladung auf der Oberfläche der Zellen und der retroviralen Partikel und erleichtert so ihre Annäherung und letztendlich die Infektion der Zellen.

Nach Selektion stabil transfizierter Zellen in Medium mit G418 wurden sowohl T-Zellklone wie Mischpopulationen auf die Expression des chimären Rezeptors im Durchflusszytometer untersucht.

Die FACS-Analyse von C196-Wildtypzellen zeigte zwei Zellpopulationen (R1 und R3) mit verschiedener Zellgröße und Granularität (Abb.3.19, A). Daraufhin wurde die lebende T-Zellpopulation durch eine Propidiumjodid (PI)-Färbung ermittelt und es zeigte sich, dass die Zellen aus R1 die lebende nicht PI-gefärbte Population (R2) darstellten, während die Population in Gate 3 (R3) die toten PI-gefärbten Zellen (R4) repräsentierten (A+B). Die toten Zellen besaßen eine starke Eigenfluoreszenz (nicht ausgefülltes Histogramm, C), so dass bei der Kontrollfärbung mit dem Isotyp-Antikörper eine Verschiebung des Fluoreszenzhistogramms im Vergleich zu den lebenden Zellen (ausgefülltes Histogramm, C) auftrat. Bei der Reaktion des c-myc-Antikörpers (nicht ausgefülltes Histogramm) wurde im Vergleich zur Isotyp-Kontrollfärbung (ausgefülltes Histogramm) eine geringe Verschiebung beobachtet (D). Der gegen das humane c-myc-Epitop gerichtete Antikörper scheint geringe Kreuzreaktionen mit dem intrazellulären murinen c-myc-Protein durchzuführen. Bei den lebenden Zellen trat keine Verschiebung des Fluoreszenzsignals zwischen der Isotyp- und c-myc-Färbung auf (E), so dass eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen durch die PI-Färbung unbedingt nötig war, um Fehlmessungen durch die Hintergrund-Fluoreszenz der toten Zellen auszuschließen. Die PI-Färbung wurde deshalb bei den weiteren FACS-Analysen durchgeführt.

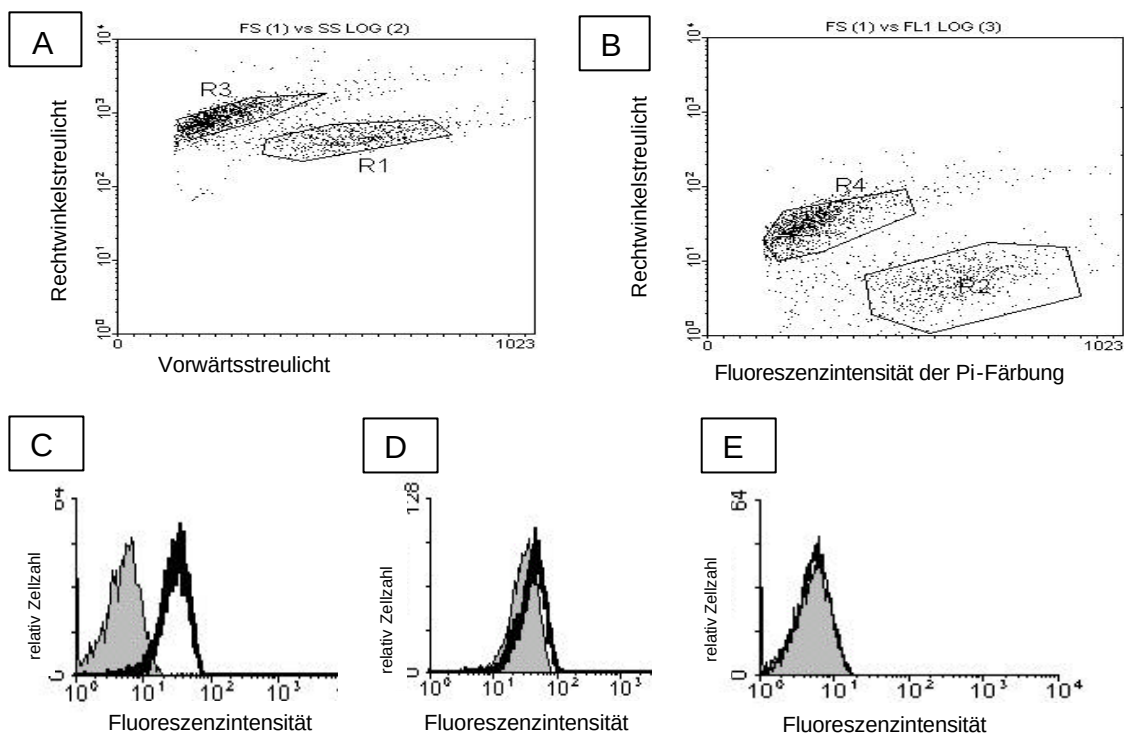


Abb.3.19: FACS-Analyse der C196-Wildtyp-Zellen. A: Streulichthistogramm (X-Achse: Rechtwinkelstreulicht; Y-Achse: Vorwärtstreulicht), B: PI-Färbung (X-Achse: Rechtwinkelstreulicht; Y-Achse: Fluoreszenzintensitäten der PI-Färbung), C: Isotyp-Antikörper-Kontrollfärbung (relative Zellzahl gegen die Fluoreszenzintensitäten). Das ausgefüllte Histogramm stellt jeweils die Antikörperreaktion der lebenden Zellen (gegatet auf R1 und R2) und das nicht ausgefüllte Histogramm die Antikörperreaktion der toten Zellen (gegatet auf R3 und R4) dar. D und E: Histogramme der Isotyp-Antikörper-Kontrollfärbung (ausgefülltes Histogramm) und der c-myc-Färbung (nicht ausgefülltes Histogramm) der toten Zellen (D) und der lebenden Zellen (E).

Die Voraussetzung für die Funktionalität des chimären Rezeptors ist seine Lokalisation auf der Zelloberfläche. Um dies nachzuweisen, wurde die Expression des chimären Rezeptors der CI96(VFF17)cyYZ-Zellen nun im Durchflusszytometer untersucht. Abbildung 3.20 zeigt die Expression eines CI96(VFF17)cyYZ-Klons und einer CI96(VFF17)cyYZ-Mischpopulation (gepoolt).

Die klonalen CI96(VFF17)cyYZ-Zellen zeigten eine Verschiebung des gesamten Histogramms wodurch man auf eine recht homogene Expression des chimären Rezeptors auf den verschiedenen Zellen schließen konnte, während die CI96(VFF17)cyYZ Mischpopulation bei der c-myc-Färbung einen breiteres Histogramm ergaben. In dieser Population traten somit Zellen mit unterschiedlicher Expressionsstärke des chimären Rezeptors auf.

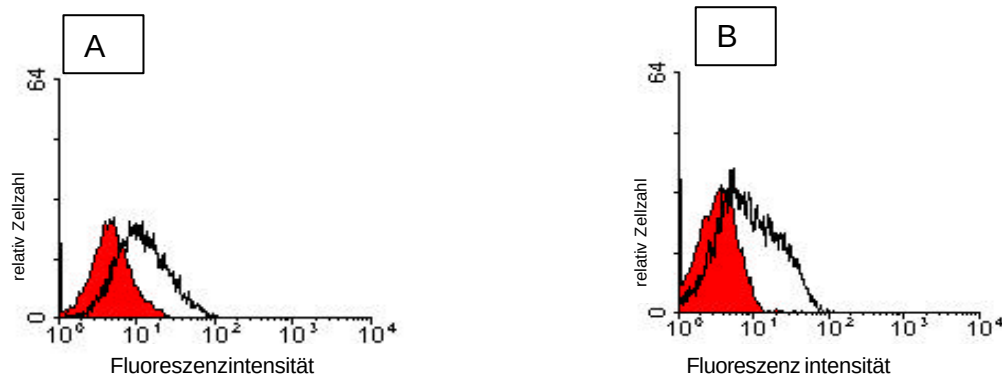


Abb.3.20: FACS-Analyse eines CI96(VFF17)cyYZ-Klones (A) und einer CI96(VFF17)cyYZ-Mischpopulation (B). Die Histogramme zeigen die Färbung mit dem Isotyp-Kontroll-Antikörper (ausgefülltes Histogramm) und mit dem c-myc-Antikörper (nicht ausgefülltes Histogramm; X-Achse: relative Zellzahl; Y-Achse: Fluoreszenzintensitäten).

Die Untersuchung verschiedener CI96(VFF17)cyYZ-Klone in der FACS-Analyse machten Unterschiede in der Expressionsstärke des chimären Rezeptors einzelner Klone sichtbar, wie anhand der relativen Verschiebungen der Maxima der Färbungen mit dem c-myc-Antikörper gegenüber der Kontrolle mit dem Isotyp-Antikörper sichtbar ist (Abbildung 3.21 A). CI96(VFF17)cyYZ-Klon 1 zeigte eine stärkere Expression des chimären Rezeptors als Klon 2. Bei einigen wenigen Klone konnte durch die FACS-Analyse keine Expression des chimären Rezeptors nachgewiesen werden (B).

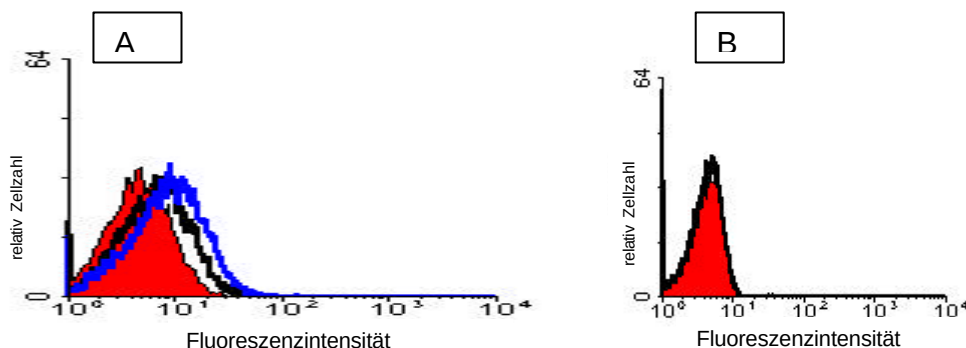


Abb. 3.21: FACS-Analyse verschiedener CI96(VFF17)cyYZ-Klone, die eine unterschiedlich starke (A) bis fehlende Expression des chimären Rezeptors zeigten (B). Die Diagramme stellten die Kontrollfärbung des Isotyp-Antikörpers (ausgefüllte Histogramme) und Färbung des c-myc-Antikörpers (nicht ausgefüllte Histogramme, X-Achse: relative Zellzahl; Y-Achse: Fluoreszenzintensitäten) dar. Die c-myc-Färbung des CI96(VFF17)cyYZ-Klon 1 ist blau, die des CI96(VFF17)cyYZ-Klon 2 schwarz dargestellt.

Die rekombinanten T-Zellen sollten bei einer Therapie dem Patienten möglichst lange zur Verfügung stehen, deshalb ist eine stabile Expression des chimären Rezeptors eine wichtige Voraussetzung. Die Expression des chimären Rezeptors wurde unmittelbar nach der Selektion und Klonexpansion, nach 3 Monaten und nach 7 Monaten in einer FACS-Analyse quantifiziert. Die CI96(VFF17)cyYZ-Klone exprimieren über den untersuchten Zeitraum von 7 Monaten den Rezeptor relativ konstant (Abbildung 3.22). Durch diese lange Expression des chimären Rezeptors auf der T-Zelllinie kann man davon ausgehen, dass die *in vivo* Effizienz der rekombinanten T-Zellen nicht durch eine zeitlich limitierte Expression des Rezeptors begrenzt wird.

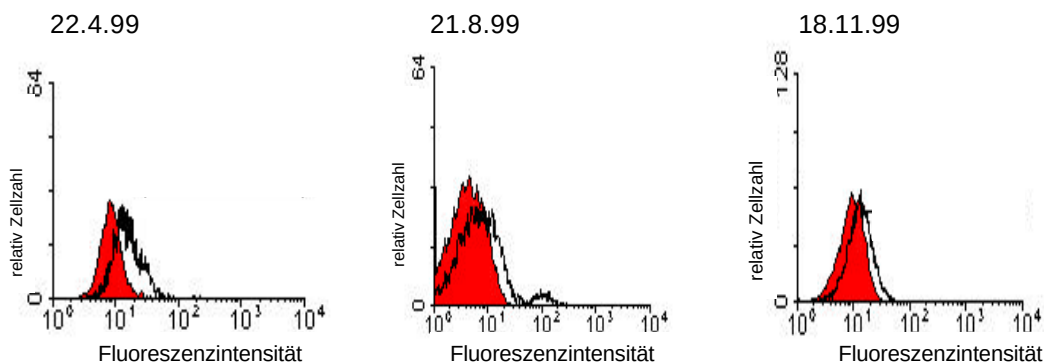


Abb.3.22: Untersuchung der Langzeitexpression des chimären Rezeptors über 7 Monate eines CI96(VFF17)cyYZ-Klons. Die ausgefüllten Histogramme stellen die Fluoreszenzintensitäten der Isotyp-Antikörper-Färbung, die nicht ausgefüllten Histogramme die Fluoreszenzintensitäten der c-myc-Antikörper-Färbung aufgetragen gegen die relative Zellzahl dar.

3.2.4.3 Retroviraler Gentransfer des scFv(VFF18):y:a:z-Fusionsgens

Das pL[scFv(VFF18):y:a:z]SN-Plasmid wurden ebenfalls durch das FuGENETM-Transfektionsreagenz (Boehringer, Mannheim) in die ecotrope Verpackungszelllinie Ω E übertragen. Stabil transfizierte Ω E-Zellen (Ω E VFF18cyYZ) wurden durch Kultivierung in Medium mit G418 selektioniert und die Klone mit den besten Virustitern (1×10^5) für die Infektion der CI96-T-Zellen durch Kokultivierung verwendet. Die infizierten T-Zellen wurden selektioniert, Klone isoliert und expandiert. Bei den selektionierten CI96(VFF18)cyYZ-Klonen konnte im Durchflusszytometer jedoch keine Expression des chimären Rezeptors (Abb. 3.23) nachgewiesen werden.

Es sollte nun überprüft werden ob auch die Verpackungszelllinie keine Expression des chimären Rezeptors auf der Zelloberfläche zeigte. Es wurden verschiedene Ω E(VFF18)cyYZ-Klone im Durchflusszytometer auf die Expression des chimären Rezeptors untersucht. Sie zeigten ebenfalls keine nachweisbare Expression des Rezeptors, so dass die fehlende Expression nicht nur auf die T-Zelllinie beschränkt war.

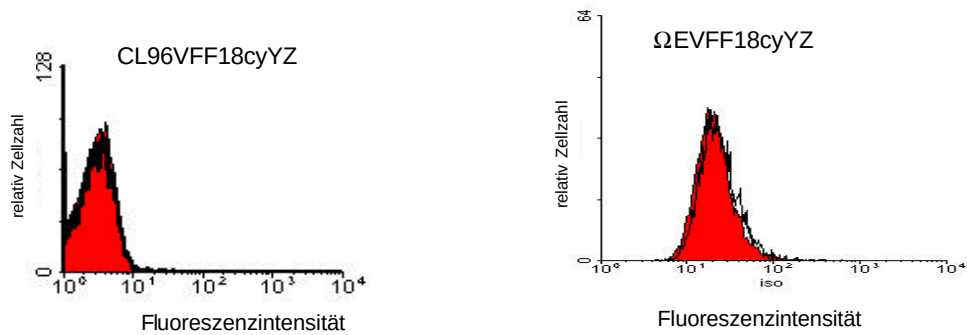


Abb. 3.23: Nachweis der fehlenden Expression des chimären Rezeptors auf CL96VFF18cyYZ- und Ω EVFF18cyYZ-Zellen. Die Fluoreszenzsignale (gegen die relative Zellzahl) der Isotyp-Antikörper-Kontrollfärbung werden von dem ausgefüllten Histogramm dargestellt und die der c-myc-Antikörper von dem nicht ausgefüllten Histogramm.

Die Expression des chimären Rezeptors ließ sich durch die FACS-Analyse auf der Proteinebene nicht nachweisen. Es sollte nun überprüft werden, ob eine Transkription des chimären Rezeptorgens stattgefunden hatte. Dafür wurde eine RT-PCR mit einem 5'-Primer, der in der Sequenz des c-myc-Epitops ansetzte, und einem 3'-Primer, der in der Sequenz der ζ -Kette ansetzte, durchgeführt.

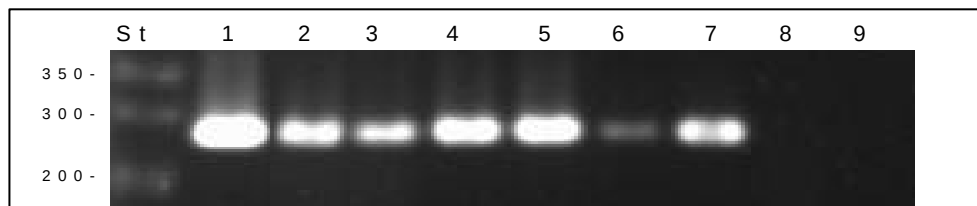


Abb. 3.24: Transkription des *scFv(VFF18):y:a:z*-Gens. Die cDNAs von verschiedenen CL96VFF18cyYZ-Klonen wurden auf die Transkription des *scFv(VFF18):y:a:z*-Gens überprüft. Bei der PCR wurde ein 5'-Primer, der im Bereich des c-myc-Epitops anlagerte, und ein 3'-Primer, der im Bereich der ζ -Kette ansetzte, verwendet. Bei Transkription des chimären Rezeptorgens wurde ein 276 bp großes Transkript amplifiziert, im 1,5%(w/v) Agarosegel aufgetrennt und durch eine Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht.
 Spur 1: Kontroll-PCR mit pL[*scFv(VFF18):y:a:z*]SN-Vektor;
 Spur 2: PCR-Reaktion mit cDNA eines Ω E(VFF17)cyYZ-Klones;
 Spur 3-8: PCR-Reaktion mit cDNA der verschiedenen CL96(VFF18)cyYZ-Klone;
 Spur 9: PCR-Negativkontrolle mit cDNA aus RL95-2-Zellen.
 St= Größenstandard.

Als Positiv-Kontrollen der PCR-Reaktion wurden zum einen der pL[*scFv(VFF18):y:a:z*]SN-Vektor und zum anderen die cDNA eines Ω E(VFF17)cyYZ-Klones, der den chimären Rezeptor an der Oberfläche exprimiert, verwendet. Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Eine Kontamination durch genomische DNA wurde durch den direkten Einsatz der isolierten RNA in die PCR ausgeschlossen. Die CL96VFF18cyYZ-Klone zeigten alle bis auf den Klon in Spur 8 die Transkription des chimären Rezeptorgens, ohne dass sich im Durchflusszytometer die Expression des chimären Rezeptors an der Zelloberfläche nachweisen ließ. Die Ursachen, die zu keiner nachweisbaren Oberflächen Expression des chimären Rezeptors führen, müssen somit auf Proteinebene liegen.

3.2.5 Antgenspezifität der gentechnologisch modifizierten CTL-Zelllinie

3.2.5.1 Bindung von CI96(VFF17)cyYZ-Zellen an CD44v7/8-positive Zielzellen

Die Fähigkeit der CI96(VFF17)cyYZ-Zellen an CD44v7/8-positive Zielzellen zu binden wurde mit HPKII-Zellen getestet, bei denen sich sowohl durch FACS-Analysen wie durch IHC die Expression des CD44v7/8-Epitops nachgewiesen werden konnte. Die Wildtyp CI96-Zellen und zwei CI96(VFF17)cyYZ-Klone mit unterschiedlicher Expression des chimären Rezeptors wurden mit den HPKII-Zellen inkubiert, zentrifugiert und anschließend alle nicht gebundenen T-Zellen mit PBS gründlich abgespült. Die Ethylviolettgefärbung zeigte, dass die Wildtyp CI96-T-Zellen nicht mit den HPKII-Zellen interagieren, während die CI96(VFF17)cyYZ-Klone mit den Zielzellen reagierten. Die Bindungsfähigkeit der T-Zellen an die Zielzellen wurde somit durch den chimären Rezeptor vermittelt.

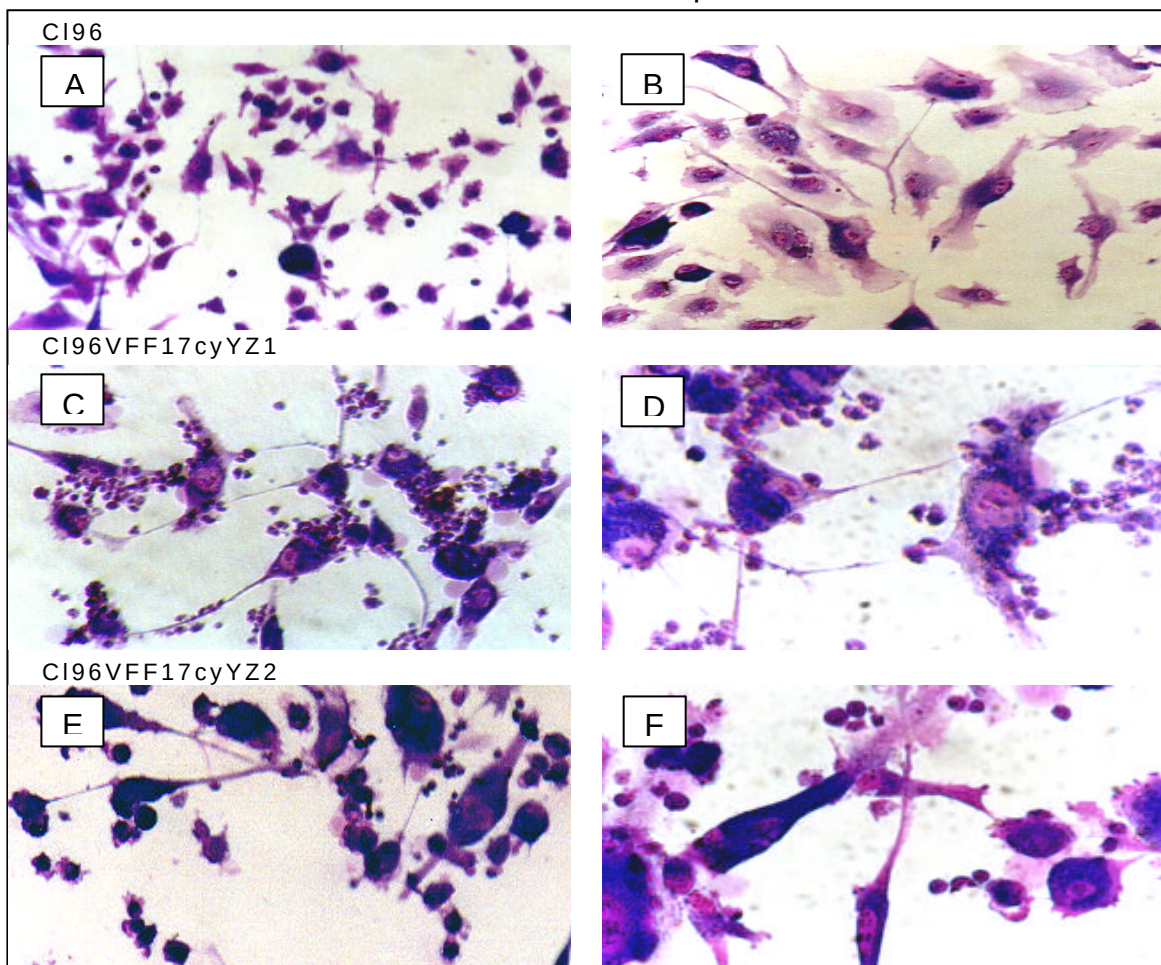


Abb. 3.25: Rosettingtest mit CI96-Zellen und zwei CI96(VFF17)cyYZ-Klonen. Die CD44v7/8-positiven Targetzellen (HPKII) wurden mit den T-Zellen 10 Minuten bei 37°C inkubiert, zentrifugiert und anschließend 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nicht gebundene T-Zellen wurden durch gründliches Abspülen mit PBS entfernt, bevor die Zellen mit Ethylviolett gefärbt wurden. CI96-Zellen konnten nicht an die HPKII-Zellen (A+B) binden, während die CI96(VFF17)cyYZ-Klonen mit den HPKII-Zellen interagierten (C-F). Der CI96(VFF17)cyYZ-Klon 1 mit einer höheren Expression des chimären Rezeptors als der CI96(VFF17)cyYZ-Klon 2 konnten stärker an die HPKII-Zellen binden. Für die Ansätze sind je zwei verschiedene Vergrößerungen abgebildet.

Es interagierten deutlich mehr T-Zellen des CI96(VFF17)cyYZ-Klons 1 als des CI96(VFF17)cyYZ-Klons 2 mit den Zielzellen. Die T-Zellen CI96(VFF17)cyYZ-Klons 1 interagierten dabei in Clustern aus mehreren Zellen an die Zielzellen. Bei

der Quantifizierung der Expression des chimären Rezeptors im Durchflusszytometer wurde für Klon 1 eine höhere Expression als für Klon 2 gemessen. Es besteht wahrscheinlich somit ein Zusammenhang zwischen der Bindungsfähigkeit der CI96(VFF17)cyYZ-Zellen an die Zielzellen und der Expression des chimären Rezeptors.

3.2.5.2 *In vitro* Zytotoxizität der CI96(VFF17)cyYZ-Zellen

Die zytolytische Aktivität der CI96(VFF17)cyYZ-Zellen gegen eine CD44v7/8-exprimierende Zielzelle (HaCat) wurde in einem LDH-Test überprüft. Im LDH-Test wurde die enzymatische Aktivität der durch die Zytolyse freigesetzten Lactatdehydrogenase quantifiziert. Die Zielzellen wurden in verschiedenen Verhältnissen mit den Effektorzellen sechs Stunden inkubiert und anschließend die LDH-Aktivität im Überstand ermittelt.

Der CI96(VFF17)cyYZ-Klon 1 konnte ca. 40% der Zielzellen bei einer Effektor/Zielzellratio von 10:1 und 20:1 lysieren, während der CI96(VFF17)cyYZ-Klon 2 bei diesen Ratios nur 25% der Zielzellen lysierte. Da Klon 1 den chimären Rezeptor stärker als Klon 3 exprimierte, schien die Expression des chimären Rezeptors einen Einfluss auf die Zytotoxizität der T-Zellen zu besitzen. Die Zytotoxizität war jedoch nicht nur von der Expressionsstärke des chimären Rezeptors abhängig, sondern musste noch von anderen Faktoren, wie z.B. von koregulatorischen Signalen abhängen. Die Expressionsstärke des CI96(VFF17)cyYZ-Klone 3 entsprach zum Beispiel der des Klon 1. Eine Zytolyse von 40% der Zielzellen konnte jedoch nur mit Effektor/Zielzellratio von 20:1 erreicht werden.

Die Wildtyp-CI96-T-Zellen bewirken keine Zytolyse der HaCat-Zellen, so dass die Zytotoxizität der CI96(VFF17)cyYZ-Klone gegen die Zielzellen an die Expression des chimären Rezeptors gebunden war.

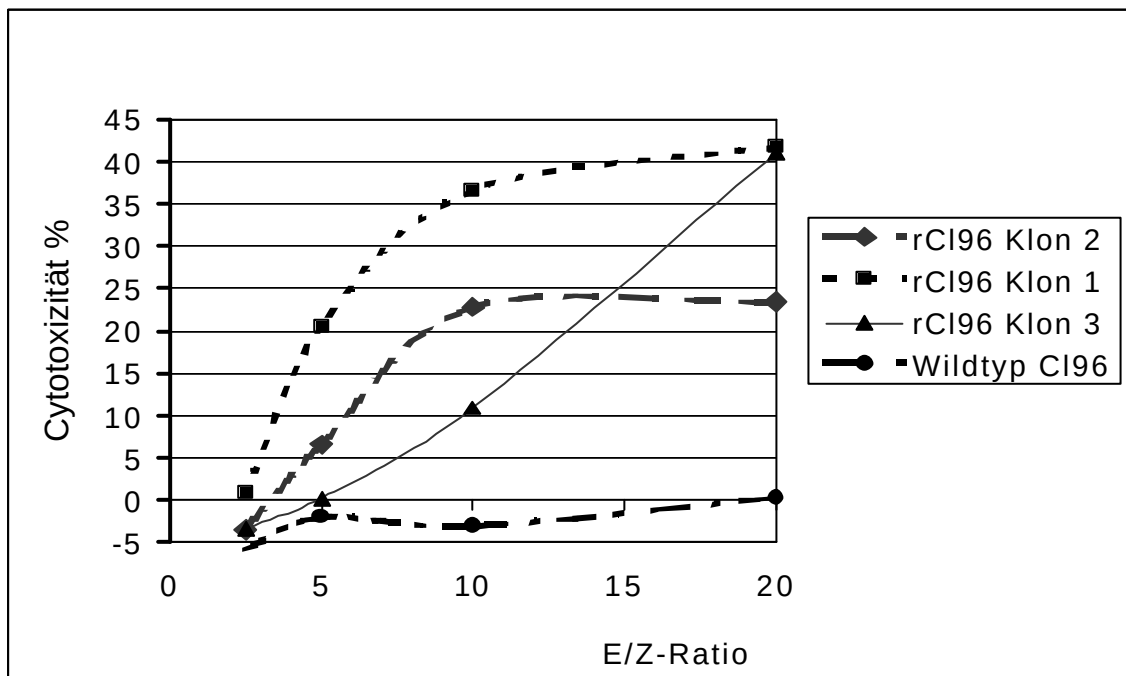


Abb. 3.26: Zytotoxizität verschiedener CI96(VFF17)cyYZ-Klone (Klone 1-3) und der Wildtyp CI96-T-Zellen gegen CD44v7/8-positive Zielzellen (HaCat). Es wurde die LDH-Aktivität im Überstand von Ansätzen mit verschiedenen Effektor/Zielzell-(E/Z)-Ratios (2,5:1; 5:1; 10:1 und 20:1) ermittelt und in Bezug zur maximalen LDH-Aktivität, die durch Lyse der Zielzellen mit Triton-X-100 erreicht wurde, gesetzt.

Nun war die Frage, ob auch verschiedene Tumorzellen durch die CI96(VFF17)cyYZ-Zellen lysiert werden konnten. Zunächst wurde die Expression des CD44v7/8-Antigens auf den Zielzellen quantifiziert, die IHC-CD44v7/8-positiv waren, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Antigenexpression und der Zytolyse durch rekombinante T-Zellen untersuchen zu können. Dafür wurden verschiedene Zelllinien mit dem VFF17-(CD44v7/8)-Antikörper oder mit dem Isotyp-Kontroll-Antikörper inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert. Wie man an der relativen Verschiebung der Maxima der Histogramme sehen kann, exprimierten die Zervixkarzinom-Zelllinie ME-180 das Antigen ähnlich stark wie die HPKII-Keratinocyten, während die Zervixkarzinom-Zelllinie SiHa eine geringere CD44v7/8-Expression zeigte. Bei einer Antigen-abhängigen Zytolyse der Zielzellen durch die rekombinanten T-Zellen wäre somit eine höhere Zytolyse der ME-180 und HPKII-Zellen als die der SiHa-Zellen zu erwarten.

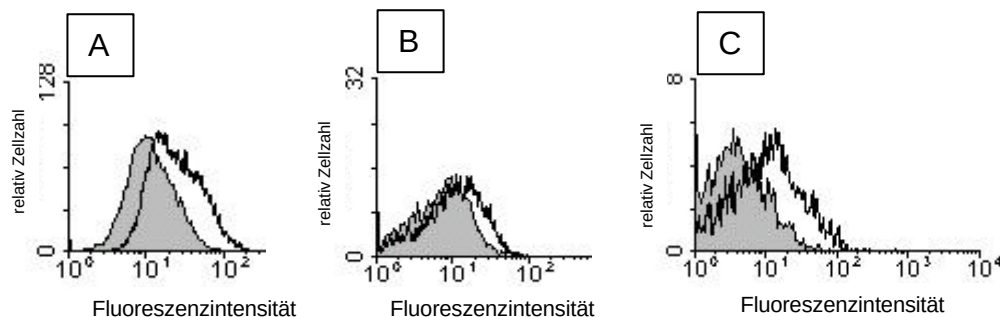


Abb.3.27: Quantifizierung der CD44v7/8-Expression im Durchflusszytometer der Zervixkarzinom-Zelllinie ME-180 (A) und SiHa (B), sowie der HPKII- Keratinocyten (C). Die ausgefüllten Histogramme repräsentieren die Färbung mit dem Isotyp-Kontroll-Antikörper, während die nicht ausgefüllten Histogramme die Färbungen mit dem VFF17-(CD44v7/8)-Antikörper darstellen (X-Achse: relative Zellzahl; Y-Achse: Fluoreszenzintensitäten).

Die zwei Zervix-Karzinom-Zelllinien ME-180 und SiHa sowie die HPKII-Keratinocyten wurden nun für den Zytotoxizitätstest mit den CI96(VFF17)cyYZ-Zellen in verschiedenen Effektor/Zielzellratio inkubiert.

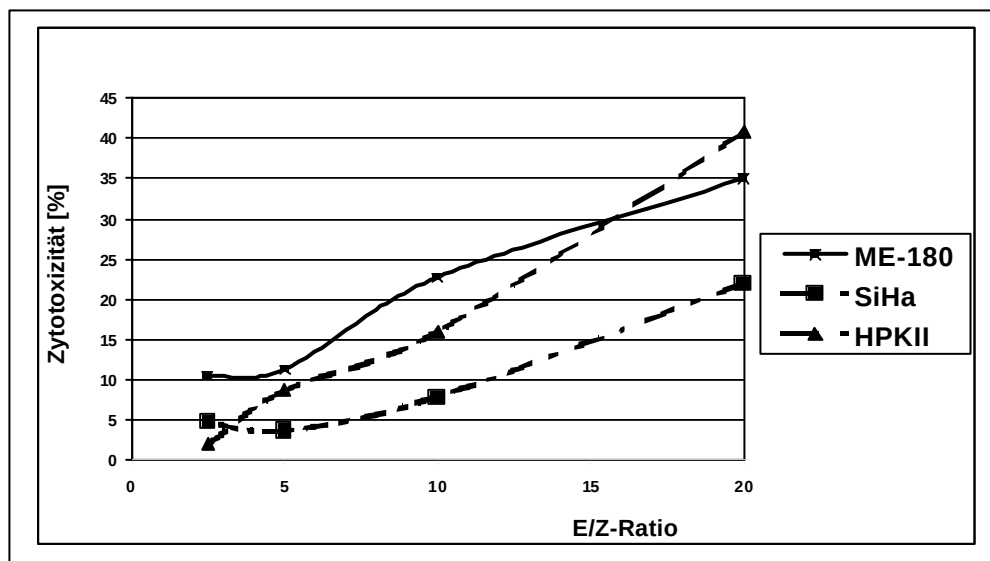


Abb. 3:28: Zytotoxizität von CI96(VFF17)cyYZ-Zellen gegen verschiedene Zervixkarzinom-Zelllinien (ME-180 und SiHa) und gegen HPKII-Keratinocyten. Die Zielzellen wurden mit den Effektorzellen in verschiedenen Verhältnissen (E/Z-Ratio) inkubiert und die LDH-Aktivität des Überstandes bestimmt. Die maximale LDH-Aktivität (100%) wurde durch Lyse der Zielzellen mit Triton-X-100 ermittelt.

Die CI96(VFF17)cyYZ-Zellen waren in der Lage die Zervix-Karzinomzellen zu lysieren. Bei Effektor/Zielzellratios von 25 :1 wurden 35% der ME-180-Zellen und 22% der SiHa-Zellen lysiert. Die HPKII-Keratinocyten mit einer hohen CD44v7/8-Antigenexpression wurden zu 40% lysiert. Die Zytotoxizität schien somit auch von der Expressionshöhe des CD44v7/8-Antigen in den Zielzellen beeinflusst zu werden.

Die Abhängigkeit der Zielzelllyse von der Expression des chimären Rezeptors konnte bereits durch eine fehlenden Zytolyse von CD44v7/8-positive Zielzellen durch die CI96-Wildtypzellen gezeigt werden (3.26). Um die Spezifität der Zytotoxizität zu beweisen, sollte nun das CD44v7/8-Epitop durch den VFF17-Antikörper blockiert werden. Dafür wurde die Zervix-Karzinom-Zelllinie ME-180 eine Stunde mit dem VFF17-Antikörper oder als Kontrolle mit dem Isotyp-Antikörper vorinkubiert. Die Zytotoxizität der CI96(VFF17)cyYZ-Zellen gegen die Tumorzellen konnte komplett blockiert werden, während der Isotyp-Kontroll-Antikörper keinen Einfluss auf die Lyse der Tumorzellen zeigte.

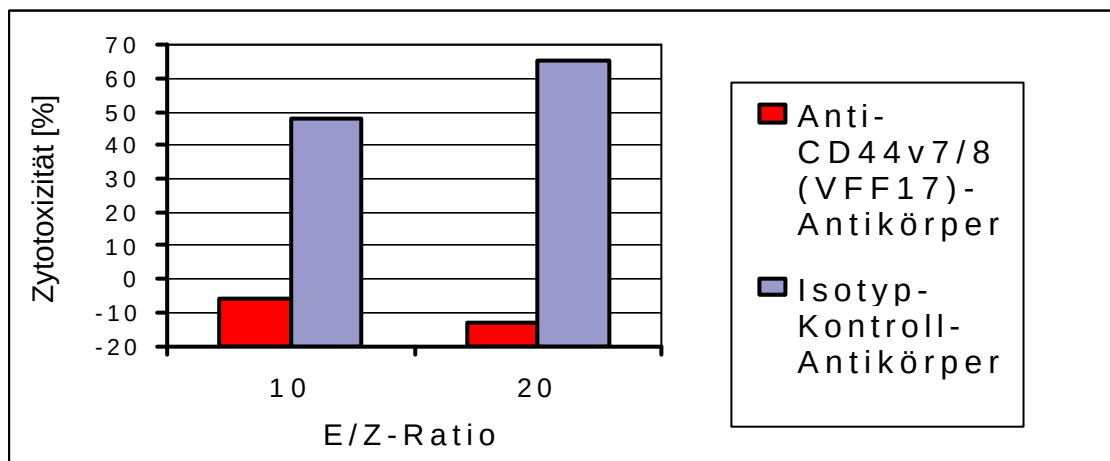


Abb.3.29: Hemmung der lytischen Aktivität der CI96(VFF17)cyYZ-Zellen durch den VFF17-Antikörper. Die Tumorzellen (ME-180) wurden eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Isotyp-Antikörper (gestrichelte Säulen) und mit dem VFF17-Antikörper (ausgefüllte Säule) inkubiert, bevor sie bei Effektor/Zielzellratios von 10:1 und 20:1 mit den CI96(VFF17)cyYZ-Zellen inkubiert wurden.

Gamma-IFN erhöht die Oberflächenexpression der HLA-Antigene und teilweise die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber der Fas-vermittelten Apoptose (Yang et al., 1995, Kaene et al., 1996). Durch γ -IFN könnte aber auch eine erhöhte Expression des CEA-(carcinoma embryonic antigen)-Tumorantigens auf Kolonkarzinomzellen erzielt werden (Darcy et al., 1998). Es wurde nun versucht, durch Behandlung der Tumorzellen mit γ -IFN eine gesteigerte Zytotoxizität der CI96(VFF17)cyYZ-Zellen gegen die Tumorzellen zu erzielen. Die Tumorzelllinie ME-180 wurde sechzehn Stunden mit 1000 U/ml γ -IFN vorinkubiert und dann für den Zytotoxizitätstest mit CI96(VFF17)cyYZ-Zellen inkubiert.

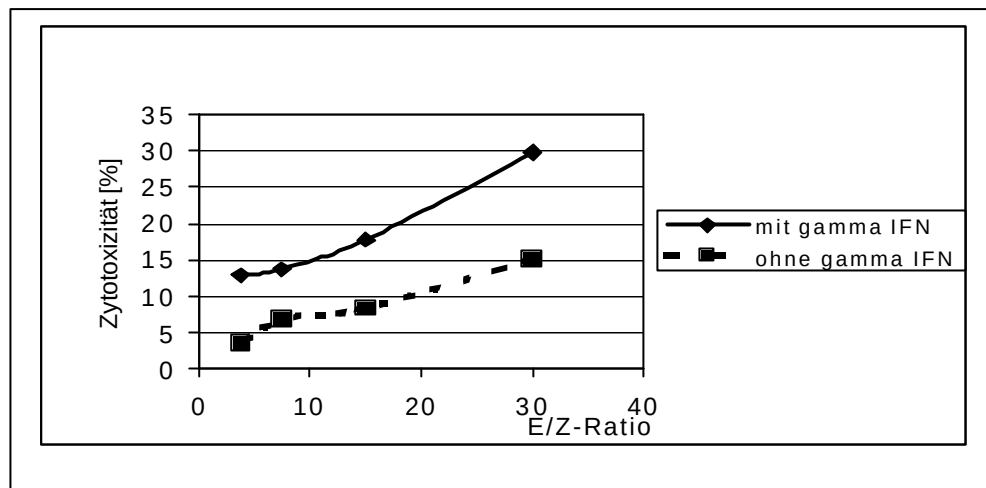


Abb. 3.30: Erhöhung der Zytotoxizität durch eine Vorinkubation der ME-180-Tumorzellen mit 1000 U/ml γ -IFN. Die Tumorzellen wurden von dem Zytotoxizitätsansatz 16h mit γ -IFN inkubiert und dann mit verschiedenen Verhältnissen mit den Effektorzellen inkubiert. Die LDH-Aktivität des Überstandes wurde in Relation zur maximalen LDH-Aktivität durch Lyse der Zielzellen mit Triton-X-100 gesetzt.

Die mit γ -IFN inkubierten Zellen waren sensitiver gegen die T-Zell-vermittelte Lyse als die nicht vorbehandelten Zellen. Bei Effektor/Zielzellratios von 20:1 wurden mit γ -IFN behandelte Zielzellen zu 30% lysiert im Vergleich zu einer Lyse von 15% der Zellen, die ohne γ -IFN kultiviert wurden. Es sollte nun untersucht werden, wodurch die erhöhte Sensitivität der Tumorzellen gegen die CI96(VFF17)cyYZ-Zellen begründet war. Die Zytolyse-Experimente mit den verschiedenen Tumorzelllinien hatten bereits gezeigt, dass die Höhe der Antigenexpression eine wichtige Rolle bei der Zytolyse der Tumorzellen durch die rekombinanten T-Zellen spielte. Weiterhin ist eine Fas-Expression auf der Zielzelle die Voraussetzung für den Fas/FasL-vermittelten Zytolyseweg durch die T-Zellen und Veränderungen der Fas-Expression durch γ -IFN konnten bereits beobachtet werden. Deshalb wurde die CD44v7/8- und die Fas-Expression auf zwei Zervixkarzinom-Zelllinien (ME-180 und Caski) und einer Ovarialkarzinomzelllinie (SiHa) untersucht, die mit und ohne γ -IFN kultiviert wurden. Abbildung 3.31 zeigt die Quantifizierung der CD44v7/8- und Fas-Expression im Durchflusszytometer (exemplarisch nur für die ME-180-Zellen dargestellt) und macht deutlich, dass durch γ -IFN in allen Zelllinien die Expression des CD44v7/8-Antigens nahezu unverändert blieb, während die Fas-Expression zunahm hatte.

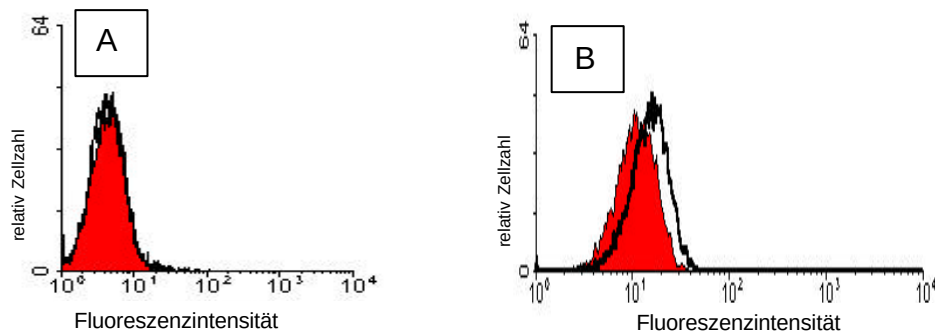


Abb.3.31: Veränderung der CD44v7/8-Expression (A) und der Fas-Expression (B) durch Inkubation der Zervixkarzinom-Zelllinie ME-180 mit 1000 U/ml γ -IFN. Die ausgefüllten Histogramme stellen die Färbung der CD44v7/8- oder die Fas-Antikörper-Reaktion von Zellen, die ohne γ -IFN kultiviert wurden, dar, während die nicht ausgefüllten Histogramm die Färbung der Zellen, die mit γ -IFN inkubiert wurden, widerspiegeln (X-Achse: relative Zellzahl; Y-Achse: Fluoreszenzintensitäten).

Die gesteigerte Sensitivität der Tumorzellen gegenüber der T-Zell-vermittelten Zytolyse durch γ -IFN war somit nicht durch eine erhöhte CD44v7/8-Expression begründet. Die erhöhte Fas-Expression auf den Tumorzellen durch γ -IFN lässt vermuten, dass die Zytolyse durch die CI96(VFF17)cyYZ-Zellen Fas/FasL-vermittelt wurde und so die erhöhte Fas-Expression für die erhöhte Zytolyserate der γ -IFN-behandelten Tumorzellen verantwortlich war.

3.2.5.3 Therapie Tumor-tragender Nacktmäuse durch adoptive Immunisierung mit Hilfe von CI96(VFF17)cyYZ-Zellen

An ME-180-Tumor-tragenden Nacktmäusen sollte nun die Fähigkeit der CD44v7/8-spezifischen rekombinanten T-Zellen getestet werden, Tumorzellen solider Tumore zu lysieren und damit das Tumorstadium zu inhibieren. Dafür wurden 5×10^5 ME-180-Zervix-Karzinomzellen subkutan pro Seite in thymusaplastische BALB/c Mäuse injiziert. Die Behandlung der Tiere begann bei einer Tumorstadiumgröße von 30-50 mm³, die mittels Schieblehre ermittelt wurde. Sechs Tieren (entsprach 12 Tumoren) wurden pro Tumor 1×10^6 CI96(VFF17)cyYZ-Zellen mit 1×10^5 U Proleukin[®] in 100 μ l PBS intratumoral an sieben aufeinanderfolgenden Tagen appliziert. Die Kontrolltiere erhielten 100 μ l PBS (6 Tiere) oder die Wildtyp CI96-Zellen mit 1×10^5 U Proleukin[®] in 100 μ l PBS (7 Tiere). Das Tumorstadium wurde über einen Zeitraum von 20 Tagen untersucht. Die Behandlung der Tiere mit den Wildtyp CI96-Zellen und Proleukin[®] hatte keinen Einfluss auf das Tumorstadium. Das Tumorstadium verzehnfachte sich innerhalb der 20 Tage auf ein Volumen von durchschnittlich 413 mm³. Hingegen führte die Behandlung der Tiere mit CI96(VFF17)cyYZ-Zellen und Proleukin[®] zu einem deutlich verminderten Tumorstadium (119 mm³).

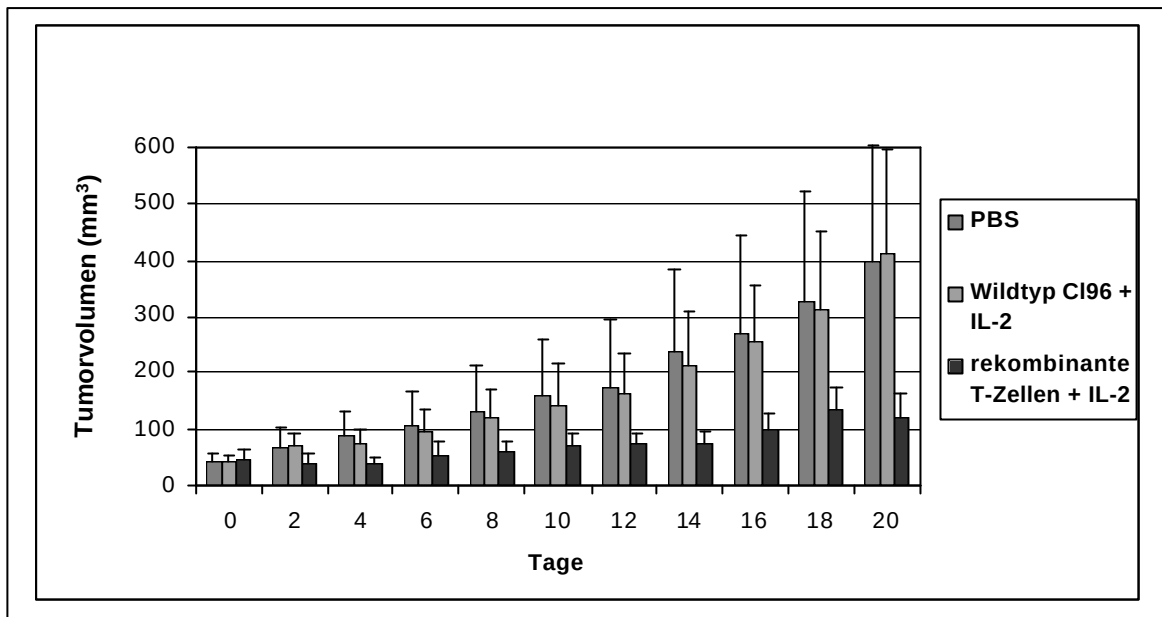


Abb.3.32: Adoptive Immunisierung ME-180 Tumor-tragender Mäuse durch CI96(VFF17)cyYZ-Zellen. Die bilateralen Tumore mit einem Volumen von 30-50 mm³ wurden an sieben aufeinanderfolgenden Tagen an je 6 Tieren intratumoral mit 100 µl PBS (■), an je 7 Tieren mit 1 x 10⁶ CI96-Zellen und 1 x10⁵U Proleukin® (▨) und an je 6 Tieren mit 1 x 10⁶ CI96(VFF17)cyYZ-Zellen und 1 x10⁵U Proleukin® (■) behandelt. Das Tumolvolumen wurde über einen Zeitraum von 20 Tagen gemessen. Die Mittelwerte des Tumolvolumens mit der entsprechenden Standardabweichung sind gegen die Zeit (Tage) aufgetragen.

3.2.6 Isolierung von primären T-Zellen aus Mausmilzen und retrovirale Transduktion des scFv(VFF17):y:a :z-Fusionsgens in primäre T-Zellen

Nach dem die Funktionalität dieser rekombinanten T-Zellen gezeigt worden war, sollte durch die Abrichtung von primären T-Zellen gegen CD44v7/8-exprimierende Zielzellen, eine Schritt näher an die *in vivo* Situation gegangen werden.

Aus BALB/c-Mäusen wurden Milzen entnommen und durch ein Metallsieb mit einer Porengröße von 100 µm homogenisiert. Die T-Zellanreicherung erfolgt nach einer für die T-Zellen recht schonenden und relativ einfach durchzuführenden Methode nach Coligan et al. (1993). Die Zellen wurden nach der Lyse der Erythrozyten in einer Säule inkubiert, die mit Nylonwolle gefüllt war. Alle Zellen mit einer hohen Oberflächenladung wie Makrophagen und B-Zellen interagierten mit der Nylonwolle, während die relativ ungeladenen T-Zellen eluiert werden konnten. Pro Milz wurden mit dieser Methode 5-10 x10⁶ T-Zellen isoliert. Es befanden sich 60-80% CD4-positive und 20-40% CD8-positive Zellen und nur 5% CD4- und CD8-negative Zellen im Eluat, so dass eine ausreichende Aufreinigung der T-Zellen erzielt werden konnte. Die Zellen wurden mit 5 µg/ml PHA und 1000 U/ml Proleukin stimuliert, da mit diesen Agenzien die höchste Proliferationsstimulation bei primären und bei CI96-T-Zellen erzielt worden war. Die T-Zellen wurden nur 48h mit den ΩE(VFF17)cyYZ kokultiviert und dann der Überstand abgehoben. Das Gleichgewicht der CD4- und CD8-positiven Zellen hatte sich während der Kokultivierung zu Gunsten der CD8-positiven Zellen verschoben. Es waren 90% der Zellen CD8-positiv, während die CD4-positiven Zellen nur noch 5% der Population ausmachten. Der Anteil der CD4- und CD8-negativen Zellen lag weiterhin bei 5%. Die Verschiebung der CD4/CD8-Verhältnisse stellte einen günstigen Nebeneffekt dar, da nur die CD8-positiven T-Zellen zytotoxische Eigenschaften aufwiesen. Der geringe Anteil der CD4- und CD8-negativen Zellen

zeigte, dass nur ein geringer Anteil der Population auf die Verpackungszellen zurückzuführen sein konnte.

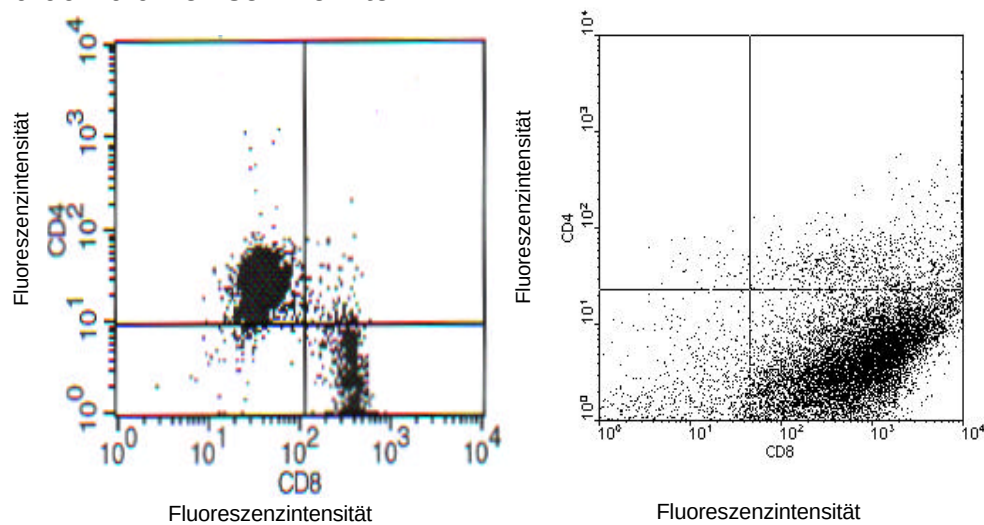


Abb. 3.33: Zunahme der CD8-positiven Zellen nach der Kokultivierung mit den Verpackungszellen. Die primären T-Zellen wurden direkt nach ihrer Isolierung (A) und nach der Kokultivierung mit der Verpackungszelllinie (B) mit einem FITC-markierten CD8-Antikörper und einem PE-markierten CD4-Antikörper inkubiert und im Durchflusszytometer quantifiziert. Die Histogramme zeigen die Fluoreszenzintensitäten der CD4-Färbung (y-Achse) gegen die der CD8-Färbung (x-Achse).

Die Transduktionseffizienzen des *scFv(VFF17):y:a:z*-Fusionsgens und die Oberflächenexpression des Rezeptors auf den primären T-Zellen wurde nun im Durchflusszytometer quantifiziert. Dazu wurden nach der Kokultivierung die T-Zellen mit dem Überstand abgehoben und mit dem c-myc-Antikörper inkubiert.

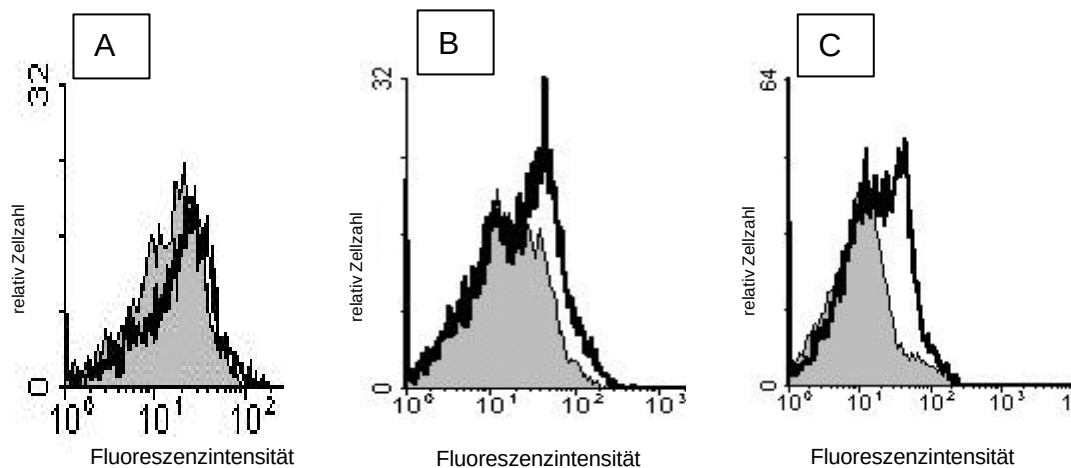


Abb.3.34: FACS-Analyse der Transduktionseffizienzen des *scFv(VFF17):y:a:z*-Fusionsgens durch Kokultivierung primärer T-Zellen mit Ω EVFF17cyYZ-Zellen. Es wurden nicht infizierte primäre T-Zellen (A) und aus zwei verschiedenen Transduktionsexperimenten infizierte primäre T-Zellen (B+C) mit dem Isotyp-Antikörper oder dem c-myc-Antikörper inkubiert. Die Diagramme stellen die Färbungen des Isotyp-Kontroll-Antikörper (ausgefülltes Histogramm) und des c-myc-Antikörpers (nicht ausgefülltes Histogramm) dar (X-Achse: relative Zellzahl; Y-Achse: Fluoreszenzintensitäten).

Die Histogramme der c-myc-Antikörperreaktion der transfizierten T-Zellen ergaben einen Doppelpeak (B+C), während sich das Fluoreszenzsignal der c-myc-Färbung der nichttransfizierten Kontrollzellen als einzelner Peak darstellte (A). Der Teil des Doppelpeaks, der die Zellen mit den höheren Fluoreszenzintensitäten enthielt repräsentierte die transfizierten T-Zellen und somit die Population, die den chimären Rezeptor exprimierte. Es konnten Transferraten von 40-50% erzielt werden, wie in Abbildung 3.34 anhand der Fluoreszenzsignale der transduzierten Population zweier Transduktionsexperimente dargestellt ist.

3.2.7 Zytotoxizität der transfizierten primären T-Zellen

Die Mischpopulationen der infizierten T-Zellen wurden in verschiedenen Verhältnissen mit HPKII- und HaCat-Keratinocyten inkubiert und die LDH-Aktivität des Überstandes ermittelt.

Die transfizierten primären T-Zellen konnten bei Effektor/Zielzellratios von 30:1 40% der HPKII-Keratinocyten und 27% der HaCat-Keratinocyten lysieren. Die nicht transfizierten primären T-Zellen zeigten keine zytotoxischen Eigenschaften gegenüber den Zielzellen. Die Zytolyse der CD44v7/8-positiven Zielzellen durch die transfizierten T-Zellen ist somit durch den chimären Rezeptor vermittelt.

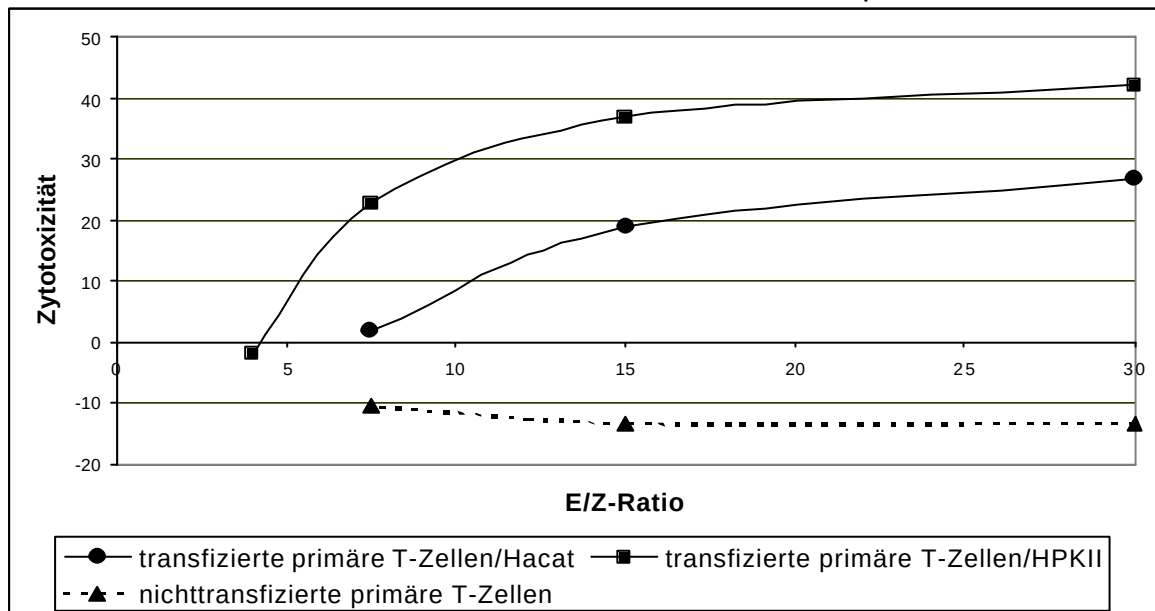


Abb.3.35: Zytotoxizität der transfizierten primären T-Zellen gegen CD44v7/8 positive HPKII- (■) und HaCat-Keratinocyten (◆). Die Zielzellen wurden in verschiedenen Verhältnissen mit den transfizierten primären T-Zellen inkubiert und die LDH-Aktivität des Überstandes bestimmt. Die maximale LDH-Aktivität der Zielzellen wurde über die Lyse der Zellen mit Triton-X-100 ermittelt. Die nichttransfizierten primären T-Zellen lysierten keine Zielzellen (▲).

Es konnten somit durch die Kokultivierung der T-Zellen mit den $\Omega E(VFF17)cyYZ$ -Zellen gute Transferraten des $scFv(VFF17):y:a:z$ -Fusionsgens erzielt werden. Die transfizierten primären T-Zellen waren weiterhin in der Lage, CD44v7/8-positive Zielzellen zu lysieren. Dies zeigt, dass auch primäre T-Zellen gentechnologisch so modifiziert werden können, dass sie spezifisch Zielzellen erkennen und lysieren können.

4. Diskussion

4.1. CD44-Expression im Endometriumkarzinom und im Normalgewebe

Das invasive und metastatische Potential von Tumorzellen erfordert eine Veränderung vieler zellulärer Funktionen. Die Fähigkeit bestimmter varianter CD44-Isoformen, Pankreas-Adenokarzinomzellen der Ratten metastatische Eigenschaften zu verleihen, weist darauf hin, dass CD44-Proteine als Zelladhäsionsmoleküle am Multistep-Prozess der Metastasierung beteiligt sein könnten (Günthert et al., 1991, Rudy et al., 1993). Die Transfektion von CD44v-cDNA in verschiedene nicht metastasierende Tumorzellen zeigte jedoch, dass nicht bei allen Tumorzellen eine Metastasierung induziert werden konnte (Sy et al., 1991, Bartolazzi et al., 1995). Beim Menschen wurde bei vielen Tumoren eine Überexpression verschiedener varianter CD44-Isoformen beobachtet. Außerdem korrelierte bei verschiedenen Tumoren die Expression einiger varianter CD44-Isoformen mit der Tumorprogression und der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten (Stauder et al., 1995, Mulder et al., 1994, Kainz et al., 1995a). Bei Endometriumkarzinomen konnte im Rahmen dieser Arbeit eine erhöhte CD44v-Expression und ein komplexeres Spleißmuster als im Normalgewebe postmenopausaler Frauen beobachtet werden.

Bei den immunhistochemisch untersuchten Normalgeweben postmenopausaler Frauen wurde vor allem auf der basalen Seite der Drüsenzellen eine CD44-Expression beobachtet. Variante CD44-Isoformen wurden im Normalgewebe nur selten nachgewiesen. In der Literatur wurde bisher eine CD44-Expression nur im Normalgewebe von prämenopausalen Frauen beschrieben, welches ebenfalls die CD44-Expression auf der basalen Membran der Drüsenzellen (Fujita et al., 1994, 1995) und der lateralen Membran (Albers et al., 1995) zeigte. Beim Endometrium prämenopausaler Frauen konnte eine zyklusabhängige Veränderung der CD44-Expression beobachtet werden. In der mittleren und späten sekretorischen Phase war die Expression der CD44-Standardform sowie varianter CD44-Isoformen höher als in der proliferativen Phase (Tempfer et al., 1998). Es konnte außerdem eine inverse Korrelation der CD44-Expression zum Östrogenrezeptor- und Progesteronrezeptor-Status beschrieben werden (Saegusa et al., 1998). Es wurde spekuliert, dass ovariäre Steroidhormone wie Östrogen und Progesteron einen Einfluss auf die CD44-Expression im Endometrium haben könnten und damit die Einnistung des befruchteten Eis während der mittleren und späten sekretorischen Phase unterstützen (Albers et al., 1995, Yaegashi et al., 1995).

Die CD44-Expression bei Endometriumkarzinomen wird noch kontrovers diskutiert. Die in dieser Arbeit immunhistochemisch untersuchten Endometriumkarzinome zeigten vergleichbar mit den Endometriumkarzinomen aus Studien mit dem bisher größten Probenkollektiv (Tempfer et al., 1998, Saegusa et al., 1998) eine erhöhte CD44v-Expression im Vergleich zu prämenopausalem Normalgewebe. CD44v7/8- und CD44v10- wurde bei 79% der untersuchten Tumore nachgewiesen, während CD44v6 sich nur bei 29% der Proben detektieren ließ. Eine Studie mit 156 Tumoren zeigten die Expression von CD44v3 bei 26%, CD44v5 bei 31%, CD44v6 bei 22% und CD44v7/8 bei 15% der Tumore (Tempfer et al., 1998). Die höhere Anteil an CD44v7/8-positiven Tumoren des in Rahmen dieser Arbeit untersuchten Probenkollektivs beruht vermutlich auf der geringeren Probenzahl von 14 Tumoren. Die Studie von Tempfer und Kollegen (1998) beobachtete weiterhin, dass die CD44v6-Expression in der univariaten Analyse mit einem kürzeren Überleben korrelierte. Die multivariante Analyse zeigte jedoch,

dass die CD44v6-Expression im Endometriumkarzinom nicht als prognostischer Faktor dienen kann (Tempfer et al., 1998). Korrespondierend zu dieser Studie beschrieb Saegusa et al. (1998) eine erhöhte CD44s-, CD44v3-, CD44v6-Expression bei 140 Endometriumkarzinomen im Vergleich zur proliferativen Phase des Normalgewebes (35 Proben) und zu 72 Hyperplasien, ohne dass eine Assoziation zu prognostischen Faktoren bestünde.

In zwei Studien einer Arbeitsgruppe (Fujita et al., 1994, 1995) wurde jedoch von einer reduzierten CD44v-Expression im Endometriunkarzinom berichtet. In den Studien fanden sich bei 13/17 (76,5%) und 9/11 (81,8%) Normalgewebe verglichen zu 11/58 (19,0%) und 8/47 (17,0%) Tumoren die Expression varianter CD44-Isoformen. Hyperplasien exprimierten zu 42,9% (3/7) CD44-Varianten. In der CD44-negativen Tumorgruppe konnte ein statistisch signifikantes häufigeres Auftreten von Tumorzellen im vaskulären Lymphspalt beobachtet werden.

Mittels immunhistochemischer Untersuchungen kann nur die Expression einzelner Epitope nachgewiesen werden. Das Metastasierungsmodell der Ratte und die Fähigkeit von CD44v3-exprimierenden B-Zelllymphomazellen, das Knochenmark zu infiltrieren (Bartolazzi et al., 1995) hatten jedoch gezeigt, dass auch die Kombination bestimmter varianter Exons für das Metastasierungsverhalten der Tumorzellen wichtig sein kann. Von den mittels Southern-Blot analysierten Endometriumkarzinomen exprimierten 7/10 (70%) CD44v3, 6/10 (60%) CD44v6, 8/10 (80%) CD44v8 und 8/10 (80%) CD44v10. Bei 5 Tumoren wurde nur in einem Transkript CD44v6 detektiert. Nur ein Tumor zeigte ein zusätzliches CD44v6-Transkript. Die anderen untersuchten varianten Exons waren jedoch in vielen verschiedenen Transkripten vertreten. 9/10 Karzinomproben exprimierten ein CD44v3-enhaltendes 950 bp großes Transkript und 6/10 ein CD44v6-enhaltendes 1050 bp großes Transkript. Nur ein Normalgewebe exprimierte das CD44v3-enhaltende 950 bp große Transkript sehr schwach, das CD44v6-enhaltende 1050 bp großes Transkript konnte im Normalgewebe nicht detektiert werden, so dass Tumor-spezifische Spleißvarianten auftreten. Die epitheliale Isoform wurde wie in zahlreichen anderen Normalgeweben auch im endometrialen Normalgewebe detektiert als auch bei 8/10 Tumorproben nachgewiesen. Die Expression der epithelialen CD44-Isoform bleibt somit beim Endometriumkarzinom unverändert. Die Ähnlichkeit der Spleißmuster der CD44v8- und CD44v10-positiven Transkripte zeigte, dass im Endometriumkarzinom diese Exons, im Gegensatz zu den Exons CD44v3 und CD44v6 durch alternatives Spleißens selten voneinander getrennt werden.

Die Tumore zeigten ein komplexes Spleißmuster und exprimierten viele hochmolekulare Isoformen, sowie die Maximalvariante, die nicht bei den Normalgewebeproben detektiert wurde. Das Auftreten größerer Isoformen im Vergleich zum Normalgewebe wurde bei verschiedenen anderen Tumoren, wie z.B. beim Kolorektalkarzinom, Non-Hodgkin Lymphom, Magenkrebs und Zervixkarzinom beschrieben (Wielenga et al., 1993, Koopman et al., 1993, Heider et al., 1993, Dall et al., 1994).

Ein Zusammenhang zwischen der CD44v6-Expression und dem fortgeschrittenen Stadium der Tumore konnte nicht beobachtet werden. Zwei von vier der Karzinome mit einer Invasion von Tumorzellen in das Myometrium exprimierten sogar nur die CD44-Standardform. Yorishima et al. (1997) berichteten von einem positiven Zusammenhang zwischen der CD44v6-Expression und einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium, d.h. dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen oder einer myometrialen und vaskulären Invasion. In dieser Studie wurde CD44v6 bei 13 von 18 Patientinnen mit vaskulärer Invasion

und nur bei einer von 5 Patientinnen ohne vaskulärer Invasion immunhistochemisch nachgewiesen. Die CD44v6-Expression war erhöht in Primärtumoren, die die Hälfte des Myometriums infiltriert hatten oder bereits Lymphknoten befallen hatten. Tempfer et al. (1998) und Saegusa et al. (1998) konnten keinen Zusammenhang zwischen der CD44-Expression und prognostischen Faktoren nachweisen. Die Ergebnisse dieser beiden Studien erscheinen wegen des größeren Probenkollektivs aussagekräftiger als die von Yorishima et al. (1997). Die hier untersuchten Proben zeigten ebenfalls eine erhöhte CD44v-Expression einhergehend mit einem komplexen Spleißmuster varianter CD44-Isoformen, ohne dass ein Zusammenhang zu dem Tumorstadium bestanden hätte.

Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Studien bei der Untersuchung der CD44-Expression in Endometriumkarzinomen im Vergleich zum Normalgewebe könnten in den verschiedenen Nachweismethoden (z.B. monoklonale/polyklonale Antikörper, RT-PCR, Southern Blot/IHC) oder durch Unterschiede in der Qualität und/oder Größe der Probenkollektive begründet sein. Weiterhin differenzierten Fujita und Mitarbeiter nicht zwischen der proliferativen und sekretorischen Phase des Normalgewebes, die sich nach Aussage andere Studien bezüglich der CD44-Expression unterschieden, so dass verschiedene Bezugspunkte für die Bewertung des CD44-Expressionsniveaus im Tumor verwendet wurden.

4.2 Beeinflussung der CD44-Expression durch Hormone und Hormonantagonisten

Standardisierte Zellkultur-Untersuchungen, die bei Endometriumkarzinomen einen Zusammenhang zwischen der CD44-Expression und Hormonen bzw. Zytokinen überprüften, sind bislang noch nicht bekannt. Es bestehen jedoch statistische Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der ER- und der CD44-Expression im Endometriumgewebe von prämenopausalen Frauen (Albers et al., 1995, Saegusa et al., 1998, Yaegashi et al., 1995, Tempfer et al., 1998). Da die singuläre Östrogenbehandlung Behandlung von Frauen erhöht das Risiko an einem Endometriumkarzinom zu erkranken und ein Zusammenhang zwischen Hormonen und der CD44-Expression im normalen Endometrium diskutiert wird (Albers et al., 1995, Yaegashi et al., 1995), wurde der Einfluss von ovarialen Hormonen und Hormonantagonisten auf die CD44-Expression von Endometriumkarzinom-Zelllinien untersucht. Zunächst wurde die CD44-Expression verschiedener Brust- und Endometriumkarzinom-Zelllinien analysiert. Alle zeigten die Expression der CD44-Standardform und ein komplexes Spleißmuster der untersuchten varianter CD44-Isoformen (CD44v3, CD44v6 und CD44v10). Nur bei An3 CA-Zellen konnte keine CD44-Expression, möglicherweise durch eine fehlende CD44-Promotoraktivität, detektiert werden.

Das Auftreten vieler varianter CD44-Isoformen in den untersuchten Zelllinien stimmt mit der CD44v-Expression in Mammakarzinomen (Dall et al., 1995, Iida und Bourguignon 1995, Matsumura et al., 1992) und mit den hier untersuchten Endometriumkarzinomen (3.1.1.2) überein. Die Endometriumkarzinom- und Brustkrebs-Zelllinien exprimierten mehrere große Isoformen, sowie die Maximalvariante vergleichbar zu den untersuchten Endometriumkarzinomen. Einige Spleißvarianten traten in allen untersuchten Tumorzelllinien auf, das 1050 bp große v6-enhaltende Transkript und ein ca. 950 bp großes v3-enhaltendes Transkript. Diese Isoformen wurden ebenfalls bei den untersuchten Endometriumkarzinomen gefunden. Es ist möglich, dass diese Isoformen eine

Rolle bei der Entstehung maligner Eigenschaften haben, wie es für die varianten Exons CD44v4-CD44v7 und CD44v6/7 beim Ratten-Pankreasadenokarzinom gezeigt worden war.

Ein weiteres Beispiel für eine spezifische Funktionalität von varianten CD44-Isoformen sind die CD44v3-enhaltende Isoformen, welche in der Lage sind Heparansulfat zu binden. Über das Heparansulfat können dann die Wachstumsfaktoren bFGF (basic-fibroblast growth factor) und HEGF (Heparin-bindig epidermal growth factor) gebunden werden (Bennett et al., 1995). Die CD44-abhängige Präsentation von Wachstumsfaktoren könnte mit einer erhöhten Proliferationsstimulation der Tumorzellen in Zusammenhang stehen.

Die untereinander ähnlichen Expressionsmuster von CD44v8- und CD44v10-Transkripten, die sogar in Tumorzelllinien und Tumoren beobachtet werden konnten, machen deutlich, dass diese Exons durch die Spleißmaschinerie selten voneinander getrennt werden. Die epitheliale CD44-Form (CD44v8-10) wurde in allen analysierten Zelllinien und in den Hormonstimulations-Experimenten konstant exprimiert. Die ubiquitäre Expression in vielen normalen Epithelien und auch im normalen Endometrium spricht gegen eine Rolle der epithelialen CD44-Form in der endometrialen Karzinogenese (Saegusa und Okayasu, 1998).

Hole und Kollegen (1997) berichteten von einer hohen CD44s-Expression und einer reduzierten CD44v-Expression, einschließlich der Exons CD44v7 und CD44v10 in ER-negativen verglichen zu ER-positiven Brustkrebszelllinien. Im Gegensatz zu Hole und Mitarbeiter konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Korrelation zwischen dem Expressionsmuster der varianten Isoformen und dem ER-Status gefunden werden. Es wurde jedoch in ER-positiven Zelllinien eine erhöhte CD44-Gesamtexpression im Vergleich zu ER-negativen Zelllinien gemessen. Die CD44-Expression der ER-positiven RL95-2-Zelllinie konnte durch Zusatz von FCS zum Kulturmedium erhöht werden. Es mussten somit Komponenten im FCS in der Lage sein die CD44-Expression zu beeinflussen. Durch konnte 17 β -Estradiol nur mit der hochsensitiven quantitativen PCR eine kurzzeitige Induktion der CD44-Expression gemessen werden. Eine mögliche Erklärung könnte ein direkter oder indirekter Einfluss des Östrogenrezeptors auf die CD44-Expression sein. Hole und Kollegen konnten durch 17 β -Estradiol in ER-positiven Brustkrebszelllinien die CD44-Expression nicht beeinflussen, gaben jedoch keine Auskunft über die Inkubationszeit der Zellen mit 17 β -Estradiol. Die hier gemessene CD44-Expressionserhöhung hielt nur eine Stunde an, so dass anzunehmen ist, dass Hole und Kollegen die CD44-Expression außerhalb dieses Zeitraumes untersucht hatten. Außerdem konnten die Unterschiede der CD44-Expressionstärke nur durch die Verwendung der hoch sensitiven quantitativen PCR und Fragmentanalyse mittels DNA-Sequenzier gemessen werden.

Es wurde gezeigt, dass c-Ha-ras vermittelt über AP-1 die CD44-Expression durch eine Erhöhung der Promotoraktivität beeinflusst (Hofmann et al., 1993). Die Ras-Aktivierung ist in die Karzinogenese des Endometriumkarzinoms eingebunden und verantwortlich für den Erwerb der invasiven und metastatischen Eigenschaften (Enomoto et al., 1991, Greig et al., 1991). Es wurde weiterhin demonstriert, dass die AP-1-Aktivität durch Estradiol erhöht und durch anti-Östrogene inhibiert wurde (Philips et al., 1993, Webb et al., 1999). Die erhöhte CD44-Expression bei der RL95-2-Endometriumkarzinom-Zelllinie durch 17 β -Estradiol und FCS kann durch eine AP-1-vermittelte Aktivierung des CD44-Promotors begründet sein. Erhöhung der CD44-Expression verändert jedoch nicht das alternative Spleißen der CD44 mRNA, wie die Stimulationsexperimente mit 17 β -Estradiol zeigten. Es wurde außerdem in allen untersuchten Endometriumkarzinom-Zelllinien durch Southern-

Blot-Analysen kein verändertes CD44v-Expressionsmuster durch Inkubation der Zellen mit den Hormonen 17β -Estradiol und Progesteron sowie den Antihormonen Tamoxifen und Hydroxytamoxifen beobachtet.

Mackay und Mitarbeiter (1994) konnten durch Behandlung zweier Myelomonocytischen Zelllinien, einer Lungenkarzinom-, einer Kolon- und einer Keratinozyten-Zelllinie mit γ -IFN eine Erhöhung der CD44v6-Expression erzielen. Die CD44s- und CD44v9-Expression wurde durch eine 48-stündige Inkubation mit γ -IFN erniedrigt. Die CD44-Expression wurden durch eine FACS-Analyse quantifiziert und bezog sich somit auf die CD44-Proteinexpression an der Zelloberfläche. Diese CD44-Expressionsunterschiede ließen sich auf mRNA-Ebene nicht darstellen. Weiterhin zeigten diese untersuchten Tumorzelllinien wie die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte HEC-1-A-Endometriumkarzinom-Zelllinie keine Unterschiede im CD44v6-, CD44v8- und CD44v10-mRNA-Expressionsmuster. Die CD44v7/8-Expression in zwei Zervixkarzinom-Zelllinien (ME-180 und Ca Ski) und einer Ovarialkarzinomzelllinie (SiHa) ließ sich in Rahmen dieser Arbeit auf Proteinebene (quantifiziert durch FACS-Analyse) durch eine γ -IFN-Inkubation ebenfalls nicht beeinflussen.

Die Zytokine G-CSF und α -IFN zeigten ebenfalls keine Einfluss auf das CD44-Spleißmuster der HEC-1-A-Endometriumkarzinom-Zelllinie. Eine qualitative oder quantitative Modifikation des alternativen Spleißens von CD44 durch Hormone, Hormonantagonisten und Zytokine bei Endometriumkarzinom-Zelllinien konnte in unseren Experimenten nicht nachgewiesen werden. Insgesamt konnte die CD44-Expression jedoch durch FCS und kurzzeitig durch 17β -Estradiol erhöht werden. Verschiedene Zelldichten in den Kulturschalen konnten als Ursache für diese Unterschiede in der CD44-Expression ausgeschlossen werden. Veränderungen der CD44v-Expression, die bei der Karzinogenese verschiedener anderer Tumore eine Rolle spielen könnten, hervorgerufen durch die Behandlung der Zelllinien mit den verschiedenen Agenzien, wurden jedoch nicht beobachtet.

Durch die häufig erhöhte Expression des CD44v7/8-Epitops bei Endometrium- und Zervixkarzinomen, sowie der seltenen Expression dieses Epitops in Normalgewebe konnte es als Ziel-Epitop für einen immuntherapeutischen Ansatz verwendet werden.

4.3 Tumorthherapie mit rekombinaten T-Zellen

Das Immunsystem von Krebspatienten ist in der Regel nicht in der Lage, eine effektive Immunantwort gegenüber dem körpereigenen Tumor zu entwickeln. Die meisten spontanen Tumore umgehen das Immunsystem, da sie nicht ausreichend immunogen sind. Außerdem können immunogene Tumore die spezifische Immunantwort umgehen und/oder unterdrücken. Die meisten immuntherapeutischen Ansätze versuchen deshalb, dem Patienten entweder eine aktive oder passive Immunität direkt gegen ein einzelnes Tumorantigen zu vermitteln.

Ein grundsätzliches Problem stellt die Suche nach tumorspezifischen Antigenen dar. Diese sollten im Tumorgewebe hoch exprimiert sein und im Idealfall nicht im Normalgewebe auftreten. Neue Tumorantigene entstehen durch zwei verschiedene Mechanismen. So kann bei einem im Normalgewebe exprimierten Protein eine Veränderung der Struktur z.B. durch eine Punktmutation entstehen. Alternativ kann es zu einer transkriptionellen Aktivierung von Genen kommen, die im Normalgewebe nicht oder nur selten exprimiert werden, mit der Folge einer unphysiologischen Expression bzw. Überexpression (Wölfel et al., 1995).

Punktmutationen, die zur Bildung neuer, durch T-Zellen erkennbaren Epitopen führen wurden z.B. für die Cyklin-abhängige-Kinase 4 beobachtet. Beispiele für Gene, die spezifische Tumorantigene kodieren, sind *MAGE*, *BAGE* und *GAGE* (Van den Bruggen et al., 1991, De Plaen et al., 1994, Boel et al., 1995). So exprimieren z.B. mehr als 60% der Tumorzellen von Melanom-Patienten mindestens eins dieser drei Antigene. Die einzigen Normalgewebe, die diese Gene exprimieren, sind die Hoden und die Plazenta. Auch die CD44v7/8- und CD44v6-Epitope sind bei vielen Malignomen exprimiert, lassen sich nicht oder nur schwach in Geweben lebenswichtiger Organe nachweisen.

Das Immunsystem besitzt eine hohe Effizienz und Spezifität bei der Beseitigung von Zellen, die Fremdanigene exprimieren. Mit Ausnahme von Virus-induzierten Tumoren, wie z.B. dem EBV-induzierten Burkitt-Lymphom, findet jedoch in der Regel keine immunogene Antigen-Präsentation durch die Tumorzellen statt. Die Präsentation viraler Antigene führt bei einem intakten Immunsystem meist zur Eliminierung der Tumorzellen. Dementsprechend treten EBV-assoziierte B-Zell-Lymphome vermehrt bei immunsupprimierten Patienten auf (als Übersicht siehe Ioachim, 1990).

Die Abrichtung des Immunsystems gegen Tumorzellen stellt ein hoffnungsvolles Konzept dar wie Studien mit antitumoralen monoklonalen Antikörpern bereits zeigen konnten. Die postoperative Behandlung mit dem 17-1A-Antikörper konnte bei Patienten mit Dukes' C Kolorektalkarzinomen ein signifikant längeres, Rezidiv-freies Überleben im Vergleich zu unbehandelten Patienten erzielen. Das Auftreten von Fernmetastasen wurde durch die Antikörper signifikant reduziert (Riethmüller et al., 1998). Die Immunogenität der humanen Maus-Antikörper führte jedoch zu einer limitierten Möglichkeit einer Mehrfachanwendung.

Eine geringere Immunogenität und eine Verbesserung des Effektes von Antikörpern wurde erreicht durch den Einsatz von bifunktionalen weitgehende humanisierter Fusionsproteinen, die eine single chain Antikörperdomäne (scFv) und toxische Effektorfunktion enthalten. So wurde Rituximab, ein chimärer Maus/Mensch-Antikörper für die Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) bereits getestet (Übersicht Grillo-Lopez et al., 1999). Er vermittelt die Komplement-abhängige Zellyse und die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität. Die Behandlung von Patienten konnte gute Ansprechraten erzielen (McLaughlin et al., 1998).

Ein weiterer bereits klinisch getesteter humanisierter Antikörper, der gegen eine Domäne des Her2-Rezeptors gerichtet ist, stellt Trastuzumab (Herceptin®) dar. Brustkrebspatientinnen, die mit Paclitaxel oder Anthrazyklin/Cyclophosphamid behandelt wurden, zeigten eine höhere Ansprechrate, wenn die Chemotherapie in Kombination mit Trastuzumab verabreicht wurde, im Vergleich zur Chemotherapie allein (Goldenberg, 1999). Die gemessene Halbwertszeit des Antikörpers von 5,8 Tagen war jedoch recht niedrig, so dass der Antikörper nur transient im Körper vertreten war und somit nur recht kurz eine Antitumor-Reaktivität vermitteln konnte. Antikörper besitzen weitere Nachteile; so können sie solide Tumore nur unzureichend durchdringen (Jain, 1994) und zeigen meist nur Effekte bei einem lokalen Tumor.

Eine andere Strategie, die zahlreiche Vorteile gegenüber einer reinen Antikörpertherapie zeigt und ebenfalls das Immunsystem gegen Tumorzellen abrichtet, ist die gentechnologische Modifikation von T-Zellen (Übersicht Eshhar, 1997), die auch in der vorliegenden Arbeit verfolgt wurde. Die gentechnisch modifizierten CTL's erkennen, vermittelt über einen chimären Rezeptor, spezifisch und MHC-unabhängig Epitope auf den Tumorzellen. Sie können aktiv zum Tumor

gelangen, ihn gut durchdringen und weiterhin hoch-effizient und spezifisch Tumorzellen lysieren (Altenschmidt et al., 1997). Außerdem sind mit einem chimären Rezeptor stabil transfizierte T-Zellen länger für den Patienten verfügbar im Vergleich zu den monoklonalen Antikörpern.

Die hohe Selektivität der monoklonalen Antikörper oder der rekombinanten T-Zellen gegenüber Tumorzellen sollte zu geringeren Nebenwirkungen der Therapie führen als sie bei der Chemotherapie auftreten. Die Chemotherapie nutzt nur Proliferationsunterschiede des Tumor- und Normalgewebes, um das Tumorgewebe verstärkt zu zerstören. Dadurch treten oft starke Nebenwirkungen auf. Bei einer spezifischen Zerstörung von CD44v7/8- und CD44v6-positiven Zellen durch die rekombinanten T-Zellen ist aufgrund der restriktiven Expression dieser Epitope im Normalgewebe nur mit geringen Nebenwirkungen zu rechnen. So wird das CD44v6-Epitop vor allem im Stratum basale und Stratum spinosum der Haut, in aktivierten T-Zellen sowie in den basalen Krypten des Kolons exprimiert (Heider et al., 1993, Mackay et al., 1993). Das CD44v7/8-Epitop wird noch seltener exprimiert und ist vor allem in den basalen Hautschichten anzutreffen. Wichtige Organe wie die Leber, Niere und das ZNS exprimieren weder CD44v6 noch CD44v7/8, so dass die Therapie mit rekombinanten T-Zellen gegen CD44v7/8- und CD44v6-exprimierende Tumorzellen nur zu geringen Nebenwirkungen führen sollte. Die Expression der CD44v6- und CD44v7/8-Epitope in der Haut könnte bei einem Durchdringen von rekombinanten T-Zellen durch die Basalmembran der Epithelien zu einer abakteriellen Dermatitis führen.

4.4 Chimäre Rezeptoren und rekombinante T-Zellen

Es wurden bereits verschiedene chimäre Rezeptoren entwickelt, bei denen eine extrazelluläre Erkennungsdomäne (scFv) mit einer Signaltransduktionseinheit z.B. CD3 ζ -Kette (Eshhar et al., 1993, Moritz et al., 1994, Weijtens et al., 1996, Jensen et al., 1998), oder der Fc(γ)RI-Domäne, (Hwu et al., 1993, Eshhar et al., 1993, Darcy et al., 1998) fusioniert wurden. Als potenteste Signaltransduktionseinheiten stellten sich die CD3 ζ -Kette und die Fc(γ)RI-Domäne heraus. Die ζ -Fusionsproteine bilden über Disulfidbrücken Homodimere oder mit der endogenen ζ -Kette Heterodimere (Moritz und Groner, 1995).

Die Quervernetzung der chimären Rezeptoren durch extrazelluläre Liganden löste frühe und späte Signaltransduktionen aus, die sich nicht von denen unterscheiden ließen, die bei der Aktivierung des Wildtyp-TCR/CD3-Komplexes entstanden (Irving und Weiss, 1991). Durch diese chimären Rezeptoren war man in der Lage, T-Zellen zu erzeugen, die gegen ein gewünschtes Antigen gerichtet waren. Bei den chimären Rezeptoren wurde außerdem noch eine hinge-Region zwischen die scFv-Domänen und der Signaltransduktionseinheit fusioniert. Diese vergrößerte den Abstand des scFv zur Zellmembran und war für eine effiziente Antigenbindung des chimären Rezeptors erforderlich. Sie spielte weiterhin eine Rolle bei der Expression des chimären Rezeptors, der Rezeptorstabilität und der T-Zellaktivität (Patel et al., 1999). Fusionsproteine ohne hinge-Region waren nicht funktionell (Moritz und Groner, 1995). Als hinge-Region, die zu funktionellen Rezeptoren führten, wurden verschiedene Regionen bereits eingesetzt z.B. die Ig-hinge-ähnliche Domäne des CD8 α -Moleküls (Moritz und Groner, 1995, Darcy et al., 1998, Haynes et al., 1999), die Ig-ähnlichen D3- und D4-Domänen (Moritz und Groner, 1995) oder die hinge-CH2-CH3-Region des CD4-Moleküls (Jensen et al., 1998).

Für die Bekämpfung von verschiedenen Tumoren wurden die chimären Rezeptoren bereits mit unterschiedlicher Antigenspezifität ausgestattet, wie z.B. gegen CEA (carcinoma embryonic antigen, Darcy et al., 1998), CD20 (Jensen et al., 1998), G250 (Weijtens et al., 1998) und CD44v6 (Hekele et al., 1996).

Die Funktionalität dieser chimären Rezeptoren war in mehreren Ansätzen gezeigt worden. Der ErbB2-Rezeptor wird bei vielen Tumoren überexprimiert und stellt ein für diese adoptive Immuntherapie häufig verwendetes Antigen dar. So führte die Inkubation von T-Zellen, die mit einem chimären Rezeptorgen transfiziert wurden, der gegen den ErbB2-Rezeptor gerichtet war (scFv:hinge:ζ und scFv:D3/D4:ζ), nach einer ErbB2-vermittelten Quervernetzung des T-Zellrezeptors zur γ-INF-Sezernierung und zur intrazellulären Calcium-Freisetzung. Maus-T-Zelllinien (Altenschmidt et al., 1996, Haynes et al., 1999) und primäre murine T-Zellen (Altenschmidt et al., 1996), die gegen den ErbB2-Rezeptor gerichtet waren, lysierten ErbB2-exprimierende Tumorzellen.

Die Kombination der verschiedenen Komponenten, aus denen sich die chimären Rezeptoren zusammensetzen, führte jedoch nicht immer zu einem funktionellen Rezeptor. So wurde z.B. ein chimärer Rezeptor exprimiert, der ein scFv-Fragment gegen das TAG72-(B72.3)-Antigen mit der Fc(γ)RI-Kette kombinierte. Der Austausch der Signaltransduktionseinheit durch die ζ-Kette führte zu einem nicht funktionellen chimären Rezeptor. Durch Einführung einer CH2/3-Domäne eines humanen IgGs konnte die stabile Expression sowohl des γ-Rezeptors wie des ζ-Rezeptors erreicht werden (Hombach et al., 1999).

Die Einführung des c-myc-Epitops vor die CD8α-hinge-Region des chimären scFv(VFF18):α:ζ-Rezeptors führte in dieser Arbeit zum Verlust einer nachweisbaren Expression des chimären Rezeptors an der Zelloberfläche. Die Transkription konnte in fast allen Cl96VFF18cyYZ-Klonen nachgewiesen werden, ohne dass im Durchflusszytometer durch den c-myc-Antikörper der chimäre Rezeptor an der Zelloberfläche detektiert werden konnte. Auf Proteinebene können verschiedene Ursachen zu diesem Ergebnis geführt haben. Zum einen ist es möglich, dass der Rezeptor an der Zelloberfläche exprimiert wurde, aber aus sterischen Gründen nicht für den c-myc-Antikörper zugänglich war. Weiterhin ist es denkbar, dass z.B. durch eine Punktmutation, die zu einem Stopkodon führte, keine Translation stattgefunden hatte. Der Rezeptor kann aber auch, z.B. durch eine fehlerhafte Faltung, nicht an die Oberfläche transportiert worden sein.

Die Insertion der c-myc-Sequenz in das scFv(VFF17):α:ζ-Rezeptorgen verhinderte jedoch nicht die Expression des chimären Rezeptors und erlaubte einen schnellen Expressionsnachweis an der Zelloberfläche, da sich durch die FACS-Analyse auf fast allen Cl96(VFF17)cyYZ-Klonen die Expression des chimären Rezeptors nachweisen ließ. Die einzelnen Klone zeigten eine unterschiedliche Expressionsstärke des chimären Rezeptors. Diese war möglicherweise durch verschiedene Integrationsstellen und Kopienzahlen des chimären Rezeptorgens in das T-Zell-Genom begründet. Die Cl96(VFF17)cyYZ-Klone interagierten abhängig von der unterschiedlichen Höhe der chimären Rezeptorexpression verschieden stark mit CD44v7/8-positiven Zellen. Entsprechend der Cl96(VFF17)cyYZ-Klone zeigten auch murine rekombinante MD45-CTL-Hybridomzellen, die gegen den ErbB2-Rezeptor gerichtet waren, abhängig von der Expression des chimären Rezeptors im Rosettingtest eine unterschiedlich starke Interaktion mit den Zielzellen (Haynes et al., 1999). Darcy und Kollegen (1998) zeigten durch eine Scatchard-Analyse ebenfalls, dass die Expressionsstärke des chimären Rezeptors mit der Antigenbindungsfähigkeit direkt korrelierte.

Die CI96(VFF17)cyYZ-Klone konnten *in vitro* CD44v7/8-positive Zellen lysieren. Diese Lyse war sowohl abhängig von der Höhe der Antigenexpression der verschiedenen Zielzellen als auch von der Höhe der Rezeptorexpression der einzelnen CI96(VFF17)cyYZ-Klone. So konnte z.B. bei einem Effektor/Zielzell-Verhältnis von 20:1 der CI96(VFF17)cyYZ-Klon 1 mit der höheren Rezeptorexpression 40% der Zielzellen lysieren, während der CI96(VFF17)cyYZ-Klon 2 mit der geringeren Rezeptorexpression nur 25% der Zielzellen lysierte.

Auch bei rekombinante MD45-Zellen war Fähigkeit, CEA-positive Colonkarzinom-Zelllinien zu lysieren, abhängig von der Expression eines gegen das CEA-Antigen gerichteten chimären Rezeptors (Darcy et al., 1998). So konnten Klone mit einer höheren Rezeptorexpression bei einer Effektor/Zielzell-Ratio von 20:1 ca. 50% der Zielzellen lysieren, während die Klone mit einer geringeren Expression nur 15-20% der Zielzellen lysierten.

Die zytotoxischen Eigenschaften der verschiedenen CI96(VFF17)cyYZ-Klone war jedoch nicht nur von der Expression des chimären Rezeptors abhängig. Die Zytolyse der Zielzellen bei den verschiedenen Effektor/Zielzell-Ratios durch die CI96(VFF17)cyYZ-Klone 1 und 3 unterschieden sich trotz einer vergleichbaren Rezeptorexpression voneinander.

Bei der T-Zellaktivierung und Zytolyse spielen Adhäsions- und Akzessorische Moleküle eine wichtige Rolle. Für CD2-, CD3-, und CD11/CD18-CD54-Moleküle wurde eine koregulatorische Rolle bei der Lyse von G250-exprimierenden renalen Karzinomzellen durch rekombinante CTL's ermittelt (Weijtens et al., 1998). Die CD11/CD18-CD54-Interaktion war jedoch nur nötig, wenn das Tumorantigen nur gering exprimiert wurde. Bei einem hohen Expressionsspiegel des G250-Antigens konnte die Lyse der Zielzellen durch CD58-Antikörper nicht mehr inhibiert werden. Durch den CD58-Antikörper wurde die Interaktion der rekombinanten T-Zellen an die Tumorzellen nicht verhindert, so dass die Hemmung der Zytolyse vermutlich durch ein inhibitorisches Signal im Zytoplasma der CTL's begründet war.

Die unterschiedlichen Eigenschaften der rekombinanten T-Zellen sind somit nicht nur von der Expression des chimären Rezeptors abhängig, sondern auch von der Expression verschiedener koregulatorischer Moleküle, so dass unterschiedliche zytotoxische Eigenschaften der einzelnen CI96VFF17cyYZ-Zellklonen durch eine unterschiedliche Expression koregulatorischer Moleküle begründet sein könnte.

Die Expression des Tumorantigens, gegen welches der chimäre Rezeptor gerichtet ist, spielte weiterhin eine wichtige Rolle bei der Sensitivität der Zielzellen gegenüber der T-Zell-vermittelten Zytolyse.

Weijtens und Kollegen (2000) zeigten, dass primäre humane CTL's, die einen chimären Rezeptor gegen das G250-Antigen nur sehr schwach exprimierten, nur Zielzellen mit einer hohen Antigenexpression lysieren konnten. Durch Umklonierung des chimären Rezeptorgens aus dem auch in dieser Arbeit verwendeten pLXSN-Vektor in einen STITCH-Vektor konnten trotz gleicher Transferraten des Rezeptorgens T-Zellen generiert werden, die eine wesentlich höhere Expression des chimären Rezeptors zeigten. Diese Zellen konnten nicht nur Zielzellen lysieren, die viel G250-Antigen, sondern auch Zielzellen, die relativ wenig G250-Antigen exprimieren. Die Lyse der Tumorzellen durch die rekombinanten CTL's stand in direktem Zusammenhang zur Expression des Tumorantigens. Auch die in dieser Arbeit untersuchten Tumorzellen zeigten abhängig von der CD44v7/8-Antigendichte unterschiedliche Sensitivität gegenüber den rekombinanten T-Zellen. Die von Weijtens et al. (2000) verwendeten Tumorzellen besaßen alle den gleichen CD54- und CD58-Expressionsspiegel. Die Expression der koregulatorischen Moleküle ist bei den hier verwendeten

Tumorzelllinien nicht untersucht worden, so dass deren unterschiedliche Expression nicht auszuschließen ist. Dennoch wurde eine CD44v7/8-abhängige Zytolyse der Tumorzellen durch die CI96(VFF17)cyYZ-Zellen beobachtet, die sich durch den VFF17-Antikörper gegen CD44v7/8 komplett hemmen ließ. Der Zusammenhang zwischen der Tumorgenexpression, der Expression des chimären Rezeptors und den zytotoxischen Eigenschaften der rekombinanten T-Zellen zeigt, dass es unbedingt nötig ist, rekombinante T-Zellen zu generieren, die sich durch eine hohe Rezeptorexpression auszeichnen, um auch Tumorzellen zu lysieren, die nur eine geringe Tumorantigendichte besitzen. Durch Verwendung des STITCH-Vektors wäre es eventuell möglich, auch die Expression des chimären VFF17cyYZ-Rezeptors zu erhöhen.

Weijtens et al. (2000) konnten bei einer geringen Dichte des Tumorantigens durch Verlängerung der Inkubationszeit der rekombinanten T-Zellen mit den Zielzellen die Zytolyse steigern. Auch Darcy und Kollegen (1998) beobachteten den Zusammenhang zwischen der Zytotoxizität und Inkubationszeit der T-Zellen mit den Zielzellen. Die durch einen scFv-anti-CEA- γ -Rezeptor-vermittelte Zytotoxizität von rekombinanten MD45-T-Zellen gegen Lovo-Kolonkarzinomzellen konnte durch eine Verlängerung der Inkubationszeit der Effektorzellen mit den Zielzellen von ca. 4% (18%) nach 4 h (8 h) auf 23% (30%) nach 12 h (16 h) gesteigert werden.

Die zytotoxischen Eigenschaften der CI96(VFF17)cyYZ-Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit durch einen nicht-radioaktiven LDH-Test ermittelt. Dieser Test erlaubte aufgrund der auftretenden Proliferationsunterschiede in den verschiedenen Ansätzen mit unterschiedlicher Effektor-/Zielzell-Ratio nur eine Inkubationszeit bis zu 6h, da sonst Messfehler auftreten würden. Durch den von Darcy und Kollegen eingesetzten ^{51}Cr -Release-Test können längere Reaktionszeiten gemessen werden. Es wäre somit zu erwarten, dass seine längere Inkubationszeit der CI96VFF17cyYZ-Zellen mit CD44v7/8-positiven Zielzellen auch zu höheren Zytolyseraten führen würde.

Durch die unterschiedlichen Inkubationszeiten der verschiedenen Studien lassen sich die *in vitro* Zytolyseraten der Tumorzellen schlecht untereinander vergleichen. Die durch CI96(VFF17)cyYZ-Zellen erreichten Zytolyseraten entsprachen jedoch den durch andere Tumorantigene vermittelten Zytolyseraten rekombinanter T-Zellen von bis zu 50% der Tumorzellen (Darcy et al., 1998, Jensen et al., 1998).

4.5 In vivo Reaktivität von rekombinanten T-Zellen

Die Reaktivität von rekombinanten T-Zellen wurde zuerst 1994 von Moritz und Kollegen im Tiermodell überprüft. Sie setzten rekombinante CI96-T-Zellen gegen *ERBB2*-transformierte NIH 3T3#3.7-Zellen ein. 4×10^5 NIH 3T3#3.7-Zellen wurden in die rechte Flanke von thymusaplastischen BALB/c nu/nu-Mäusen injiziert und nach 4 Tagen mit der i.v. Behandlung begonnen. Tumor-tragende Tiere wurden in Kombination mit 500 U IL-2 mit 10^7 rekombinanten T-Zellen, die einen scFv(anti-ErbB2)-CD8 $\alpha\zeta$ -Rezeptor exprimierten oder mit Wiltyp-CI96-Zellen behandelt. Die mit CI96-Zellen behandelten Kontrolltiere erreichten nach 10 Tagen ein durchschnittliches Tumolvolumen von ca. 320 mm³ im Vergleich zu einem durchschnittlichen Volumen ca. 200 mm³ bei den mit rekombinanten T-Zellen behandelten Tieren. Die Fluoreszenzmarkierung der T-Zellen zeigte, dass nur die rekombinanten T-Zellen sich an die Tumorzellen angelagert hatten. Der Effekt gegen *ERBB2*-exprimierende Zellen ließ sich auch auf ein autologes System mit immunkompetenten Mäusen übertragen (Altenschmidt et al., 1997). In diesem Experiment wurden *ERBB2*-transfizierte HC11 R2-Zellen s.c. BALB/c-Mäusen injiziert. Nach 7 Tagen erreichte das Tumolvolumen 350-600 mm³. Tumor-

tragende-Mäuse wurden nun über 5 Tage intratumoral mit 10^7 retroviral-infizierten primären murinen T-Zellen, die einen chimären anti-ErbB2-Rezeptor exprimierten bzw. mit nicht-infizierten T-Zellen behandelt. Die Behandlung mit rekombinanten T-Zellen führte nach einer Woche zu einer vollständigen Tumorregression. Durch Untersuchung von fluoreszenz-markierten rekombinanten T-Zellen konnten sie zeigen, dass die Mehrzahl der modifizierten T-Zellen das Tumorgewebe verlassen hatte und in der Leber, der Milz und in Lymphknoten nachgewiesen wurden. Nach 48 Stunden ließen sich im Tumorgewebe nur noch rekombinante T-Zellen nachweisen. Die T-Zellakkumulation war folglich abhängig von der Erkennungsspezifität der T-Zellen.

Die Mäuse entwickelten keine Immunantwort gegen die rekombinanten T-Zellen. Sie zeigten jedoch eine humorale Reaktion gegen die Tumorzellen als Konsequenz auf die T-Zell-vermittelte Tumolyse.

Einen Nachteil dieser Studien stellte der Einsatz von *ERBB2*-transfizierten Zielzellen dar, die zu 100% Antigen-positiv waren. Die einzelnen Zellen der meisten Tumore sind jedoch bezüglich ihrer Antigenexpression heterogen, entsprechend der CD44v7/8-Expression bei den hier verwendeten Tumorzelllinien. Das Tumorwachstum der Zervixkarzinomzellen konnte durch Behandlung von CI96(VFF17)cyYZ-Zellen in Kombination mit 10^5 U Proleukin im Vergleich zu der Behandlung mit 1×10^6 CI96-Zellen und 10^5 U Proleukin zu 70% reduziert werden. Für den Tierversuch wurden nur 1×10^6 CI96(VFF17)cyYZ-Zellen im Vergleich zu 1×10^7 rekombinanter CI96-T-Zellen, die von Moritz et al. (1994) eingesetzt wurden, verwendet. Der verbesserte Effekt im Vergleich zu den rekombinanten anti-ErbB2-Zellen ist wahrscheinlich durch Unterschiede des Versuchsaufbaus begründet. So wurden die CI96VFF17cyYZ-Zellen wie auch von Altenschmidt et al. (1997) intratumoral appliziert, während Moritz et al. (1994) i.v.-Injektionen der CTL's durchführte. Weiterhin betrug die Therapiedauer 7 Tage im Vergleich zu nur zwei Tagen bei Moritz et al. (1994). Für eine klinische Anwendung von rekombinanten T-Zellen sind somit die Injektionsform und Anwendungsdauer genau auszutesten.

Die Verwendung von primären T-Zellen sollte aufgrund einer Stimulation der zytotoxischen T-Zellen durch die T-Helferzellen, z.B. durch Sezernierung von IL-2, zu höheren Zytolyseraten führen als der alleinige Einsatz einer CTL-Zelllinie. Der Vergleich der beiden Studien von Moritz et al. (1994) und Altenschmidt et al. (1997) bestätigt dies, obwohl man auch die unterschiedlichen Versuchsbedingungen, wie z.B. die verschiedenen Applikationsarten der T-Zellen (i.v. und intratumoral), berücksichtigen muss. Die Verwendung von autologen rekombinanten T-Zellen hat weiterhin den Vorteil, dass das Immunsystem der immunkompetenten Tiere die gentechnologisch modifizierten T-Zellen unterstützen kann. So konnten Altenschmidt et al. (1997) eine zusätzliche Induktion der humoralen Antwort erreichen. Weiterhin können durch die Zytolyse von Tumorzellen durch die rekombinanten T-Zellen unspezifische Immunzellen wie Makrophagen und natürliche Killerzellen angelockt und aktiviert werden, so dass im immunkompetenten Tiermodell auch eine verstärkte Reduktion des Tumorwachstums durch die rekombinanten primären T-Zellen gegen CD44v7/8-exprimierende Tumore zu erwarten wäre.

Wegen der hohen Mengen an rekombinanten T-Zellen, die für eine Therapie nötig sind, würde dieser Therapieansatz sich nicht für die Behandlung ausgedehnter Tumorformationen sondern zur Elimination von postoperativen minimaler, aber systemisch verstreuter Tumorresten eignen. Die spezifische Akkumulation von

rekombinanten T-Zellen im Tumorgewebe demonstrierte einen möglichen Einsatz der rekombinanten T-Zellen für die Therapie von Fernmetastasen.

Die nachgewiesene Langzeitexpression des chimären Rezeptors durch die rekombinanten T-Zellen ist für eine effektive Wirkung und eine lange Verfügbarkeit der T-Zellen wichtig. Überlebende T-Zellen könnten den Patienten möglicherweise sogar vor neu auftretenden Tumoren oder vor Rezidiven schützen. Eine lange Überlebensdauer von retroviral *ex vivo* mit dem humanen ADA-Gen transfizierten T-Lymphozyten konnte bereits bei ADA-immundefizienten Patienten nachgewiesen werden (Bordignon et al., 1995).

Eine erhöhte Sensitivität der Tumorzellen durch γ -IFN gegenüber den rekombinanten T-Zellen könnte wahrscheinlich *in vivo* ebenfalls zu einer höheren Zytolyse der Tumorzellen führen. γ -IFN besitzt einen antiproliferativen Effekt gegenüber Tumorzellen. Weiterhin wurde eine *in vitro* und *in vivo* Sensitivität der Proliferation von Zervixkarzinom-Zelllinien durch γ -IFN beschrieben (Iwasake et al., 1991). Sie setzten γ -IFN außerdem für eine postoperative Behandlung ein (Iwasake et al., 1990). Eine Kombination der Therapie aus rekombinanten T-Zellen und einer γ -IFN-Behandlung könnte sich somit ergänzen, da die γ -IFN-Behandlung z.T. einen direkten antiproliferativen Effekt besitzt und außerdem bei Tumorzellen mit einer reduzierten Fas-Expression eine Sensitivität gegenüber der Fas/FasL-vermittelten Zytolyse über die γ -IFN-induzierte Fas-Expressionserhöhung, wiederherstellen könnte.

4.6 Die Infektion von primären T-Zellen

Die Reaktivität von rekombinanten T-Zellen gegenüber Tumorzellen konnte nicht nur durch gentechnologische Modifikation einer T-Zelllinie, sondern auch durch die Transfektion von primären T-Zellen mit dem chimären *scFv(VFF17):y:a:z*-Rezeptorgen erzielt werden.

Die Infektion der primären T-Zellen konnte durch die Kokultivierung der primären T-Zellen mit einer Verpackungszelllinie erreicht werden. Die Transferraten lagen mit 40-50% im Bereich der in der Literatur beschriebenen Transfereffizienzen. So konnten Pollok et al. (1998) 40% und Di Ianni et al. (1999) 30-40% der T-Zellen infizieren. Nur Altenschmidt et al. (1996) erreichten mit dieser Methode, möglicherweise aufgrund höherer Virustiter, Transfereffizienzen von 70%.

Nachteile der Kokultivierungsmethode in der klinischen Anwendung liegen in einer möglichen Übertragung von Zellen der Verpackungszelllinie zusammen mit den rekombinanten CTL's. Diese können zwar durch Bestrahlung an ihrer Ausbreitung gehindert werden. Sie würden aber als murine Zellen voraussichtlich zu einer Immunantwort führen, die eine Wiederholung der Therapie erschweren würde. Für eine klinische Anwendung müsste eine Übertragung der Verpackungszelllinie, z.B. durch eine Membran, welche die T-Zellen und die Verpackungszellen trennt und nur für die Viren durchgängig ist, verhindert werden. Es besteht aber auch die Möglichkeit für eine klinische Anwendung andere Transfermethoden zu verwenden. Mittlerweile wurden bereits verschiedene Transfermethoden entwickelt mit vergleichbaren Transfereffizienzen. So können z. B. durch eine spezielle Zentrifugationstechnik oder durch eine Kolokalisation der Retroviren und der T-Zellen an spezifischen Adhäsionsdomänen von rekombinantem Fibronectin (Pollok et al., 1998) hohe Transfereffizienzen von 70% bis 90% erreicht werden. Der Vorteil der Zentrifugationstechnik ist beispielsweise, dass sie ohne FCS auskommt, welches ein potentes Immunogen darstellt. Ferner könnte sie GMP-

(good manufacturing practice)-gerecht durch geführt werden. Sie ist einfach zu handhaben und erlaubt bei der Infektion eine hohe Zelldichte (Ayuk et al., 1999). Eine G418-Selektion von primären T-Zellen beeinflusste weder die T-Zellproliferation, noch die Alloresponsivität noch die Fähigkeit, auf IL-2 zu reagieren und es zu produzieren (Di Ianni et al., 1999). Weijtens et al. (2000) führten nach der Infektion von primären humanen T-Zellen eine G418-Selektion und Expansion der T-Zellen durch, ohne dass die T-Zellen ihre zytotoxischen Eigenschaften verloren. Nach der Transfektion könnte somit für die Anreicherung der Rezeptor-positiven T-Zellen eine Selektion und Expansion der T-Zellen erfolgen, so dass für eine Therapie eine größere Anzahl an rekombinanten T-Zellen zur Verfügung stehen würde. Eine andere Anreicherungs-methode von Rezeptor-positiven T-Zellen wäre über das in den Rezeptor eingefügte cmyc-Epitop durch FACS-basierende Zellsortierungstechnologie vorstellbar. Für eine klinische Anwendung der rekombinanten T-Zellen sind noch viele Schritte zu absolvieren. Als Effektorzellen sollten dann autologe, primäre T-Zellen des Tumorpatienten verwendet werden. Die Gewinnung der primären T-Zellen könnte durch Apherese erfolgen, die dann retroviral mit dem chimären Rezeptorgen transfiziert würden. Die Rezeptor-positiven T-Zellen könnten dann *ex vivo* expandiert werden. Während dieser *ex vivo* Phase müssen die Zellen präaktiviert werden, da in ruhenden T-Zellen die alleinige Aktivierung durch die über die ζ -Kette-vermittelten Signaltransduktion nicht ausreichte (Brockner und Karjalainen, 1995). Die rekombinanten T-Zellen würden dann, eventuell kombiniert mit γ -IFN, in den Patienten retransfundiert werden und damit eine adoptive Immuntherapie im autologen System ermöglichen. Falls der Patient keine Immunreaktion gegen Komponenten des chimären Rezeptors entwickelte, wären aufgrund des autologen Systems mehrere Therapiezyklen möglich. Hombach et al. (2000) gelang es bereits, aufgereinigte periphere humane T-Zellen zu 5-40% mit einem chimären Rezeptorgen gegen CEA zu transduzieren. Über magnetisch aktiviertes Zellsorting könnten die Rezeptor-positiven T-Zellen 2- bis 6-fach angereichert werden und CEA-exprimierende Tumorzellen lysiert werden. Diese Gruppe plant bereits eine Phase I-Studie. Die Optimierung einer Therapie von Tumorpatienten mittels rekombinanter T-Zellen wird jedoch noch Zeit in Anspruch nehmen.

5. Zusammenfassung

CD44 umfasst eine Familie von Oberflächenglykoproteinen, deren Isoformen durch alternatives Spleißen 10 varianter Exons (CD44v1-CD44v10) entstehen. Die Expression bestimmter varianter Isoformen bedingt ein metastatisches Potential eines Adenokarzinoms der Ratte, welches durch einen Antikörper gegen CD44v6 gehemmt werden konnte. Bei verschiedenen humanen Malignomen konnte eine Assoziation zwischen der Expression varianter CD44-Isoformen mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium gezeigt werden. So korreliert z.B. beim Zervixkarzinom die Expression der CD44v7/8-Isoform mit der Tumorprogression.

In der vorliegenden Arbeit wurde die CD44-Expression in Endometriumkarzinomen und dem korrespondierenden Normalgewebe auf Protein- und mRNA-Ebene untersucht. Die Karzinome zeigten im Vergleich zum Normalgewebe eine erhöhte CD44v3-, CD44v7/8-, CD44v8- und CD44v10-Expression. CD44v6-enhaltende Isoformen wurden jedoch im Gegensatz zu anderen Tumoren nur selten nachgewiesen.

Die CD44mRNA-Expression verschiedener Brust- und Endometriumkarzinom-Zelllinien mit einem unterschiedlichen Östrogenrezeptor-(ER)-Status zeigte eine höhere CD44-Gesamtexpression in ER-positiven Zelllinien, ohne dass vom ER-Status-abhängige Unterschiede bei der CD44v-Expression auftraten. Weiterhin wurde der Einfluss von klinisch relevanten Hormonen, Hormonantagonisten und Zytokinen auf die CD44-Expression untersucht. Die CD44-Gesamtexpression konnte durch Kultivierung der Zellen in Medium mit FCS im Vergleich zur Kultivierung ohne FCS erhöht werden. Inkubation der Zellen in Medium mit 17 β -Estradiol führte zu einer kurzzeitigen Expressionserhöhung. Das alternative Spleißen ließ sich jedoch durch Hormone, Hormonantagonisten und Zytokine nicht verändern. Insgesamt wurden CD44v3- oder CD44v6-enhaltende Transkripte in den Zelllinien variabler exprimiert als CD44v8- oder CD44v10-enhaltende Isoformen.

Die häufige CD44v7/8- und CD44v6-Expression in Karzinomen und die fehlende Expression dieser Isoformen in lebenswichtigen Organen war die Voraussetzung zur Entwicklung eines Immuntherapie-Ansatzes. Bei diesem Ansatz werden T-Zellen gentechnologisch so modifiziert, dass sie in der Lage sind, MHC-unabhängig das CD44v7/8- und CD44v6-Antigen zu erkennen und Tumorzellen zu lysieren. Die Antigenerkennung wurde durch single chain(scFv)-Fragmente ermöglicht, die jeweils von Antikörpern gegen CD44v6 (VFF18) bzw. CD44v7/8 (VFF17) abgeleitet waren. Für Expressionsanalysen der chimären Rezeptoren wurde ein c-myc-Epitop in die chimären Rezeptoren kloniert, die bereits ein scFv, eine CD8 α -hinge-Region und die TCR- ζ -Kette enthielten. In FACS-Analysen zeigten, die infizierten primären T-Zellen und die transfizierten Klone der C196-Zelllinie, die Oberflächenexpression des chimären scFv(VFF17):y: α : ζ -Rezeptors, nicht jedoch des scFv(VFF18):y: α : ζ -Rezeptors. Bei primären T-Zellen konnten Transfektionsraten des scFv(VFF17):y: α : ζ -Fusionsgens von ca. 40%-50% erreicht werden. Die rekombinanten T-Zellen konnten bis zu 40% der CD44v7/8-positiven Zielzellen lysieren. Diese Zytolyse lässt sich durch Vorinkubation der Tumorzellen mit dem CD44v7/8-spezifischen Antikörper blockieren und durch γ -IFN steigern. γ -IFN erhöhte die Fas-Expression, während das CD44v7/8-Antigen nahezu unverändert exprimiert wurde, so dass die Zytolyse vermutlich Fas-vermittelt ablief. Im Tierversuch konnte das Tumorwachstum bei Mäusen, die mit den rekombinanten T-Zellen behandelt wurden, im Vergleich zu den Kontrollen deutlich reduziert (70%) werden.

Die erzielte erfolgreiche Expression des chimären Rezeptors, die erreichte Transduktionseffizienz primärer T-Zellen und die dadurch erzielte CD44v7/8-spezifische Zytotoxizität sowie das reduzierte Tumorwachstum bei Mäusen durch die Behandlung mit rekombinanten T-Zellen bilden die Grundlagen für einen möglichen gentherapeutischen Ansatz gegen CD44v7/8-positive Tumorzellen.

6. Literatur

- Abbasi AM, Chester KA, Talbot IC, Macpherson AS, Boxer G, Forbes A, Malcolm AD, Begent RH: CD44 is associated with proliferation in normal and neoplastic human colorectal epithelial cells. *Eur. J. Cancer*, 29A (14),1995-2002, 1993.
- ACOG Committee Opinion: Tamoxifen and endometrial cancer. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 53, 197-199, 1996.
- Albers A, Thie M, Hohn HP, Denker HW: Differential expression and localization of integrins and CD44 in the membrane domains of human uterine epithelial cells during the menstrual cycle. *Acta Anat. (Basel)*, 153 (1), 12-9, 1995.
- Altenschmidt U, Kahl R, Moritz D, Schierle BS, Gerstmayer, Wels W, Groner B: Cytolysis of tumor cells expressing the Neu/erbB-2, erbB-3 and erbB-4 receptors by genetically targeted naive T lymphocytes. *Clin. Cancer Res.* 2, 1001-1008, 1996.
- Altenschmidt U, Klundt E, Groner B. Adoptive transfer of in vitro-targeted, activated T lymphocytes results in total tumor regression. *J. Immunol.* 159 (11), 5509-5515, 1997.
- Altenschmidt U, Kahl R, Klundt E, Stocklin E, Mihatsch M, Weindel K, Groner B: Schwannoma cells induce a tumor-cell-specific cytotoxic-T-cell response upon transplantation into syngeneic rats but escape elimination through the secretion of immunosuppressive factors. *Int. J. Cancer*, 70 (5), 542-550, 1997.
- Anzai Y, Holinka CF, Kuramoto H, Gurside E: Stimulatory effects of 4-hydroxytamoxifen on proliferation of human endometrial adenocarcinoma cells (Ishikawa line). *Cancer Res.*, 49 (9), 2362-5, 1989.
- Arch R, Wirth K, Hofmann M, Ponta H, Matzku S, Herrlich P, Zöller M: Participation in normal immune response of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *Science*, 257, 682-685, 1992.
- Arteaga CL, Hurd SD, Winner AR, Johnson MD, Fendley BM, Forbes JT: Anti-transforming-growth-factor(TGF)- β antibodies inhibit breast-cancer -cell tumorigenicity and increase mouse-spleen natural- killer -cell activity. *J. Clin. Invest.* 92, 2569-2576, 1993.
- Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B: CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61, 1303-1313, 1990.
- Atzpodien J, Buer J, Sel S, Janssen J, Oevermann K: Chemonimmunotherapy in the systemic treatment of advanced renal carcinoma. *Urologe A*, 38 (5), 474-8, 1999.
- Ayuk FA, Li Z, Küchle K, Lindemann C, Schade UM, Eckert HG, Zander AR, Fehse B: Establishment of an optimised gene transfer protocol for human primary T lymphocytes according to clinical requirements. *Gene Therapy*, 6, 1788-1792, 1999.
- Bartolazzi A, Peach R, Aruffo A, Stamenkovic I: Interaction between CD44 and hyaluronate is directly implicated in the regulation of tumor development. *J. Exp. Med.* 180, 53-66, 1994.
- Bartolazzi A, Jackson D, Bennett K, Aruffo A, Dickinson R, Shields J, Whittle N, Stamenkovic I: Regulation of growth and dissemination of a human lymphoma by CD44 splice variants. *J. Cell Sci.* 108, 1723-1733, 1995.
- Bennett KL, Modrell B, Greenfield B, Bartolazzi A, Stamenkovic I, Peach R, Jackson DG, Spring F, Aruffo A: Regulation of CD44 binding to hyaluronan by glycosylation of variably spliced exons. *J Cell Biol.* 131, 1623-1633, 1995a.
- Bennett KL, Jackson DG, Simon JC, Tanczos E, Peach R, Modrell B, Stamenkovic I, Plowman G, Aruffo A: CD44 isoforms containing exon v3 are responsible for representation of heparin-binding growth factor. *J Cell Biol.* 128:687-698, 1995b.
- Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B, Olt G, Kinney R, Soper JT, Dodge R, Clarke-Pearson DL, Marks P, McKenzie P, Yin, Bast JRC: Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* 50, 4087-4091, 1990.
- Berchuck A, Boyd J: Molecular basis of endometrial cancer. *Cancer* 76, 2034-2040, 1995.
- Blood C, Zetter B: Tumor interaction with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim. Biophys. Acta* 1032, 889-118, 1990.
- Boel P, Wildmann C, Sensi ML, Brasseur F, Renauld JC, Coulie P, Boon T, van der Bruggen P: BAGE, a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity* 2, 167-175, 1995.
- Bonifacio JS, Cosson P, Klausner RD: Colocalized transmembrane determinates for ER degradation and subunit assembly explain in intracellular fate of TCR chains. *Cell* 63, 503-913, 1990.
- Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, Ferrari G, Casorati G, Panina P, Mazzolari E, Maggioni D, Rossi C, Servida P et al: Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immundeficient patients. *Science* 270 (5235),470-475, 1995.

- Boukamp P, Pertussevska RT, Breitkreuz D, Hornung J, Markam A, Fusening NE: Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocytes cell line. *J. Cell Biol.* 106, 761-771, 1988.
- Bourguignon LYW, Kalomiris EL, Lokeshwar VB: Acylation of the lymphoma transmembrane glycoprotein, GP85, may be required for GP85-ankyrin interaction. *J. Biol. Chem.* 266, 11761-11765, 1991.
- Bourguignon LYW, Lokeshwar VB, He J, Chen X, Bourguignon GJ: A CD44-like endothelial cell transmembrane glycoprotein (GP116) interacts with extracellular matrix and ankyrin. *Mol. Cell Biol.* 12, 4464-4474, 1992.
- Bourguignon LYW, Lokeshwar VB, Chen X, Kerrick WGJ: Hyaluronic acid-induced lymphocyte signal transduction an HA receptor (GP85/CD44)-cytoskeleton interaction. *J. Immunol.* 151, 6634-6644, 1993.
- Bourguignon LY, Zhu H, Chu A, Iida N, Zhang L, Hung MC: Interaction between the adhesion receptor, CD44, and the oncogene product, p185HER2, promotes human ovarian tumor cell activation. *J. Biol. Chem.* 272, 27913-8, 1997.
- Branch P, Bicknell DC, Rowan A, Bodmer WF, Karran P. Immune surveillance in colorectal carcinoma. *Nature Genet.* 9, 231-232. 1995.
- Brockert T, Karjalainen K: Signals through T cell receptor- ζ chain alone are insufficient to prime resting T-lymphocytes. *J. Exp. Med.* 181, 1653-1659, 1995.
- Brown TA, Bouchard T, St. John T, Wayner E, Carter WG: Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as a heparan-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons. *J. Cell Biol.* 113, 207-221, 1991.
- Burg van der B, Rutteman GR, Blankenstein MA, Laatz SW, Zoelen van EJ: Mitogenic stimulation of human breast cancer cells in a growth factor-defined medium: synergistic action of insulin and estrogen. *J. Cell Physiol.* 134, 101-108, 1988.
- Cannistra SA, DeFranzo B, Niloff J, Ottensmeier C: Functional Heterogeneity of CD44 molecules in ovarian cancer cell lines. *Clinical cancer research* 1 (3), 333-342, 1995.
- Camp RL, Scheynius A, Johansson C, Puré E: CD44 is necessary for optimal contact allergic responses but is not required for normal leukocyte extravasation. *J. Exp. Med.* 178, 497-507, 1993.
- Carter WG, Wayner EA: Characterization of the class III collagen receptor, a phosphorylated transmembrane glycoprotein expressed in nucleated human cells. *J. Biol. Chem.* 263, 4193-4201, 1988.
- Cascino I, Fiucci G, Papoff G, Ruberti G: Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *J. Immunol.* 154, 2706-2713, 1995.
- Chan AC, Dalton M, Johnson R, Kong GH, Wang T, Thoma R, Kurosaki: Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *EMBO J.* 14, 2499-2508, 1995.
- Chen L, Linsley PS, Hellström KE: Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunol. Today* 14, 483-486, 1993.
- Cho KR, Vogelstein B: Genetic alterations in the adenoma-carcinoma sequence. *Cancer* 70 (Suppl. 6), 1727-31, 1992.
- Chomczynski P, Quasba PK: Alkaline transfer of DNA to plastic membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122 (1), 340-344, 1984.
- Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159, 1987.
- Clapham DE: Calcium signalling. *Cell.* 80 (2), 259-268, 1995.
- Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W: Current Protocols in Immunology, Vol. 2, pp. 3.2.1-3.2.3. New York: J. Wiley & Sons. Inc., 1993.
- Cooper DL, Dougherty GJ, Harn HJ, Jackson S, Baptist EW, Byers J, Datta A, Phillips G, Isola NR: The complex CD44 transcriptional unit; alternative splicing of three internal exons generates the epithelial form of CD44. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182, 569-578, 1992.
- Cromme FV, Airey J, Heemels MT, Ploegh HL, Keating PJ, Stern PL, Meijer CJLM Walboomers JMM: Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J. Exp. Med.* 179, 335-340, 1994a.
- Cromme FV, van Brommel PFJ, Walboomers JMM, Gallee MPW, Stern PL, Kenemans P, Helmerhorst TJM, Stukart MJ, Meijer CJLM: Differences in MHC and TAP-1 expression in cervical cancer lymph node metastases as compared with the primary tumours. *Br. J. Cancer*, 69, 1176-1181, 1994b.

- Culty M, Nguyen HA, Underhill CB: The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J. Cell Biol.* 116,1055-1062, 1992.
- Culty M, O'Mara TE, Underhill CB, Yaeger H, Swartz RP: Hyaluronan receptor (CD44) expression and function in human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *J. Leukocyte Biol.* 56, 605-611, 1994.
- Dalchau R, Kirkley J, Fabre JW: Monoclonal antibody to a human brain-granulocyte T-lymphocyte antigen probably homologous to the W 3/13 antigen of the rat. *Eur. J. Immunol.* 10, 745-749, 1980.
- Dall P, Heider KH, Hekele A, von Minckwitz G, Kaufmann M, Ponta H, Herrlich P: Surface protein expression and messenger RNA-splicing analysis of CD44 in uterine cervical cancer and normal cervical epithelium. *Cancer Res.* 54, 3337-3341, 1994.
- Dall P, Heider KH, Sinn HP, Skroch-Angel P, Adolf G, Kaufmann M, Herrlich P, Ponta H: comparison of immunohistochemistry and RT-PCR for detection of CD44v-expression, a new prognostic factor in human breast cancer. *Int. J. Cancer* 60, 471-477, 1995.
- Dall P, Hekele A, Beckmann MW, Bender HG, Herrlich P, Ponta H: Efficient lysis of CD44v7/8-presenting target cells by genetically engineered cytotoxic T lymphocytes. A model for immunogene therapy of cervical cancer. *Gyn. Oncol.* 66, 209-216, 1997.
- Dallenbach-Hellwig G: Endometrium. *Pathologische Histologie in Diagnostik und Forschung.* Springer Verlag – Berlin - Heidelberg – New York 78,166-180, 1985.
- Darcy PK, Kershaw MH, Trapani JA, Smyth MJ: Expression in cytotoxic T lymphocytes of a single-chain anti-carcinoembryonic antigen antibody. Redirected Fas ligand-mediated lysis of colon carcinoma. *Eur. J. Immunol.*, 28 (5) 1663-1673, 1998.
- Deckert M, Tartare-Decker S, Couture C, Mustelin T, Altman A: Functional and physical interactions of sky family kinases with the Vav proto-oncogene product. *Immunity* 5, 591-694, 1996.
- Deckert M, Elly C, Altman A, Lui YC: Coordinated regulation of the tyrosine phosphorylation of Cbl by Fyn and Syk tyrosin kinases. *J. Biol. Chem.* 273, 8867-8874, 1998.
- Denhardt DT, Greenberg AH, Egan SE, Haminton RT, Wright JA: Cysteine proteinase cathepsin L expression correlates closely with the metastatic potential of H-ras-transformed murine fibroblasts. *Oncogene* 2, 55-59, 1987.
- De Plaen E, Arden K, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora JP, De Smet C, Brasseur F van der Bruggen P, Lethe B, Lurquin C et al.: Structure, chromosomal localization and expression of twelve genes on the MAGE family. *Immunogenetics* 40, 360-369, 1994.
- Di Ianni M, Di Florio S, Venditti G, Falzetti F, Mannoni P, Martelli MF, Tabilio A: T lymphocyte transduction with herpes simplex virus-thymidine kinase (HSV-tk) gene: comparison of four different infection protocols. *J. Hematother Stem. Cell Res.* 8(6), 645-652, 1999.
- Dougherty GJ, Landrop PM, Cooper DL, Humphries RK: Molecular cloning of CD4R1 and CD44R2, two novel isoforms of the human CD44 lymphocyte "homing" receptor expressed by hemopoietic cells. *J. Exp. Med.* 174, (1) 1-5, 1991.
- Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose V, Jackson V, Hamada H, Pradoll D, Mulligan RC: Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulation factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 3539-3543, 1993.
- Ebnet K, Hausmann M, Lehmann-Grube F, Mullbacher A, Kopf M, Lamers M, Simon MM: Granzyme A-deficient mice retain potent cell-mediated cytotoxicity. *EMBO J.* 14(17), 4230-4239, 1995.
- Engelhard VH: Die Antigen-Prozessierung. *Spektrum der Wissenschaft Okt.*, 48-56, 1994.
- Enomoto T, Inoue M, Perantoni AO, Buzard GS, Miki H, Tanizawa O, Rice JM: K-ras activation in premalignant and malignant epithelial lesions of the human uterus. *Cancer Res.* 51: 5308-5314, 1991.
- Eshhar Z, Waks T, Gross G, Schindler DG: Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chain consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 (2), 720-724, 1993.
- Eshhar Z: Tumor-specific T-bodies: towards clinical application. *Cancer Immunol. Immunother.* 45, 131-136, 1997.
- Fidler I: Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eight G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res.* 50, 6130-6138, 1990.
- Fieber C, Plug R, Sleeman J, Dall P, Ponta H, Hofmann M: Characterisation of the murine gene encoding the intracellular hyaluronan receptor IHABP (RHAMM). *Gene* 226, 41-50, 1999.

- Filmus J, Zhao J, Buick RN: Overexpression of H-ras oncogene induces resistance to the growth-inhibitory action of transforming growth factor beta-1 (TGF-beta 1) and alters the number and type of TGF-beta 1 receptors in rat intestinal epithelial cell clones. *Oncogene* 7, 521-526, 1992.
- Filmus J, Shi W, Spencer T: Role of transforming growth factor alpha (TGF-alpha) in the transformation of ras-transfected rat intestinal epithelial cells. *Oncogene* 8, 1017-1022, 1993.
- Filmus J, Robles AI, Shi W, Wong MJ, Colombo LL, Conti CJ: Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras. *Oncogene* 9, 3627-3633, 1994.
- Flanagan BF, Dalchau R, Allen AK, Daar AS, Fabre JW: Chemical composition and tissue distribution of the human Cd44v glycoprotein. *Immunology* 67, 167-175, 1989. *Immunology* 67, 167-175, 1989.
- Foekens JA, Dall P, Klijn JGM, Skroch-Angel P, Classen CJC, Look MP, Ponta H van Putten WLJ, Herrlich P, Henzen-Logmans S: Prognostic value of CD44 variant expression in primary breast cancer. *Int. J. Cancer* 84, 209-215, 1999.
- Friedrichs K, Franke F, Lisboa BW, Kügler G, Gille I, Terpe HJ, Hölzel F, Maass H, Günthert U: CD44 isoforms correlated with cellular differentiation but not with prognosis in human breast cancer. *Cancer Res.* 55, 5424-5433, 1995.
- Froelich CJ, Orth K, Turbov J, Seth P, Gottlieb R, Babior B, Shah GM, Bleackley RC, Dixit VM, Hanna W: New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271(46), 29073-9, 1996.
- Froelich CJ, Dixit VM, Yang X: Lymphocyte granule-mediated apoptosis: matters of viral mimicry and deadly proteases. *Immunol. Today* 19 (1), 30-36, 1998.
- Fujita N, Yaegashi N, Ide Y, Sato S, Nakamura M, Ishiwata I, Yajima A: Expression of CD44 in normal human versus tumor endometrial tissues: possible implication of reduced expression of CD44 in lymph-vascular space-involvement of cancer cells. *Cancer Res.* 54, 3922-3928, 1994.
- Fujita N, Sato S: Expression of CD44 in endometrial cancer and metastasis. *Nippon Rinsho* 53, 1716-1729, 1995.
- Furlong MT, Mahrenholz AM, Kim KH, Ashendel CL, Harrison ML, Geahlen RL: Identification of the major site of autophosphorylation of the murine protein-tyrosin kinase Syk. *Biochem. Biophys. Acta* 1355, 177-190, 1997.
- Futterer K, Wong J, Grucza RA, Chan AC, Waksman G: Structural basis for Syk tyrosin kinase ubiquity in signal transduction pathways revealed by the crystal structure of its regulatory SH2 domains bound to a dually phosphorylated ITAM peptide. *J. Mol. Biol.* 281, 523-537, 1998.
- Galandrini R, Albi N, Tripodi G, Zarcone D, Terenzi A, Moretta A, Grossi CE, Velardi A: Antibodies to CD44 trigger effector functions of human T cell clones. *J. Immunol.* 150, 4225-4235, 1993.
- Galandrini R, Galluzzo E, Albi N, Grossi CE, Velardi A: Hyaluronate is costimulatory for human T-cell effector functions and binds CD44 on activated T cells. *J. Immunol.* 153, 21-31, 1994a.
- Galandrini R, De Maria R, Piccoli M, Frati L, Santoni A: CD44 triggering enhances human NK cell cytotoxic functions. *J. Immunol.* 153, 4399-4407, 1994b.
- Galluzzo E, Albi N, Fiorucci S, Merigiola C, Ruggeri L, Tosti A, Grossi CE, Velardi A: Involvement of CD44 variant isoforms in hyaluronate adhesion by human activated T cells. *Eur. J. Immunol.* 25, 2932-2939, 1995.
- Garbisa S, Pozzatti R, Muschel RJ, Saffiotti U, Ballin M, Goldfarb RH, Khoury G, Liotta LA: malignant processes. *Cancer Res.* 47, 1523-1528, 1987.
- Garcia KC, Scott CA, Brunmark A, Carbone FR, Peterson PA, Wilson IA, Teyton L: CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes. *Nature*, 384, 577-81, 1996.
- Germain R: MHC-dependent receptor processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76, 287-299, 1994.
- Goldenberg MM: Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer. *Clinical therapeutics* 21, 2, 309-318, 1999.
- Goldstein LA, Zhou DFH, Picker LJ, Minty CN, Bargatze RF, Ding JF, Butcher EC: A human lymphocyte homing receptor, the Hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. *Cell* 56, 1063-1072, 1989.

- Gotley DC, Fawcett J, Walsh MD, Reeder JA, Simmons DL, Antalis TM: Alternatively spliced variants of the cell adhesion molecule CD44 and tumour progression in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 74 (3), 342-51, 1996.
- Grady D, Gebretsadik T, Kerlikowske K, Ernster V, Petiti D: Hormone replacement therapy and endometrium cancer risk: a meta-analysis. *Obstet. Gynecol* 85, 305-313, 1995.
- Greig RG, Koestler TP, Trainer DL, Corwin SP, Miles L, Kline T, Sweet R, Yokoyama S, Poste G: Tumorigenic and metastatic properties of "normal" and ras-transfected NIH3/T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 3698-3701, 1991.
- Grillo-Lopez AJ, White CA, Varns C, Shen D, Wei A, McClure A, Dallaire BK: Overview of the clinical development of rituximab: first monoclonal antibody approved for treatment of lymphoma. *Semin. Oncol.* 26 (5 Suppl. 14), 66-73, 1999.
- Gross G, Waks T und Eshhar Z: Expression of immunoglobulin T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10024-10028, 1989.
- Gruber MF, Webb DS, Gerrard TL: Stimulation of human monocytes via CD45, CD44, and LFA-3 triggers macrophage-colony-stimulating factor production. Synergism with lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J. Immunol.* 148, 113-118, 1992.
- Günthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zöller M, Haubmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P: A new variant of glykoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65, 13-24, 1991.
- Hamlyn PH, Browlee GG, Cheng CC, Gait MJ, Milstein C: Complete sequence of constant and 3' noncoding regions of an immunoglobulin mRNA using the dideoxynucleotide method of RNA sequencing. *Cell* 15, 1067-1075, 1978.
- Hanahan D: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580, 1983.
- Harlan DM, Abe R, Lee KP, June CH: Potential roles of the B7 and CD28 receptor families in autoimmunity and immune evasion. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 75, 99-111, 1995.
- Hatada MH, Lu X, Laird ER, Green J, Moregnstern JP, Lou M, Marr CA, Phillips TB, Ram MK, Theriault K et al: Molecular basis for interaction of the protein tyrosin kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature*, 377, 32-38, 1995.
- Haynes NM, Smyth MJ, Keshaw MH, Trapani JA, Darcy PK: Fas-ligand-mediated lysis of erbB-2-expressing tumour cells by redirected cytotoxic T lymphocytes. *Cancer immunol. Immunother.* 47 (5), 278-286, 1999.
- He Q, Lesley J, Hyman R, Ishihara K, Kincade PW: Molecular isoforms of murine CD44 and evidence that the membrane proximal domain is not critical for hyaluronate recognition. *J. Cell Biol.* 119, 1711-1719, 1992.
- Heider KH, Hofmann M, Hors E, Berg van den F, Ponta H, Herrlich P, Pals STA: A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J. Cell Biol.* 120, 227-233, 1993.
- Hekele A, Dall P, Moritz D, Wels W, Groner B, Herrlich P, Ponta H: Growth retardation of tumors by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes reprogrammed by CD44v6-specific scFv: ζ -chimera. *Int. J. Cancer* 68, 232-238, 1996.
- Herrlich P, Zöller M, Pals S, Ponta H: CD44 splice variants: metastases meet lymphocytes. *Immunol. Today* 14, 395-399, 1993.
- Hersh EM, Taylor CW: Immunotherapy by active immunization: use of nonspecific stimulants and immunomodulators. In: *Cancer Principles and Practice of Oncology* 4th Ed. DeVita VT, Hellman Jr S, and Rosengerg SA eds. Lippincott JB, Philadelphia, pp 613-623, 1991.
- Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russel JH, Ley TJ: Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 76 (6), 977-987, 1994.
- Hock H, Dorsch M, Kunzendorf U, Quin Z, Diamantstein T, Blanckenstein T: Mechanisms of rejection induced by tumor-cell targeted gene transfer of interleukin-2, interleukin-4, interleukin-7, tumor necrosis factor, or interferon- γ . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 2774-2278, 1993.
- Hofmann M, Rudy W, Zöller M, Tölg C, Ponta H, Herrlich P, Günthert U: CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res.* 51, 5292-5297, 1991.
- Hofmann M, Rudy W, Günthert U, Zimmer SG, Zawadzki V, Zöller M, Lichtner RB, Herrlich P, Ponta H: A link between *ras* and metastatic behavior of tumor cells: *ras* induces CD44 promoter activity and leads to low-level expression of metastasis-specific variants of CD44 in CREF cells. *Cancer Res.* 53, 1516-1521, 1993.

- Hombach A, Schneider C, Sent, Koch D, Willemsen RD, Diehl V, Kruis W, Boluis RL, Pohl C, Abken H: An entirely humanized CD3 zeta-Chain signalling receptor that directs peripheral blood t cells to specific lysis of carcinoembryonic antigen-positive tumor cells. *Int. J. Cancer* 88(1), 115-120, 2000.
- Hombach A, Koch D, Sircar R, Heuser C, Diehl V, Kruis W, Pohl C, Abken H: A chimeric receptor that selectively targets membrane-bound carcinoembryonic antigen (mCEA) in the presence of soluble CEA. *Gene Ther.* 6, 300-304, 1999.
- Honjo T, Obata M, Yamawaki-Kataoka Y, Kataoka T, Kawakami T, Takahashi N, Mano Y: Cloning and complete nucleotide sequence of mouse immunoglobulin $\gamma 1$ chain gene. *Cell* 18, 559-568, 1979.
- Honda A, Noguchi N, Takehara H, Ohashi Y, Asuwa N, Mori Y: Cooperative enhancement of hyaluronic acid synthesis by combined use of IGF-I and EGF, and inhibition by tyrosine kinase inhibitor genistein, in cultured mesothelial cells from rabbit pericardial cavity. *J. Cell Sci.* 98, 91-98, 1991.
- Howe LR, Weiss A: Multiple kinases mediate Tcell-receptor signaling. *Trends Biochem. Sci.* 20 (2), 59-64, 1995.
- Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B: Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 2, 52-58, 1996
- Hua Q, Knudson CB, Knudson W: Internalization of hyaluronan by chondrocytes occurs via receptor-mediated endocytosis. *J. Cell Sci.* 106, 365-375, 1993.
- Hung MC, Zhang X, Yen DH, Zhang HZ, He GP, Zhang TQ, Shi DR: Aberrant expression of the c-erbB-2/neu protooncogene in ovarian cancer. *Cancer Let.* 61, 95-103, 1992.
- Hwu P, Shafer GE, Treisman J, Schindler DG, Gross G, Cowherd R, Rosenberg SA Eshar Z: Lysis of ovarian cancer cells by human lymphocytes redirected with a chimeric gene composed of an antibody variable region and the Fc receptor gamma chain. *J. Exp. Med.* 178 (1), 361-366, 1993.
- Hwu P, Yang JC, Cowherd R, Treisman J, Shafer GE, Eshar Z, Rosenberg SA: In vivo antitumor activity of T cells redirected with chimeric antibody/T-cell receptor genes. *Cancer Res.* 55 (15) 3369-3373, 1995.
- Hynes NE: Amplification and over-expression of the erbB-2 gene in human tumors: its involvement in tumor development significance as a prognostic factor, and potential target for cancer therapy. *Semin. Cancer Biol.* 4, 19-26, 1993.
- Iida N, Bourguignon LYW: New splice variants associated with human breast cancer. *J. Cell Physiol.* 162, 127-133, 1995.
- Ioachim HL: The opportunistic tumors of immune deficiency. *Adv Cancer Res.* 54, 301-317, 1990.
- Irving BA, Weiss A: The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* 64 (5), 891-901, 1991.
- Iwasake T, Hayashi Y, Yokoyama M, Hachisuga T, Sugimori H: Interferon gamma treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol. Oncol.* 37(1) 96-102, 1990.
- Iwasake T, Hara K, Hayashi Y, Yokoyama M, Hachisuga T, Fukuda K, Okuma Y, Sugimori H: Antitumor effects of human recombinant interferon-gamma and tumor necrosis factor on five cervical adenocarcinoma cell lines, in vivo and in vitro. *Gynecol. Oncol.* 42(1) 39-43, 1991.
- Jackson DG, Buckely J, Bell JI: Multiple variants of the human lymphocyte homing receptor CD44 generated by insertions at a single site in the extracellular domain. *J. Biol. Chem.* 267, 4732-4739, 1992.
- Jain RK: Barriers to drug delivery in solid tumors. *Sci. Am.* 271, 42-49, 1994.
- Jalkanen S, Bargatze RF, de los Toyos J, Butcher EC: Lymphocyte recognition of high endothelium: antibodies to distinct epitopes of an 85-95-kD glycoprotein antigen differentially inhibit lymphocyte binding to lymph node, mucosal, of synovial endothelial cells. *J. Cell Biol.* 105, 983-990, 1987.
- Jalkanen S, Jalkanen M: CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J. Cell. Biol.* 116, 817-825, 1992.
- Jalkanen S, Joensuu H, Klemi P: Prognostic value of lymphocyte homing receptor and S phase fraction in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 75 (7), 1549-56, 1990.
- Jamal HH, Cano-Gauci DF, Buick RN, Filmus J: Activated ras and src induce CD44 overexpression in rat intestinal epithelial cells. *Oncogene* 9, 417-423, 1994.
- Jensen M, Tan G, Forman S, Wu AM, Raubitschek A: CD20 is a molecular target for scFvFc: zeta receptor redirected T cells: implication for cellular immunotherapy of CD20+ malignancy. *Biol. Blood Marrow Transplant* 4 (2), 75-83, 1998.

- Jiang S, Ojcius DM, Persechini PM, Young JDE: Resistance of lymphocytes to perforin-mediated killing: inhibition of perforin binding activity by surface membrane proteins. *J. Immunol.* 144, 998, 1990.
- Jin YJ, Clayton LK, Howard FD, Koyasu S, Sieh M, Steinbrich R, Tarr GE, Reinherz EL: Molecular cloning of the CD3 η subunit identifies CD3 ζ -related product in thymus-derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3319-3323, 1990.
- Kainz C, Kohlenberger P, Sliutz G, Tempfer C, Heinzl H, Reinthaller A, Breitenecker G, Koelbl H: Prognostic value of CD44 splice variants in human stage III cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 57, 383-387, 1995a.
- Kainz C, Kohlenberger P, Tempfer C, Sliutz G, Gitsch G, Reinthaller A, Breitenecker G: Splice variants of CD44 in human cervical cancer stage IB to IIB. *Eur. J. Cancer* 31A, 1706-1709, 1995b.
- Kalomiris EL, Bourguignon LYW: Mouse T lymphoma cells contain a transmembrane glycoprotein (GP85) that binds ankyrin. *J. Cell Biol.* 106, 319-327, 1988.
- Kalomiris EL, Bourguignon LYW: Lymphoma protein kinase C is associated with the transmembrane glycoprotein, GP85, and may function in GP85-ankyrin binding. *J. Biol. Chem.* 264, 8113-8119, 1989.
- Katoh S, McCarthy JB, Kincade PW: Characterization of soluble CD44 in the circulation of mice. Levels are affected by immune activity and tumor growth. *J. Immunol.* 153, 3440-3062, 1994.
- Kaufman M, Heider KH, Sinn HP, van Minckwitz G, Ponta H, Herrlich P: CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival. *Lancet* 345, 625-629, 1995.
- Kehrl JH, Roberts AB, Wakefield LM, Jakowiew S, Sporn MB, Fauci AS: Transforming growth factor β is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J. Immunol.* 137, 3855, 1986.
- Kaene MM, Ettenberg SA, Lowrey GA, Russell EK, Lipkowitz S: Fas expression and function in normal and malignant breast cell lines. *Cancer Res.* 56, 4791-4798, 1996.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currier AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257, 1972.
- Kincade PW, He Q, Ishihara K, Miyake K, Lesley J, Hyman R: CD44 and other cell interaction molecules contributing to B lymphopoiesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 184, 215-222, 1993.
- Knudson W, Biswas C, Toole BP: Interactions between human tumor cells and fibroblasts stimulate hyaluronate synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 6767-6771, 1984.
- König R, Huang LY, Germain RN: MHC class II Interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature* 356, 799-801, 1992.
- Kogerman P, Sy MS, Culp AL: Over-expression of human CD44s in murine 3t3 cells: selection against during primary tumorigenesis and selection for during micrometastasis. *Clin. Exp. Metastasis* 14, 73-82, 1996.
- Koopmann G, Heider KH, Horst E, Adolf GR, van den Berg F, Ponta H, Herrlich P, Pals ST: Activated human lymphocytes and aggressive Non-Hodgkin lymphomas express a homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44. *J. Exp. Med.* 177, 897-904, 1993.
- Koretz K, Moller P, Lehnert T, Hinz U, Otto HF, Herfarth C: Effect of CD44v6 on survival in colorectal carcinoma. *Lancet* 4, 345 (8945), 327-8, 1995.
- Kumar S, Colussi PA: prodomains-adaptors-oligomerization and the pursuit of caspase activation in apoptosis. *Trans. Biochem. Sci* 24, 1-4, 1999.
- Kume T, Oshima K, Yamashita Y, Shirakusa T, Kikuchi M: Relationship between Fas-ligand expression on carcinoma cell and cytotoxic T-lymphocyte response in lymphoepitheloma-like cancer of the stomach. *Int. J. Cancer*, 84 (4), 339-343, 1999.
- Lacy BE, Underhill CB: The hyaluronate receptor is associated with actin filaments. *J. Cell Biol.* 105, 1395-1404, 1987.
- Lazaar AL, Albeda SM, Pilewski JM, Brennan B, Pure E, Panetteri RA: T-Lymphocytes adhere to airway of smooth muscles cells via integrins and CD44 and induce smooth muscle cell DNA synthesis. *J. Exp. Med* 180, 807-816, 1994.
- Laurent TC, Fraser JRE: Hyaluronan. *FASEB J.* 6, 2397-2404, 1992.
- Law CL, Chandran KA, Sidorenko SP, Clark EA: Phospholipase $C\gamma 1$ interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk. *Mol. Cell Biol.* 16, 1305-1315, 1996.
- Lee G, Ellingsworth LR, Gillis S, Wall R, Kincade PW: β transforming growth factor is a potential regulator of B lymphopoiesis. *J. Exp. Med.* 166, 1290-1299, 1987.

- Lee SB, Rhee SG: Significance of PIP2 hydrolysis and regulation of phospholipase C isozymes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7 (2), 183-189, 1995.
- Lesley J, Kincade PW, Hyman R: Antibody-induced activation of the hyaluronan receptor function of CD44 requires multivalent binding by antibody. *Eur. J. Immunol.* 23 (8), 1902-9, 1993.
- Letourneur F, Klausner RD: T-cell and basophil activation through the cytoplasmic tail of T-cell-receptor ζ - family proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8905-8909, 1991.
- Lokeshwar VB, Bourguignon LYW: Post-translational protein modification and expression of ankyrin-binding site(s) in GP85 (Pgp-1/CD44) and its biosynthetic precursors during T-Lymphoma membrane biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 266, 17983-17989, 1991.
- Lokeshwar VB, Bourguignon LYW: The lymphoma transmembrane glycoprotein GP85 (CD44) is a novel guanine nucleotide-binding protein which regulates GP85 (CD44)-ankyrin interaction. *J. Biol. Chem.* 267, 22073-22078, 1992.
- Lokeshwar VB, Fregien N, Bourguignon LYW: Ankyrin-binding domain of CD44 (GP85) is required for the expression of h hyaluronic acid-mediated adhesion function. *J. Cell Biol.* 126, 1099-1109, 1994.
- Lowrey DM, Aebischer T, Olsen K, Lichtenheld M, Rupp F, Hengartner H, Podack ER: Cloning, analysis, and expression of murine perforin 1 cDNA, a component of cytolytic T-cell granules with homology to complement component C9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 247, 1989.
- Liu CC, Steffen M, King F, Young JDE: Identification, isolation, and characterization of a novel cytotoxin in murine cytolytic lymphocytes. *Cell* 51, 393-403, 1987.
- Mackay CR, Terpe HJ, Stauder R, Marston WL, Stark H, Günthert U: Expression and modulation of CD44 variant isoforms in human. *J. Cell Biol.* 124, 71-82, 1994.
- Marchand M, Weynants P, Rankin E, Arienti F, Belli F, Parmiani G, Cascinelli N, Boulond A, Vanwijck R, Humblet Y, et al.: Tumor regression response in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3. *Int. J. Cancer*, 63, 883-885, 1995.
- Marcucci F, Waller M, Kirchner H, Kramer P: Production of immune interferone by murine T-cell clones from long-term cultures. *Nature* 291, 79-81, 1981.
- Marshall CJ: How does p21^{ras} transform cells? *Trends Genet.* 7, 91-95, 1991.
- Mason RM, Crossman MV, Sweeney C: Hyaluronan and hyaluronan-binding proteins in cartilaginous tissues. *Ciba Found. Symp.* 143, 107-120, 1989.
- Matsumura Y, Tarin D: Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet* 340, 1053-1058, 1992.
- McAdam A, Schweitzer AN, Sharpe AH: The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Immunol. Rev.* 165, 231-247, 1998.
- McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, Levy R, Czuczman M, Williams ME, Heyman MR, Bence-Bruckler I, White CA, Cabanillas F, Jain V, Ho AD, Lister J, Wey K, Shen D, Dallaire BK: Rituximab chimeric Anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four –does treatment program. *J. Clinical Oncology* 16, 2825-2833, 1998.
- Meazza R, Marciano S, Sforzini S, Orenco AM, Coppoleccia M, Musiani R, Ardizzoni A, Santi L, Azzarone B, Ferrini S: Analysis of IL-2 Receptor expression and of the biological effects of IL-2 gene transfection in small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer* 74, 788-795, 1996.
- Miller AD, Buttimore C: Redesign of retrovirus vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques* 9, 980-990, 1986.
- Miyake K, Median KL, Hayashi SI, Ono T, Kincade PW: Monoclonal antibodies to pgp-1/CD44 block lympho-hemopoiesis in long-term bone marrow cultures. *J. Exp. Med.* 172, 69-75, 1990.
- Morgenstern JP, Land H: Advanced mammalian gene transfer: high retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acid Res.* 18, 3587-3596, 1990.
- Moritz D, Wels W, Mattern J, Groner B: Cytotoxic T lymphocytes with a grafted recognition specificity for ERBB2-expressing tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4318-4322, 1994.
- Moritz D, Groner B: A spacer region between the single chain antibody-and the CD3 ζ -chain domain of chimeric T cell receptor components is required for efficient ligand binding and signalling activity. *Gene therapy* 2, 539-46, 1995.
- Mosmann TR, Sad S: The expanding universe of Tcell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* 17, 138-146, 1996.
- Mulder JW, Krut PM, Sewnath M, Oosting J, Seldenrijk CA, Weidema WF, Offerhaus GJ, Pals ST: Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6-containing CD44 proteins. *Lancet* 344 (8935), 1470-2, 1994.

- Mule JJ, Shu SL, Schwarz SL, Rosenberg SA: Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin-2 *Science* 225, 1487, 1984.
- Murphy GP, Tjoa BA, Lodge PA, Salgaller ML, Boynon AL: Administration of autologous dendritic cells pulsed with prostate-specific membrane antigen to patient with prostate cancer. *J. Leukoc. Biol.* 1998 Suppl. 2, 14, 1998.
- Muzio M Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer Ph, Peter ME, Dixit VM: FLICE , a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death -inducing signal complex. *Cell* 85 (6), 817-827, 1996.
- Nakajima H, Henkart PA: Cytotoxic lymphocyte granzymes trigger a target cell internal distintegration pathway leading to cytolysis and DNA breakdown. *J. Immunol.* 152, 1057, 1994.
- Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom : CD44 : Structure, function and association with the malignant process. *Adv. Cancer Res.* 71, 241-319, 1997.
- Nestle FO, Aljagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D: Vaccination of melanoma patients with peptide-or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 4, 328-32, 1998.
- Neumeister EN, Zhu Y, Richard S, Terhorst C, Chan AC, Shaw AS: Binding of ZAP-70 to phosphorylated TCell receptor ζ and η enhances is autophosphorylation and generates specific binding sites for SH2 domain-containing proteins. *Mol. Cell Biol.* 15, 3171-3178, 1995.
- Orloff DG, Ra C, Frank SJ, Klausner RD, Kinet JP: Family of disulfid-linked dimers containing the ζ and η chain of the T-cell receptor and the γ chain of Fc receptors. *Nature* 347, 189-191, 1990.
- Orzechowski HD, Beckenbach C, Herbst H, Stolzel U, Riecken EO, Stallmach A: Expression of CD44v6 is associated with cellular dysplasia in colorectal epithelial cells. *Eur. J. Cancer* 31 (12), 2073-9, 1995.
- Owen-Schaub LB: Soluble Fas/APO-1 in tumor cells: a potential regulator of apoptosis? *Cancer Lett.* 94, 1-8, 1995.
- Pals ST, Hogervorst F, Keizer GD, Thepen T, Horst E, Figdor CC: Identification of a widely distributed 90-kDa glycoprotein that is homologous to the Hermes-1 human lymphocyte homing receptor. *J. Immunol.* 143, 851-857, 1989.
- Pals ST, Horst E, Ossekoppele GJ, Figdor CC, Scheper RJ, Meijer CJ: Expression of lymphocyte homing receptor as a mechanism of dissemination in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 73, 885-888, 1989.
- Patel SD, Moskalenko M, Smith D, Maske B, Finer MH, McArthur JG: Impact of chimeric immune receptor extracellular protein domains on T cell function. *Gene Ther.* 6, 412-419, 1999.
- Parkinson DR, Abrams JS, Wiernik PH, Rayner AA, Margolin KA, Van Echo DA, Zlot M, Dutcher JP, Aroman FR, Doroshow JH: Interleukin-2 therapy in patients with metastatic malignant melanoma a Phase II study. *J. Clin. Oncol.* 8, 1650, 1990.
- Peach RJ, Hollenbaugh D, Stamenkovic I, Aruffo A: Identification of hyaluronic acid binding sites in the extracellular domain of CD44. *J. Cell Biol.* 122, 257-264, 1993
- Peter und Pichler.: *Klinische Immunologie*, 1 Aufl. München, 1996.
- Phillips A, Chalbos D, Rochefort H: Estradiol increases and anti-estrogens antagonize the growth factor induced activator protein-1 activity in MCF7 breast cancer cell without affecting c-fos and c-jun synthesis. *J. Biol. Chem.* 268 (19), 14103-8, 1993.
- Pollok KE, Hanenberg H, Noblitt TW, Schroeder WL, Kato I, Emanuel D, Williams DA : High-efficiency gene transfer into normal and adenosine deaminase-deficient T lymphocytes is mediated by transduction on recombinant fibronectin fragments. *J. Virol.* 72(6), 4882-4892, 1998.
- Rabe T, Vladescu E, Heinemann L, von Holst T: Endometriumkarzinom. *Onkologe* 5, 432-443, 1999.
- Reed KC, Mann DA: Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucleic Acids Res.* 13 (20), 7207-7221, 1985.
- Reth M: Antigen receptor tail clue. *Nature* 338, 383-384, 1989.
- Restifo NP, Esquivel F, Asher AI, Stotter H, Barth RJ, Bennink JR, Mulé JJ, Yewdell JW, Rosenberg SA: Defective presentation of endogenous antigens by murine sarcoma: implication for the failure of an anti-tumor immune response. *J. Immunol.* 147, 143-1459, 1991.
- Restifo NP, Kawakami Y, Marincola F, Shamamian P, Taggarse A, Esquivel F, Rosenberg SA: Molecular mechanisms used by tumors to escape immune recognition: immunogenethrapy

- and the cell biology of major histocompatibility complex class I. *J. Immunother.* 14, 182-189, 1993.
- Reuning U, Magdolen V, Wilhelm O, Fischer K, Lutz V, Graeff H, Schmitt M: Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (Review). *Int. J. Oncol.* 13, 893-906, 1998.
- Ridley AJ, Davis JB, Stroobant P, Land H: Transforming-growth factors- β 1 and β 2 are mitogens for rat Schwann cells. *J. Cell Biol.* 109, 3419-3424, 1989.
- Riethmüller G, Holz E, Schlimok G, Schmiegel W, Rabb R, Hoffken K, Gruber R, Funke I, Pichlmaier H, Hirche H, Buggosch P, Witte J, Pichmayr R: Monoclonal antibody therapy for Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomised trial. *J. Clin. Oncol.* 16 (5), 1788-94, 1998.
- Ristamäki R, Joensuu H, Söderström KO, Jalkanen S: CD44v6 expression in non-Hodgkin's lymphoma: an association with low histological grade and poor prognosis. *J. Pathol.* 176, 259-267, 1995.
- Römisch K: Peptide traffic across the ER membrane: TAP and other conduits. *Trends Cell Biol.* 4, 311-314, 1994.
- Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, Linehan WM, Robertson CN, Lee RE, Rubin JT et al.: A process report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer and interleukin-2 or high doses interleukin-2 alone. *N. Engl. J. Med.* 316, 89-897, 1987.
- Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang A, Ettinghausen SE, Matory YL, Skibber JM, Shiloni E, Vetto JT et al.: Observation on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 316, 89-897, 1985.
- Rosenberg SA, Spiess PJ, Lafreniere R: A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 233, 1318-1321, 1986.
- Rowley RB, Burkhardt AL, Chao HG, Matsueda GR, Bolen JB: Syk protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig α /Ig β immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* 270, 11590-11594, 1995.
- Rudy W, Hofmann M, Schwartz-Albiez R, Zöller M, Heider KH, Ponta H, Herrlich P: The two major CD44 proteins expressed on a metastatic rat tumor cell line are derived from different splice variants: each one individually suffices to confer metastatic behavior. *Cancer Res.* 53, 1262-1268, 1993.
- Runnebaum IB, Wang S, Kreienberg R: Retrovirally mediated wild-type p53 restores S phase modulation without inducing WAF1 mRNA in breast carcinoma cells containing mutant p53. *J. Cell Biochem.* 59, 538-544, 1995.
- Saegusa M, Hashimura M, Okayasu I: CD44 expression in normal, hyperplastic, and malignant endometrium. *J. Pathol.* 184, 297-306, 1998.
- Salter RD, Benjamin RJ, Wesley PK, Buxton S, Garrett TPJ, Clayberger C, Krensky AM, Norment AM, Littman DR, Parham P: A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the α 3 domain of HLA-A2. *Nature* 345, 41-46, 1990.
- Screaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI: Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 12160-12164, 1992.
- Screaton GR, Bell MV, Bell JI, Jackson DG: The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor. *J. Biol. Chem.* 268, 12235-12238, 1993.
- Scolding NJ, Jones J, Compston AS, Morgan BP: Oligodendrocytes susceptibility to injury by T-cell perforin. *Immunology* 70, 6, 1990.
- Schneider P, Tschopp J: Apoptosis induced by death receptors. *Pharm. Acta Helv.* 74, 281-286, 2000.
- Seiter S, Arch R, Reber S, Komitowski D, Hofmann H, Ponta H, Herrlich P, Matzku S, Zöllner M: Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J. Exp. Med.* 177, 443-445, 1993.
- Shermann L, Alloul N, Golan I, Durst M, Baram A: Expression and splicing patterns of human papillomavirus type-16 mRNAs in pre-cancerous lesions and carcinoma of cervix, in human keratinocytes immortalized by HPV 16, and in cell lines established from cervical cancers. *Int. J. Cancer* 50 (3), 356-64, 1992.
- Sherman L, Sleeman J, Herrlich P, Ponta H: the CD44 Proteins in embryonic development and in cancer. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 213, 249-269, 1994.

- Sherman L, Sleeman J, Dall P, Hekele A, Moll J, Ponta H, Herrlich P: The CD44 Proteins in embryonic development and in cancer. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 213, 249-269, 1996.
- Shi L, Kam CM, Powers JC, Aebersold R, Greenberg AH: Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions. *J. Exp. Med.* 176, 1521-1529, 1996.
- Shiue L, Zoller MJ, Brugge JS: Syk is activated by phosphotyrosine-containing peptides representing the tyrosine-based activation motif of the high affinity receptor for IgE. *J. Biol. Chem.* 279, 10498-10502, 1995.
- Shiver JW, Henkart PA: A noncytotoxic mast cell tumor line exhibits potent IgE-dependent cytotoxicity after transfection with the cytolysin/perforin gene. *Cell* 64, 1175, 1991.
- Shiver JW, Su L, Henkart PA: Cytotoxicity with target DNA breakdown by rat basophilic leukaemia cells expressing both cytolysin and granzym A. *Cell* 71, 315, 1992.
- Sinn HP, Heider KH, Skroch-Angle P, von Minckwitz G, Kaufmann M, Herrlich P, Ponta H: Human mammary carcinomas express homologues of rat metastasis-associated variants of CD44. *Breast Cancer Res. Treat.* 36, 307-313, 1995.
- Solary E, Micheau O, Dimanche-Boitrel MT, Martin F: The Fas/Fas-ligand system: implications in the antitumor immune response and in the activity of cytotoxic agents. *Bull. Cancer* 85 (8), 685-94, 1998.
- Spinner DM, Brandstetter T, Kiechle-Schwarz M, Du-Bois A, Angel P, Bauknecht T: C-jun expression and growth stimulation in human ovarian carcinoma cell lines following exposure to cytokines. *Int J Cancer* 63 : 423-427, 1998.
- Sretanvan DW, Feng L, Pure E, Reichardt LF: Embryonic neurons of the developing optic chiasm express L1 and CD44 cell surface molecules with opposing effects on retinal axon growth. *Neuron* 12, 957-975, 1994.
- Stamenkovic I, Amiot M, Pesando JM, Seed B: A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell* 56, 10057-1062, 1989.
- Stamenkovic I, Aruffo A, Amiot M, Seed B: The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *EMBO J.* 10, 3483-348, 1991.
- Stamenkovic I, Amiot M, Pesando JM, Seed B: Lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell* 56, 1057-1062, 1989.
- Stauder R, Eisterer W, Thaler J, Günthert U: CD44 variant isoforms in non-Hodgkin's lymphoma : a new independent prognostic factor. *Blood* 85, 2885-2899, 1995.**
- Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Muller M, Otto G, Strand D, Mariani SM, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR: Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand expressing tumor cells –a mechanism of immune evasion? *Nat. Med.* 2, 1361-1367, 1996.**
- Sy M-S, Guo Y-J, Stamenkovic I: Distinct effects of two CD44 isoforms on tumor growth in vivo. *J. Exp. Med.* 174, 859-866, 1991.
- Suh SI, Baek WK, Park JW, Bae OS, Suh MH, Choe BK: Identification of CD44 splice variant in Korean colorectal cancers and cell lines. *J. Korean. Med. Sci.* 10 (3), 169-75, 1995.
- Tanaka K, Yoshioka T, Bieberich C, Jay G: Role of the major histocompatibility complex class I antigens in tumor growth and metastasis. *Annu. Rev. Immunol.* 6, 359-380, 1988.
- Tanaka Y, Adams DH, Hubscher S, Hirano H, Siebenlist U, Shaw S: T-cells adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 β . *Nature* 361, 79-82, 1993.
- Teder P, Bergh J, Heldin P: Functional hyaluronan receptor are expressed on a squamous cell lung carcinoma cell line but not on other lung carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 55, 3908-3914, 1995.
- Tempfer C, Losch A, Heinzl H, Hausler G, Hanzal E, Kolbl H, Breitenecker G, Kainz C: Prognostic value of immunohistochemically detected CD44 isoforms CD44v5, CD44v6 and CD44v7-8 in human breast cancer. *Eur. J. Cancer* 32A (11), 2023-5, 1996.
- Tempfer C, Hausler G, Kaider A, Hefler L, Hanzal E, Reinthaller A, Breitenecker G, Kainz C: The prognostic value of CD44 isoform expression in endometrial cancer. *Br. J. Cancer* 77, 1137-1139, 1998.
- Terpe HJ, Koopmann R, Imhof BA, Günthert U: Expression of integrins and CD44 isoforms in non-Hodgkin's lymphomas: CD44 variant isoforms are preferentially expressed in high-grade malignant lymphomas. *J. Pathol.* 174 (2), 89-100, 1994.
- Thomas L, Byers HR, Vink J, Stamenkovic I: CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate. *J. Cell Biol.* 118, 971-977, 1992.
- Thompson CB: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462, 1995.
- Thornberry NA, Lazebnik Y: Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316, 1998.

- Tian Q, Streuli M, Saito H, Schlossman SF, Anderson P: A polyadenylate binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. *Cell* 67, 629-639, 1991.
- Toole BP, Biswas C, Gross J: Hyaluronate and invasiveness of the rabbit V2 carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76 (12), 6299-303, 1979.
- Toole BP: Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2 (5), 839-44, 1990.
- Toyama-Sorimachi N, Miyasaka M: A novel ligand for CD44 is sulfated proteoglycan. *Int. Immunol.* 6, 655-660, 1994.
- Tsukita S, Oishi K, Sato N, Sagara J, Kawai A, Tsukita S: ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J. Cell Biol.* 126, 391-401, 1994.
- Turley EA, Tretiak M: Glycosaminoglycan production by murine melanoma variants in vivo and in vitro. *Cancer Res.* 45, 5098-5105, 1985.
- Van den Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes and a human melanoma. *Science* 254, 1643-1647, 1991.
- Vicard E, Hijazi A, Muchade E, Chouvert C, Devonec M, Saez S: Flow cytometry analysis of growth inhibitory effect of a 4-hydroxy-tamoxifen on a human breast carcinoma cell line. *Anticancer Res.* 8, 375-380, 1988.
- Vieweg J, Gilboa E: Considerations for the use of cytokine-secreting tumor cell preparations for cancer treatment. *Cancer Invest.* 13, 193-201, 1995.
- Visco C, Magistrelli G, Bosotti R, Perego R, Rusconi L, Toma S, Zanai M, Acuto O, Isacchi A: Activation of Zap-70 tyrosine kinase due to a structural rearrangement induced by tyrosine phosphorylation and/or ITAM binding. *Biochemistry* 39 (10), 2784-91, 2000.
- Wang Z, Cao Y, Albino AP, Zeff RA, Houghton A, Ferrone S: Lack of HLA class I antigen expression by melanoma cells SK-MEL-33 caused by a reading frameshift in β_2 -microglobulin messenger RNA. *J. Clin. Invest.* 91, 684-692, 1993.
- Wardenburg JB, Fu C, Jackman JK, Flotow H, Wilkinson SE, Williams DH, Johnson R, Kong G, Chan AC, Findell PR: Phosphorylation of SLP-76 by ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function. *J. Biol. Chem.* 271, 19641-19644, 1996.
- Webb DS, Shimizu Y, Van Seventer GA, Shaw S, Gerrard TJ: LFA-3, CD44, and CD45: physiologic triggers of human monocyte TNF and IL-1 release. *Science* 249, 11295-1297, 1996.
- Webb P, Nguyen P, Valentine C, Lopez GN, Kwok GR, McInerney E, Katzenellenbogen BS, Enmark E, Gustafsson JA, Nilsson S, Kushner: The estrogen receptor enhancer AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Mol. Endocrinol.* 13 (19), 1672-85, 1999.
- Weijtens ME, Hart EH, Bolhuis RL: Functional balance between T cell chimeric receptor density and tumor associated antigen density: CTL mediated cytotoxicity and lymphokine production. *Gene Ther.* 7(1), 35-42, 2000.
- Weiss A, Littman DR: Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76, 263-274, 1994.
- Weissman AM, Baniyash M, Hou D, Samelson LE, Burgess WH, Klausner RD: Molecular cloning of the zeta chain of the T cell antigen receptor. *Science* 239, 1018-1021, 1988.
- Weijtens ME, Willemsen RA, Valero D, Stam K, Bolhuis RL: Single chain Ig/gamma gene-redifferentiated human T-lymphocytes produce cytokines specifically lyse tumor cells, and recycle lytic capacity. *J. Immunol.* 157, 836-843, 1996.
- Weijtens ME, Willemsen RA, van Krimpen BA, Bolhuis RL: Chimeric scFv/gamma receptor-mediated T-cell lysis of tumor cells is coregulated by adhesion and accessory molecules. *Int. J. Cancer* 77 (2), 181-187, 1998.
- Wielenga VJ, Heider KH, Offerhaus GJ, Adolf GR, van den Berg FM, Ponta H, Herrlich P, Pals ST: Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res.* 53 (20), 4754-6, 1993.
- Williams DB, Watts TH: Molecular chaperones in antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 77-84, 1995.
- Wirth R, Friesenegger A, Fiedler S: Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Mol. Gen. Genet.* 216, 175-177, 1989.
- Weigel PH, Frost SJ, LeBoeuf RD, McGary CT: The specific interaction between fibrin(ogen) and hyaluronan: possible consequences in haemostasis, inflammation and wound healing. *Ciba Found. Symp.* 143, 248-261, 1989.

- Weissman AM, Baniyash M, Hou D, Samelson LE, Brugess WH, Klausner RD: Molecular cloning of the zeta chain of the T cell antigen receptor. *Science* 239, 1018-1021, 1988.
- West DC, Hampson IN, Arnold F, Kumar S: Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* 228, 1324-1326, 1985.
- Whitesell L, Rosolen A, Neckers LM: In vivo modulation of N-myc expression by continuous perfusion with an antisense oligonucleotide. *Antisense Rev. Dev.* 1, 343-350, 1991.
- Wölfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wölfel C, Klehmann-Hieb E, De Plean E, Hankeln T, Meyer zum Büschenfelde K-H, Beach D: A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269, 11281-1284, 1995.
- Wu J, Zhao Q, Kurosaki T, Weiss A. the Vav binding site (Y315) in ZAP is critical for antigen receptor-mediated signal transduction. *J. Exp. Med.* 185, 1877-1882, 1997.
- Wyllie AH: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556, 1980
- Yaegashi N, Fujita N, Yajima A, Nakamura M: Menstrual cycle dependent expression of CD44 in normal human endometrium. *Hum. Pathol.* 26, 862-865 1995.
- Yang G, Hellström KE, Hellström I, Chen L: Antitumor immunity elicited by tumor cells transfected with B7-2 a second ligand for CD28/CTLA-4 costimulatory molecules. *J. Immunol.* 1554, 2794-2800, 1995.
- Yang Y, Xiang Z, Ertl HC, Wilson JM: Up-regulation of class I major histocompatibility complex antigens by interferon gamma is necessary for T cell-mediated elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7257-7261, 1995.
- Yamaguchi A, Urano T, Goi T, Saito M, Takeuchi K, Hirose K, Nakagawara G, Shiku H, Furukawa K: Expression of a CD44 variant containing exons 8 to 10 is a useful independent factor for the prediction of prognosis in colorectal cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 14 (4), 1122-7, 1996.
- Yorishima T, Nagai N, Ohama K: Expression of CD44 alternative splicing variants in primary and lymph node metastatic lesion of gynecological cancer. *Hiroshima J. Med. Sci.* 46, 21-29, 1997.
- Zhang JF, Hu C, Geng Y, Selm J, Klein SB, Orazi A, Taylor MW: Treatment of a human breast cancer xenograft with an adenovirus vector containing an interferon gene results in rapid regression due to viral oncolysis and gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 4513-4518, 1996.
- Zhang W, Sloan-Lancaster J, Kitchen L, Tribble RP, Samelson LE: LAT: the ZAP-10 tyrosinkinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92, 83-92, 1998.
- Zeytun A, Hassuneh M, Nagarkatti M, Nagarkatti PS: Fas-Fas ligand-based interactions between tumor cells and tumor-specific cytotoxic T-lymphocytes: a lethal two-way street. *Blood*, 90 (5), 1952-1959, 1997.
- Zhao J, Buick RN: Relationship of levels and kinetics of H-ras expression to transformed phenotype and loss of TGF-beta 1-mediated growth regulation in intestinal epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 204 (1), 82-7, 1993.
- Zhou DF,H, Ding JF, Picker LF, Bargatze RF, Buthcher EC, Goeddel DV : Molecular cloning and expression of Pgp-1: the mouse homolog of the human H-CAM (Hermes) lymphocyte homing receptor. *J. Immunol.* 143, 3390-3395, 1989.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A.L.F.	Automatischer-Laser-Fluoreszenz DNA-Analysator
Ak	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American type culture collection
Bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-Phosphat
BSA	Bovines serum albumin (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
C-	Carboxyl-
CD	Cluster of differentiation
CD44E	epiteliale CD44-Isoform (CD44v8-v10)
CD44s	CD44-Standardform
CD44v	variante CD44-Isoformen
cDNA	komplementäre DNA
CED3	C. elegans cell death protein
cfu	colony forming unit
ConA	Concanavalin A
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
dUTP	Desoxyuracil-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
E2	17 β -Östradiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Östrogenrezeptor
FADD	Fas-associated protein with death domain
FACS	fluorescence activated cell scanning (fluoreszenzaktivierter Zellsorter)
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FLICE	FADD-like ICE/MORT-1-associated Ced3 homologue
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
G418	Geneticin
G-CSF	Granulocyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gpt	Xanthin-Guanine-Phosphoribosyltransferase
HA	Hyaluronsäure
HEPES	4,2-Hydroxyethyl-1-Piperazinethansulfonsäure
HPV	humanes Papillomavirus

ICE	Interleukin-1 β –converting enzym
IHC	Imunhistochemie
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Ig	Imunoglobulin
kb	Kilobasenpaare
KDa	Kilo-Dalton (Einheit der Molekülmasse)
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LTR	long terminal repeat
MCS	Multikonierungsstelle
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
MAGE-1	Melanoma Antigen-1
M-CSF	Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
MLH1	Mut L homolog 1
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MoMuLV	muriner Moloney Leukemie Virus
MoMuSV	muriner Moloney Sarkoma Virus
MSH	Mut S homolog
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2 yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
N-	Amino-
NAD(P)H	Nicotinamidadenin(phosphat)-dinucleotid (oxidierte Form)
NAD(P) ⁺	Nicotinamidadenin(phosphat)-dinucleotid (reduzierte Form)
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NeoR	Neomycinresistenzgen
dNTP	2' Desoxyribonukleotid-5' Triphosphat
OD	Optische Dichte
PAI 1/2	plasminogen activator inhibitor-1/2
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PHA	Phytohämagglutinin
PE	Phycoerythrin
RHAMM	Receptor for hyaluronan (HA)-mediated motility
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natrium-Dedecylsulfat
SSC	Standard Saline Citrate
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N',-Tertametylenylendiamin
TIMP 1	tissue inhibitor of metalloproteinase-1
TK	Thymidinkinase-Gen
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X 100	Octylphenyl-polyethylenglycolether
U	units (Einheit der Enzymaktivität)
UPA	Urokinase-type plasminogen activator
Upm	Umdrehungen/min
UV	Ultraviolett
v/v	volume per volume (Volumenanteil)

VEGF	Vascular endothelial growth factor
w/v	weight per volume (Gewichtsanteil)

7. 2 Danksagung

Herrn Prof. Dr. H.G. Bender danke ich für die Möglichkeit im Molekulargenetischen Labor der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf wissenschaftlich arbeiten zu können und Prof. Dr. R. Wagner danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und dafür, dass er die Arbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität vertritt.

Herrn PD. Dr. P. Dall danke ich für die anspruchsvolle und interessante Aufgabenstellung, für seine tatkräftige Unterstützung und seinem starken Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herzlichen Dank an Herrn D. Niederacher für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, seinen Anregungen und konstruktiven Diskussionen.

Insbesondere möchte ich mich bei Dr. R. Sorg aus dem Institut für Transplantation, Diagnostik und Zelltherapeutika für die Messung am Durchflusszytometer und die zahlreichen Anregungen bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau B. Hanzen und Herrn G. Röder nicht nur für die wissenschaftliche Unterstützung, sondern auch für ihre aufmunternden Worte, wenn ich mal wieder total in der Krise steckte.

Bei allen wissenschaftlichen Mitarbeitern des Molekularbiologischen Labors und der onkologischen Chemie besonders bei Frau B. Betz, Frau D. Larbig, M. Gläser, Dr. B. Prisack, Dr. C. Karreman und Dr. O. Keil, möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die zahlreichen Anregungen bedanken.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für ihre finanzielle Unterstützung.

Bei Dir, Michael, möchte ich mich besonders bedanken für Deine Unterstützung, für die Kraft die Du mir gegeben hast, und dass Du alle meine schlechten Launen ausgehalten hast.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir das Studium ermöglicht haben.

7.3. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit von mir selbständig angefertigt wurde und dass ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Der Inhalt dieser Arbeit ist bisher weder veröffentlicht und bei keiner anderen Hochschule zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt.

Wuppertal, 23.10.00