

**Aus dem Institut für Klinische Molekularbiologie  
und Tumorgenetik des Helmholtz-Zentrums München**

**Komm. Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt  
HMGU-München**

***Charakterisierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort bei  
einem Patienten mit chronischer  
Graft-versus-Host-Erkrankung***

**Dissertation**

**zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**Vorgelegt von**

**Karzan Karim**

**aus Kirkuk / Irakische-Kurdistan**

**2012**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Zeidler

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Christina T. Rieger

Prof. Dr. Reinhard Hohlfeld

Mitbetreuung durch den

Promovierten Mitarbeiter: PD. Dr. rer. nat. Josef Mautner

Dekan: Prof. Dr. Dr.h.c.mult. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2012

**Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:**

Milosevic S, Bachnick B, Karim K, Bornkamm GW, Witter K, Gerbitz A, Mautner J, Behrends U. *Transplantation*. (2010) 9:1030-5.

„*Identification of MHC II-restricted minor histocompatibility antigens after HLA-identical stem-cell transplantation*“

**Es gibt nur ein einziges Gut für den Menschen: Die Wissenschaft. Und nur ein einziges Übel: Die Unwissenheit.**

Sokrates

griechischer Philosoph (um 469 v.Chr - 399 v.Chr)

<b>1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Historische Entwicklung .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2. Allogene, hämatopoetische Stammzelltransplantation (aHSZT).....</b>	<b>7</b>
<b>2.3. Die Spender-gegen-Wirt Erkrankung .....</b>	<b>7</b>
2.3.1. Akute GvHD .....	8
2.3.2. Chronische GvHD .....	8
2.3.3. Immunbiologie der GvHD .....	9
2.3.3.1. Phase 1: Schädigung von Empfängergewebe durch die Konditionierung ...	12
2.3.3.2. Phase 2: Spender-T-Zell Aktivierung .....	12
2.2.3.3. Phase 3: Effektorphase .....	15
<b>2.4. Graft-versus-Leukämie-Effekt (GvL) .....</b>	<b>16</b>
<b>2.5. Die Donor-Lymphozyten-Infusion (DLI).....</b>	<b>17</b>
<b>2.6. Nebenhistokompatibilitätsantigene .....</b>	<b>17</b>
<b>3. ZIELE DER ARBEIT .....</b>	<b>25</b>
<b>4. MATERIAL .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1. Geräte und sonstige Materialien .....</b>	<b>26</b>
<b>4.2. Chemikalien und biologische Reagenzien .....</b>	<b>28</b>
<b>4.3. Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen .....</b>	<b>29</b>
4.3.1. Zellkulturmedien.....	29
4.3.2. Allgemeine Puffer und Medien .....	30

<b>4.4. Antibiotika</b> .....	<b>31</b>
<b>4.5. Antikörper</b> .....	<b>32</b>
<b>4.6. Primer</b> .....	<b>32</b>
<b>4.7. Expressionsplasmide</b> .....	<b>33</b>
<b>4.8. Bakterienstämme und Bakteriophagen</b> .....	<b>34</b>
<b>4.9. Enzyme</b> .....	<b>34</b>
<b>4.10. Software</b> .....	<b>35</b>
<b>5. METHODEN</b> .....	<b>36</b>
<b>5.1. Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>36</b>
5.1.1. DNA-Klonierung .....	36
5.1.1.1. Schneiden der DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	37
5.1.1.2. Synthese von glatten Enden nach dem Restriktionsverdau.....	37
5.1.1.3. Phenol-Chloroform-Extraktion .....	38
5.1.1.4. Extraktion der DNA-Fragmente aus einem Agarosegel .....	38
5.1.1.5. Ligation.....	39
5.1.1.6. Agarosegelelektrophorese .....	40
5.1.2. Analyse des T-Zellrezeptor (TZR)-V $\beta$ -Repertoires .....	40
5.1.2.1. RNA-Isolation mit Hilfe des RNeasy-Mini-Kits .....	40
5.1.2.2. cDNA-Synthese.....	41
5.1.2.3. T-Zellrezeptor-Analyse: V $\beta$ Repertoire .....	41
5.1.3. Herstellung elektrokompenter Bakterien .....	43
5.1.3.1. Transformation elektrokompenter Bakterien .....	43

---

<b>5.2. Serologische Identifikation von Antigenen durch rekombinantes Expressionsklonieren (SEREX)</b> .....	<b>44</b>
5.2.1. Allgemeine Beschreibung .....	44
5.2.2. Vorbereitung der Patientenseren .....	45
5.2.2.1. Präabsorption über mechanische und lytische Affinitätssäulen .....	45
5.2.2.2. Präabsorption über lytische Folien.....	46
5.2.3. Bakterienanzucht .....	46
5.2.3.1. <i>E. coli</i> -Bakterien des Stammes XL1-Blue MRF´ .....	46
5.2.3.2. <i>E. coli</i> -Bakterien des Stammes SOLR .....	47
5.2.4. Infektion der XL-1 Bakterien mit $\lambda$ -Phagen .....	47
5.2.5. Kultur der infizierten Bakterien auf Agarplatten .....	48
5.2.6. Titerbestimmung der Phagenlösung .....	48
5.2.7. Blau-Weiß-Test .....	49
5.2.8. Amplifikation der cDNA-Expressions-Bibliothek.....	49
5.2.9. Übertragung der Proteine auf Nitrozellulose-Folien .....	50
5.2.10. Inkubation der Folien mit Patientenserum.....	51
5.2.11. Inkubation der Folien mit Alkalische Phosphatase-markiertem Sekundärantikörper.....	51
5.2.12. Alkalische Phosphatase-Färbung .....	52
5.2.13. Isolation positiver Klone .....	52
5.2.14. Subklonierung durch „ <i>in vivo</i> Exzision“ .....	53
5.2.15. Mini-Präparation von Plasmid-DNA .....	54
5.2.16. Maxi-Präparation von Plasmid-DNA .....	55
5.2.17. Sequenzanalyse.....	56
<b>5.3. Zellkulturmethoden</b> .....	<b>56</b>
5.3.1. Zelllinien.....	56
5.3.2. Allgemeine Zellkulturmethoden.....	57
5.3.2.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	57
5.3.2.2. Kultivierung von Zelllinien .....	58

---

5.3.2.3. Bestimmung der Zellzahl.....	58
5.3.3. Gewinnung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes.....	58
5.3.4. Generierung EBV- und mini-EBV-transformierter, lymphoblastoider B-Zelllinien .....	59
5.3.5. PHA-Blasten.....	59
5.3.6. Generierung mHags-spezifischer T-Zelllinien .....	59
5.3.7. Generierung mHags-spezifischer T-Zellklone.....	60
5.3.8. Magnetische Zellsortierung .....	60
5.3.9. Durchflusszytometrie.....	61
5.3.10. Enzyme-linked Immunosorbent Assay .....	62
<b>5.4. Proteinbiochemische Methoden .....</b>	<b>64</b>
5.4.1. Herstellung von RIPA-Extrakten .....	64
5.4.2. Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine.....	64
5.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	65
5.4.4. Western-Transfer und Immundetektion.....	66
5.4.5. Aufkonzentrierung von Proteinen aus Zell-Überstand .....	67
<b>6. ERGEBNISSE .....</b>	<b>68</b>
<b>6.1. Strategie zur Identifizierung von Transplantations-assoziierten Antigenen .</b>	<b>68</b>
<b>6.2. Die humorale Immunantwort nach aHSZT.....</b>	<b>70</b>
6.2.1. Serologische Identifizierung von mHags.....	70
<b>6.3. Die zelluläre Immunantwort nach aHSZT .....</b>	<b>73</b>
6.3.1. Generierung mHags-spezifischer CD4 <sup>+</sup> T-Zelllinien .....	73
6.3.2. Generierung mHags-spezifischer T-Zellklone.....	75
6.3.3. Veränderung der Antigenerkennungsmuster bei mHags-spezifischen T- Zellklonen.....	77

---

<b>6.4. Charakterisierung von potentiellen Autoantigenen .....</b>	<b>78</b>
6.4.1. Bestimmung der Autoantigenform.....	81
6.4.2. Erkennung von Autoantigenen durch unterschiedliche CD4 <sup>+</sup> T-Zelllinien und Klone .....	83
6.4.3. Proteinaufkonzentrierung durch Ammoniumsulfatfällung.....	84
6.4.4. Zelltyp-spezifische Expression von Autoantigenen.....	86
6.4.5. Bestimmung der HLA-Restriktion der T-Zellen .....	89
6.4.6. Generierung von Autoantigen-spezifischen CD4 <sup>+</sup> T-Zellklonen.....	90
6.4.8. Untersuchung einer möglichen Erkennung von SNX1 durch die autoreaktiven T-Zellen .....	91
6.4.9. Charakterisierung des Autoantigenes .....	92
<b>7. DISKUSSION .....</b>	<b>94</b>
7.1. Identifizierung von Transplantations-assoziierten Antigenen im Kontext chronischer GvHD .....	94
7.2. Charakterisierung der Transplantations-assoziierten CD4 <sup>+</sup> T-Zellantwort .....	97
7.3. Die mögliche Rolle von Autoantigenen in der GvHD-Pathogenese .....	102
<b>8. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>104</b>
<b>10. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>106</b>
<b>ANHANG:.....</b>	<b>124</b>
Expressionsplasmide .....	124
<b>DANKSAGUNGEN.....</b>	<b>127</b>
<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>



## 1. Abkürzungsverzeichnis

<b>aGvHD</b>	Akute Spender-gegen-Wirt Erkrankung ( <i>acute graft-versus-host disease</i> )
<b>AK</b>	Antikörper
<b>Amp</b>	Ampicillin-Resistenz
<b>AP</b>	Alkalische Phosphatase
<b>APZ</b>	Antigenpräsentierende Zelle
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BL</b>	Burkitt-Lymphom (Zellen)
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>BZR</b>	B-Zellrezeptor
<b>bzw.</b>	Beziehungsweise
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>cGvHD</b>	Chronische Spender-gegen-Wirt Erkrankung ( <i>chronic graft-versus-host disease</i> )
<b>cDNA</b>	Komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
<b>CIP</b>	<i>Calf intestine phosphatase</i>
<b>CMV</b>	Cytomegalievirus
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Doppelt destilliertes Wasser
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>DLI</b>	Donor-Lymphozyten-Infusion ( <i>donor lymphocyte infusion</i> )
<b>dNTP</b>	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EBV</b>	Epstein-Barr Virus
<b>E. coli</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence activated cell scanning</i>

---

<b>FCS</b>	Fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
<b>FITC</b>	Fluorescein-Isothiocyanat
<b>GM-CSF</b>	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
<b>GvL</b>	Graft-versus-Leukämie Effekt ( <i>graft-versus-tumor</i> )
<b>HPLC</b>	<i>high performance liquid chromatography</i>
<b>HLA</b>	Humane Leukozytenantigene
<b>HRP</b>	Meerrettich Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferon- $\gamma$
<b>IgG</b>	Immunglobulin der Klasse G
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalacto-Pyranosid
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>LB-Medium</b>	Luria-Bertani-Medium
<b>LCL</b>	Lymphoblastoide Zelllinie ( <i>lymphoblastoid cell line</i> )
<b>MACS</b>	<i>Magnetic cell separation</i>
<b>MCS</b>	Multiple Klonierungsstelle ( <i>multiple cloning site</i> )
<b>MHC</b>	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
<b>mHags</b>	Nebenhistokompatibilitätsantigene
<b>ml</b>	Milliliter
<b><math>\mu</math>g</b>	Mikrogramm
<b><math>\mu</math>l</b>	Mikroliter
<b><math>\mu</math>M</b>	Mikromol/mikromolar
<b>mRNA</b>	Boten ( <i>messenger</i> ) RNA
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>pDNA</b>	Plasmid-DNA
<b>pAPZ</b>	Professionelle Antigenpräsentierende Zelle
<b>PBL</b>	Periphere Blutleukozyten
<b>PBMC</b>	Periphere mononukleäre Blutzellen ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion

<b>PI</b>	Propidiumjodid
<b>PEI</b>	Polyethylenimin
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute of rotor</i> )
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>SEREX</b>	<i>serological analysis of recombinant cDNA-expression libraries</i>
<b>SNP</b>	<i>single nucleotide polymorphism</i>
<b>SOLR</b>	E. coli Bakterienstamm SOLR
<b>TAA</b>	Tumor-assoziiertes Antigen
<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA Puffer
<b>Taq</b>	Hitzestabile Polymerase von <i>Thermophilus aquaticus</i>
<b>TBE</b>	Tris-Borat-EDTA Puffer
<b>TBS</b>	Tris-gepufferte Saline ( <i>Tris-buffered saline</i> )
<b>Tet</b>	Tetracyclin
<b>TEMED</b>	Tetramethylethylendiamin
<b>T<sub>H</sub></b>	T-Helfer-Lymphozyten
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>Treg</b>	Regulatorische T-Zellen
<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl) aminomethan
<b>TZR</b>	T-Zell-Rezeptor ( <i>T-cell receptor</i> )
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>X-Gal</b>	5-Bromo-4-chloro-3-indlyl-beta-D-galactopyranoside
<b>XL-1</b>	<i>E. coli</i> Bakterienstamm XL-1 Blue MRF'
<b>ZTL</b>	Zytotoxische T-Lymphozyten

## 2. Einleitung

Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen aus Knochenmark (KMT: Knochenmarktransplantation), peripherem Blut (PBSZT: periphere Blutstammzelltransplantation) oder postnatalem Nabelschnurblut, wird zur Behandlung von kongenitalen und erworbenen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, einschließlich Neoplasien und Autoimmunkrankheiten, durchgeführt (Tabbara *et al.*, 2002).

Die transplantierten, hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) können autologen, syngenen, oder allogenen Ursprungs sein.

Bei der autologen Transplantation handelt es sich um ein Verfahren, bei dem den Patienten körpereigene, in der Regel vor einer Hochdosismotherapie entnommene Stammzellen bzw. Knochenmark retransplantiert werden. Unter einer syngenen Transplantation versteht man die Übertragung der Stammzellen zwischen eineiigen Zwillingen. Dagegen werden bei der allogenen Transplantation Stammzellen eines nicht genetisch identischen Spenders übertragen (Chiang & Worthington-White, 2004). Bei der allogenen HSZT (aHSZT) wird zudem zwischen humanem Leukozytenantigen (HLA)-identischer und HLA-nicht-identischer Transplantation unterschieden.

Im Gegensatz zur syngenen und autologen HSZT treten nach allogener Transplantation häufig immunologische Abstoßungsreaktionen auf, die durch Gewebeunverträglichkeiten ausgelöst werden. Da jedoch eineiige Zwillinge selten als Spender zur Verfügung stehen und autologes Knochenmark in der Regel nicht zur Behandlung von Erkrankungen des hämatopoetischen Systems eingesetzt werden kann, stellt die allogene Transplantation nach wie vor oftmals die einzige therapeutische Option für viele Patienten dar (Richard *et al.*, 2002).

Die durch Gewebeunverträglichkeit ausgelösten, immunologischen Abstoßungsreaktionen nach aHSZT können zur Schädigung normalen Gewebes und dadurch zur Entstehung der sogenannten Spender-gegen-Wirt Erkrankung (*graft-versus-host disease*; GvHD) führen, die mit einer hohen Mortalitätsrate behaftet ist (Ball & Egeler, 2008). Diese beruht auf der Reaktion von T-Zellen des Spenders gegen

Gewebemerkmale des Empfängers, die als „fremd“ erkannt werden (Penas & Zaman, 2010). Als wichtigste Auslöser dieser T-Zell-vermittelten Immunreaktion gelten HLA-Moleküle, in denen sich Spender und Empfänger unterscheiden (Sangiolo *et al.*, 2010). Deshalb ist die GvHD-Inzidenz und -Schwere nach nicht-HLA-identischer aHSZT am höchsten. Aber auch nach HLA-identischer aHSZT kommt es häufig zur Entwicklung einer GvHD (Storb & Champlin, 1991). Die wichtigsten immunologischen Zielstrukturen sind hierbei die Nebenhistokompatibilitätsantigene (*minor histocompatibility antigens*, mHags) (Goulmy *et al.*, 1977). Dabei handelt es sich um Peptide polymorpher, nicht im HLA-Locus codierter Proteine, in denen sich Spender und Empfänger unterscheiden und die auf HLA-Molekülen präsentiert und von Spender-T-Zellen erkannt werden (Goulmy, 1996). Die T-Zell-vermittelten, immunologischen Abstoßungsreaktionen nach aHSZT können auch zu einer Eliminierung residueller Tumorzellen beitragen, was als *graft-versus-leukemia* (GvL)-Effekt bezeichnet wird (Sullivan *et al.*, 1989). Aus diesem Grund ist die Wahrscheinlichkeit eines Tumorrückfalls nach allogener HSZT niedriger als nach autologer oder syngener Transplantation (Horowitz *et al.*, 1990; Zittoun *et al.*, 1995; Le *et al.*, 2010). GvHD- und GvL-Effekte sind häufig, aber nicht notwendigerweise gekoppelt und vermutlich vom mHags-Expressionsmuster abhängig. Eine ubiquitäre Expression bedingt eine Immunreaktion gegen verschiedene Gewebe und die Entstehung von GvHD, während eine auf das hämatopoetische System beschränkte Expression der mHags zu einer Eliminierung von residuellen Leukämiezellen ohne GvHD führen kann (Riddell *et al.*, 2002; Shlomchik, 2007). Die molekulare Identifizierung von mHags ist aus mehreren Gründen von klinischem Interesse. Durch die gezielte Auswahl von HSZ-Spendern, die sich in wenigen ubiquitär und vielen Hämatopoese-spezifisch exprimierten mHags unterscheiden, könnte das Risiko einer GvHD vermindert und GvL-Effekte verstärkt werden (Larsen *et al.*, 2010; Warren *et al.*, 2010). Darüber hinaus könnten mHags-spezifische T-Zellen zur Behandlung bösartiger Tumorerkrankungen eingesetzt werden (Warren *et al.*, 1998; Turtle & Riddell, 2010). Obwohl GvL-Effekte auch nach Infusion CD8<sup>+</sup> depletierter T-Zellen beschrieben wurden und somit vermutlich CD4<sup>+</sup> T-Zellen entscheidend zu dieser Immunreaktionen

beitragen, konnten bislang nur wenige mHags identifiziert werden, die von CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt werden (Goulmy, 1996; Bioley *et al.*, 2009).

## 2.1. Historische Entwicklung

Die Erforschung der Knochenmarktransplantation begann unter dem Aspekt des Schutzes vor Strahlenschäden nach den Atombombenabwürfen auf Hiroshima und Nagasaki (Barnes & Loutit, 2001). Im Jahre 1951 berichteten Jacobsen *et al.* von Versuchen, in denen Mäuse eine tödliche Strahlendosis überlebten, wenn ihre Milz während der Bestrahlung durch ein Bleischild geschützt wurde (Jacobson *et al.*, 1951). Im gleichen Jahr zeigten Lorenz *et al.* in Tierexperimenten, dass nachträglich intravenös verabreichtes Knochenmark das Überleben einer letalen Strahlendosis ermöglichte (Lorenz *et al.*, 1951). Darüber hinaus wurde in Tierexperimenten gezeigt, dass die Blutbildung auf die transplantierten Zellen des Spenders zurückzuführen war, was als Chimärismus bezeichnet wurde (Ford *et al.*, 1956). Der erste Versuch einer Knochenmarktransplantation beim Menschen wurde von Thomas *et al.* im Jahre 1957 durchgeführt (Thomas *et al.*, 1957). Auch wenn dieser Versuch zunächst erfolglos blieb, berichteten die Autoren zwei Jahre später von einer erfolgreichen, syngenen Knochenmarktransplantation nach Ganzkörperbestrahlung bei einem Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (Thomas *et al.*, 1959).

In den 1970er Jahren konnte gezeigt werden, dass eine Hochdosistherapie mit nachfolgender Transplantation HLA-identischen Knochenmarks zu verlängertem Überleben bei bislang therapierefraktären, akuten Leukämien führen kann (Fefer *et al.*, 1977). Dies führte zu einer weltweiten Zunahme an hämatopoetischen Stammzelltransplantationen, deren Zahl auch heute noch kontinuierlich ansteigt (Weiss *et al.*, 2004).

## **2.2. Allogene, hämatopoetische Stammzelltransplantation (aHSZT)**

Die allogene, hämatopoetische Stammzelltransplantation wurde anfangs zur Behandlung von Patienten mit Sichelzellanämie und X-chromosomal vererbtem, schwerem, kombiniertem Immundefekt (X-SCID) entwickelt. Hierbei wird das blutbildende System eines erkrankten Patienten durch Stammzellen eines gesunden Spenders ersetzt. Darüber hinaus ermöglicht sie eine Hochdosis-Chemo- bzw. Strahlentherapie bei Patienten mit malignen Erkrankungen. Diese aggressive Behandlung von Tumoren und Leukämien führt auch zur Zerstörung des blutbildenden Systems des Patienten, was eine Rekonstitution durch die Reinfusion von hämatopoetischen Stammzellen notwendig macht.

Die aHSZT birgt das Risiko von T-Zell-vermittelten Abstoßungsreaktionen, die zur sogenannten Spender-gegen-Wirt Erkrankung führen können. Allerdings ist die aHSZT auch mit einer vorteilhaften, T-Zell-vermittelten Immunreaktion gegen residuelle Tumorzellen assoziiert (Weiden *et al.*, 1981).

## **2.3. Die Spender-gegen-Wirt Erkrankung**

Die Abstoßungsreaktion GvHD ist eine häufig vorkommende und oftmals lebensbedrohliche Komplikation nach aHSZT (Lee & Williams, 2010). Die Inzidenz liegt zwischen 30 bis 60% und die Mortalitätsrate kann nach nicht HLA-identischer aHSZT bei über 65% liegen (Barton-Burke *et al.*, 2008). Die GvHD wird durch allogene Spender-T-Lymphozyten verursacht, die die Gewebe des Transplantatempfängers erkennen und inflammatorische Entzündungsprozesse auslösen, was zu multiplen Organversagen führen kann (Shaw *et al.*, 2010). Wichtigste Risikofaktoren für die Entstehung der GvHD sind gegengeschlechtliche Transplantationen (Stammzellen aus weiblichen Spendern in männliche Empfänger), bestimmte HLA-Haplotypen, das Alter des Patienten, die Bedingungen der Konditionierung und die Prophylaxe der GvHD (Gratama *et al.*, 1992; Barton-Burke *et al.*, 2008; Dierselhuis & Goulmy, 2009). In

Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Auftretens von GvHD wird zwischen akuter und chronischer GvHD unterschieden (Travnik *et al.*, 2011a).

### **2.3.1. Akute GvHD**

Tritt eine GvHD innerhalb der ersten 100 Tage nach Transplantation auf, so wird definitionsgemäß von einer akuten GvHD (aGvHD) gesprochen. Die Schwere der Erkrankung wird dabei in 4 Stadien (I bis IV) unterteilt (Ball & Egeler, 2008). Die GvHD beruht auf Immunreaktionen, die durch Unterschiede in den HLA-Molekülen bzw. auf HLA-Molekülen präsentierten Peptiden zwischen Spender und Empfänger ausgelöst werden (Travnik *et al.*, 2011b).

Haut, Darm und Leber sind die am häufigsten betroffenen Organe der aGvHD (Olsson *et al.*, 2010). Die Depletion von Spender-T-Zellen aus dem Transplantat vor einer aHSZT führt zu einer verminderten Inzidenz der Erkrankung. Jedoch bedingt diese Maßnahme auch ein erhöhtes Risiko eines Transplantatversagens und Tumorrückfalls (Mielke *et al.*, 2008).

### **2.3.2. Chronische GvHD**

Tritt die Spender-gegen-Wirt Erkrankung mehr als 100 Tage nach der aHSZT auf, so wird diese als chronische GvHD (cGvHD) bezeichnet (Goddard *et al.*, 2010). Das Krankheitsbild der cGvHD kann, je nach betroffenen Organen, zwischen lokalen Läsionen und systemischen Dysfunktionen variieren und wird ebenfalls in 4 Stadien unterteilt. In 50% der Patienten mit cGvHD sind mehr als zwei Organe betroffen (Martin, 2008; Riera *et al.*, 2010). Ihre sklerodermiformen Weichteil-Manifestationen können die Lebensqualität der Patienten erheblich beeinträchtigen (Shlomchik, 2007). Die Beziehung zwischen akuter und chronischer GvHD ist noch immer nicht vollständig verstanden. Die Ergebnisse mehrerer klinischer Studien haben ergeben, dass die cGvHD nicht immer einer aGvHD folgt (Chu *et al.*, 2010). Etwa ein Drittel der Patienten, die eine aGvHD entwickelten, zeigten keine Zeichen einer cGvHD.



Umgekehrt ist der cGvHD in über 30% der Fälle keine akute GvHD vorausgegangen (Ferrara *et al.*, 2009).

Trotz der Tatsache, dass die akute und cGvHD die gleichen Organe betreffen, führt die cGvHD zu mehr entzündlichen und fibrotischen Veränderungen, während die aGvHD vermehrt mit Apoptose und Nekrose assoziiert ist (Barton-Burke *et al.*, 2008; Lee & Williams, 2010).

### **2.3.3. Immunbiologie der GvHD**

Die GvHD basiert auf einer von Spender-T-Lymphozyten-vermittelten Immunreaktion (Busca *et al.*, 2011). T-Lymphozyten erkennen über ihren T-Zell-Rezeptor (TZR) Peptide, die auf Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*; MHC) präsentiert werden. Die MHC-Moleküle werden in zwei Klassen unterteilt: Klasse-I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert, während Klasse-II-Moleküle nur auf wenigen Zelltypen, hauptsächlich hämatopoetischen Ursprungs, vorkommen. Die Expression von MHC-II-Molekülen kann jedoch auf einigen Geweben durch Zytokine, zum Beispiel Interferon- $\gamma$ , induziert werden (Romieu-Mourez *et al.*, 2007). Beim Menschen werden MHC-Moleküle auch als humane Leukozytenantigene (HLA) bezeichnet. Es gibt drei verschiedene HLA-Klasse-I (HLA-A, -B und -C) und drei HLA-Klasse-II Untergruppen (HLA-DQ, -DR und -DP) (Marsh, 2011).

Die Aufgabe von MHC-Molekülen ist die Präsentation von Antigen-Fragmenten in Form von Peptiden an T-Zellen. Dabei erkennen T-Zellen, die den CD8 Korezeptor exprimieren, Antigene auf MHC-Klasse-I-Molekülen während T-Zellen, die den CD4 Korezeptor exprimieren, Peptide auf MHC-Klasse-II-Molekülen erkennen.

Ausgelöst werden GvH-Reaktionen durch immunkompetente Zellen im Transplantat, die Selbst-Antigene auf Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) des Empfängers als fremd erkennen (Choi *et al.*, 2010). Der Schweregrad der Erkrankung korreliert dabei mit der Menge an infundierten Spender-T-Lymphozyten (Kernan *et al.*, 1986). So wird Häufigkeit und Schweregrad einer aGvHD durch die Depletion von T-Zellen aus dem Transplantat verringert (Busca *et al.*, 2011).

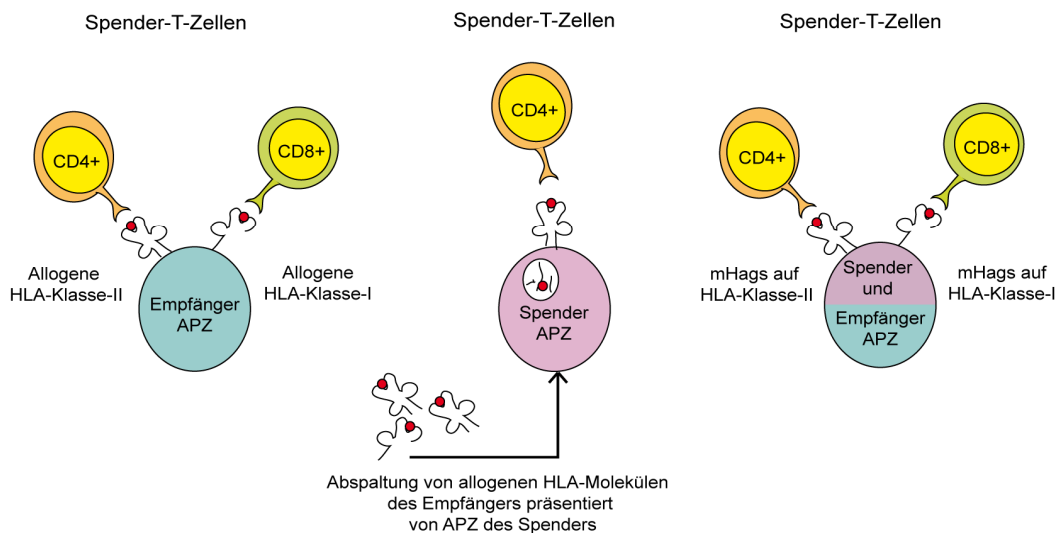
Wie in Abbildung 1 dargestellt, kann die Aktivierung von Spender T-Zellen nach aHSZT auf drei Wegen erfolgen.

(a) Direkte Erkennung allogener HLA-Moleküle: Die Immunreaktion gegen intakte, allogene HLA-Moleküle nach HLA-disparater Transplantation wird als direkter Erkennungsweg bezeichnet. Dieser Erkennungsweg löst sehr schnelle und starke Abstoßungsreaktionen aus (Nowak, 2008).

(b) Indirekte Erkennung allogener HLA-Moleküle: Auch hier werden allogene HLA-Moleküle des Empfängers von Spender T-Zellen erkannt, jedoch nicht direkt sondern nach Spaltung in Peptide und deren Präsentation auf *HLA-Molekülen* (Tivol et al., 2005).

(c) Erkennung von mHags: Peptide polymorpher Proteine, in denen sich Spender und Empfänger unterscheiden, werden auf HLA-Molekülen autologer APZ präsentiert und von Spender-T-Zellen erkannt (Rufer et al., 1998).

(a) Direkte allogene Erkennung      (b) Indirekte allogene Erkennung      (c) Erkennung von mHags

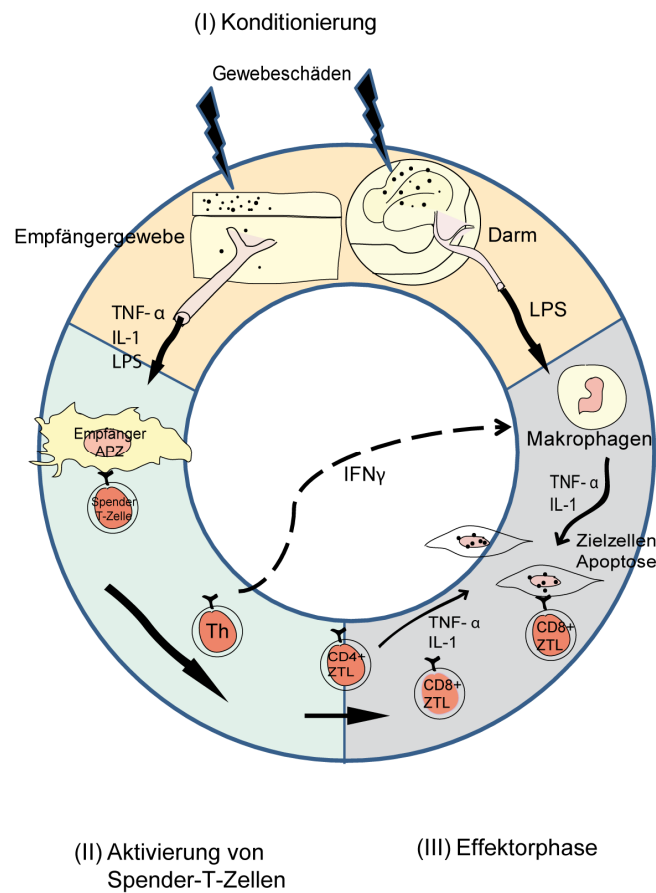


**Abbildung 1: T-Zell-Antigenerkennung nach aHSZT**

(a) Direkter Erkennungsweg: Die Immunreaktion gegen intakte, allogene MHC-Moleküle. (b) Indirekter Erkennungsweg: Reaktion gegen Peptide allogener HLA Moleküle, die auf autologen HLA-Molekülen präsentiert werden. (c) Erkennung von Nebenhistokompatibilitätsantigenen (mHags): Peptide polymorpher Proteine, in denen sich Spender und Empfänger unterscheiden, werden auf HLA-Molekülen präsentiert.

Die Pathophysiologie der GvHD kann in drei Prozesse unterteilt werden (Ferrara & Yanik, 2005):

- (1) Schädigung von Empfängergewebe durch die Konditionierung.
- (2) Spender-T-Zell-Aktivierung und klonale Expansion.
- (3) T-Zell-Effektorphase mit weiteren Schädigungen des Empfängergewebes durch Spender T-Zellen.



**Abbildung 2: Die Pathophysiologie der GvHD**

(I) Die Konditionierung des Patienten führt zu einer Schädigung von Empfängergewebe. (II) Aktivierung und klonale Expansion von Spender T-Zellen nach Transplantation. (III) T-Zell-Effektorphase, die zu weiteren Schädigungen von Empfängergewebe führen. LPS: Lipopolysaccharid, Th: CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, ZTL: CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen, IL-1: Interleukin-1, ein entzündungsförderndes Zytokin, TNF- $\alpha$ : Tumornekrose-Faktor alpha, proinflammatorisches Zytokin, IFN $\gamma$ : Interferon-gamma, inflammatorisches Zytokin. Die Abbildung wurde modifiziert nach Ferrara und Yanik, 2005.

---

### **2.3.3.1. Phase 1: Schädigung von Empfängergewebe durch die Konditionierung**

Die therapiebedingte Schädigung von Empfängergewebe durch die Konditionierung führt zu inflammatorischen Prozessen (Hiemenz, 2009), die durch die Gewebeinfiltration von Immunzellen und der Ausschüttung weiterer Entzündungsmediatoren noch verstärkt werden. Im Darm können durch die Zerstörung des Epithels Bestandteile von Darmbakterien, wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS), in die Blutbahn gelangen, wo sie über die Bindung an Toll-ähnliche Rezeptor (toll like receptor; TLR) die systemische Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumor-Nekrose-Faktor-alpha ( $TNF\alpha$ ), Interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-12 und Interferon-gamma ( $IFN\gamma$ ) auslösen (Mickelson et al., 2010).

Das geschädigte Empfängergewebe reagiert darauf mit einer weiteren Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie  $TNF-\alpha$  und IL-1, was als Zytokin-Sturm bezeichnet wird (Rotolo et al., 2009).

### **2.3.3.2. Phase 2: Spender-T-Zell Aktivierung**

#### **(a) Zielantigene**

Auslöser von Antigen-spezifischen Immunreaktionen nach aHSZT sind allogene HLA-Moleküle und Nebenhistokompatibilitätsantigene (mHags), in denen sich Spender und Empfänger unterscheiden. Die Frequenz alloreaktiver T-Zellen im Transplantat, die allogene HLA-Moleküle direkt erkennen, ist abhängig von der HLA-Disparität zwischen Spender und Empfänger und kann bis zu 10% des gesamten T-Zell-Repertoires umfassen (Martins *et al.*, 2004; Nikolich-Zugich, 2007).

Im Gegensatz dazu ist der Prozentsatz an Spender T-Zellen, die Antigene des Empfängers auf autologen APZ erkennen, mit weniger als 1% deutlich geringer (Warren *et al.*, 2010). Folglich ist das GvHD-Risiko nach HLA-disparater Transplantation deutlich höher als nach HLA-identischer Transplantation (Arora *et al.*, 2009). Im letzteren Fall bilden mHags die wichtigsten Zielstrukturen der Spender-T-

Zell-vermittelten Abstoßungsreaktionen (Jameson *et al.*, 1994). mHags werden von polymorphen Genen codiert, die außerhalb des MHC-Genlocus liegen. Wieviele solcher mHags existieren, ist bislang nicht bekannt. In Mäusen wird ihre Zahl auf 430 bis 720 geschätzt (Perreault & Brochu, 2002) und beim Menschen wird eine mindestens ähnlich große Anzahl vermutet. Allerdings ist noch unklar, ob alle mHags gleich immunogen sind (Korngold, 1993; Bleakley & Riddell, 2011). Im Falle des mHag HA-1 konnte eine fehlende Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger mit der Entstehung von GvHD in Verbindung gebracht werden (Nicholls *et al.*, 2009). Dagegen entwickeln viele Patienten trotz statistisch anzunehmender mHags Disparität keine GvHD. Somit sind nicht nur Anzahl und Identität, sondern auch Immunogenität der verschiedenen mHags noch weitgehend unbekannt.

### **(b) Die Rolle von Antigen-präsentierenden Zellen**

In der ersten Phase der GvHD führt die Empfänger-Konditionierung zu einem Verlust der epithelialen Integrität, und die systemische Exposition mit mikrobiellen Produkten zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Zudem überleben einige Empfänger-APZ die Konditionierung und fördern die Aktivierung und Differenzierung von Spender-T-Zellen (Tawara *et al.*, 2010). Wie eine Reihe von Tierexperimenten belegt, trägt nach HLA-disparater aHSZT die Erkennung allogener MHC-Moleküle auf überlebenden Empfänger-APZ entscheidend zur Entwicklung von GvHD bei. Wurden beispielsweise CD8<sup>+</sup> Spender-T-Zellen in Mäuse mit unterschiedlichem MHC-Klasse-I Genotyp infundiert, so entwickelten die Mäuse GvHD. Fehlte den Empfänger-Mäusen jedoch das  $\beta_2$ -Mikroglobulin-Gen, so trat keine GvHD auf (Zhang *et al.*, 2002). Das  $\beta_2$ -Mikroglobulin bildet einen Komplex mit der schweren Kette der MHC-Klasse-I-Moleküle und ist notwendig für deren Präsentation auf der Zelloberfläche. Nach einer Rekonstitution von Wildtyp Mäuse mit  $\beta_2$ -Mikroglobulin-defizientem Knochenmark wurde eine geringere Ausprägung der GvHD beobachtet (Shlomchik, 2007). Auch in einem CD4<sup>+</sup> T-Zell-abhängigen GvHD-Modell trat keine GvHD auf, wenn die APZ keine MHC-Klasse-II-Moleküle exprimierten. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass

Empfänger-APZ wesentlich an der GvHD-Entwicklung in der frühen Phase nach MHC-disparater aHSZT beteiligt sind (Duffner *et al.*, 2004).

### **(c) T-Lymphozytensubpopulationen in der GvHD**

Hauptverantwortlich für die Entstehung von GvHD sind Spender-T-Zellen. So führt die Depletion von T-Zellen aus dem Transplantat zu einer niedrigeren GvHD-Inzidenz (Morris & Hill, 2007; Markey *et al.*, 2010). Besonders CD4<sup>+</sup> Spender-T-Zellen scheinen eine kritische Rolle in der GvHD-Pathogenese zu spielen (Godfrey *et al.*, 2004). Nach Interaktion mit aktivierten APZ können CD4<sup>+</sup> Spender-T-Zellen zu Effektorzellen des T<sub>H</sub>1-Subtyps differenzieren. T<sub>H</sub>1 CD4<sup>+</sup> T-Zellen unterstützen die Differenzierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTL), welche nach Antigenerkennung auf MHC-Klasse-I-Molekülen enorme Gewebeschäden verursachen können (Morris & Hill, 2007). Außerdem führen proinflammatorische Zytokine wie INF $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , die von T<sub>H</sub>1 CD4<sup>+</sup> T-Zellen sezerniert werden, MHC-unabhängig zu weiteren Gewebeschäden. Interessanterweise berichteten Ichiki *et al.* von einer milderen Form der GvHD, wenn CD4<sup>+</sup> Spender-T-Zellen zu T<sub>H</sub>2-Zellen differenzierten (Ichiki *et al.*, 2006). Allerdings können Immunantworten sowohl vom T<sub>H</sub>1- als auch vom T<sub>H</sub>2-Subtyp zur GvHD-Entstehung beitragen, wobei T<sub>H</sub>2-Zellen besonders in der Entwicklung der cGVHD eine wichtige Rolle zu spielen scheinen (Ellison *et al.*, 2002). Dies konnte durch eine Reihe adoptiver T-Zell-Transferexperimente bestätigt werden (Shlomchik, 2007). In letzter Zeit wurde eine neue Untergruppe der CD4<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben, welche IL-17 produzieren. Diese T<sub>H</sub>17-Zellen sind vermutlich an der Entstehung von Autoimmunkrankheiten wie Multipler Sklerose und rheumatoider Arthritis beteiligt (Lee *et al.*, 2010). Die vorläufigen Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass sie auch eine Rolle in der akuten und chronischen GvHD spielen. So verursachen CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus IL-17 defizienten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine mildere Form der GvHD. Ob und welche Rolle genau den T<sub>H</sub>17-Zellen in der GvHD-Entstehung zukommt, müssen weitere Studien zeigen (Thompson *et al.*, 2010).

**(d) Die Rolle von naiven und Gedächtnis-T-Zellen in der GvHD**

Mehrere unabhängige Arbeitsgruppen haben festgestellt, dass hauptsächlich naive, CD62L-positive T-Zellen und nicht CD62L-negative Effektor-Gedächtnis-T-Zellen an der Entwicklung akuter GvHD beteiligt sind (Chen *et al.*, 2007; Chen, 2008). CD62L ist wichtig für das Einwandern der T-Zellen in Lymphknoten (Denecke *et al.*, 2010). Im MHC-identischen Mausmodell wurde zudem beobachtet, dass nur naive, CD45RA<sup>+</sup>, aber nicht CD45RO<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen eine Zytotoxizität gegenüber allogenen Stimulatoren aufweisen (Bleakley *et al.*, 2010). Auch wurden relativ milde klinische Symptome der GvHD nach adoptivem CD4<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zelltransfer im Mausmodell beobachtet (Moncrieffe *et al.*, 2008). Untersuchungen an aHSZT-Patienten ergaben, dass diejenigen, die einen hohen Anteil an naiven CD4<sup>+</sup> Spender-T-Zellen erhalten hatten, früher und schwerer an aGvHD erkrankten (Yakoub-Agha *et al.*, 2006; Wysoczanska *et al.*, 2007). Diese Beobachtungen zeigen, dass naive-T-Zellen in der GvHD Pathogenese eine wichtige Rolle spielen.

**2.2.3.3. Phase 3: Effektorphase**

Zu den Auslösern der aGvHD zählen insbesondere CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, sowie inflammatorische Zytokine. CD8<sup>+</sup> ZTL eliminieren Zielzellen über die Weitergabe zytotoxischer Proteine, die innerhalb zytoplasmatischer Granula gespeichert werden und kontaktabhängig zur Zielzelle hin freigesetzt werden. Diese zytoplasmatischen Granula enthalten u.a. Granzyme und Perforin. Die Hauptfunktion des Perforins ist eine Durchlöcherung der Zellmembran der Zielzelle, damit sekretierte Granzyme ins Zellinnere gelangen können (Voskoboinik *et al.*, 2010). Granzyme sind Serin-Proteasen, die auf unterschiedliche Weise Apoptose in den Zielzellen auslösen (Bots & Medema, 2006). Experimente in Mausmodellen weisen darauf hin, dass Perforin und die Granzyme in der Pathogenese der GvHD involviert sind. So kam es in einem murinen GvHD-Modell nach Infusion von Perforin-defizienten T-Zellen zwar in allen Fällen zur Entwicklung einer GvHD, allerdings mit einer signifikanten Verzögerung (Baker *et al.*, 1996).

Ein weiterer Mechanismus der Zytotoxizität von T-Zellen ist der Fas-Ligand-abhängige Apoptoseweg. Die Fas/Fas-Ligand-Interaktion bewirkt eine Aktivierung der intrazellulären Caspase-Kaskade, die zum Zelltod führt. In murinen GvHD-Modellen induzierten FasL-defiziente T-Zellen zwar eine schwere Kachexie, jedoch traten nur minimale, GvHD-assoziierte Leber- und Hautveränderungen auf (Ramirez-Montagut *et al.*, 2007). Dies lässt darauf schließen, dass FasL eine wichtige Rolle in der GvHD Pathogenese spielt.

### **2.4. Graft-versus-Leukämie-Effekt (GvL)**

Erste Hinweise auf eine antileukämische Wirkung von Spender-T-Zell-vermittelten Immunreaktionen wurden in einer Studie an 2,254 Patienten mit AML, ALL und CML nach HLA-identischer aHSZT erhalten (Horowitz *et al.*, 1990). Dabei wurde bei Patienten, die kein T-Zell-depletiertes Knochenmark erhalten hatten, eine verminderte Tumorezidivrate beobachtet. Zudem lag das relative Risiko eines Tumorrückfalls bei Patienten mit ausschließlich aGvHD bei 0,68, bei Patienten mit ausschließlich cGvHD bei 0,43 und bei Patienten mit akuter und cGvHD bei 0,33. Im Vergleich dazu lag das relative Risiko eines Tumorrückfalls bei Patienten, die Stammzellen von eineiigen Zwillingen, die als genetisch identische Kopien gelten, erhalten hatten, bei 2,09 und somit fast gleich hoch wie bei Patienten, die ein T-Zell-depletiertes Transplantat erhalten hatten (1,76). Diese Daten belegten einen GvL-Effekt der aHSZT, der in Verbindung mit GvHD auftritt. Nachfolgende Studien zeigten darüber hinaus, dass GvL-Effekte nicht immer mit einer GvHD assoziiert sein müssen (Aoki *et al.*, 1994; Riddell *et al.*, 2002).



## 2.5. Die Donor-Lymphozyten-Infusion (DLI)

Der nachgewiesene, auf Spender T-Zellen beruhende, antileukämische Effekt der aHSZT führte zu der Überlegung, T-Zellen des Spenders zur Behandlung von Leukämie-Rezidiven einzusetzen (Kolb *et al.*, 2005). Diese sogenannte Donor-Lymphozyten-Infusion (*Donor lymphocyte infusion*, DLI) erwies sich als besonders wirksam bei der Behandlung von CML-Rezidiven nach aHSZT und ist mittlerweile fester Bestandteil der Therapieprotokolle (Tomblyn & Lazarus, 2008). Der therapeutische Effekt beruht wahrscheinlich auf der Erkennung von mHags auf Leukämiezellen. Die DLI ist jedoch auch mit einem hohen GvHD-Risiko behaftet. Aus klinischer Sicht wünschenswert wäre deshalb die Behandlung mit T-Zellen, die mHags ausschließlich auf Tumorzellen, aber nicht normalem Gewebe erkennen. Voraussetzung hierfür ist allerdings die Kenntnis der mHags, in denen sich Spender und Empfänger unterscheiden.

## 2.6. Nebenhistokompatibilitätsantigene

Nebenhistokompatibilitätsantigene oder mHags sind die Zielantigene der Spender-T-Zell-vermittelten Immunantwort nach HLA-identischer aHSZT (Goulmy, 1996). Im Vergleich zu Immunreaktionen gegen allogene MHC-Moleküle entwickeln sich die von mHags ausgelösten Abstoßungsreaktionen in der Regel langsamer, sind dafür aber meist länger anhaltend (Goulmy *et al.*, 1977). Das menschliche Genom enthält zahlreiche sogenannte Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNP) (Rueff *et al.*, 2002). Liegen SNPs in kodierenden Genabschnitten, so können sie zu einer Aminosäure-Substitution in einem Protein führen. In der Regel bewirken diese Aminosäureaustausche keine Funktionsbeeinträchtigung des Proteins, sie können aber vom Immunsystem detektiert werden. Werden Peptide dieser polymorphen Proteine, in denen sich Spender und Empfänger unterscheiden, auf MHC-Molekülen der APZ präsentiert und von Spender T-Zellen erkannt, so können sie Immunreaktionen auslösen (Inamoto *et al.*, 2010).

Eine Sonderform der mHags stellen Y-chromosomal codierte Antigene dar. Diese stellen Zielstrukturen für T-Zellen eines weiblichen Spenders in einem männlichen Empfänger dar. Beispielsweise konnten Vogt *et al.* zeigen, dass sich die Y- und X-chromosomal codierten UTY Genprodukte in zwei Aminosäuren unterscheiden (Vogt *et al.*, 2000). Diese Unterschiede können nach gegengeschlechtlicher aHSZT zu einer Aktivierung von Spender-T-Zellen führen.

Entscheidend darüber, ob mHags GvHD- und/oder GvL-Effekte auslösen, ist deren Gewebe-Expressionsmuster. Werden mHags ubiquitär exprimiert, so ist die Folge eine Immunreaktion gegen verschiedene Gewebe, was zum Erscheinungsbild einer GvHD führen kann. Werden die mHags jedoch Hämatopoese-spezifisch exprimiert, so richtet sich die Immunantwort gegen hämatopoetische Zellen des Empfängers, die eventuell die Konditionierung überlebt haben, einschließlich residueller Leukämiezellen.

Eine Reihe von mHags wurde mittels Antigen-spezifischer T-Zellen, hauptsächlich CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die aus dem peripheren Blut von Patienten mit GvHD nach aHSZT gewonnen worden waren, isoliert und charakterisiert. Die molekulare Identifizierung der Antigene erfolgte über drei methodische Verfahren. Die mHags HA-1, HA-2 und HA-8 wurden durch ein biochemisches Nachweisverfahren identifiziert (den Haan *et al.*, 1995; den Haan *et al.*, 1998; Brickner *et al.*, 2001). Dabei wurden Peptide durch Säurebehandlung von den HLA-Klasse-I Molekülen eluiert und mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*; HPLC) aufgetrennt. Die Fraktionen wurden einzeln auf APZ beladen und diese auf eine mögliche Erkennung durch die mHags-spezifischen T-Zellen hin untersucht. Antigen-positive Fraktionen wurden weiter aufgereinigt und auf Anwesenheit des Antigens wie beschrieben überprüft, bis eine Identifikation des antigenen Peptids mittels Massenspektroskopie durchgeführt werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde das mHag HB1 mit Hilfe einer cDNA-Expressionsklonierungsmethode identifiziert (Boon *et al.*, 1994; Dolstra *et al.*, 1999). Dazu wurde eine cDNA-Bibliothek aus Antigen-exprimierenden Zellen konstruiert und *pools* der Bibliothek transient in COS-7 Zellen transfiziert. Im Falle einer Erkennung transfizierter Zellen durch die mHags-spezifischen T-Zellen wurden die im transfizierten *pool* enthaltenen cDNAs einzeln

getestet und durch Sequenzierung des entsprechenden Expressionsplasmids das Antigen identifiziert. Eine weitere, erfolgreich eingesetzte Methode zur Identifizierung von mHags ist die Kopplungsanalyse (Akatsuka *et al.*, 2003). Dadurch wurde das Genprodukt von BCL2A1 als mHag identifiziert. Hierbei wurde die Erkennung von mehreren LCL-Pedigrees der CEPH-Sammlung (*Centre d'Etude du Polymorphisme Humain*) durch die mHags-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellklone analysiert. Mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern konnte der für das Antigen codierende Bereich auf einen kleinen chromosomalen Abschnitt mit weniger als 50 Genen eingengt, und darunter BCL2A1 als das für das mHag codierende Gen identifiziert werden.

Die Identifizierung von HLA-Klasse-II-restringierten mHags hat sich bislang als schwieriger erwiesen. Das erste identifizierte HLA-Klasse-II-restringierte mHag war das Y-chromosomal codierte DBY Protein (Vogt *et al.*, 2002). Dazu wurden weibliche Zielzellen mit Kandidatengenen des Y-Chromosoms retroviral transduziert und anschließend mit den mHags-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen kokultiviert. Obwohl dadurch die Identifikation eines MHC-Klasse-II-restringierten Antigens gelang, erscheint dieser methodische Ansatz für die Identifikation von Antigenen in komplexeren Gen-Bibliotheken untauglich. Die allgemein gering effiziente Transfektion bzw. Infektion MHC-Klasse-II exprimierenden APZ sowie die Spezialisierung der Zellen auf die Präsentation exogener, und weniger endogener, Antigene auf MHC-Klasse-II, bedingen eine niedrige Sensitivität dieser Methode. Somit können nur einzelne Kandidatengene, aber keine Gen-Gemische getestet werden, was den experimentellen Aufwand entsprechend erhöht. Im Jahr 2003 stellten Sahara *et al.* eine weiterentwickelte Methode zur Identifikation von MHC-Klasse-II Antigenen vor, die auf der bakteriellen Expression von cDNA-Bibliotheken und der anschließenden Phagozytose der rekombinanten Bakterien durch APZ basiert. Peptide der bakteriell exprimierten Antigene werden dabei effizient auf MHC-Klasse-II präsentiert, wo sie von Antigen-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt werden können. Auf diese Art wurde das murine mHag IL4i-1 identifiziert (Sahara & Shastri, 2003). Mit demselben methodischen Ansatz identifizierten Griffioen *et al.* das autosomale, HLA-Klasse-II-restringierte mHag PI4K2B. Polyklonale, PI4K2B-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden

darauhin in Form einer Donor-Leukozyten-Infusion (*Donor lymphocyte infusion*, DLI) erfolgreich zur Behandlung eines Patienten mit rezidivierender chronisch myeloische Leukämie (CML) eingesetzt (Griffioen *et al.*, 2008).

Neben diesen, auf T-Zellerkennung basierenden Methoden der Antigenidentifikation wurde von der eigenen Arbeitsgruppe ein indirektes, serologisches Nachweisverfahren entwickelt. Damit wurden in einem Patienten mit aGvHD nach HLA-identischer aHSZT 18 Antigene identifiziert, die von Serumantikörpern des Patienten erkannt wurden. Zwei dieser Antigene wiesen insgesamt drei Polymorphismen auf, in denen sich Spender und Empfänger unterschieden. Peptide, die diese polymorphen Sequenzen des Empfängers, aber nicht des Spenders, umfassten, wurden von CD4<sup>+</sup> T-Zellen des Patienten nach Transplantation erkannt (Tabelle 1) (Milosevic *et al.*, 2010). Diese Ergebnisse lieferten den ersten Hinweis darauf, dass MHC-Klasse-II-restringierte mHags auch durch indirekte serologische Verfahren nachgewiesen werden können.

**Tabelle 1: Bislang molekular identifizierte mHags**

mHags <sup>†</sup>	HLA- Restriktion	Peptidsequenz <sup>‡</sup>	mHags Gen <sup>††</sup>	SNP Ag+/Ag- <sup>§</sup>	Referenz
<b><u>Autosomal codierte mHags</u></b>					
HA-2 <sup>v</sup>	A*0201	YIGEVLVSV	MYO1G	G/A	(den Haan <i>et al.</i> , 1995)
HA-1 <sup>H</sup>	A*0201	VLHDDLLEA	HMHA1	A/G	(den Haan <i>et al.</i> , 1998)
HA-1 <sup>H</sup>	B60	KECVLHDDL	HMHA1	A/G	(Mommaas <i>et al.</i> , 2002)
HA-1 <sup>H</sup>	A*0206	VLHDDLLEA	HMHA1	A/G	(Torikai <i>et al.</i> , 2007)
HB-1 <sup>H</sup>	B44	EEKRGSLHVW	HMHB1	C/T	(Dolstra <i>et al.</i> , 1999)

mHags <sup>†</sup>	HLA- Restriktion	Peptidsequenz <sup>‡</sup>	mHags Gen <sup>††</sup>	SNP Ag+/Ag- <sup>§</sup>	Referenz
<b>Autosomal codierte mHags</b>					
<b>HB-1<sup>Y</sup></b>	B44	EEKRGSLYVW	<i>HNHB1</i>	T/C	(Dolstra <i>et al.</i> , 2002)
<b>HA-8<sup>R</sup></b>	A*0201	<u>R</u> TLDKVLEV	<i>KIAA0020</i>	G/C	(Brickner <i>et al.</i> , 2001)
<b>HA-3<sup>I</sup></b>	A1	V <u>T</u> EPGTAQY	<i>AKAP13</i>	C/T	(Spierings <i>et al.</i> , 2003)
<b>UGT2B17</b>	A29	AELLNIPFLY	<i>UGT2B17</i>	***Gen-defekt	(Murata <i>et al.</i> , 2003)
<b>ACC1<sup>Y</sup></b>	A24	DYLQY <u>V</u> LQI	<i>BCL2A1</i>	A/G	(Akatsuka <i>et al.</i> , 2003)
<b>ACC2<sup>D</sup></b>	B44	KEFED <u>D</u> IINW		A/G	(Akatsuka <i>et al.</i> , 2003)
<b>LRH-1</b>	B7	TPNQRQNV <u>C</u>	<i>P2RX5</i>	C/ <sup>SS</sup>	(de Rijke <i>et al.</i> , 2005)
<b>CTL-7A7<sup>R</sup></b>	A3	RVWDLPGV <u>L</u> K	<i>PANE1</i>	T/C	(Brickner <i>et al.</i> , 2006)
<b>ACC-5<sup>R</sup></b>	A*3101	ATLPLL <u>C</u> AR	<i>CTSH</i>	A/G	(Torikai <i>et al.</i> , 2006)
<b>ACC-4<sup>R</sup></b>	A*3303	WATLPLL <u>C</u> AR			(Torikai <i>et al.</i> , 2006)
<b>RDR173<sup>H</sup></b>	B7	RPH <u>A</u> IRRPLAL	<i>ECGF1</i>	A/G	(Slager <i>et al.</i> , 2006)
<b>DNR-7<sup>R</sup></b>	A3	SLPR <u>G</u> TSTPK	<i>SP110</i>	A/G	(Warren <i>et al.</i> , 2006)
<b>LB-ADIR-1<sup>F</sup></b>	A*0201	SVAPALAL <u>F</u> PA	<i>TOR3A</i>	T/C	(van Bergen <i>et al.</i> , 2007)

mHags <sup>†</sup>	HLA- Restriktion	Peptidsequenz <sup>‡</sup>	mHags Gen <sup>††</sup>	SNP Ag+/Ag- <sup>§</sup>	Referenz
<b>Autosomal codierte mHags</b>					
<b>ACC-6</b>	B44	MEIFIEVFSHF	<i>HMSD</i>	A/G	(Kawase <i>et al.</i> , 2007)
<b>LB-MR1-1R</b>	DRB3*0202	YFRLGVSDPIR	<i>MRI</i>	A/G	(Stumpf <i>et al.</i> , 2009)
<b>LB-PTK2B-1T</b>	DRB3*0101	VYMNDSPL	<i>PTK2B</i>	A/C	(Stumpf <i>et al.</i> , 2009)
<b>LB-LY75-1K</b>	DRB1*1301	GITYRNKSLM	<i>LY75i</i>	T/G	(Stumpf <i>et al.</i> , 2009)
<b>LB-MTHFD1-1Q</b>	DRB1*0301	SSIIDQIALKL	<i>MTHFD1</i>	G/A	(Stumpf <i>et al.</i> , 2009)
<b>LB-WNK-1I</b>	A*0201	RTLSPEITV	<i>WNK1</i>	A/C	(Van Bergen <i>et al.</i> , 2010)
<b>LB-SSR1-1S</b>	A*0201	SLAVAQDLT	<i>SSR1</i>	G/A	(Van Bergen <i>et al.</i> , 2010)
<b>LB/PRCP/1D</b>	A*0201	FMWDVAEDL	<i>PRCP</i>	C/A	(Van Bergen <i>et al.</i> , 2010)
<b>LB-ERAP1-1R</b>	B*0702	HPRQEIQALLA	<i>ERAP1</i>	C/G	(Van Bergen <i>et al.</i> , 2010)
<b>LB-BCAT2/1R</b>	B*0702	QPRRALLFVIL	<i>BCAT2</i>	G/A	(Van Bergen <i>et al.</i> , 2010)
<b>LB-ARHGDIB-1R</b>	B*0702	LPRACWREA	<i>ARHGDIB</i>	C/G	(Van Bergen <i>et al.</i> , 2010)
<b>LB-PDCD11-1F</b>	B*0702	GPDSSKTFLLCL	<i>PDCD11</i>	A/G	(Van Bergen <i>et al.</i> , 2010)
<b>LB-GEMIN4-1V</b>	B*0702	FPALRFVEV	<i>GEMIN4</i>	A/G	(Van Bergen <i>et al.</i> , 2010)

mHags <sup>†</sup>	HLA- Restriktion	Peptidsequenz <sup>‡</sup>	mHags Gen <sup>††</sup>	SNP Ag+/Ag- <sup>§</sup>	Referenz
<b><u>Autosomal codierte mHags</u></b>					
<b>LB-EBI3-I1</b>	B*0702	RPRARYYIQVA	<i>EBI3</i>	A/G	(Van Bergen <i>et al.</i> , 2010)
<b>LB-APOBEC3B-1K</b>	B*0702	KPQHAEMCFL	<i>APOBEC3B</i>	A/G	(Van Bergen <i>et al.</i> , 2010)
<b>10.1</b>	DRB1*1101	TQSVPRCPAR RRQS	<i>FLJ00087</i>	C/T	(Milosevic <i>et al.</i> , 2010)
<b>10.2</b>	DRB1*1101	DVRIWPLDPSLL GEP	<i>FLJ00087</i>	C/G	(Milosevic <i>et al.</i> , 2010)
<b>21</b>	DRB1*1302	GWYTYMLLPAA LTGL	<i>FLJ23270</i>	G/C	(Milosevic <i>et al.</i> , 2010)
<b><u>Y-chromosomal codierte mHags</u></b>					
<b>SMCY</b>	B7	SPSVDKARAEI	<i>JARID1D</i>	NA	(Wang <i>et al.</i> , 1995)
<b>SMCY</b>	A*0201	FIDSYICQV	<i>JARID1D</i>	NA	(Meadows <i>et al.</i> , 1997)
<b>DFFRY</b>	A*0101	IVDCLTEMY	<i>USP9Y</i>	NA	(Pierce <i>et al.</i> , 1999)
<b>UTY</b>	B8	LPHNHTDL	<i>UTY</i>	NA	(Warren <i>et al.</i> , 2000)
<b>UTY</b>	B60	RESEEEVSLS	<i>UTY</i>	NA	(Vogt <i>et al.</i> , 2000)
<b>DBY</b>	DQ5	HIENFSDIDMGE	<i>DDX3Y</i>	NA	(Vogt <i>et al.</i> , 2002)
<b>DBY</b>	DRB1*1501	GSTASKGRYIP PHLRNREA	<i>DOX3Y</i>	NA	(Zorn <i>et al.</i> , 2004)

mHags <sup>†</sup>	HLA- Restriktion	Peptidsequenz <sup>‡</sup>	mHags Gen <sup>††</sup>	SNP Ag+/Ag- <sup>§</sup>	Referenz
<b><u>Y-chromosomal codierte mHags</u></b>					
<b>RPS4Y</b>	DRB3*0301	<u>V</u> IKVNDT <u>V</u> QI	<i>RPS4Y1</i>	NA	(Spierings <i>et al.</i> , 2003)
<b>RPS4Y</b>	B*5201	TIRYPDP <u>V</u> I	<i>RPS4Y1</i>	NA	(Ivanov <i>et al.</i> , 2005)
<b>ACC-3</b>	A*3303	EVLLRPGLHFR	<i>TMSB4Y</i>	NA	(Torikai <i>et al.</i> , 2004)

†: Ursprünglicher Name des mHags. Exponenten gibt, wenn vorhanden, die Aminosäure des antigenen Allels im Einbuchstabencode an. ††: Die hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen exprimierten (und daher potentielle Ziele für GvL-Reaktionen darstellenden) Gene sind fett gedruckt. §: Das polymorphe Nukleotid, welches die Antigenität der autosomalen mHags definiert, ist für jeweils beide Allele angegeben. Nukleotiddeletionen anstelle von SNPs sind als „-“ gekennzeichnet: UGT2B17 hat eine gesamte Gendeletion als Polymorphismus. Transplantate eines Donors, welchem beide UGT2B17-Allele fehlen, an einen Empfänger mit mindestens einem UGT2B17-Allel werden für GvHD verantwortlich gemacht. §§: Dieses mHags wird durch differenzielle Proteinexpression in Empfänger- und Spenderzellen als Folge eines homozygoten *frameshift* nach einer Deletion im Spender verursacht. Eine Cytosindeletion im dritten Exon im P2X5-Gen beim Spender führt zu einem frühzeitigen Translationsabbruch.



### 3. Ziele der Arbeit

Bei der Entstehung von GvH- und GvL-Reaktionen nach HLA-identischer aHSZT spielen mHags-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine wichtige Rolle. Da jedoch einfache Nachweisverfahren fehlen, wurden bislang nur wenige MHC-Klasse-II-restringierte mHags identifiziert. Die Kenntnis dieser Antigene würde zum einen eine verbesserte Spenderauswahl ermöglichen. Durch die Gabe von Stammzellen eines Spenders, der sich in möglichst wenigen, ubiquitär exprimierten mHags vom Empfänger unterscheidet, könnte das GvHD-Risiko reduziert und durch eine möglichst hohe Diskrepanz in Hämatopoese-spezifisch exprimierten mHags GvL-Effekt verstärkt werden. Zum anderen könnte durch die Gabe von T-Zellen, die Hämatopoese-spezifisch exprimierte mHags erkennen, GvL-Effekt erzielt werden ohne GvHD zu induzieren.

Da B-Zellen für den Wechsel des Immunglobulin-Isotyps CD4<sup>+</sup> T-Zellhilfe benötigen, werden IgG-Antikörperantworten als potentielle Surrogatmarker einer CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort angesehen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob mit Hilfe serologischer Nachweisverfahren die Zielstrukturen der Transplantations-assoziierten CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort in einem Patienten mit cGvHD identifiziert werden können. Dazu sollte die Antikörperantwort mit Hilfe der SEREX-Methode molekular definiert und parallel dazu CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die Transplantations-assoziierte Antigene erkennen, aus peripherem Blut des Patienten isoliert werden. Nach rekombinanter Expression der von den Antikörpern erkannten Antigene sollte eine mögliche Erkennung dieser Antigene durch die CD4<sup>+</sup> T-Zellen analysiert werden. Diese Untersuchungen sollen Aufschluss darüber geben, ob die Transplantations-assoziierte humorale und zelluläre Immunantwort in dem Patienten mit cGvHD gegen die gleichen oder unterschiedliche Antigene gerichtet ist, und ob mit Hilfe serologischer Nachweisverfahren MHC-Klasse-II-restringierte mHags identifiziert werden können.

## 4. Material

Das folgende Kapitel beschreibt die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Reagenzien. Weitere Bezugsquellen sind in den einzelnen Methodenbeschreibungen aufgeführt.

### 4.1. Geräte und sonstige Materialien

**Tabelle 2: Geräte, Materialien, Hersteller und Standorte**

Geräte und Materialien	Hersteller	Standort
ELISA-Reader	Tecan	Crailsheim
Elektroporationsküvetten	BioRad	München
Elektroporationsgerät (Gene Pulser II)	BioRad	München
FACS-Calibur	Becton-Dickinson	Eching
FACS-Röhrchen	Becton-Dickinson	Eching
Falcon, Multiwell™ (24, 48 und 96)- Lochplatten	Becton-Dickinson	Eching
Gelelektrophoresekammer	Invitrogen	Darmstadt
Gefrierschrank -80°C	Heraeus	Hanau
Gefrierschrank -20°C	Liebherr	Lindau
Kryoröhrchen	Nunc	Wiesbaden
Kühlschrank 4°C	Liebherr	Lindau
Lichtmikroskop	Carl Zeiss	Jena
Maxi-Säulen (JetStar)	Genomed	Loehne
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld	Lauda-Königshofen
Parafilm	Dynatech	Rückersdorf
PCR (Polymerasekettenreaktion) - Purification-Kit	Qiagen	Hilden

Geräte und Materialien	Hersteller	Standort
pH-Meßgerät	Knick	Ortenberg
Pipetten	Gilson	Limburg-Offheim
Pipette Boy	INTEGRA Biosciences	Gießen
Power supply Power-Pac 300	BioRad	
Polypropylen Röhrchen (15ml, 50ml)	Becton-Dickinson	München
Qiagen Plasmid Mini/Maxi Kit	Qiagen	Hilden
Qiaex II Gel Extraction Kit	Qiagen	Hilden
RNeasy-Mini-Kit	Qiagen	Hilden
Spektrophotometer	Eppendorf	Hamburg
Sterile Werkbank	Kendro	Langenselbold
Sterilfilter (0,22µM, 0,45µM)	Millipore	Bedford, USA
UV-Transilluminator	Ultra-Violet Products Ltd	Cambridge, UK
Vortex Genie 2	Bender & Hobein	Bruchsal
Whatman 3MM-Papier	Whatman	Maidstone, UK
Wasseraufreinigungsanlage	Millipore	Bedford, USA
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One	Frickenhausen
Zellkulturflaschen	Costar, Greiner Bio-One und Nunc	Deutschland
Zellkultur CO <sub>2</sub> Inkubator	Thermo Scientific Forma	USA
Zentrifugen	Eppendorf, Beckman, Hettich und Heraeus	Deutschland

## 4.2. Chemikalien und biologische Reagenzien

**Tabelle 3: Chemikalien, biologische Reagenzien und Hersteller**

Chemikalien & Reagenzien	Hersteller	Standort
Agarose	Invitrogen	Darmstadt
Amphotericin B	Invitrogen	Darmstadt
AIM-V	Invitrogen	Darmstadt
Bromphenolblau	IBI Scientific	Peosta, USA
BSA	Sigma–Aldrich	Taufkirchen
Chloroform	Merck	Darmstadt
DMEM	Invitrogen	Darmstadt
DMSO	Sigma–Aldrich	Taufkirchen
EDTA	Sigma–Aldrich	Taufkirchen
Ethidiumbromid	Merck	Darmstadt
Ethanol	Merck	Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG	Berlin
Hybond-C	Amersham	München
Isopropanol	Merck	Darmstadt
Kaliumchlorid	Sigma–Aldrich	Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Sigma–Aldrich	Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck	Darmstadt
Natriumazetat	Merck	Darmstadt
Natriumchlorid	Merck	Darmstadt
Pancoll-Paque	PAN Biotech	Aidenbach
Phenol	Merck	Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma–Aldrich	Taufkirchen
RNase A	Roche	Penzberg
RPMI-1640	Invitrogen	Darmstadt

Chemikalien & Reagenzien	Hersteller	Standort
Salzsäure	Merck	Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck	Darmstadt
Tris	Sigma–Aldrich	Taufkirchen
Trypsin	Invitrogen	Darmstadt
Tween 20	Sigma–Aldrich	Taufkirchen

### 4.3. Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

#### 4.3.1. Zellkulturmedien

Tabelle 4: Zellkulturmedien

Name	Zusammensetzung
<b>HEK293T-Medium</b>	500 ml DMEM 10% FCS 50 µg/ml Gentamicin 2 mM L-Glutamin
<b>LCL-Medium</b>	500 ml RPMI 1640 10% FCS 1% nicht-essentielle Aminosäuren 1 mM Natrium Pyruvat 2 mM L-Glutamin 50 µg/ml Gentamicin 1% Fungizone
<b>T-Medium</b>	500 ml AIM-V 10% hitzeinaktiviertes humanes Serum 2 mM L-Glutamin 10 mM HEPES [ 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure]

### 4.3.2. Allgemeine Puffer und Medien

**Tabelle 5: Allgemeine Puffer und Medien**

<b>Puffer, Medien</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)</b>	10 g NaCl 10 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt gelöst in 1 l H <sub>2</sub> O, pH 7,0 autoklaviert
<b>Luria-Bertani-Agar Platten (LB-Agar-Platten)</b>	10 g NaCl 10 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt 20 g Agar gelöst in 1 l H <sub>2</sub> O, pH 7,0 autoklaviert und in Kulturschalen (~25 ml/100-mm Platte) gegossen
<b>LB-Tet-Platten:</b>	400 ml LB-Medium + 8 g Select Agar autoklaviert, abkühlen auf 52°C im Wasserbad + 600 µl Tetrazyklin-Stammlösung (10 mg/ml)
<b>Super-Broth Medium</b>	35 g Tryptone 20 g Hefeextrakt 5 g NaCl gelöst in 1 l H <sub>2</sub> O, pH 7,0 autoklaviert

Puffer, Medien	Zusammensetzung
<b>SOB (Super Optimal Broth) Medium</b>	20 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt 0,5 g NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> gelöst in 1 l H <sub>2</sub> O, pH 7,0 autoklaviert
<b>PBS-Puffer (Phosphate buffered saline)</b>	8 g NaCl 0,2 g KCl 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,43 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O gelöst in 1 l H <sub>2</sub> O, pH 7,5
<b>TE-Puffer</b>	10 mM Tris/HCl pH 7,5 1 mM EDTA in H <sub>2</sub> O

#### 4.4. Antibiotika

Tabelle 6: Antibiotika

Substanz	Endkonzentration	Stammlösung
<b>Ampicillin</b>	100 µg/ml	100 mg Ampicillin gelöst in 10 ml 70% Ethanol
<b>Kanamycin</b>	50 µg/ml	100 mg Kanamycin gelöst in 10 ml ddH <sub>2</sub> O
<b>Tetracyclin</b>	15 µg/ml	100 mg Tetracyclin gelöst in 10 ml 70%iger Ethanol-Lösung
<b>BM-Cyclin 1</b>	10 µg/ml	gelöst in 10 ml sterilem PBS (2,5 mg/ml)
<b>BM-Cyclin 2</b>	5 µg/ml	gelöst in 10 ml sterilem PBS (1,25 mg/ml)

## 4.5. Antikörper

Tabelle 7: Antikörper

Name	Spezifität	Wirtspezies	Kopplung	Hersteller
<b>Anti-Human IgG (H+L)</b>	IgG	Ziege	Alkalische Phosphatase	Dianova
<b>Anti-Human CD3</b>	CD3	Maus	Fluorescein-Isothiocyanat	Becton-Dickinson
<b>Anti-Human CD4</b>	CD4	Maus	Phycoerythrin	Becton-Dickinson
<b>Anti-Human CD8</b>	CD8	Maus	Phycoerythrin	Becton-Dickinson
<b>Anti-Human-W6/32</b>	HLA-Klasse-I	Maus	ohne	AG Kremmer
<b>Anti-Human-L243</b>	HLA-Klasse-II-DR	Maus	ohne	AG Kremmer

## 4.6. Primer

Alle Primer wurden von der Firma Metabion GmbH, Martinsried, synthetisiert. Die Primer-Sequenzen sind in 5' → 3'-Richtung angegeben.

Tabelle 8: Primer

Vβ Primer	Sequenz (5' → 3')
Vβ1	GCA CAA CAG TTC CCT GAC TTG CAC
Vβ2	TCA TCA ACC ATG CAA GCC TGA CCT
Vβ3	GTC TCT AGA TGT CAA GTC GAT
Vβ4	ACG ATC CAG TGT CAA GTC GAT
Vβ5.1	ATA CTT CAG TGA GAC ACA GAG A



V $\beta$ Primer	Sequenz (5' → 3')
V $\beta$ 5.2	TTC CCT AAC TAT AGC TCT GAG CTG
V $\beta$ 6	AGG CCT GAG GGA TCC GTC TC
V $\beta$ 7	CCT GAA TGC CCC AAC AGC TCT C
V $\beta$ 8	ACT TTA ACA ACA ACG TTC CGA
V $\beta$ 9	CTA AAT CTC CAG ACA AAG CTC AC
V $\beta$ 10	TCC AAA AAC TCA TCC TGT ACC T
V $\beta$ 11	TGT TCT CAA ACC ATG GGC CAT GAC
V $\beta$ 12	GAT ACT GAC AAA GGA GAA GTC TCA GAT
V $\beta$ 13	GGT GAG GGT ACA ACT GCC
V $\beta$ 14	ACC CAA GAT ACC TCA TCA CAG
V $\beta$ 15	AGT GTC TCT CGA CAG GCA CAG
V $\beta$ 16	CAT GAT AAT CTT TAT CGA CGT GTT
V $\beta$ 17	TTT CAG AAA GGA GAT ATA GCT
V $\beta$ 18	AGC CCA ATG AAA GGA CAC AGT CAT
V $\beta$ 19	ACC CCC GAA AAA GGA CAT ACT
V $\beta$ 20	CTC TGA GGT GCC CCA GAA
V $\beta$ 21	CCT ATT TCT GGC CAT GCT ACC CTT
V $\beta$ 22	GAT CAG AGA AAA GAG GGA AAC
V $\beta$ 23	ATG AAA TCT CAG AGA AGT CT
V $\beta$ 24	TAC CCA GTT TGG AAA GC
Common $\beta$	TTC TGA TGG CTC AAA CAC
Common $\beta$ für radioaktive Probe	TTC CCA CCC GAC CCT GCC
C $\alpha$ 5'	ATG CAG AAC CCT GAC CCT GCC
C $\alpha$ 3'	ATC ATA AAT TCG GGT AGG ATC C
Actin 5'	GTG GGC CGC TCT AGG CAC CA
Actin 3'	CGG TTG GCC TTA GGG TTC AGG GGG
SNX1-Nco-I-for.	GGG CCA TGG CGT CGG GTG GTG GT
SNX1-Sal-I-I-rev.	CGC GTC GAT TTA GGA GAT GGC CTT TGC CT

#### 4.7. Expressionsplasmide

Siehe Anhang

## 4.8. Bakterienstämme und Bakteriophagen

### ***E. coli* XL1-Blue MRF'**

Genotype:  $\Delta(\text{mcrA})183$ ,  $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173$ , *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*, [F'proAB lacqZ  $\Delta$  M15 Tn10 (Tetr)]c.

Verwendung: Wirtsstamm für  $\lambda$ -Phagen, alle Anwendungen (Titer, Blau-Weiß-Selektion, Amplifizierung, *Screening* mit Serum).

### ***E. coli* SOLR**

Genotype: *E14-(McrA-)*,  $\Delta \text{mcrCB-hsdSMR-mrr}171$ , *sbcC*, *recB*, *recJ*, *uvrC*, *umuC:Tn5*, (*Kanr*), *lac*, *gyrA96*, *relA1*, *thi-1*, *endA1*,  $\lambda R$ , [F'proAB lacqZ $\Delta$ M15]c.

Verwendung: als Wirtsstamm für verpackte Phagemide nach *in vivo* Exzision.

### **$\lambda$ -ZAP® II**

Phagen-Expressionsvektor mit einer Kapazität von bis zu 10 kb und 6 Klonierungsstellen innerhalb des lacZ-Gens. Der Vektor eignet sich für die Erstellung von cDNA Expressionsbanken und das *Screening* mit Antikörpern oder Nukleinsäureproben. Eine Exzision des pBluescript-Plasmids samt Insert ist möglich.

### **ExAssist® interference resistant helper phage**

Helferphage wird für Exzision des pBluescript-Plasmids aus  $\lambda$ -ZAP® II-Bibliotheken verwendet. Konzentration  $\sim 1 \times 10^{10}$  pfu/ml (*plaque forming units*; pfu)

## 4.9. Enzyme

**Tabelle 9: Enzyme**

Name des Enzymes	Hersteller
DNA Polymerase I(Klenow Fragment)	New England BioLabs
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs und Fermentas
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Invitrogen
T4 DNA Polymerase	New England BioLabs
SuperScript™ II Reverse Transkriptase	Invitrogen

---

## 4.10. Software

**Tabelle 10: Software**

<b>Name der Software</b>	<b>Entwickler</b>
Clone Manager	Sci-Ed Software
XFluor™	Tecan
CellQuest Pro	BD Biosciences

## 5. Methoden

### 5.1. Molekularbiologische Methoden

#### 5.1.1. DNA-Klonierung

Die DNA-Klonierung ist eine Methode, um ein bestimmtes DNA-Fragment in einen Klonierungsvektor einzufügen. In den meisten Fällen handelt es sich bei den Vektoren um Plasmide. Das Plasmid besitzt bestimmte Sequenzbereiche, sogenannte *multiple cloning sites*, die für das Schneiden und das erneute Ligieren des Vektors genutzt werden können. Nachdem das DNA-Fragment in den Vektor eingefügt wurde, kann der rekombinante Klonierungsvektor in Bakterien eingebracht werden. Das Aufspalten des Vektors und das Herausschneiden des *Inserts* erfolgt durch Restriktionsendonukleasen. Diese schneiden die DNA sequenzspezifisch, wobei je nach Enzym entweder glatte Enden (*blunt ends*) oder überhängende Enden (*sticky ends*) entstehen. Wenn möglich sollte der Vektor und das *Insert* mit dem gleichen Enzym geschnitten werden, das nach Möglichkeit überhängende Enden hinterlässt. So kann der linearisierte Vektor mit dem gewünschten DNA-Fragment durch komplementäre Basenpaarung eine Bindung eingehen und zu einem rekombinanten DNA-Ring verschmelzen. Die Reaktion, bei der der Vektor mit dem *Insert* wieder zu einem funktionsfähigen Plasmid zusammengefügt wird, wird durch das Enzym DNA-Ligase katalysiert. Wie zuvor beschrieben können nun Bakterien mit dem neuen rekombinanten Plasmid transformiert werden. Zur Selektion tragen die Plasmide einen Selektionsmarker, der meist eine Antibiotikaresistenz vermittelt. Indem die transformierten Bakterien auf Antibiotika-haltigem Agar ausplattiert werden, können nur solche Bakterien wachsen, die das Plasmid aufgenommen haben und daher über die entsprechende Antibiotikaresistenz verfügen. Diese Bakterien vermehren sich nun, wobei die Plasmide ebenfalls repliziert werden. Dadurch erhält man eine große Kopienzahl des rekombinanten Plasmids.

### 5.1.1.1. Schneiden der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen kann DNA sequenzspezifisch geschnitten werden. Diese Enzyme erkennen meist palindromische DNA-Sequenzen und katalysieren die Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen beider DNA-Stränge. Der Restriktionsverdau von DNA erfolgte gemäß Herstellerangaben. Meist handelte es sich dabei um Enzyme, die bei 37°C aktiv sind. Generell wurde die Reaktion bei entsprechender Temperatur für 1-2 Stunden durchgeführt.

**Tabelle 11: Ansatz für den Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Name	Zusammensetzung
DNA	1 µg
Puffer 10x	2 µl
Enzym	2-5 Unit
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µl

### 5.1.1.2. Synthese von glatten Enden nach dem Restriktionsverdau

Nach dem Schneiden der DNA mit Restriktionsenzymen, die überhängende DNA-Enden hinterlassen, war es manchmal nötig, diese in glatte Enden umzugestalten. Dazu wurden direkt nach dem Schneiden der Plasmid-DNA Desoxy-Nukleosid-Triphosphate und T4-DNA-Polymerase zum Reaktionsansatz zugegeben. Während der Inkubationszeit von 10-15 Minuten bei Raumtemperatur werden die überhängenden Enden von der T4-DNA-Polymerase komplementär mit den dNTPs aufgefüllt, bis glatte Enden entstanden sind. Um nach der Reaktion weiterarbeiten zu können, ist eine Inaktivierung der Polymerase notwendig, da diese zudem über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität verfügt und bei längerer Inkubation die DNA abbauen würde. Diese Inaktivierung erfolgt durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion.

**Tabelle 12: Ansatz für die Synthese von glatten Enden mit DNA-Polymerase**

Name	Zusammensetzung
Ansatz Restriktionsverdau	20 µl
dNTP (je 10 mmol)	1 µl
T4 DNA-Polymerase (5 U/µl)	1 µl

### 5.1.1.3. Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient der Inaktivierung von Enzymen, wie der T4-DNA-Polymerase, und einer Reinigung der DNA, damit beispielsweise ein weiterer Restriktionsverdau mit einem weiteren Restriktionsenzym durchgeführt werden kann, das einen anderen Puffer benötigt. Direkt nach der Inkubation der DNA-Polymerase, oder auch nach dem Schneiden mit einem Restriktionsenzym wurde zu dem Ansatz das äquivalente Volumen Phenol und Chloroform zugegeben und gevortext. Durch anschließende Zentrifugation für 20 Minuten bei 18.000 x g und 4°C erfolgte die Trennung in zwei Phasen, wobei die DNA in der oberen, wässrigen Phase enthalten war. Diese wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 2,5-fachem Volumen an Ethanol versetzt. Durch erneutes Zentrifugieren, ebenfalls für 20 Minuten bei 18.000 x g und 4°C, bildete die DNA ein Pellet, das nach dem Trocknen in Wasser aufgenommen und gelöst wurde.

### 5.1.1.4. Extraktion der DNA-Fragmente aus einem Agarosegel

Die mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA musste in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt werden, um danach im UV-Licht das entsprechende DNA-Fragment ausschneiden und isolieren zu können. Dazu wurde der gesamte Restriktionsansatz mit 1/5 (v/v) Ladepuffer versehen und in eine große Tasche auf das Agarosegel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120 Volt für ca. 1-2 Stunden. Unter dem UV-Licht konnte die DNA sichtbar gemacht werden, da sich im Agarosegel Ethidiumbromid befand, das in die DNA interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert. Zum Ausschneiden der Banden wurde langwelliges UV-Licht

(Wellenlänge 365 nm) verwendet um eine mögliche Schädigung der DNA zu minimieren. Für die Isolation der DNA aus dem ausgeschnittenen Gelstück wurde das peqGOLD Gel-Extraktions-Kit der Firma peqlab verwendet. Zuerst wurde das Gewicht des Gelstücks bestimmt, um anschließend die entsprechende Menge an XP2 Binde-Puffer zuzusetzen. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß im Heizblock auf 55-65°C erhitzt und wiederholt gevortext, um das Gelstück aufzulösen. Der Inhalt wurde dann durch spezielle Säulen zentrifugiert (1 Minute bei 10.000 x g), und der Durchlauf verworfen. Die in der Säule gebundene DNA wurde zweimal mit je 600 µl SPW Wasch-Puffer gewaschen. Zur nachfolgenden Elution wurden 50 µl des im Kit enthaltenen Elutions-Puffers verwendet und die DNA durch Zentrifugation für 1 Minute bei 5.000 x g in ein neues Reaktionsgefäß eluiert. Von dem isolierten DNA Fragment wurde anschließend ein Aliquot erneut auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt, um einerseits anhand der Bandengröße überprüfen zu können, ob es sich um das gewünschte DNA-Fragment handelte und andererseits, um die Konzentration der isolierten DNA abzuschätzen.

#### 5.1.1.5. Ligation

Die zuvor isolierten DNA-Fragmente, Vektor und *Insert*, wurden in der Ligationsreaktion mit Hilfe des Enzyms T4-DNA-Ligase zu einem geschlossenen DNA-Ring zusammengefügt. Die DNA-Ligase verbindet die Enden von Vektor und *Insert* durch Ausbildung einer neuen Phosphodiesterbindung. Die Mengen an Vektor und *Insert*-DNA wurden im Verhältnis 1:3 eingesetzt. Die Ligationsreaktion erfolgt über Nacht bei 16°C.

**Tabelle 13: Ansatz der Ligation**

Name	Zusammensetzung
Vektor-DNA	2 µl
<i>Insert</i> -DNA	6 µl
T4-DNA-Ligase (40 U/µl)	1 µl
10 x T4-DNA-Ligase-Puffer	1 µl

### **5.1.1.6. Agarosegelelektrophorese**

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäuren ihrer Größe nach im elektrischen Feld. Unter Verwendung einer konstanten Gleichstromspannung wandert die negativ geladene DNA zur Anode. Dabei kommen kleine Fragmente schneller voran als größere. Für die Kontrolle der PCR (Polymerasekettenreaktion) - Produkte wurde ein 1%-iges Agarosegel angefertigt. Nach Abwiegen der Agarose wurde 1 x TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) Puffer zugegeben und die Lösung in der Mikrowelle aufgekocht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Die Lösung wurde auf ca. 60°C abgekühlt, mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) versetzt und in eine Gelträger-Form mit Plastikkamm für die Geltaschen gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde in die Gelkammer 1 x TAE Laufpuffer gegeben, bis das Gel vollständig von Puffer bedeckt war. Die PCR-Produkte wurden aufgetaut, mit 1/5 Volumen 6 x DNA-Ladepuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. In die erste und die letzte Tasche wurde jeweils der Größenstandard (*GeneRuler*<sup>TM</sup> 1kb DNA Ladder von MBI-Fermentas) gegeben. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte für 90 Minuten bei  $\leq 120$  Volt.

#### **TAE-Puffer:**

40 mM Tris/HCl pH 7,8, 5 mM NaAc, 1 mM EDTA

#### **Ladepuffer:**

10 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 10% Glycerin

### **5.1.2. Analyse des T-Zellrezeptor (TZR)-V $\beta$ -Repertoires**

#### **5.1.2.1. RNA-Isolation mit Hilfe des RNeasy-Mini-Kits**

Das RNeasy-Mini-Kit diente zur RNA Isolierung aus Geweben und Zelllinien.  $1 \times 10^7$  T-Zellen wurden abzentrifugiert und in 600 µl Lyse-Puffer (0,01%  $\beta$ -Mercaptoethanol) resuspendiert. Diese Lösung wurde anschließend mehrfach durch eine Nadel (Durchmesser 20G) gezogen um genomische DNA mechanisch zu fragmentieren.



Anschließend wurde 1 Volumen (600  $\mu$ l) 70%iges Ethanol zugegeben und gemischt. Das Lysat wurde auf die RNeasy Mini-Säule gegeben, für 15 Sek. bei 8.000 x g zentrifugiert und der Durchlauf anschließend verworfen. Danach wurden 700  $\mu$ l RW1 Wasch-Puffer auf die Säulen gegeben und diese erneut für 15 Sek. bei 8.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Säulen zweimal mit jeweils 500  $\mu$ l RPE-Puffer gewaschen und die Säulen durch Zentrifugation getrocknet. Die Säulen wurden danach in 1,5 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und die RNA durch zweimalige Zugabe von jeweils 25  $\mu$ l DEPC-behandeltem Wasser und anschließender Zentrifugation für 1 Minute bei 8.000 x g von den Säulen eluiert.

### **5.1.2.2. cDNA-Synthese**

Für die reverse Transkription der RNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde die SuperScript II Reverse Transkriptase verwendet. Diese weist eine reduzierte Rnase H Aktivität und eine erhöhte thermische Stabilität im Vergleich zur klassischen M-MLV Reversen Transkriptase auf. Für diese Reaktion wurden je 4  $\mu$ g RNA und 2  $\mu$ l Oligo(dT)-Primer (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l) verwendet. Anschließend wurde jede Probe mit DEPC-behandeltem Wasser auf ein Endvolumen von 36  $\mu$ l aufgefüllt, für 5 Minuten bei 70°C inkubiert und anschließend sofort in ein Eis-Bad gestellt. Für die eigentliche reverse Transkription wurden nach dem Abkühlen je Probe 10  $\mu$ l 5 x *first strand* Puffer, 2  $\mu$ l dNTP (10 mM), und 2  $\mu$ l (200U) Reverse Transkriptase (RT) zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 42°C. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **5.1.2.3. T-Zellrezeptor-Analyse: V $\beta$ Repertoire**

Das TZR-V $\beta$ -Repertoire wurde mittels PCR untersucht. Hierzu wurden nach der RNA-Isolation und cDNA-Synthese die Gensegmente der variablen Ketten des T-Zellrezeptors mit spezifischen Primern amplifiziert.

Dazu wurden 24 verschiedene 5'-V $\beta$ -Primer (Tabelle 9) verwendet, die an die verschiedenen variablen (V) TZR-Regionen binden. Als Gegenstrangprimer wurde ein

Oligonukleotid (C $\beta$ ) eingesetzt, das an die konstante Region des TZR-Gens bindet. Als Positiv-Kontrolle wurde ein Aktin-Primer-Paar eingesetzt, wodurch ein Abschnitt des Aktin-Gens von 250 bp synthetisiert wurde.

**Tabelle 14: PCR-Mix**

Name	Zusammensetzung für 1 x PCR-Ansatz
cDNA	1 $\mu$ l
dNTP (10 mM)	1 $\mu$ l
V $\beta$ x (Tabelle 8) Primer	1 $\mu$ l
Common V $\beta$ Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
PCR-Puffer (10 x)	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 $\mu$ l
DMSO	2,5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	36,5 $\mu$ l
Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l

**Tabelle 15: Positivkontrolle**

Name	Zusammensetzung
cDNA	1 $\mu$ l
dNTP (10 mM)	1 $\mu$ l
Aktin Primer 3'	1 $\mu$ l
Aktin Primer 5'	1 $\mu$ l
PCR-Puffer (10 x)	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 $\mu$ l
DMSO	2,5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	36,5 $\mu$ l
Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l

Negativkontrolle: wie in der Tabelle 13 nur DEPC-H<sub>2</sub>O statt cDNA.

- PCR-Programm:
1. Denaturierung bei 94°C für 2 Minuten
  2. Denaturierung bei 94°C für 1 Minute
  3. Anlagerung bei 55°C für 1 Minute
  4. Synthese bei 72°C für 1 Minute
  5. Terminale Elongation bei 72°C für 10 Minuten

Die Schritte 2 bis 4 wurden 24-mal wiederholt.

### **5.1.3. Herstellung elektrokompetenter Bakterien**

Für die Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurden 500 ml SOB Medium mit 10 µg/ml Tetrazyklin versetzt und in einem 2 l Erlenmeyerkolben mit einer Einzelkolonie des Bakterienstamms XL1-blue MRF' angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C solange geschüttelt, bis die OD<sub>600</sub> (Optische Dichte; OD) bei 0,5-0,7 lag. Anschließend wurde die Kultur für 15 Minuten auf Eis abgekühlt, für 15 Minuten bei 4.800 x g und 4°C zentrifugiert und in 250 ml kaltem, 10% Glycerin in dH<sub>2</sub>O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspendierung in 250 ml 10% Glycerin wurden die Bakterien sedimentiert, in 2-4 ml eiskaltem 10% Glycerin resuspendiert und Aliquots von je 50 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

#### **5.1.3.1. Transformation elektrokompetenter Bakterien**

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu erhalten, mussten elektrokompetente Bakterien (XL1-Blue) mit der benötigten Plasmid-DNA transformiert und expandiert werden. Hierzu wurde ein Aliquot der elektrokompetenten Zellen aufgetaut, 40 µl Bakteriensuspension mit 1 ng Plasmid-DNA vermischt, in Küvetten (0,1 cm Spaltbreite) überführt und im Elektroporationsgerät *Gene Pulser II* unter Einwirkung eines Elektropulses (1,8 kV, 200 Ohm) transformiert. Nach der Elektroporation wurde umgehend 1 ml SOC-Medium zugegeben, die Bakterienlösung in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 1 h bei 37°C im Heizblock inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Ansatz für zehn Minuten bei 3.200 x g

zentrifugiert, anschließend 800 µl des Überstands verworfen und die Bakterien in den verbliebenen 200 µl resuspendiert. Die transformierten Bakterien wurden auf einer Antibiotikum-haltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

**SOC-Medium:**

SOB-Medium, 0,2% Glucose, sterilfiltriert

**5.2. Serologische Identifikation von Antigenen durch rekombinantes Expressionsklonieren (SEREX)**

Das SEREX-Verfahren wurde ursprünglich in der Tumorimmunologie entwickelt, um neue Zielstrukturen für die Krebsimmuntherapie zu entdecken. Inzwischen findet dieses Verfahren aber auch in anderen Gebieten der Medizin Anwendung, wie beispielsweise der Rheumatologie, Kardiologie und Gastroenterologie. In der vorliegenden Arbeit wurde die SEREX-Methode zur Identifizierung von Transplantations-assoziierten Antigenen in einem pädiatrischen Patienten mit cGvHD angewendet.

**5.2.1. Allgemeine Beschreibung**

Zunächst wurde eine cDNA-Bibliothek aus Patientenmaterial vor aHSZT generiert und mit Hilfe von Bakteriophagen in *Escherichia coli* exprimiert. Die in den lytischen Plaques vorhandenen, rekombinanten Proteine wurden auf eine Membran übertragen und anschließend mit Patientenserum inkubiert. Gebundene Antikörper aus dem Serum wurden danach mit Hilfe eines Enzym-gekoppelten Sekundärantikörpers detektiert.

### 5.2.2. Vorbereitung der Patientenserum

Da *Escherichia coli*-Bakterien, in denen die Proteine der cDNA Bibliothek exprimiert wurden, zu den physiologischen Bewohnern des menschlichen Gastrointestinaltrakts gehören und Antikörper gegen *E. coli* Bestandteile im menschlichem Serum nachweisbar sind, wurden diese Antikörper aus den Seren entfernt um so die Hintergrundfärbung zu minimieren. Eine Aufreinigung der Patientenserum erfolgt deshalb durch Präabsorption der Seren gegen *E. coli*-Proteine über Affinitätssäulen und lytische Folien.

#### 5.2.2.1. Präabsorption über mechanische und lytische Affinitätssäulen

Zur Herstellung mechanischer Säulen (M-Säule) wurde das Pellet einer 50 ml XL1-Blue Übernachtskultur in 5 ml PBS gelöst. Die Suspension wurde dreimal für eine Minute in Intervallen sonifiziert, um die Bakterienwand völlig aufzuschließen und die DNA zu fragmentieren. Für die Herstellung lytischer Säulen wurde das Pellet einer 50 ml XL-1-Blue Übernachtskultur in 2 ml einer 0,01 M  $MgSO_4$  Lösung aufgenommen. 200  $\mu$ l dieser Bakteriensuspension wurden mit 500  $\mu$ l nicht-rekombinanten  $\lambda$ -Phagen versetzt und in 5 ml LB-Tetrazyklin-Medium für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die restlichen 1,8 ml Bakteriensuspension mit weiteren 5 ml LB-Tetrazyklin-Medium zugegeben und für weitere 2 Stunden bei 37°C inkubiert. In einem 15 ml Falcon-Röhrchen wurden 2 ml Glutaraldehyd-aktiviertes Kieselgel (Roche) gegeben und mit dem sonifizierten Bakterien-Phagen-Gemisch vermischt. Das Röhrchen wurde über Nacht bei 4°C in einen Überkopffrotor eingespannt und das Gemisch bis zum Morgen rotiert, um eine optimale Bindung der Bakterien- und  $\lambda$ -Phagenbestandteile an das Kieselgel zu ermöglichen. Zur Aufreinigung wurden 20 ml des 1:10 verdünnten Serums auf die abzentrifugierte „mechanische“ Säule gegeben und mittels Überkopffrotor über Nacht bei 4°C mit dem Kieselgel vermischt. Am zweiten Tag wurde die M-Säule mit 500 x g für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Serumüberstand wurde abgenommen und auf die abzentrifugierte „lytische“ Säule (L-Säule) geben, und mittels Überkopffrotor über Nacht bei 4°C mit dem Kieselgel vermischt. Am dritten Tag wurde

die L-Säule mit 500 x g für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Serumüberstand wurde abgenommen und auf eine mit ddH<sub>2</sub>O angefeuchtete lytische Folie in eine Petrischale gegeben.

### **5.2.2.2. Präabsorption über lytische Folien**

Zur Herstellung lytischer Folien wurden 600 µl einer XL1-Blue-Suspension mit nicht-rekombinanten λ-Phagen infiziert und dieser Ansatz auf LB-Platten ausplattiert. Nach 16-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Proteine des lytisch infizierten Bakterienrasens auf Nitrozellulosefolie übertragen und diese mit 5% Magermilchpulver in TBS für 1 h bei RT inkubiert. Über Säulen präabsorbierte Seren wurden jeweils 3 Stunden mit insgesamt 5 solcher lytischen Folien bei RT inkubiert. Anschließend wurde das präabsorbierte Serum nochmals 1:10 mit TBS verdünnt und mit 0,01% Natriumazid und 0,01% Thimerosal versetzt, um Keimwachstum zu unterbinden.

### **5.2.3. Bakterienanzucht**

Die rekombinante Phagenbibliothek wurde in *E. coli* XL1-Blue MRF'-Bakterien der Firma Stratagene zur Expression gebracht. Der Bakterienstamm *E. coli* SOLR wurde für die Gewinnung rekombinanter pBluescript-Phagemide verwendet.

#### **5.2.3.1. *E. coli*-Bakterien des Stammes XL1-Blue MRF'**

10 µl des Glycerin-Stocks von *E. coli* XL1-Blue-MRF' wurden auf einer Tetracyclin-haltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zum Animpfen einer Flüssigkultur wurden ca. 10 Kolonien der XL-1-Bakterien-Stammplatte in 50 ml LB-Medium, den zusätzlich 20% Maltose, 0,01 M MgSO<sub>4</sub> und 15 µg/ml Tetracyclin zugestzt worden war, gegeben und bei 37°C mit 200 rpm geschüttelt. Die Zugabe von Maltose und Magnesiumsulfat in das Medium sollte eine spätere Anheftung der Phagen an die Bakterien begünstigen. Die Kultur wurde bei einer OD von 0,5 (Wellenlänge 600 nm) abgeerntet, da man bei dieser OD von einem exponentiellen Wachstum der Bakterien ausgehen kann, und die Infektion der

Bakterien mit den  $\lambda$ -Phagen in der exponentiellen Wachstumsphase erfahrungsgemäß die besten Ergebnisse liefert. Nach Zentrifugation des Kulturansatzes für 10 Minuten bei 500 x g wurde der Überstand abgegossen und das Bakterienpellet anschließend in sterilem 0,01 M  $\text{MgSO}_4$  resuspendiert, bis eine OD von 0,5 erreicht war. Pro Platte (14,5 cm Durchmesser) wurden 600  $\mu\text{l}$  einer Bakteriensuspension mit einer OD von 0,5 verwendet, um einen dichten Bakterienrasen zu erhalten.

### **MgSO<sub>4</sub> (1 M):**

2,46 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  gelöst in 10 ml  $\text{ddH}_2\text{O}$

### **5.2.3.2. *E. coli*-Bakterien des Stammes SOLR**

Die Anzucht der *E. coli* SOLR-Bakterien erfolgte durch das Animpfen des LB-Mediums mit einer Bakterienkolonie der Bakterien-Stammplatte. Die SOLR-Bakterien tragen ein Kanamycin-Resistenzgen. Neben 20% Maltose und 0,01  $\text{MgSO}_4$  wurde zum Medium daher Kanamycin (50  $\mu\text{g/ml}$ ) zugesetzt, um eine selektive Bakterienanzucht zu gewährleisten. Die Anzucht der Bakterien erfolgte im Bakterienrührer über Nacht bei 30°C. Am nächsten Tag wurden die Bakterien für 10 Minuten bei 500 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 0,01M  $\text{MgSO}_4$  resuspendiert und auf eine optische Dichte von 1,0 bei einer Wellenlänge von 600 nm eingestellt. Die Bakterien wurden bis zum weiteren Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.

### **5.2.4. Infektion der XL-1 Bakterien mit $\lambda$ -Phagen**

Das Volumen der Phagensuspension pro Transfektionsansatz wurde so gewählt, dass sich auf einer Agarplatte mit 14,5 cm Durchmesser ca. 3.000 Plaques bildeten. Die jeweils einen rekombinanten Phagenklon enthaltenden Plaques sollten zur Gewährleistung einer optimalen Effizienz des *Screenings* einerseits möglichst dicht liegen, andererseits dabei jedoch nur minimal überlappen. Dazu wurden pro Platte eine bestimmte Menge Phagensuspension (ca. 3.000 pfu) mit 600  $\mu\text{l}$  der XL-1

Bakteriensuspension (OD 0,5) zunächst für 15 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert.

### **5.2.5. Kultur der infizierten Bakterien auf Agarplatten**

Jedem Transfektionsansatz wurde vor dem Ausplattieren je 6 ml vorgewärmter Topagar (52°C) zugesetzt. Falls eine Expression der rekombinanten Proteine erwünscht war, wurden zudem jedem Ansatz 30 µl 1 M IPTG-Stammlösung zugesetzt. Der Ansatz wurde auf vorgewärmten LB-Tet-Platten (37°C) ausplattiert, und die Platten über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

#### **IPTG-Stammlösung (1 M):**

0,238 g IPTG gelöst in 1 ml ddH<sub>2</sub>O, bei -20°C aufbewahrt.

#### **Topagar:**

2,4 g NZYM Broth, 3,46 g NZYM-Agar gelöst in 200 ml ddH<sub>2</sub>O, autoklaviert und danach im Wasserbad auf 52°C bis zum Ausplattieren warmstellen.

### **5.2.6. Titerbestimmung der Phagenlösung**

Um den Titer der Phagenlösung zu bestimmen, wurde eine Verdünnungsreihe der Phagenlösung von 1:10 bis 1:10<sup>9</sup> in 0,01 M MgSO<sub>4</sub> hergestellt. Die XL-1-Bakterien wurden mit verschiedenen Mengen der Phagenlösung inkubiert und auf LB-Tet-Platten ausplattiert. Am nächsten Tag konnten zwei Platten, deren Plaque-Dichte dies zuließ, ausgezählt und unter Berücksichtigung des eingesetzten Volumens der Phagentiter in pfu pro ml berechnet werden (Formel:  $Plaques/\mu l = Anzahl\ der\ Plaques \times Verdünnung/Volumen\ Einsatz$ ). Um möglichst alle im Ausgangsgewebe exprimierten Gene in das Screening einzubeziehen, sollte die primäre cDNA-Bibliothek einen Titer von mehr als  $1 \times 10^6$  rekombinanten Phagen aufweisen. Zur Kontrolle der Klonierungseffizienz in der Primärbibliothek wurde die Titeranalyse deshalb mit dem sogenannten Blau-Weiß-Test kombiniert.



### 5.2.7. Blau-Weiß-Test

Mithilfe des Blau-Weiß-Tests konnte das zahlenmäßige Verhältnis von nicht-rekombinanten zu rekombinanten Phagen und damit die Effizienz der Klonierung überprüft werden. Der Polylinker des „Uni-ZAP® XR“-Vektors liegt innerhalb des Leserahmens des *lacZ*-Gens, das für eine essentielle Untereinheit ( $\alpha$ -Domäne) des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase kodiert. Durch Zugabe von IPTG, das den *lac*-Repressor durch Konformationsänderung vom Promotor löst, wird das Gen induziert. Nach Zugabe des Lactoseanalogons X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) als Substrat, entsteht bei Vorhandensein von  $\beta$ -Galaktosidase das dunkelblaue Reaktionsprodukt 5,5-Dibrom-4,4-dichlorindigo. Rekombinanten Klonen fehlt diese Enzymaktivität der  $\beta$ -Galaktosidase, da das *lacZ*-Gen durch die einklonierte cDNA unterbrochen ist, so dass es nicht zu einer Blaufärbung der Plaques kommt. Bei guter Effizienz der Klonierung liegt das Verhältnis von blauen zu weißen Plaques bei  $< 1:10$ . Dazu wurden je 3  $\mu$ l der verdünnten Aliquots ( $1:10$ - $1:10^9$ ) der Phagenbibliothek mit 600  $\mu$ l XL-1 Bakterien und 6 ml Topagar ausplattiert. Vor Zugabe des Topagars wurden zu dem Bakterien-Phagengemisch 30  $\mu$ l (1M in H<sub>2</sub>O) IPTG und 50  $\mu$ l X-Gal (250 mg/ml in Dimethylformamid) zugesetzt.

### 5.2.8. Amplifikation der cDNA-Expressions-Bibliothek

Zur Vermeidung von Informationsverlust durch das Absterben einzelner Phagen sowie zur Generierung eines stabilen Stocks wurde die primäre cDNA-Expressionsbibliothek, die etwa eine Million rekombinanter  $\lambda$ -Phagen enthielt, amplifiziert. Die gesamte primäre cDNA-Bibliothek wurde mit XL-1 Bakterien fraktioniert auf 20 frisch hergestellten LB-Tet-Platten ausplattiert (20 Ansätze mit je 600  $\mu$ l Bakteriensuspension und ca. 50.000 pfu der cDNA-Bibliothek). Nachdem die Plaques eine Größe von maximal 2 mm erreicht hatten, wurden die Platten mit jeweils 6-8 ml SM-Puffer überschichtet und über Nacht auf dem Schüttler inkubiert, um die Phagen aus den Plaques herauslösen. Am nächsten Tag wurde der Puffer, der die Phagen enthielt, abgenommen und vereint. Durch Zugabe von 5% (v/v) Chloroform wurden die

Bakterien in der Phagensuspension abgetötet. Nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer bei 2.000 x g für 10 Minuten wurde der Phagenüberstand mit 0,3% (v/v) Chloroform versetzt und bei 4°C gelagert. Ein Aliquot wurde nach Bestimmung des Phagentiters mit 7% DMSO versetzt und bei -80°C gelagert. Nach erfolgreicher Amplifikation einer Primärbank mit ca.  $1 \times 10^6$  rekombinanten Phagen sollte das Amplifikat mindestens ca.  $1 \times 10^9$  rekombinante Phagen enthalten.

### **SM-Puffer:**

5,8 g NaCl, 2 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 50 ml 1 M Tris-Cl pH 7,5 und 5,0 ml 2% (w/v) Gelatine, ad 1 l mit ddH<sub>2</sub>O, sterilfiltriert.

### **5.2.9. Übertragung der Proteine auf Nitrozellulose-Folien**

Die inkubierten Agar-Platten wurden unter Vermeidung von Luftblasenbildung sorgfältig mit beschrifteten Nitrozellulose-Membranen bedeckt. Um nach Ablösen der Membranen und erfolgtem *Screening* das spätere Wiederauffinden seroreaktiver Plaques auf der jeweiligen Agar-Platte sicherzustellen, wurden die Membranen einschließlich der darunterliegenden Agarschicht mit 3 asymmetrischen Einstichen (20 G-Kanüle) versehen. Zur Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosefilter wurden die membranbedeckten Platten für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie bei 4°C über eine Dauer von mindestens 30 Minuten abgekühlt, um die Trennung der Membranen vom Topagar zu erleichtern. Nach vorsichtigem Abziehen wurden die Membranen in eine Schale mit 1 x TBS-T Puffer gelegt (mindestens 20 ml pro Membran) und für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Im Anschluss daran wurden die Membranen zur Blockierung unspezifischer Bindungen einzeln in sauberen Petrischalen mit jeweils 20 ml 1 x TBS/Magermilch-Lösung für eine Stunde sanft geschwenkt.

**1 x TBS:**

8,75 g NaCl

6 g Tris-Base,

gelöst in 1 l ddH<sub>2</sub>O, pH 7,5 einstellen

**1 x TBS-T:**

1 l 1 x TBS Puffer

0,5 ml TWEEN 20

**1 x TBS / Magermilchlösung:**

1 x TBS-Puffer mit 5% Magermilchpulver

**5.2.10. Inkubation der Folien mit Patientenserum**

Nach drei Waschgängen auf dem Schüttler in frischem 1 x TBS-Puffer von je 10 Minuten Dauer wurden die Membranen einzeln in saubere Petrischalen gelegt, mit je 20 ml präabsorbiertem Serum überschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur sanft geschwenkt.

**5.2.11. Inkubation der Folien mit Alkalische Phosphatase-markiertem Sekundärantikörper**

Eine immunologische Färbung mit einem Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelten Sekundär-Antikörper aus der Ziege, der gegen die konstante Region (*fragment crystallisation*; Fc) menschlicher Immunglobulin IgG gerichtet war (Dianova), ermöglichte die Identifikation seroreaktiver Antigene. Nachdem die Membranen nach Abnehmen des Serums dreimal 10 Minuten in jeweils frischem 1 x TBS-Puffer gewaschen worden waren, wurden sie einzeln in Petrischalen gegeben und mit je 20 ml verdünnter Antikörper-Stammlösung für eine Stunde sanft geschwenkt.

**Verdünnte Antikörper-Lösung:**

AP-konjugierter Sekundärantikörper 1:2500 in 1 x TBS mit 0,5% Magermilchpulver.

### **5.2.12. Alkalische Phosphatase-Färbung**

Die Zugabe der Entwicklerlösung führte zu einer enzymatischen Farbreaktion mit der an den Sekundär-Antikörper gekoppelten AP. Auf diese Weise konnte ein gebildeter Antigen-Antikörper-Komplex auf der Nitrozellulosemembran sichtbar gemacht werden. Die Membranen wurden zweimal für 15 Minuten in jeweils frischem 1 x TBS-Puffer gewaschen, anschließend mit je 20 ml Entwicklerlösung überschichtet und für ein bis zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

#### **Entwicklerlösung pro Membran:**

20 ml 1 x CDS + je 20 µl BCIP-Stammlösung (50 mg/ml in 100% DMF, Dimethylformamid) und NBT-Stammlösung (100mg/ml in 70% DMF)

#### **5 x CDS:**

250 ml 2 M NaCl

500 ml 1 M Tris

5,083 g  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ , ad 1 l mit ddH<sub>2</sub>O, pH 9,5

### **5.2.13. Isolation positiver Klone**

Durch die beschriebene, enzymatische Reaktion kam es zu einer Blaufärbung derjenigen Plaques auf der Nitrozellulosefolie, die von IgG-Antikörpern aus dem Patientenserum gebunden wurden. Mit Hilfe der angebrachten Markierung durch Kanüleneinstiche konnten die seroreaktiven Plaques auf den kühl gelagerten Agarplatten identifiziert werden. Diese Plaques wurden zusammen mit zwei bis drei angrenzenden, seronegativen Plaques ausgestochen. Die Agarwürfel wurden in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt und über Nacht bei 4°C in 500 µl SM-Puffer inkubiert, damit die Phagen aus dem Agar in den Puffer diffundieren konnten. Am nächsten Tag wurden die Eppendorfgefäße ca. 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Phagenüberstand wurde nach Überführung in ein neues Eppendorfgefäß mit 20 µl Chloroform versetzt, kurz gemischt und bei 4°C gelagert.

#### 5.2.14. Subklonierung durch „*in vivo* Exzision“

Eine notwendige Voraussetzung für die Sequenzierung des Gewebeanhängigen-*Inserts* war das Vorliegen der rekombinanten Plasmid-DNA in reiner Form.

Dazu wurden über Nacht jeweils eine XL-1- und eine SOLR-Suspensionskultur bei 30°C angelegt. Am folgenden Tag wurden die Bakterienkulturen 10 Minuten lang bei 500 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen, und die Bakteriensedimente in 0,01 M MgSO<sub>4</sub> bis zu einer OD von 1 (Wellenlänge 600 nm) resuspendiert. Die SOLR-Suspension wurde zunächst bei 4°C gelagert. Für die „*in vivo*-Exzision“ des Plasmidvektors in Bakterien wurden 200 µl XL-1-Blue MRF´ mit 250 µl Phagenlösung eines positiven Phagen-Klons (aus Abschnitt 5.2.13) ( $> 1 \times 10^5$  pfu) und 1 µl des Helferphagen Ex-Assist® ( $> 1 \times 10^6$  pfu) 15 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml LB-Tet-Medium wurde der Ansatz für drei Stunden bei 37°C geschüttelt. Daraufhin wurde die Probe für 20 Minuten auf eine Temperatur von 70°C erhitzt und danach für 15 Minuten bei 1.000 x g zentrifugiert. Der Überstand mit λ-Phagen, f1-Helferphagen und verpackten, rekombinanten pBluescript-Phagemiden wurde in sterile Spitzbodenröhrchen gegeben. Für die Infektion der SOLR-Bakterien wurden zwei Ansätze mit verschiedenen Verdünnungen hergestellt: 200 µl der SOLR-Bakteriensuspension wurden jeweils mit 100 µl und 10 µl des Phagenüberstandes inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten im Wasserbad bei 37°C wurden die Infektionsansätze mit einem Glasspatel auf LB-Ampicillin-Platten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Da der pBluescript-Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen trägt, war durch Zugabe von Ampicillin eine Selektion rekombinanter Phagemide möglich. Von je einer der gewachsenen Kolonien wurde schließlich die Plasmid-DNA mittels Mini-Präparation gewonnen und einer Restriktionsanalyse unterzogen.

### **5.2.15. Mini-Präparation von Plasmid-DNA**

Die Mini-Präparation mittels alkalischer Lyse diente der Gewinnung kleiner Mengen an Plasmid-DNA. Dabei wurden 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin versehen und mit einer Bakterienkolonie der SOLR-Platte angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde von den dicht gewachsenen Schüttelkulturen jeweils ca. 1,5 ml abgenommen und in ein Eppendorfgesäß überführt, für 5 Minuten bei 14.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl E1-Puffer aufgenommen. Durch die im E1-Puffer enthaltene Ribonuklease wurde die Degradation der RNA gewährleistet. Nach Zugabe von 100 µl E2-Lyse-Puffer zur Auflösung der Zellmembran wurden die Proben gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 µl E3-Neutralisations-Puffer zugegeben und erneut vorsichtig gemischt. Durch 20-minütige Zentrifugation bei 14.000 x g und 4°C wurden die Bakterienzelltrümmer von der Plasmid-DNA getrennt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgesäß gegeben und 750 µl 100% Ethanol zugesetzt. Durch nachfolgende Zentrifugation für 15 Minuten bei 14.000 x g und 4°C wurde die DNA pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, und das sedimentierte Plasmid nach kurzem Trocknen an der Luft in 100 µl autoklaviertem H<sub>2</sub>O gelöst. Über die anschließende Restriktionsanalyse wurde untersucht, ob in dem jeweiligen Plasmid ein cDNA-Insert enthalten war.

#### **Puffer E1:**

50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A

#### **Puffer E2:**

200 mM NaOH, 1% SDS

#### **Puffer E3:**

3,1 M Kaliumacetat (pH 5,5)

### **5.2.16. Maxi-Präparation von Plasmid-DNA**

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu erhalten, wurden 500 µl einer geeigneten Mini-Bakterienkultur zum Animpfen von 400 ml LB-Medium verwendet. Um eine Selektion der Bakterien zu gewährleisten, die das Plasmid enthielten, wurden wiederum 100 µg/ml Ampicillin zum LB-Medium zugesetzt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C wurde die Bakterienkultur am nächsten Tag für 10 Minuten bei 5.000 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das gewonnene Bakterienpellet in 10 ml E1-Puffer resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 10 ml E2-Puffer zugegeben, und das Gemisch für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 ml E3-Puffer hinzugefügt und geschüttelt. Nach Zentrifugation für 30 Minuten bei 7.000 x g befand sich die Plasmid-DNA im Überstand. Die im Maxi-Präparations-Kit enthaltenen Säulen wurden vor Benutzung durch Zugabe von 20 ml E4-Puffer equilibriert. Anschließend wurde der Überstand der Probe auf die Säulen gegeben. Nachdem die Probe vollständig durch die Säule gelaufen war, wurde diese dreimal mit je 20 ml E5-Wasch-Puffer gespült. Die Säule wurde auf ein 50 ml Spitzbodenröhrchen gestellt und 15 ml E6-Elutions-Puffer zugegeben. Dadurch wurde die an der Säulenmatrix gebundene DNA eluiert. Um die DNA aus dem Elutions-Puffer zu isolieren, wurden 11 ml Isopropanol zugesetzt und für 30 Minuten bei 5.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Plasmid-DNA-Pellet an der Luft getrocknet und danach in 1 ml TE-Puffer gelöst. Mittels eines Photometers wurde bei 260 nm Wellenlänge die Konzentration der vorliegenden Plasmid-DNA bestimmt und zur Kontrolle eine Restriktionsanalyse einschließlich Gelelektrophorese durchgeführt.

#### **Puffer E4:**

100 mM Natriumacetat (pH 5,0), 600 mM NaCl, 0,15% Triton-X-100 in H<sub>2</sub>O

#### **Puffer E5:**

100 mM Natriumacetat (pH 5,0), 800 mM NaCl in H<sub>2</sub>O

#### **Puffer E6:**

100 mM Natriumacetat (pH 5,0), 1500 mM NaCl in H<sub>2</sub>O

**TE Puffer:**

10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA in H<sub>2</sub>O, pH 8,0

**5.2.17. Sequenzanalyse**

Die Sequenzierung der cDNA-*Inserts* wurde bei der Firma SequiServe (Vaterstetten) in Auftrag gegeben. Die einzelnen Antigensequenzen wurden zunächst mit Hilfe des Computerprogramms *Clone Manager* untereinander verglichen und anschließend mit Hilfe des Suchprogramms BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) der GenBank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sowie der SEREX-Datenbank ([www.licr.org/SEREX.html](http://www.licr.org/SEREX.html)) auf Homologie oder Identität mit bereits bekannten Sequenzen untersucht.

**5.3. Zellkulturmethoden****5.3.1. Zelllinien****Tabelle 16: HLA-Klasse-II-Genotyp der verwendete Zelllinien**

Name	HLA-DRB1	HLA-DQ	HLA-DPB1	Weitere HLA-DR-Allele
Mini-LCL-ME LCL-ME LCL-SS	1001; 1404	A1*0104; 01 B1*0501; 0503	0201;1401	
LCL # 4	1103; 1501	B1*0301; 0602	0402; 0501	DRB3*0202 DRB5*0101
LCL GB	1101; 1301	A1*0103; 0501 B1*0301; 0603	0401; 0402	DRB3*0202
L 428	1201	B1*0505; 0301	0401	DRB3*0202
LCL-JM	0801; 1301	B1*0402; 0603	0401; 1301	DRB3*01011
DG75	0404; 1301	B1*0103; 0303	0401	DRB3*0101 DRB3*0103



Die verwendeten lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) wurden durch Infektion von humanen B-Zellen mit dem Epstein-Barr Virus (EBV) generiert.

HEK (Human Embryonic Kidney) 293T ist eine adhären wachsende, humane, embryonale Nierenzelllinie, die durch Infektion mit Adenoviren immortalisiert worden war und das T-Antigen des SV40 Virus exprimiert (Zur Hausen, 1967).

Die Zelllinie L428 ist eine Hodgkin-Lymphom-Zelllinie, die im Jahre 1981 von Diehl und Mitarbeitern etabliert worden war (Diehl *et al.*, 1981).

Der HLA-Genotyp ist abhängig vom jeweiligen Spender und wurde bestimmt, um die Zelllinien zur spezifischen Stimulation von T-Zellen einsetzen zu können.

### **5.3.2. Allgemeine Zellkulturmethoden**

Alle verwendeten Zellen wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Die Arbeiten mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Arbeiten mit ungetestetem Blut (Testung auf HIV, Hepatitis B und C) wurden unter den gentechnischen Sicherheitsbedingungen der Stufe S2 und biologischen Sicherheitsbedingungen G2 durchgeführt.

#### **5.3.2.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Einzufrierende Zellen wurden je Röhrchen in 1 bis 1,7 ml 90% fötalem Kälberserum (FCS) und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) zunächst bei -80°C eingefroren und nach 24 Stunden zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen mit den Zellen im 37°C Wasserbad geschüttelt und dann sofort in Medium aufgenommen, gewaschen und je nach Zelltyp entsprechend in Kultur genommen.

### **5.3.2.2. Kultivierung von Zelllinien**

Suspensionszellen wurden je nach Zelldichte und Wachstumsgeschwindigkeit alle 3 bis 4 Tage durch Mediumwechsel im Verhältnis 1:2 bis 1:10 verdünnt. Alle neu aufgetauten Zelllinien wurden mit BM-Cyclin nach Herstellerangaben (Roche) behandelt. Der Zweck dieser Behandlung bestand darin, möglichen Kontaminationen mit Mycoplasmen vorzubeugen.

### **5.3.2.3. Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in Trypanblau zur lebend-tot-Unterscheidung verdünnt. Trypanblau kann nur in tote Zellen eindringen und färbt diese blau an. Unter dem Mikroskop wurden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die ungefärbten, lebenden Zellen in zwei bis vier Großquadraten ausgezählt, die toten ausgeschlossen und nach folgender Formel die Zellzahl bestimmt:

$$c \text{ [Zellen/ml]} = (\text{Anzahl der Zellen/Anzahl der Großquadrate}) * \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

### **5.3.3. Gewinnung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes**

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Vollblut gewonnen. Das Blut wurde 1:1 mit RPMI-1640 Kulturmedium verdünnt, 35 ml dieses Blut-Medium Gemisches mit 15 ml Ficoll unterschichtet und für 30 Minuten bei 2.000 x g ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurden die PBMC aus der Ficoll-Plasma-Interphase gesammelt, mit RPMI-1640 verdünnt und erneut abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde nochmals gewaschen, in RPMI-1640 Zellkulturmedium aufgenommen und, wie zuvor beschrieben, die Zellzahl bestimmt.

#### **5.3.4. Generierung EBV- und mini-EBV-transformierter, lymphoblastoider B-Zelllinien**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden aus PBMC verschiedener Spender EBV-immortalisierter B-Zelllinien (LCL) generiert. Zur Herstellung EBV- bzw. mini-EBV-immortalisierter B-Zelllinien wurden  $1 \times 10^6$  PBMC im LCL-Medium zusammen mit 100  $\mu$ l Virusüberstand der Zelllinie B95.8, oder Überstand einer mini-EBV-Produzentenzelllinie, in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ l in einer Vertiefung einer 96-Loch-Flachboden-Platte ausgebracht. Anschließend wurden 1  $\mu$ l Cyclosporin A (100  $\mu$ g/ml) und  $1 \times 10^4$  Wi38 (embryonale Lungenfibroblasten-Zelllinie) *feeder*-Zellen zugegeben. Die Platte wurde in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Je nach Bedarf wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Dabei wurden 100  $\mu$ l Medium pro Loch aspiriert und durch 100  $\mu$ l mit Cyclosporin A versetztem LCL-Medium ersetzt.

#### **5.3.5. PHA-Blasten**

Durch Stimulation primärer T-Zellen aus peripherem Blut mit dem T-Zellaktivator Phytohämagglutinin (PHA) werden T-Zellen unabhängig von ihrer Antigen-spezifität aktiviert. Zur Herstellung der sogenannten PHA-Blasten aus Spender-PBMC wurden pro Loch  $9 \times 10^5$  der aufgetauten Zellen in 200  $\mu$ l T-Zell-Medium mit PHA (250 ng/ml) in einer 96-Loch-Platte kultiviert. Am dritten Tag nach Kultivierung wurde das PHA-enthaltende Medium durch frisches Medium ersetzt, das mit IL-2 (10 U/ml) versehen war. Die proliferierenden Zellen wurden etwa alle drei Tage expandiert.

#### **5.3.6. Generierung mHags-spezifischer T-Zelllinien**

Zur Generierung der mHags-spezifischen T-Zelllinien wurden  $1 \times 10^6$  aufgetaute primäre T-Zellen aus peripherem Blut des Empfängers nach KMT mit  $1 \times 10^6$  bestrahlten (80 Gy) autologen mini-LCL ME in 2 ml T-Zell-Medium in einer Vertiefung einer 24-Loch-Platte kultiviert. Nach 24 Stunden wurden 10 U/ml IL-2 zugegeben und

die Zellen je nach Bedarf expandiert. Nach mehreren Restimulationszyklen wurde die Spezifität der Linien mittels ELISA bestimmt.

### **5.3.7. Generierung mHags-spezifischer T-Zellklone**

Aus mHags-spezifischen T-Zelllinien wurden durch Einzelzellklonierung T-Zellklone generiert. Zu diesem Zweck wurden drei 96-Loch-Rundbodenplatten verwendet. Dabei wurden je Loch  $5 \times 10^3$  bestrahlte (80 Gy) mini-LCL ME zusammen mit  $5 \times 10^4$  bestrahlten (40 Gy) PBMC von mindestens drei verschiedenen Spendern (*feeder*-Zellen) in 200  $\mu$ l T-Zellmedium zugesetzt. Das T-Zellmedium enthielt hierbei sowohl PHA (250 ng/ml) als auch IL-2 (10 U/ml). Anschließend wurden die mHags-spezifischen T-Zelllinien in drei Verdünnungen in den drei Platten ausgebracht. Durch die Verdünnung der T-Zellen enthielten die Platten pro Loch entweder 1, 3 oder 10 T-Zellen. Nach 72 Stunden Inkubation wurde das Medium abgenommen und durch frisches T-Zell-Medium, das 10 U/ml IL-2 enthielt, ersetzt. Die ausgewachsenen T-Zellklone wurden im 14 Tage-Zyklus mit  $5 \times 10^5$  bestrahlten Zielzellen und  $1 \times 10^6$  bestrahlten *feeder*-Zellen pro ml restimuliert. Die Spezifität der Klone wurde wiederum in Zytokinfreisetzungs-Experimenten bestimmt.

### **5.3.8. Magnetische Zellsortierung**

Bei der magnetischen Zellsortierung (*magnetic cell sorting*, MACS) werden Zellen mit Hilfe von paramagnetisch markierten Antikörpern aufgereinigt, die gegen zellspezifische Oberflächenmoleküle gerichtet sind. T-Helfer-Zellen exprimieren das Oberflächenmolekül CD4 und können mit Hilfe der paramagnetisch markierten anti-CD4-Antikörper an einer magnetischen Säule von CD4-negativen Zellen getrennt werden. Die nach der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen PBMC, oder neu generierte, antigenspezifische T-Zelllinien wurden für die magnetische Zellsortierung zweimal in RPMI-1640-Zellkulturmedium gewaschen. Danach wurde das Zellpellet in 180  $\mu$ l MACS-Puffer aufgenommen und 20  $\mu$ l paramagnetisch markierter Antikörper gegen CD4 (anti-human-CD4-*Microbeads*, Miltenyi Biotec) zugesetzt und die Proben für 15-20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden 10 ml

MACS-Puffer zugegeben und die Zellen für 5 Minuten bei 460 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen und auf die zuvor mit 3 ml MACS-Puffer equilibrierte Säule im MACS-Ständer geladen. Die Säule wurde dreimal mit je 3 ml MACS-Puffer gewaschen und der Durchlauf als Negativfraktion aufgefangen. Um die Positivfraktion zu erhalten, wurde die Säule aus dem MACS-Ständer genommen und in ein neues Reaktionsgefäß gestellt.

Anschließend wurden zweimal je 5 ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben, wobei die zweiten 5 ml mit einem zu den Säulen passenden Pistill durchgedrückt wurden. Anschließend wurde die Positivfraktion abzentrifugiert, in 10 ml RPMI-1640 aufgenommen und erneut abzentrifugiert. Die Zellen wurden danach in 2 ml T-Zellkultur-Medium aufgenommen, in einem Loch einer 24-Loch-Platte ausgebracht und wie zuvor beschrieben restimuliert.

### **MACS-Puffer:**

PBS, 0,5% BSA, 2 mM EDTA

### **5.3.9. Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie am *fluorescence activated cell scanner* (FACS) ermöglicht eine zeitgleiche Analyse der Expression mehrerer Oberflächenmoleküle auf Zellen. Dazu werden monoklonale Antikörper (Primärantikörper) genutzt, die gegen das jeweils untersuchte Molekül gerichtet sind. Diese Antikörper können direkt mit einem Fluorophor markiert sein, oder mit einem zweiten, Isotyp- oder Spezies-spezifischen, Fluoreszenz-markierten Antikörpers (Sekundär-Antikörper) nachgewiesen werden. Bei der Messung am Durchflusszytometer werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom einzeln durch eine Messküvette geleitet. Die im Gerät befindlichen Laser regen, bei passender Extinktionswellenlänge, die an die Antikörper konjugierten Farbstoffe an. Diese absorbieren die Energie des Laserlichtes und geben sie in Form eines Photons bestimmter Wellenlänge (Emissionswellenlänge) wieder ab, was durch einen Photodetektor registriert wird. Dabei ist die Anzahl der gemessenen Photonen

proportional zur Anzahl der an einer Zelle gebundenen Antikörper. Dadurch ist es möglich die relative Menge eines exprimierten Moleküls zu bestimmen. Zusätzlich erlaubt das entstehende Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*; FSC) eine Aussage über die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*; SSC) hingegen ist ein Maß der Zell-Granularität.

Zum diesem Zweck wurden  $5 \times 10^5$  Zellen einmal mit FACS-Puffer gewaschen. Für die Färbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper (PE oder FITC) wurden die Zellen in 100  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen, 2  $\mu$ l des entsprechenden Antikörpers zugegeben und die Probe für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen nach der Inkubation mit FACS-Puffer gewaschen und dann in 250  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen, zu dem zuvor 1  $\mu$ g/ml Propidiumjodid (PI) zugesetzt worden war. Propidiumjodid ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in die DNA von Zellen interkaliert. Da dieser Farbstoff die Zellmembran lebender Zellen nicht penetriert, kann über die Propidiumjodid Färbung der Anteil an toten Zellen bestimmt werden.

Alle Analysen wurden mit einem Durchflusszytometer BD FACS-Calibur™ (Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt und mit der CELLQuest™-Software ausgewertet.

### **FACS-Puffer:**

1% FCS in PBS

### **5.3.10. Enzyme-linked Immunosorbent Assay**

Mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) können Zytokine detektiert werden, die von T-Zellen nach der Erkennung des spezifischen Antigens auf antigenpräsentierenden Zellen sezerniert wurden. Bei dieser Methode werden Antikörper, die das Zytokin mit hoher Affinität binden, an die Plastikoberfläche einer 96-Loch-Platte gebunden. Ein weiterer, biotinylierter Antikörper bindet an eine andere Region des Zytokins, wodurch ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entsteht. Das Enzym Meerrettich-Peroxidase ist an Streptavidin gekoppelt, womit es an das

Biotin des zweiten Antikörpers bindet. Durch eine enzymatische Reaktion der Peroxidase mit Wasserstoffperoxid wird die farblose Leukoform des Chromogens Tetramethylbenzidin (TMBH<sub>2</sub>) zu seiner blauen Form TMB oxidiert. Schwefelsäure stoppt die Reaktion und führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Intensität der Färbung kann photometrisch nachgewiesen werden und korreliert mit der Menge des von den T-Zellen produzierten Zytokins. Für die Antigenpräsentationsstudien wurde ein IFN $\gamma$ - oder GM-CSF-Zytokin-ELISA der Firma R&D Systems verwendet. Dazu wurden 96-Loch ELISA-Platten (Corning) mit je 100  $\mu$ l/Loch des IFN $\gamma$ - bzw. GM-CSF-*Capture*-Antikörpers (1:180 in PBS) beschichtet und über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer mit je 300  $\mu$ l/Loch Blockpuffer für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem, dreimaligem Waschen erfolgte eine zweistündige Inkubation mit je 100  $\mu$ l Kulturüberstand. Anschließend wurde der Kulturüberstand durch mehrmaliges Waschen entfernt und je Loch 100  $\mu$ l IFN $\gamma$ - bzw. GM-CSF-*Detection*-Antikörper (1:180 in *reagent diluent*) zugegeben. Nach einer zweistündigen Inkubation wurden die Platten erneut dreimal gewaschen und anschließend mit je 100  $\mu$ l/Loch der Steptavidin-gekoppelten HRP (1:200 in *reagent diluent*) für 20 Minuten bei RT inkubiert. Abschließend wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen, mit 100  $\mu$ l Färbelösung je Loch versetzt und die Färbereaktion nach etwa 5 Minuten mit je 50  $\mu$ l Stopplösung abgestoppt. Die Färbung wurde umgehend im ELISA-reader (Tecan) bei 450 nm gemessen.

**Waschpuffer:**

0,05% Tween 20 in PBS

**Blockpuffer:**

1% BSA; 5% Sucrose in PBS

**reagent diluent:**

1% BSA in PBS, sterilfiltriert

**Stopplösung:**

2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

## 5.4. Proteinbiochemische Methoden

### 5.4.1. Herstellung von RIPA-Extrakten

$5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen wurden einmal in 15 ml eiskaltem PBS gewaschen, abzentrifugiert und der Überstand restlos entfernt. Die Zellen wurden anschließend durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in 100  $\mu$ l RIPA-Puffer aufgenommen und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieser Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 20.000 x g für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend bei -80°C gelagert.

#### **RIPA-Puffer:**

1% NP40, 0,5% DOC (Deoxycholin-Essigsäure), 0,15 M NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8,0, 0,1% SDS in H<sub>2</sub>O. Vor Gebrauch wurden 1/25 des Endvolumens Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche) zugesetzt.

### 5.4.2. Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

In 10 großen Zellkulturschalen (14,5 cm) wurden HEK 293T-Zellen so ausgebracht, dass sie am Tag der Transfektion etwa 80% Konfluenz erreicht hatten. Die Vektoren wurden mittels PEI (Tabelle 16) in die Zellen eingebracht und diese für 48 Stunden weiterkultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Medium vom Boden abgespült und nach Zentrifugation bei 950 x g für 5 Minuten in 50 ml UREA-Lysispuffer lysiert. Das Zelllysat wurde bei 6.000 x g für 20 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues 50 ml Falcon pipettiert. Zu dem Überstand wurden 300  $\mu$ l Nickel-NTA-*Beads* (Qiagen) gegeben und für 24 h bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurden die *Beads* für 10 Minuten bei 1.500 x g sedimentiert und der Überstand vollständig entfernt. Die *Beads* wurden dreimal mit je 5 ml UREA-Lysispuffer aus dem Spitzbodenröhrchen gewaschen, in einem 15 ml



Spitzbodenröhrchen gesammelt und für 10 Minuten bei 1.500 x g erneut sedimentiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die über den His-Tag an die Nickel-NTA-*Beads* gebundenen Proteine dreimal mit je 300 µl Elutionspuffer von diesen eluiert. Zwischen den Elutionsschritten wurde jeweils 5 Minuten bei 1.500 x g zentrifugiert. Das eluierte Protein wurde in einem Reaktionsgefäß gesammelt, mit einem Dialyseschlauch (Spectrum) dicht verschlossen und für zwei Tage gegen PBS dialysiert.

**Tabelle 17: Transfektions-Mix**

Name	Zusammensetzung
OPTIMEM (Invitrogen)	15 ml
Plasmid-DNA	45 µg
PEI (1 mg/ml)	67,5 µl

**10 X Polyethylenimine (PEI):**

0,5 g gelöst in 50 ml ddH<sub>2</sub>O, pH 7,0

**UREA-Lysispuffer:**

8 M Harnstoff, 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01 M Tris, 0,05% Tween 20, 20 mM Imidazol, gelöst in dH<sub>2</sub>O, pH 8,0

**Elutionspuffer:**

0,5 M Imidazol in UREA-Lysispuffer, pH 7,5

**5.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Bei dieser Methode wurden Proteine in einem Polyacrylamidgel (PAA-Gel) aufgetrennt, das 0,1% SDS enthielt. Das PAA-Gel bestand aus einem Sammelgel, das der Fokussierung der geladenen Proteine diente und einem Trenngel, das die Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse ermöglichte. Das verwendete 10,5%-ige Trenngel ermöglichte eine Auftrennung von Proteinen im Bereich zwischen 15 und 100 kDa. Die RIPA-Extrakte wurden 4:1 mit dem SDS-Polyacrylamid-

Gelelektrophorese (SDS-PAGE) Ladepuffer gemischt, für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und bis zum Auftragen auf das Gel auf Eis aufbewahrt. Durch den SDS-haltigen Ladepuffer und das Erhitzen kam es zu einer Denaturierung der Wasserstoffbrückenbindungen und somit zu einem Aufbrechen der Sekundär- und Tertiärstrukturen. So wurde gewährleistet, dass die Proteinstruktur das Laufverhalten nicht beeinflusste. Zudem bindet SDS an die Proteine, wodurch sie eine negative Ladung erhalten. Nach dem Beladen des Gels erfolgte die Gelelektrophorese bei 20 mA für ca. 2 Stunden. Durch Coomassie-Färbung oder Western-Transfer-Analyse wurden die aufgetrennten Proteine im Anschluss analysiert.

### **Sammelgel:**

1 ml 30% PAA, 3,75 ml 2 x Tris/SDS pH 6,8, 2,7 ml H<sub>2</sub>O, 45 µl 10% APS, 5 µl TEMED

2 x Tris/SDS pH 6,8:

7,56 g Tris-Base, 2,5 ml 20% SDS pH 6,8, H<sub>2</sub>O ad 250 ml

### **Trenngel (10,5%):**

3,5 ml PAA, 5 ml 2 x Tris/SDS pH 8,8, 1,4 ml H<sub>2</sub>O, 83 µl 10% APS, 8,5 µl TEMED

2 x Tris/SDS pH 8,8:

22,68 g Tris-Base, 2,5 ml 20% SDS, pH 8,8, H<sub>2</sub>O ad 250 ml

### **Elektrophoresepuffer:**

0,125 M Tris-Base, 0,19 M Glycin, 0,5% SDS

### **SDS-PAGE-Ladepuffer:**

200 mM Tris-HCl pH 6,8, 8% SDS, 40% Glycerin, 400 mM DTT, 0,2 mM EDTA/NaOH pH 8,0, 0,4% Bromphenolblau

### **5.4.4. Western-Transfer und Immundetektion**

Zur spezifischen Detektion von Proteinen wurden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (Hybond-P, GE-Healthcare) übertragen. Dies erfolgte in einer durch ein Eisbad gekühlten, mit Transferpuffer gefüllten Transferkammer für 1 h bei 90 Volt. Nach dem Western-Transfer wurde die Membran für 1 Stunde mittels Blockpuffer abgesättigt und anschließend mit dem in

Inkubationspuffer gelösten Primärantikörper über Nacht bei 4°C auf einem Falcon-Roller inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 10 Minuten im Waschpuffer wurde ein HRP-gekoppelter Sekundärantikörper (Schaf-anti-Maus IgG-HRP, GE-Healthcare) hinzugefügt und für 1 Stunde bei RT auf dem Falcon-Roller inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Proteine mittels ECL-Plus-Detektionssystem (GE-Healthcare) und anschließender Autoradiographie detektiert.

**Transferpuffer:**

14 g Glycin, 3 g Tris-Base, 20% Methanol, ad 1 l H<sub>2</sub>O

**Blockpuffer:**

5% Magermilchpulver in PBS

**Inkubations- und Waschpuffer:**

3% Magermilchpulver in PBS

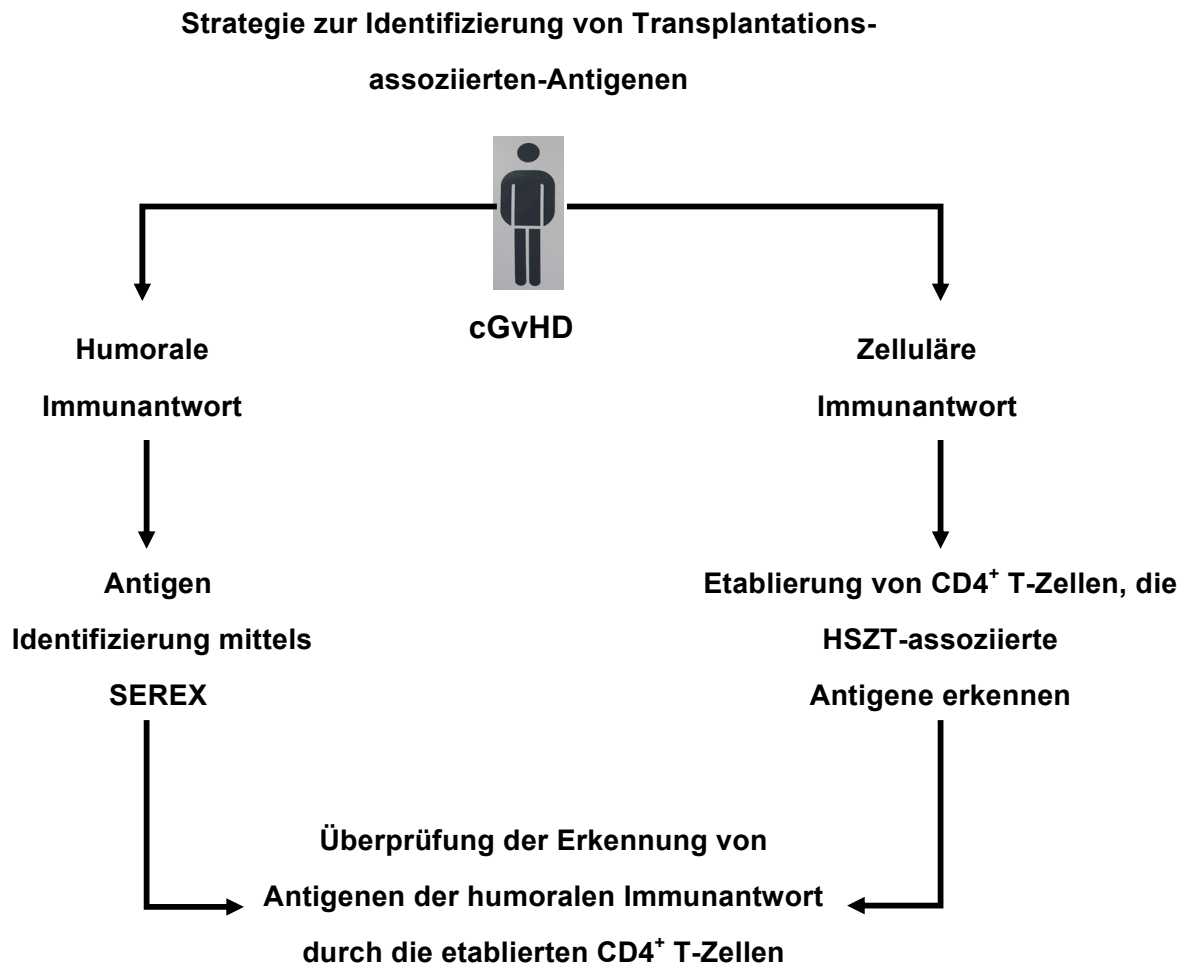
### **5.4.5. Aufkonzentrierung von Proteinen aus Zell-Überstand**

Die Konzentrierung der im Zell-Überstand enthaltenen Proteine erfolgte durch Ultrafiltration. Hierzu wurden Ultrafiltrationseinheiten der Firma Millipore mit einer Molekularausschlußgrenze (MWCO) von 10.000 Da verwendet. Die Zentrifugation erfolgte bei 3.200 x g für 30 Minuten.

## 6. Ergebnisse

### 6.1. Strategie zur Identifizierung von Transplantations-assoziierten Antigenen

Zahlreiche Studien belegen, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei der Entstehung von GvHD nach allogener, hämatopoetischer Stammzelltransplantation eine entscheidende Rolle spielen (van Els *et al.*, 1989; Ray *et al.*, 2010). Zudem sind CD4<sup>+</sup> T-Zellen entscheidend an der Entstehung von GvL Reaktionen beteiligt (Alyea *et al.*, 2001; Bucher *et al.*, 2009). Voraussetzung für die gezielte Verstärkung von GvL- und die Verminderung von GvH-Reaktionen ist daher die Kenntnis von Transplantations-assoziierten Antigenen, die von CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt werden. In früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurde eine gleichzeitige humorale und CD4<sup>+</sup> T-Zell-Antwort gegen mHags in einem Patienten mit akuter GvHD nachgewiesen (Milosevic *et al.*, 2010). Um Hinweise darüber zu erhalten, ob sich die Transplantations-assoziierten Immunantworten während akuter und chronischer GvHD qualitativ und quantitativ unterscheiden, sollten im Rahmen dieser Arbeit diese Untersuchungen auf die chronische GvHD ausgedehnt werden. Dazu sollte in zwei parallelen Ansätzen die Transplantations-assoziierte humorale und zelluläre Immunantwort in einem Patienten, der nach HLA-identischer aHSZT eine chronische GvHD entwickelte, untersucht werden. Zu diesem Zweck sollten zum einen CD4<sup>+</sup> T-Zellen generiert werden, die Transplantations-assoziierte Antigene erkennen und zum anderen die Zielstrukturen der Antikörperantwort mit Hilfe der SEREX-Methode identifiziert werden (Abbildung 3). Um zu klären, ob humorale und zelluläre Immunantworten gegen die gleichen oder gegen unterschiedliche Antigene gerichtet sind, sollte abschließend untersucht werden, ob die etablierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Antigene der Antikörperantwort erkennen.



**Abbildung 3: Strategie zur Identifizierung von Transplantations-assoziierten-Antigenen**

In einem Patienten mit Leukämie, der nach HLA-identischer, allogener Stammzelltransplantation eine chronische GvHD entwickelte, sollte die Transplantations-assoziierte humorale und  $CD4^+$  T-Zell-Immunantwort untersucht werden. Dabei sollten die Zielstrukturen der Antikörperantwort mit Hilfe des SEREX-Verfahrens identifiziert werden. Parallel dazu sollten  $CD4^+$  T-Zellen etabliert werden, die für Transplantations-assoziierte Antigene spezifisch sind. Über die mögliche Erkennung der Antikörperantigene durch  $CD4^+$  T-Zellen sollte anschließend geprüft werden, ob die humorale und zelluläre Immunantwort gegen die gleichen, oder unterschiedliche Antigene gerichtet ist.

---

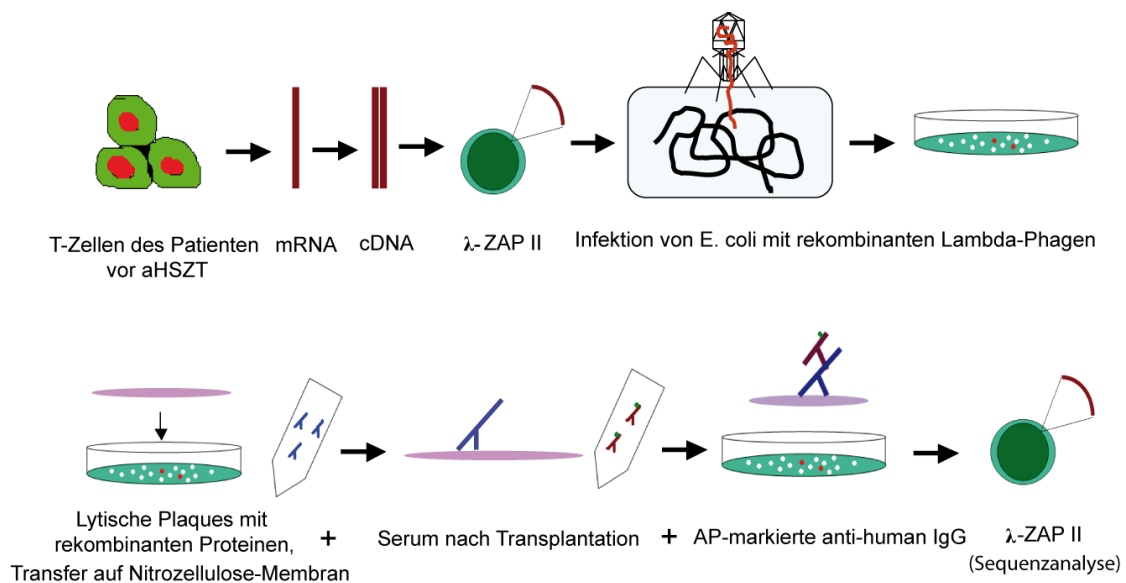
## 6.2. Die humorale Immunantwort nach aHSZT

### 6.2.1. Serologische Identifizierung von mHags

Für die serologische Identifizierung von mHags wurde ein modifiziertes SEREX-Verfahren angewandt (Abbildung 4). Die SEREX-Methode beruht auf der Erkennung von Antigenen in einer in Bakterien exprimierten cDNA-Bibliothek durch hochtitrige IgG Antikörper im Serum des Patienten. Diese Antikörper werden wiederum von mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörpern erkannt und gebunden. Eine Schwierigkeit bei der Identifizierung von Antigenen mit der SEREX-Methode ist die B-Zell-Kontamination des Patientengewebes, aus dem die cDNA-Expressionsbibliothek konstruiert wird. B-Zellen enthalten mRNA, die für Immunglobuline codieren, welche nach Expression in Bakterien zu falsch positiven Signalen führen. Deshalb kamen weder Knochenmark noch PBMC als Ausgangsmaterial für die cDNA Bibliothek in Frage. Stattdessen wurden T-Zellen des Patienten vor aHSZT als Ausgangsmaterial für die cDNA-Bibliothek verwendet. Dazu wurden PBMC mit dem T-Zellmitogen Phytohämagglutinin stimuliert, was zu einer sehr starken Proliferation und Expansion der T-Zellen führte (Abschnitt 5.3.5.). Nach insgesamt vier Stimulationszyklen konnte eine reine T-Zellpopulation gewonnen werden. Aus den T-Zellen wurde mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und in den  $\lambda$ -ZAP-II-Expressionsvektor kloniert. Danach wurde die Expressionsbibliothek in  $\lambda$ -Phagen verpackt und damit *E. coli* Bakterien infiziert. Die Expression der einklonierten cDNAs wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Insgesamt wurden  $2,1 \times 10^6$  rekombinante Phagen mit Serum des Patienten untersucht. Das Serum wurde 11 Monate nach aHSZT entnommen und gegen Bakterien und  $\lambda$ -Phagenproteine (Abschnitt 5.2.2.) präabsorbiert. Insgesamt wurden drei seroreaktive Plaques detektiert (Abbildung 5). Um zu überprüfen, ob die Immunreaktionen gegen mHags gerichtet waren, wurde eine autologe Serumanalyse durchgeführt. Dazu wurden die seropositiven Phagen erneut ausplattiert und mit Serum des Spenders und des Patienten vor Transplantation inkubiert. Wie in Abbildung 5 gezeigt, waren Antikörper

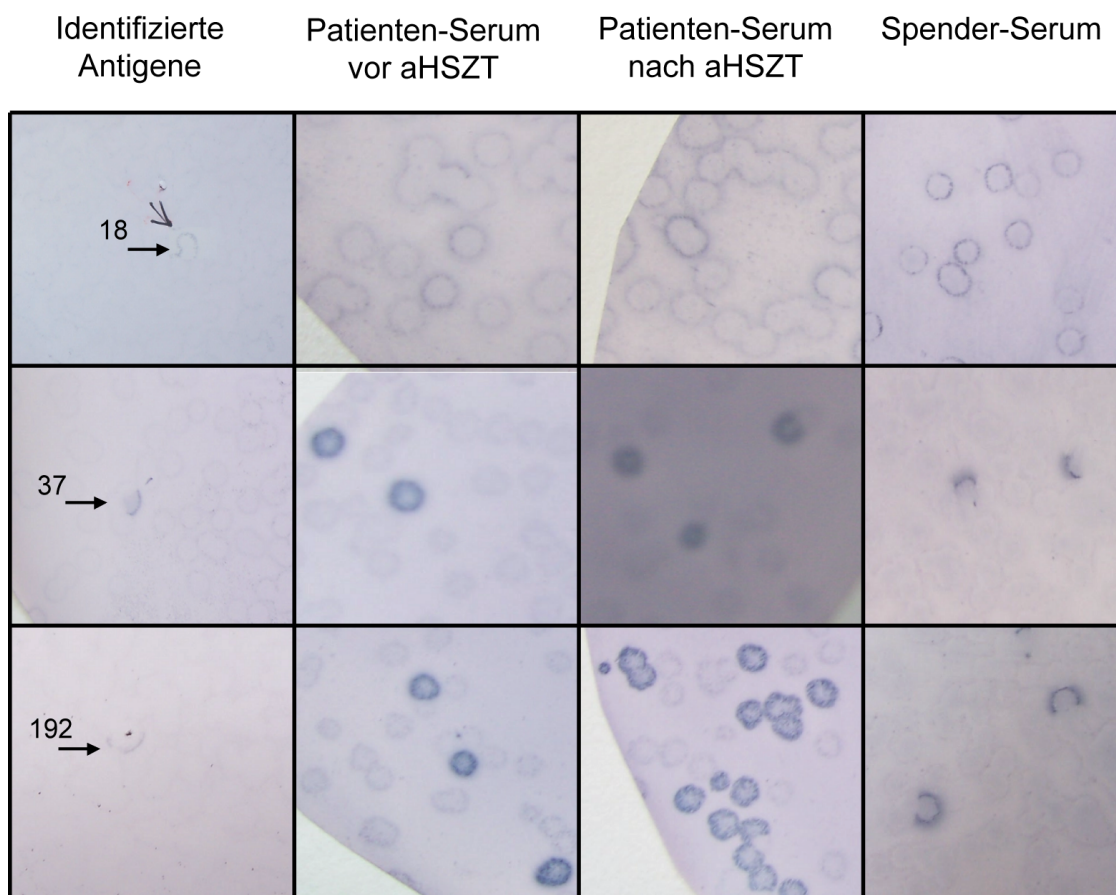
gegen alle drei Antigene „18“, „37“ und „192“ auch im Serum des Patienten vor Transplantation sowie im Serum des Spenders vorhanden. Die humoralen Immunantworten gegen diese Antigene waren somit Transplantations-unabhängig und es handelte sich dabei nicht um mHags sondern um Autoantigene. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass im Patienten trotz cGvHD keine Antikörper-Immunantworten gegen mHags nachweisbar waren.

Die serologisch identifizierten Antigene „18“ und „37“ wurden mittels Sequenzanalysen charakterisiert. Die Sequenzanalysen zeigten, dass das Antigen „18“ eine 100%ige Sequenzhomologie zum Gen *Sorting nexin 1* (SNX1) hat, während das Antigen „37“ eine Sequenzhomologie zu *Escherichia coli* zeigte. Das Antigen „192“ wurde nach der autologen Serumanalyse nicht weiter charakterisiert.



**Abbildung 4: Antigen-Identifizierung mittels SEREX-Methode**

Aus T-Zellen des Patienten vor Transplantation wurde mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben, in den Expressionsvektor λ-ZAP II kloniert und in λ-Phagen verpackt. Die Proteine der cDNA Bank wurden nach lytischer Infektion in *E. coli* Bakterien exprimiert und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Anschließend wurden die Membranen mit dem Serum des Patienten nach Transplantation inkubiert. Im Serum vorhandene Antikörper erkannten dabei das immobilisierte Antigen und konnten mittels enzymatischer Reaktion durch einen alkalische Phosphatase (AP) gekoppelten Sekundäntikörper (anti-human IgG) nachgewiesen werden. Die seropositiven Phagen wurden vereinzelt und die enthaltene cDNA sequenziert.



**Abbildung 5: Serumanalyse der identifizierten Antigene** Von insgesamt  $2,1 \times 10^6$  untersuchten, rekombinanten Phagen codierten drei („18“, „37“ und „192“) für ein seroreaktives Protein. Jedoch waren nicht nur im Patientenserum nach aHSZT, sondern bereits im Serum vor Transplantation sowie im Serum des Knochenmark-Spenders Antikörper gegen diese Antigene vorhanden. Die humoralen Immunantworten gegen diese Antigene waren somit Transplantations-unabhängig entstanden.



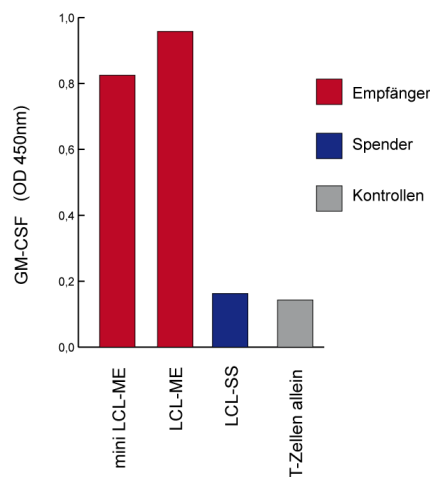
### 6.3. Die zelluläre Immunantwort nach aHSZT

#### 6.3.1. Generierung mHags-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien

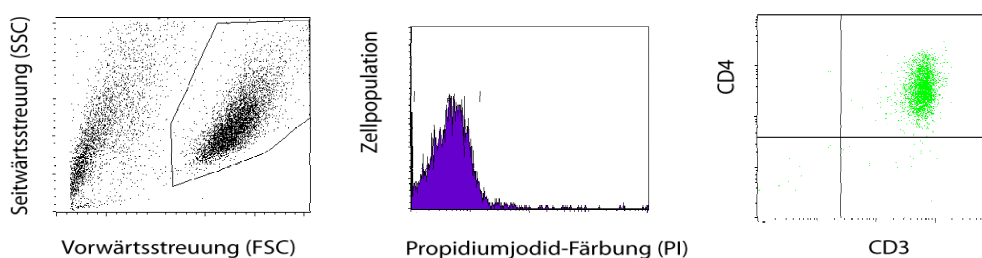
Für diese Untersuchungen stand klinisches Material einer pädiatrischen Patientin mit akuter lymphatischer Leukämie (c-ALL) zur Verfügung. Nach erfolgreicher Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen ihrer HLA-identischen Schwester entwickelte die Patientin zunächst eine akute und anschließend eine chronische GvHD. Der Patientin wurde vor und nach Transplantation PBMC und Serum entnommen. Aus den vor Transplantation entnommenen PBMC wurden mini-LCL- und LCL etabliert (Abschnitt 5.3.4) und als „mini-LCL-ME“ und „LCL-ME“ bezeichnet. Zusätzlich wurde eine weitere LCL aus PBMC des Spenders generiert (LCL-SS). Um CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu etablieren, die Transplantations-assoziierte Antigene erkennen, wurden periphere T-Zellen der Patientin, die 1, 2 und 2,5 Jahre nach Transplantation entnommen worden waren, wiederholt mit mini-LCL ME *in vitro* stimuliert (Abschnitt 5.3.6.). Um dabei das Auswachsen FCS-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu verhindern, wurden die zur Stimulation eingesetzten mini-LCL in Medium mit humanem Serum kultiviert. Dabei wurden  $1 \times 10^6$  PBMC der Patientin nach aHSZT mit  $1 \times 10^6$  bestrahlten mini-LCL ME in einem Loch einer 24-Loch-Platte in 2 ml T-Zell-Medium kokultiviert. Nach 24 Stunden wurden 10 U/ml IL-2 zugesetzt. In Abhängigkeit von der Zelldichte wurden die T-Zellen gesplittet und nach 10 Tagen auf dieselbe Art restimuliert. Um eine möglichst reine CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation zu erhalten, wurden diese T-Zellen aus den Linien mit Hilfe von anti-CD4-*Microbeads* und der MACS-Methode (Abschnitt 5.3.8.) isoliert und weiter kultiviert. Die T-Zell-Spezifität gegen Transplantations-assoziierte Antigene wurde mittels ELISA untersucht (Abschnitt 5.3.10). Durch die Stimulation mit mini-LCL des Patienten wurden T-Zellen aktiviert die gegen mHags, EBV-, oder Autoantigene gerichtet waren. Eine Unterscheidung dieser verschiedenen Spezifitäten war durch Verwendung von mini-LCL-ME, LCL-ME und LCL-SS als Zielzellen möglich. Eine Erkennung von allen drei Zielzellen wies darauf hin, dass Latenzantigene von EBV, oder Autoantigene erkannt wurden. Kam es

hingegen zu keiner Erkennung von mini-LCL-ME, deutete dies auf die Erkennung von lytischen EBV-Antigenen hin. Eine Erkennung von mini-LCL-ME und LCL-ME, nicht aber LCL-SS, wies dagegen auf die Erkennung von mHags hin. Um CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einer Spezifität für Transplantations-assoziierte Antigene zu erhalten, wurden die T-Zellen, die eine höhere Reaktivität gegen LCL des Patienten *versus* LCL des Spenders zeigten, weiter kultiviert. Aus den drei angelegten CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien wies nur die CD4<sup>+</sup> T-Zelllinie III die erwartete Spezifität auf (Abbildung 6A). Dass es sich dabei hauptsächlich um CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulationen handelte, wurde durch FACS-Analysen bestätigt (Abbildung 6B).

A)



B)

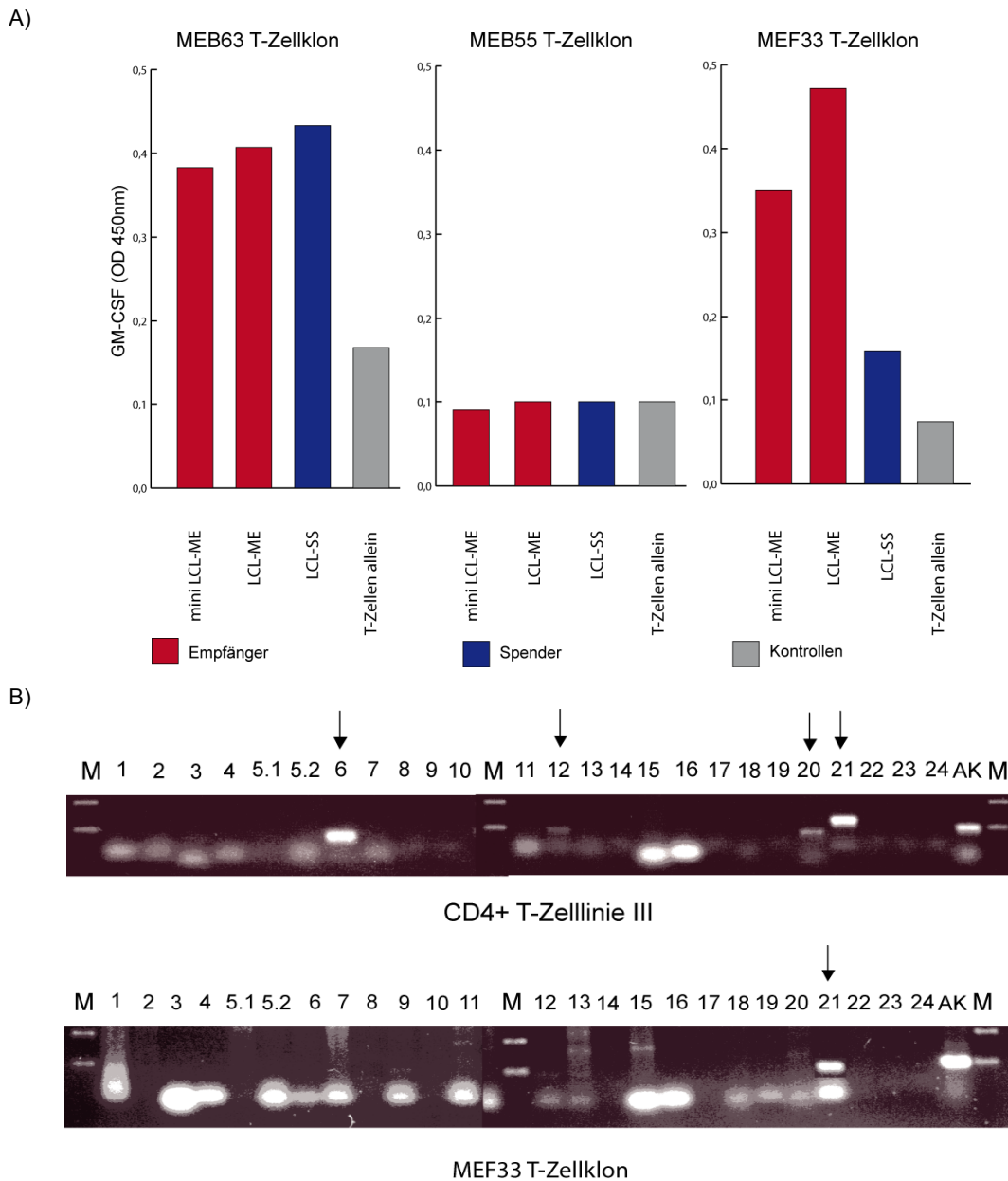


**Abbildung 6: Untersuchung der Spezifität der CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien**

(A) Die mHags-spezifische Reaktivität der T-Zelllinie (III) wurde durch Kokultur mit autologen LCL des Patienten sowie mit LCL des Spenders mittels GM-CSF ELISA bestimmt. Die CD4<sup>+</sup> T-Zelllinie (III) erkannte die LCL des Patienten (ME) deutlich besser als die LCL des Spenders (SS). (B) Die CD4<sup>+</sup> T-Zelllinie (III) wurde durch Färbung mit Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD3 und CD4 genauer charakterisiert. Das Histogramm links zeigt, dass es sich in der Zellpopulation um Lymphozyten handelt. Das Histogramm in der Mitte zeigt, dass die meisten Zellen zum Zeitpunkt der Messung Propidiumjodid-negativ und damit lebendig waren. Das Histogramm rechts veranschaulicht, dass es sich um CD4<sup>+</sup> T-Zellen handelte.

### 6.3.2. Generierung mHags-spezifischer T-Zellklone

Aus der potentiell mHags-spezifischen T-Zelllinie III wurden durch Einzelzellklonierung T-Zellklone generiert (Abschnitt 5.3.7). Insgesamt konnten 36 T-Zellklone isoliert, expandiert und ihre Spezifität untersucht werden (Abbildung 7). Dabei wurden drei unterschiedliche Spezifitäten beobachtet. Die erste Gruppe der T-Zellklone, zu der auch der Klon MEB63 gehörte, zeigte eine Spezifität gegen ein EBV- oder Autoantigen (Abbildung 7A). Die zweite Gruppe, für die stellvertretend der T-Zellklon MEB55 gezeigt ist, sezernierte dagegen weder GM-CSF noch  $IFN\gamma$  nach Ko-Kultur mit den verschiedenen LCL. Da diese T-Zellen auch keine typischen Th2 oder Th17 Zytokine sezernierten, konnte bislang keine Aussage über deren Spezifität gemacht werden. Die dritte Gruppe, zu der beispielhaft der T-Zellklon MEF33 zählte, zeigte ein Reaktionsmuster, das auf eine Erkennung von mHags schließen ließ (Abbildung 7A). Nur T-Zellklone mit diesem Erkennungsmuster wurden weiterkultiviert und charakterisiert. Die T-Zellrezeptor (TZR)-V $\beta$ -Kettenanalyse (Abschnitt 5.1.2.3.) zeigte (Abbildung 7B), dass sowohl die CD4<sup>+</sup> T-Zelllinie III als auch der Klon MEF33 die V $\beta$ -21-Kette exprimierten. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass es sich bei den MEF33-T-Zellen um einen Klon handelte.



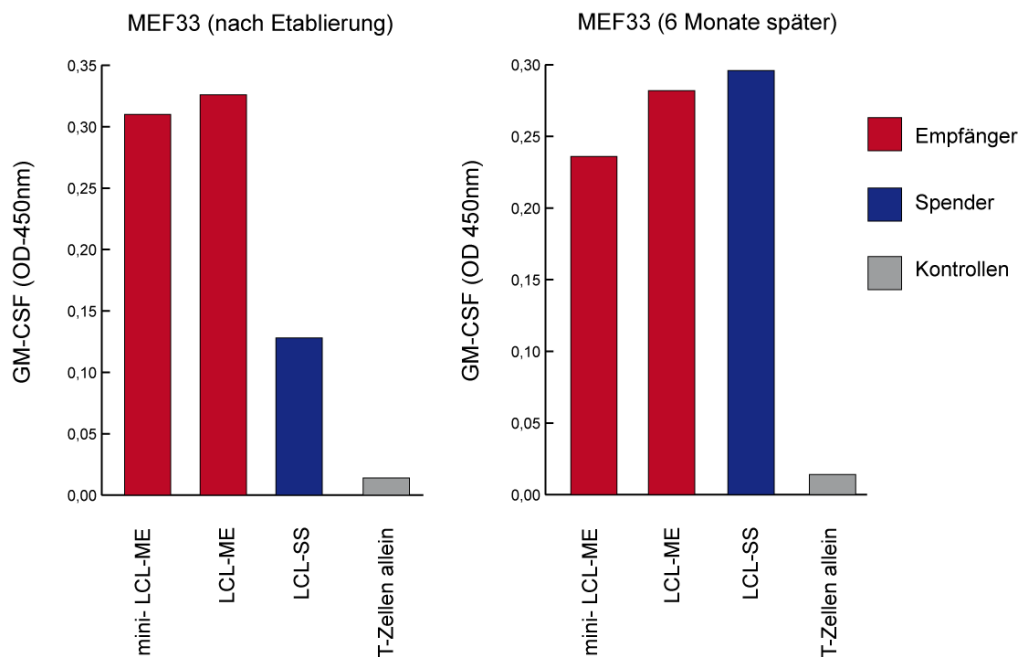
**Abbildung 7: Charakterisierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellklone**

(A) Die Spezifität der generierten T-Zellklone wurde über die Messung der GM-CSF Ausschüttung nach Kokultur mit verschiedenen Zielzellen untersucht. Die Klone zeigten dabei drei Erkennungsmuster: Klon MEB63 reagierte gegen LCL und mini-LCL des Patienten (LCL-ME und miniLCL-ME) ebenso wie gegen LCL des Spenders (LCL-SS). Dieser Klon erkannte vermutlich ein EBV- oder Autoantigen. Die Spezifität des Klons MEB55 blieb unbekannt, da diese T-Zellen kein GM-CSF nach Kokultur mit den Zielzellen ausschütteten. Klon MEF33 zeigte ein für mHags-spezifische T-Zellen typisches Erkennungsmuster. Diese T-Zellen erkannten die LCL des Patienten, aber kaum die LCL des Spenders. (B) Nachweis der Monoklonalität des CD4<sup>+</sup> T-Zellklons MEF33 mit Hilfe einer Analyse des TZR-V $\beta$ -Repertoires. Die V $\beta$ -Kette 21 wurde sowohl von der mHags-spezifischen T-Zelllinie III als auch vom Klon MEF33 exprimiert.

---

### 6.3.3. Veränderung der Antigenerkennungsmuster bei mHags-spezifischen T-Zellklonen

Nach längerer *in vitro* Kultur der mHags-spezifischen T-Zellklone wurde eine Veränderung im Erkennungsmuster beobachtet. Die T-Zellklone erkannten zunehmend die LCL des Spenders in gleichem Ausmaß und teilweise sogar stärker als die LCL und mini-LCL des Patienten (Abbildung 8). Diese Beobachtung stellte die bisherige Annahme einer mHags-Spezifität der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Frage. Diese Änderungen im Reaktivitätsmuster konnten verschiedene Ursachen haben. Erstens war nicht auszuschließen, dass es sich bei den ursprünglichen „Klonen“ um Gemische verschiedener T-Zellen handelte, und die ursprünglich dominante mHags-spezifische T-Zellkomponente durch die kontinuierliche *in vitro* Kultur von EBV- oder Autoantigen-reaktiven T-Zellen überwachsen wurde. Dagegen sprach, dass in den TZR V $\beta$  Analysen nur eine V $\beta$  Kette detektiert worden war und die gleiche V $\beta$  Kette von den T-Zellen einer späteren Passage ebenfalls exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt). Wahrscheinlicher war deshalb, dass es sich bei dem erkannten Antigen nicht um ein mHag im klassischen Sinne handelte, sondern womöglich um ein Autoantigen, das in verschiedenen Zielzellen unterschiedlich hoch exprimiert wurde, und dessen Expression in einer Zelllinie über die Zeit variieren kann. Demnach wäre die Expression des Antigens in den LCL des Spenders zum Zeitpunkt der Klonierung der T-Zellen niedrig gewesen und im Lauf der Zeit auf das Niveau der Patienten LCL angestiegen.



**Abbildung 8: Verändertes Antigen-Erkennungsmuster nach längerer *in vitro* Kultur der T-Zellen**

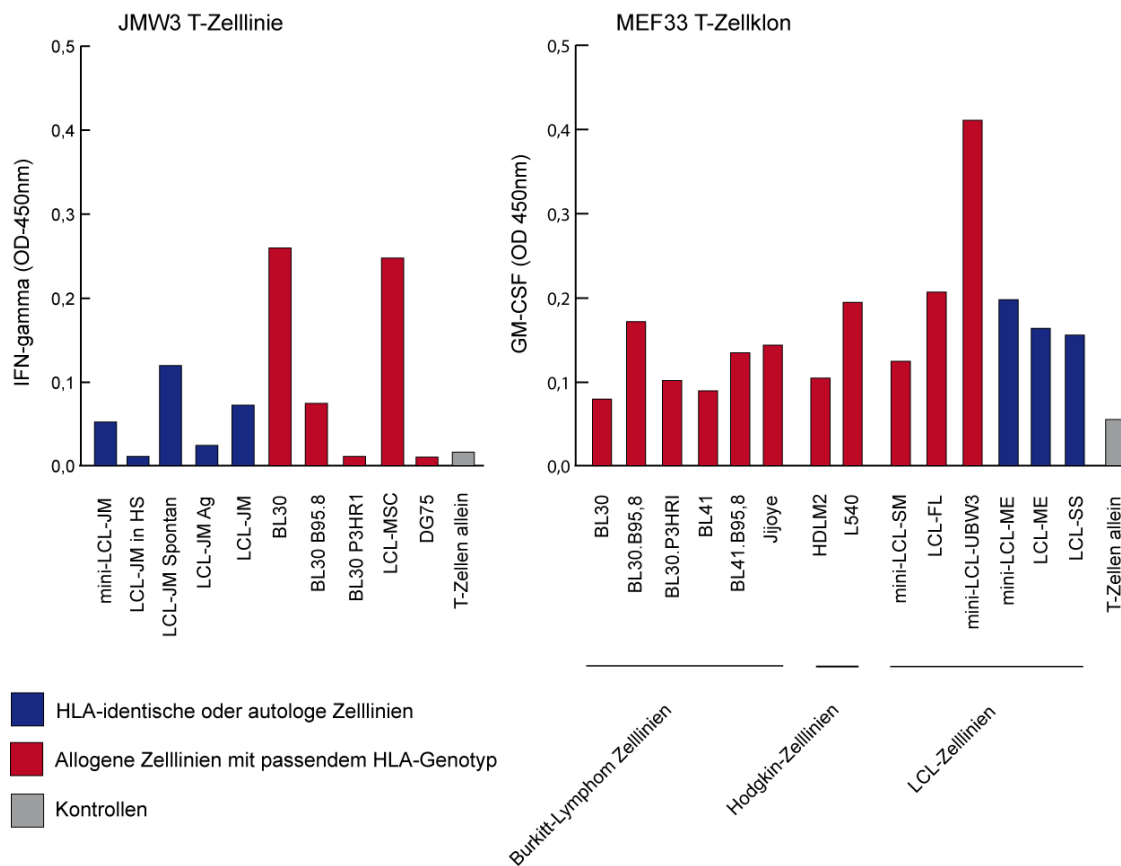
Nach 6 Monaten kontinuierlicher *in vitro* Kultur des vermeintlich mHags-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellklons MEF33 wurden die LCL des Spenders genauso gut erkannt wie die LCL des Patienten. Somit wies dieser T-Zellklon das gleiche Antigen-Erkennungsmuster auf wie autoreaktive T-Zellen.

## 6.4. Charakterisierung von potentiellen Autoantigenen

Autoreaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden bereits von verschiedenen Gruppen in peripherem Blut gesunder Spender nachgewiesen (Zhao *et al.*, 2011). In früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurden nach Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit autologen LCL ebenfalls T-Zellen isoliert, die neben EBV-positiven auch EBV-negative Tumorzelllinien, wie zum Beispiel Burkitt- oder Hodgkin-Lymphom Zelllinien erkannten und somit gegen zelluläre und nicht-virale Antigene gerichtet waren (Adhikary *et al.*, 2007). Auch andere Forschungsgruppen kamen zu vergleichbaren Erkenntnissen (Gudgeon *et al.*, 2005; Long *et al.*, 2009).

Ein ähnliches Erkennungsmuster wurde bei mehreren, in unserem Labor etablierten CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien beobachtet. Diese wurden durch Stimulation mit autologen mini-LCL aus gesunden, EBV-positiven Spendern generiert. Wie am Beispiel der CD4<sup>+</sup> T-Zelllinie JMW3 gezeigt (Abbildung 9), erkannten diese Linien auch EBV-negative

Zielzellen, was eine EBV-Reaktivität ausschloss. In diesem Beispiel erkannte die T-Zelllinie die EBV-negative Burkitt-Lymphom-Zelllinie BL30. Interessanterweise wurden die von dieser Zelllinie abgeleiteten, nachträglich mit zwei verschiedenen EBV-Stämmen infizierten Zelllinien BL30-B95.8 und BL30-P3HR1 deutlich schlechter erkannt. Zusätzlich zeigte sich ein Unterschied im Antigen-Erkennungsmuster verschiedener autologer LCL, die zu verschiedenen Zeitpunkten vom Spender JM angelegt worden waren (Abbildung 9). So wurde die LCL-JM-spontan Zelllinie deutlich besser erkannt als mini-LCL-JM und LCL-JM. Die LCL-JM-Ag (transformiert mit dem EBV-Stamm Ag876) sowie LCL-JM in HS (kultiviert in Medium mit humanem Serum statt FCS) wurden dagegen kaum erkannt. Dies wies auf eine unterschiedliche Expression von Autoantigenen in verschiedenen Zellen eines Individuums hin. Auch der MEF33 T-Zellklon zeigt ein ähnliches Erkennungsmuster. Sowohl EBV-negative (z.B. die Hodgkin-Lymphomlinie L540) als auch EBV-positive Zielzellen (z.B. LCL-UBW3) wurden in unterschiedlichem Maße, und zum Teil besser als die autologen LCL-ME erkannt. Diese Ergebnisse lieferten weitere Hinweise darauf, dass die MEF33 T-Zellen nicht ein mHag, sondern ein Autoantigen erkannten.



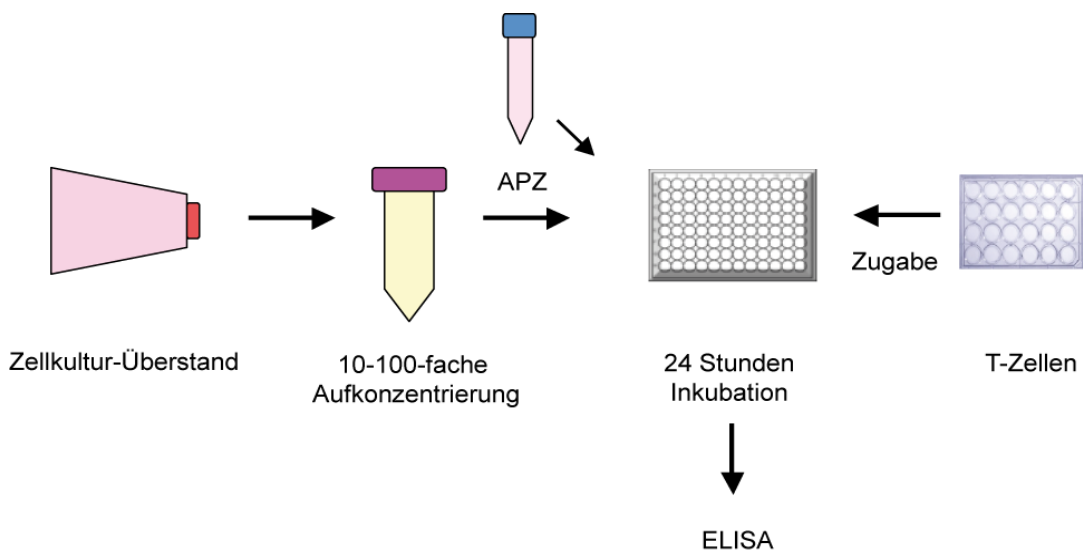
**Abbildung 9: Vergleich der Antigen-Erkennungsmuster des MEF33 T-Zellklons und der autoreaktiven JMW3 T-Zelllinie**

Das Antigen-Erkennungsmuster der autoreaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zelllinie JMW3 und des MEF33 T-Zellklons wurden nach Kokultivierung mit verschiedenen autologen und allogenen B-Zelllinien, die das jeweils restringierende HLA-Allel exprimierten, mittels IFN $\gamma$  und GM-CSF ELISA bestimmt. Die JMW3 T-Zellen erkannten unterschiedliche LCL des autologen Spenders JM in unterschiedlichem Maße. Die Zelllinien LCL-JM und -JM-spontan wurden besser erkannt als die mini-LCL-JM. Die Linien LCL-JM in HS und LCL-JM-Ag wurden hingegen kaum erkannt. Dagegen wurde die EBV-negative Burkitt-Lymphom Zelllinie BL30 deutlich besser erkannt als die EBV-positiven Konvertanten BL30.B95.8 und BL30.P3HR1. Der MEF33 T-Zellklon zeigte ein ähnliches Erkennungsmuster. Auch hier unterlag die Erkennung von Zielzellen-unabhängig vom EBV-Status-deutlichen Schwankungen. So wurden einige Linien deutlich besser oder schlechter erkannt als die autologen LCL ME. Da auch EBV-negative Zielzellen, wie beispielsweise L540, erkannt wurden, wurde kein Virus-assoziiertes Antigen erkannt, sondern vermutlich ein Autoantigen, das in unterschiedlichen Zelllinien unterschiedlich hoch exprimiert wurde.



### 6.4.1. Bestimmung der Autoantigenform

Auffällig bei den meisten autoreaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen war die zum Teil sehr gute Erkennung von Zielzellen. Da Antigene, die auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden, hauptsächlich von exogenen oder Zellmembranproteinen stammen, wurde untersucht, ob es sich bei den Autoantigenen um sezernierte Proteine handelte. Zu diesem Zweck wurde der Überstand einer dichten LCL-Kultur abgenommen und mit Hilfe von Amicon-Säulen die Proteine im Überstand (ÜS) 10- bis 100-fach aufkonzentriert (Abbildung 10).

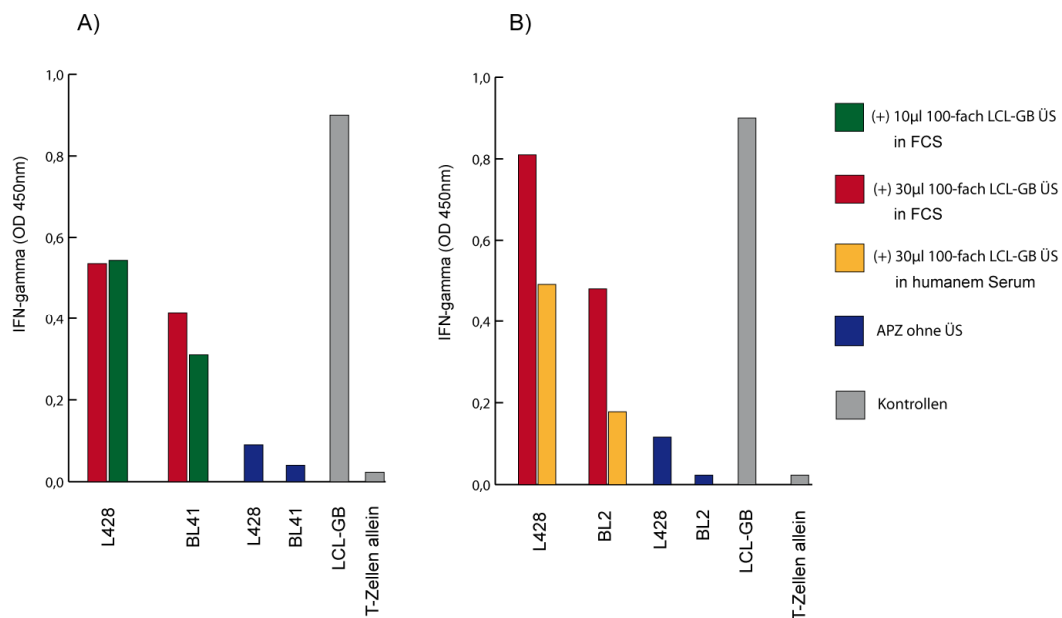


**Abbildung 10: Schematische Darstellung des Nachweises der Antigene im Kulturüberstand**

Der Zellkultur-Überstand wurde gesammelt, mit Amicon-Säulen (Ausschlussgrenze von 10 kDa) auf maximal 1/100 des Ausgangsvolumens eingengt, unterschiedliche Mengen des Überstands für 24 Stunden auf APZ beladen und diese anschließend mit den autoreaktiven T-Zellen für 20 Stunden kokultiviert. Anschließend wurde die Menge an freigesetztem IFN $\gamma$  mittels ELISA bestimmt.

Das Zellüberstandkonzentrat wurde in unterschiedlichen Volumina auf APZ beladen und für 24 Stunden inkubiert. Als APZ dienten in der Regel autologe LCL, die nicht oder kaum von T-Zellen erkannt wurden, wie am Beispiel LCL-JM zu erkennen ist. Danach wurden  $1 \times 10^5$  T-Zellen zugegeben und nach 20 Stunden Inkubation die Zytokinausschüttung der T-Zellen mittels ELISA bestimmt. Wie in Abbildung 11A gezeigt, wurden die mit Überstand beladenen, nicht aber die unbeladenen Zielzellen

L428 und BL41 von den autoreaktiven GBW3 T-Zellen erkannt. Dies deutete darauf hin, dass das Autoantigen im Zellkultur-Überstand vorlag. Um eine mögliche FCS-Reaktivität der T-Zellen auszuschließen, wurden die GB-LCL für 14 Tage in Medium mit humanem Serum kultiviert, anschließend der Zellkultur-Überstand gesammelt und nach dessen Aufkonzentrierung eine mögliche Erkennung durch autoreaktive T-Zellen mittels  $\text{IFN}_\gamma$  ELISA untersucht (Abbildung 11B). Da auch der FCS-freie, aufkonzentrierte Kulturüberstand erkannt wurde, konnte eine FCS-Reaktivität der T-Zellen ausgeschlossen werden. Dies deutete darauf hin, dass die GBW3  $\text{CD4}^+$  T-Zelllinie ein sezerniertes Autoantigen erkannte.

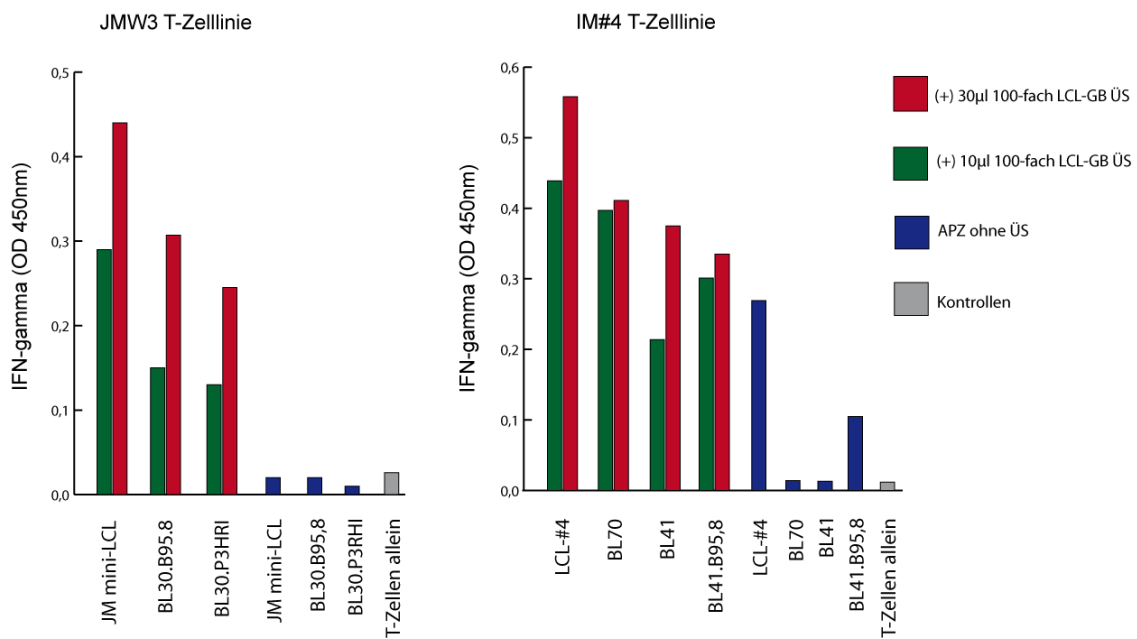


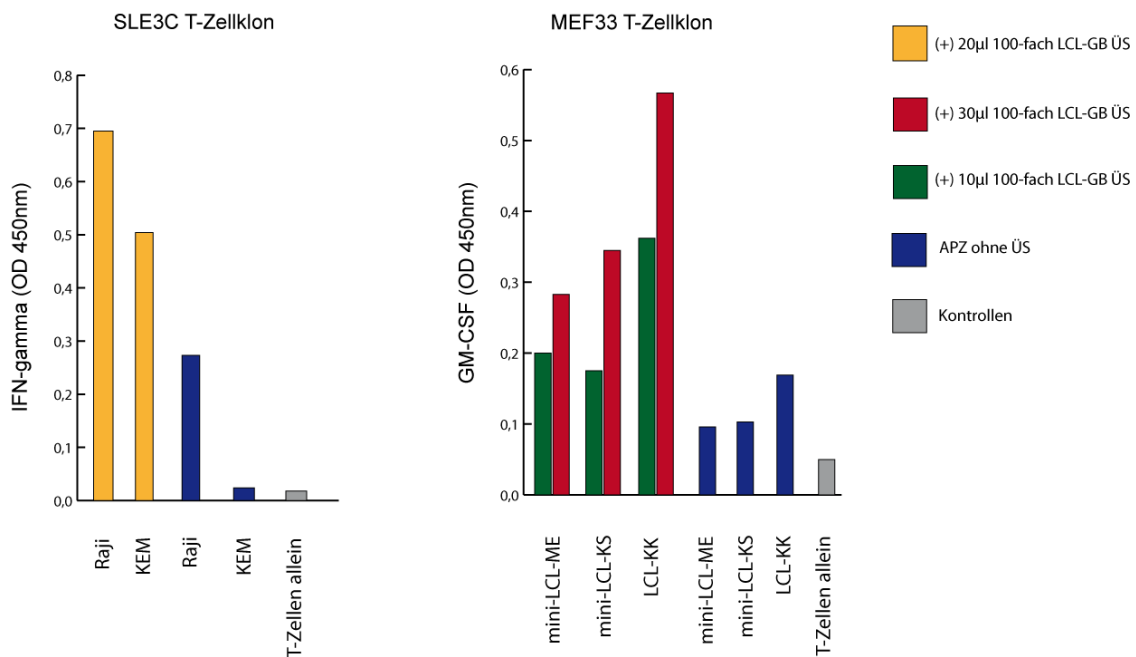
**Abbildung 11: Nachweis des Autoantigens im Überstand der LCL-GB Zelllinie**

(A) Die Zielzellen L428 und BL41 wurden mit 100-fach eingengtem LCL-GB-Zellkultur-Überstand beladen und nach 24 Stunden mit den GBW3 T-Zellen für 20 Stunden kokultiviert. Die Reaktivität der GBW3 T-Zellen wurde anhand des ausgeschütteten  $\text{IFN}_\gamma$  mittels ELISA bestimmt. Die Zielzellen wurden im beladenen Zustand sehr gut von GBW3 T-Zellen erkannt, aber nicht oder kaum im unbeladenen Zustand. Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass das Antigen ins Zellkultur-Medium abgegeben wurde. (B) Um auszuschließen, dass die T-Zellen gegen FCS-Bestandteile reagierten, wurde die Zelllinie LCL-GB sowohl in FCS-haltigem als auch in Medium mit humanem Serum kultiviert. Diese Zellkultur-Überstände wurden gesammelt, eingengt und auf BL2 und L428 Zielzellen geladen, die das restringierende HLA-Allel exprimieren, aber von T-Zellen nicht oder kaum erkannt wurden. 24 Stunden später wurden die T-Zellen zugesetzt und nach weiteren 20 Stunden die Menge an sezerniertem  $\text{IFN}_\gamma$  im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Die T-Zellen erkannten auch Zielzellen, die mit FCS-freiem Kulturüberstand beladen worden waren. Diese Ergebnisse zeigten, dass diese T-Zell-Erkennung nicht FCS-spezifisch war, sondern ein Autoantigen erkannt wurde.

### 6.4.2. Erkennung von Autoantigenen durch unterschiedliche CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien und Klone

In der Vergangenheit wurden in unserer Arbeitsgruppe mehrere Autoantigen-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien und Klone von unterschiedlichen Spendern etabliert. Um herauszufinden, ob diese T-Zellen im Vergleich zu den GBW3 T-Zellen das gleiche oder unterschiedliche Autoantigene erkannten, wurde zunächst aufkonzentrierter Überstand der LCL-GB auf autologe antigenpräsentierende Zellen beladen und die mögliche Erkennung durch die verschiedenen CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien und T-Zellklone mittels ELISA bestimmt (Abbildung 12). Alle getesteten T-Zellen, einschließlich der ursprünglich als mHags-spezifisch identifizierten T-Zellklone des Patienten mit cGvHD, erkannten die jeweiligen Zielzellen nach Beladung mit dem LCL-GB-Überstand.





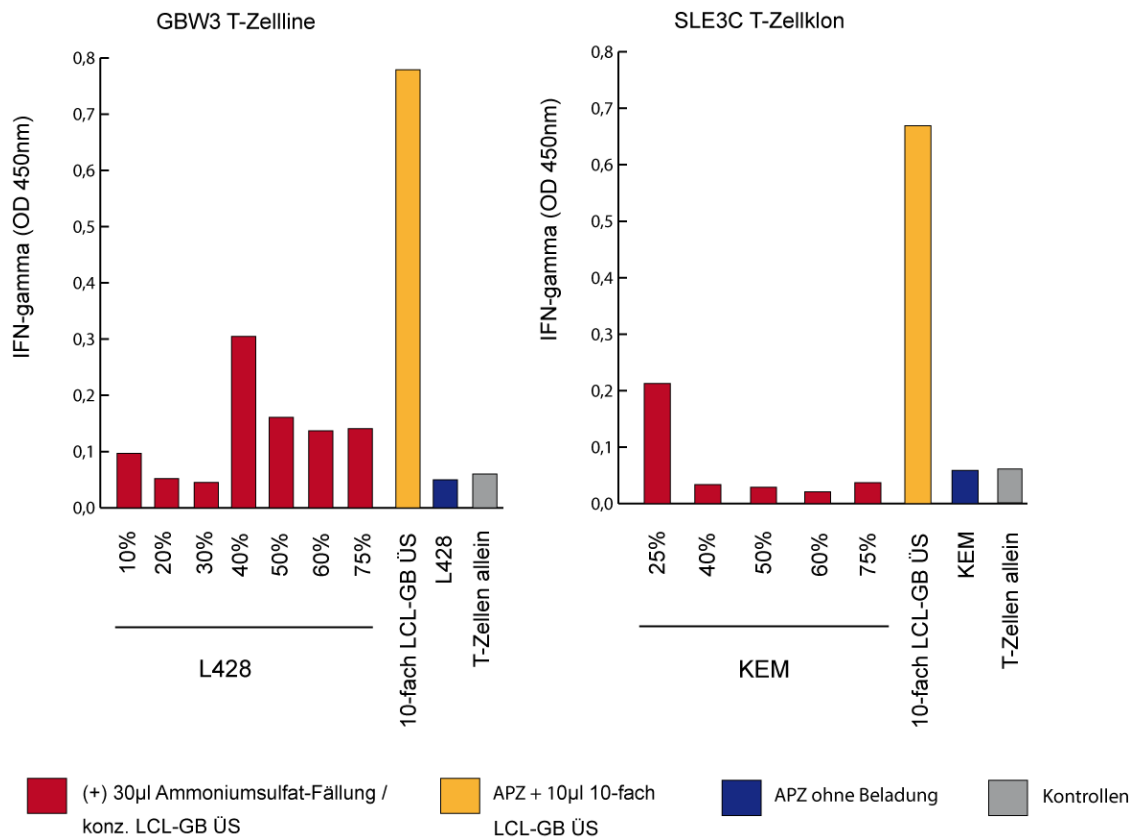
**Abbildung 12: Erkennung des Überstands der LCL-GB durch verschiedene, autoreaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Der 100-fach aufkonzentrierte Zellkultur-Überstand der LCL-GB wurde auf APZ beladen, die das entsprechende Restriktionselement exprimierten und anschließend mit den verschiedenen, autoreaktiven T-Zellen kokultiviert. Eine Erkennung der Zielzellen durch die T-Zellen wurde über die Messung der Zytokinfreisetzung bestimmt. Alle getesteten T-Zellen erkannten Überstand-beladene Zielzellen.

### 6.4.3. Proteinaufkonzentrierung durch Ammoniumsulfatfällung

Um zu untersuchen, ob es sich dabei um das gleiche oder unterschiedliche Antigene handelte, wurde durch Zugabe steigender Mengen an gesättigter Ammoniumsulfatlösung (0,75 g/ml) zu 1 ml hoch konzentriertem Zellkultur-Überstand und anschließender Zentrifugation bei 8.000 x g für 10 Minuten eine sequentielle Fällung der im Überstand enthaltenen Proteine durchgeführt. Die gefällten Proteine wurden in 100 µl PBS gelöst und in unterschiedlichen Volumina auf APZ beladen. Am nächsten Tag wurden die autoreaktiven T-Zellen zugegeben. Die Antigenerkennung der T-Zellen wurde wiederum mittels ELISA bestimmt (Abbildung 13). Hierbei konnte festgestellt werden, dass die T-Zellen unterschiedliche Autoantigene im LCL-GB-Überstand erkannten. Das von den GBW3 T-Zellen erkannte Antigen begann bei ab

40% Ammoniumsulfat auszufallen, das von den SLE3C T-Zellen erkannte Antigen bereits bei einer Konzentration von 25%.



**Abbildung 13: Verschiedene autoreaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkennen unterschiedliche Antigene im Überstand von LCL-GB**

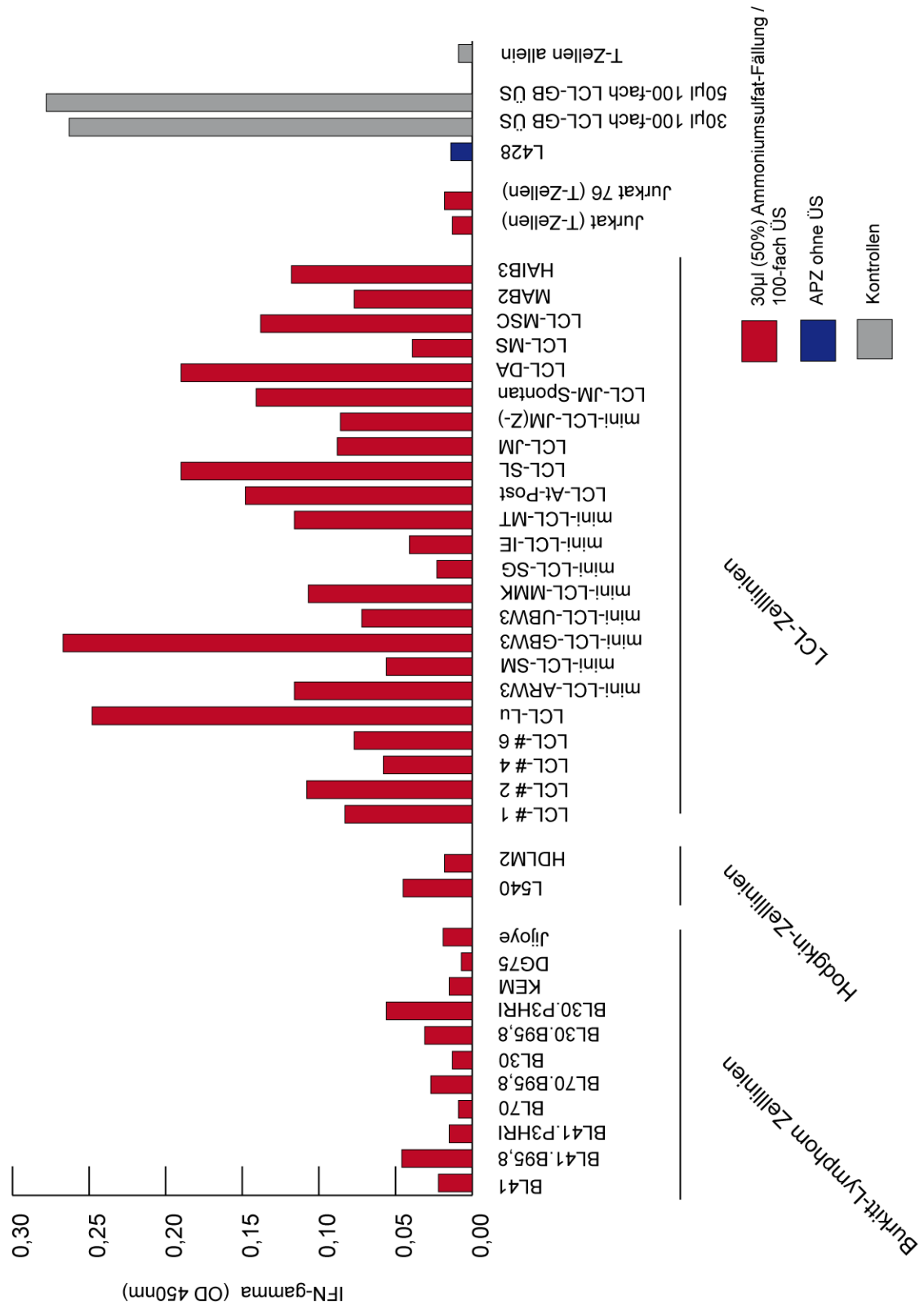
Die Proteine im Überstand (ÜS) der GB-LCL Zelllinie wurden durch sequentielle Zugabe einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung (0,75 g/ml) in unterschiedliche Fraktionen getrennt und diese einzeln auf APZ beladen. Die Spezifität der autoreaktiven T-Zelllinie GBW3 und des SLE3C T-Zellklons wurde mittels IFN $\gamma$  ELISA nachgewiesen. Das von den GBW3 T-Zellen erkannte Antigen war bei 40% Ammoniumsulfat ausgefallen, während das vom CD4<sup>+</sup> T-Zellklon SLE3C erkannte Antigen bereits bei einer Ammoniumsulfat-Konzentration von 25% ausfiel. Das Ergebnis zeigte, dass diese zwei T-Zellpopulationen unterschiedliche Antigene erkannten, die beide im Überstand der LCL-GB vorhanden waren.

#### 6.4.4. Zelltyp-spezifische Expression von Autoantigenen

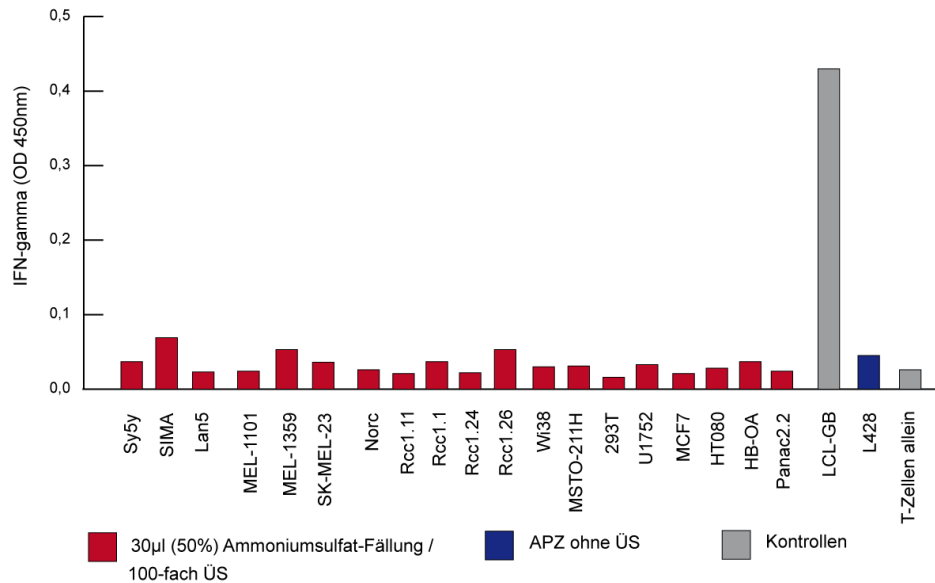
Um zu überprüfen, ob das Autoantigen im Zellkultur-Überstand von unterschiedlichen hämatopoetischen Zelllinien nachgewiesen werden kann, wurde der Zellkultur-Überstand von verschiedenen LCL, sowie Hodgkin- und Burkitt-Lymphomzellen gesammelt und durch Zugabe von 50% Ammoniumsulfat gefällt. Die ausgefallenen Proteine wurden wiederum auf L428-Zellen beladen um diese anschließend mit den GBW3 T-Zellen zu testen (Abbildung 14A). Das Testergebnis zeigte, dass das Autoantigen in unterschiedlichem Maße in fast allen Zelllinien hämatopoetischen Ursprungs vorkommt. Eine mögliche Expression des Antigens in nicht-hämatopoetischen Zelllinien wurde in dem in Abbildung 14B gezeigten Experiment untersucht. Die 100-fach aufkonzentrierten und gefällten Zellkultur-Überstände der verschiedenen nicht-hämatopoetischen Zelllinien wurden auf APZ beladen und die Erkennung des Autoantigens durch autoreaktive GBW3 T-Zelllinie mittels IFN $\gamma$  ELISA bestimmt. In diesen Experimenten wurde keine nachweisbare Reaktivität gegen Zellkultur-Überstände von nicht-hämatopoetischen Zelllinien beobachtet. Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass das Autoantigen nur im Überstand von hämatopoetischen Zelllinien vorkam, insbesondere LCL.

Um zu testen, ob sich das Autoantigen auch in den Überständen der LCL der Patientin mit cGvHD sowie in den LCL des Spenders befand, wurden die Überstände der mini-LCL-ME, LCL-ME und LCL-SS gesammelt, 100-fach aufkonzentriert und auf APZ beladen. Eine mögliche Erkennung der ÜS-gepulsten APZ durch die autoreaktiven GBW3 T-Zellen wurde über die Ausschüttung von IFN $\gamma$  im ELISA bestimmt. Wie in Abbildung 14C zu sehen, erkannten die T-Zellen APZ, die mit diesen Überständen inkubiert worden waren.

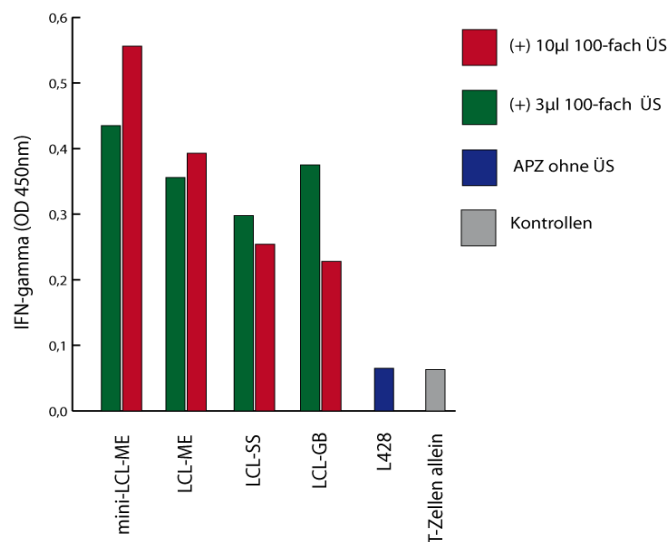
A)



B)



C)



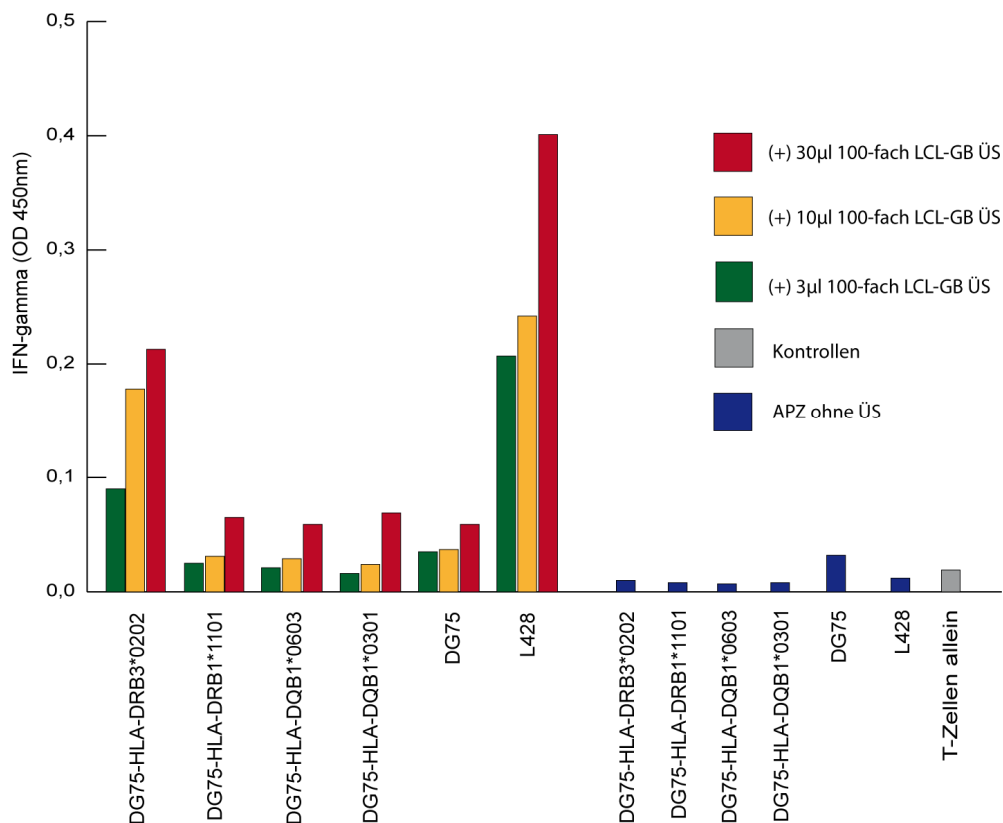
**Abbildung 14: Untersuchung der Autoantigen-Expression in hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zelllinien sowie mini-LCL-ME, LCL-ME und LCL-SS**

(A) Zur Bestimmung der Gewebeexpression des von den T-Zellen GBW3 erkannten Autoantigens wurde zu den 100-fach aufkonzentrierten Überständen unterschiedlicher Tumorzelllinien das gleiche Volumen an gesättigter Ammoniumsulfatlösung (0,75 g/ml) zugesetzt, die ausgefallenen Proteine durch Zentrifugation (30 Minuten, 5.000 x g) gesammelt, der Niederschlag in 100 µl PBS gelöst und 30µl davon auf L428 Zellen beladen. Am nächsten Tag wurden die autoreaktiven GBW3 T-Zellen zugegeben und 20 Stunden später die IFN $\gamma$  Konzentration im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Das von den T-Zellen erkannte Antigen wurde in fast allen Zelllinien hämatopoetischen Ursprungs in unterschiedlichem Maße exprimiert. (B) Die Überstände von Zelllinien nicht-hämatopoetischen Ursprungs dagegen enthielten keine nachweisbaren Mengen des Antigen. (C) Die Überstände von mini-LCL-ME, LCL-ME und LCL-SS wurden gesammelt, 100-fach aufkonzentriert und auf L428 Zellen beladen. Alle Überstände enthielten das von den Autoantigen-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen GBW3 erkannte Antigen.



#### 6.4.5. Bestimmung der HLA-Restriktion der T-Zellen

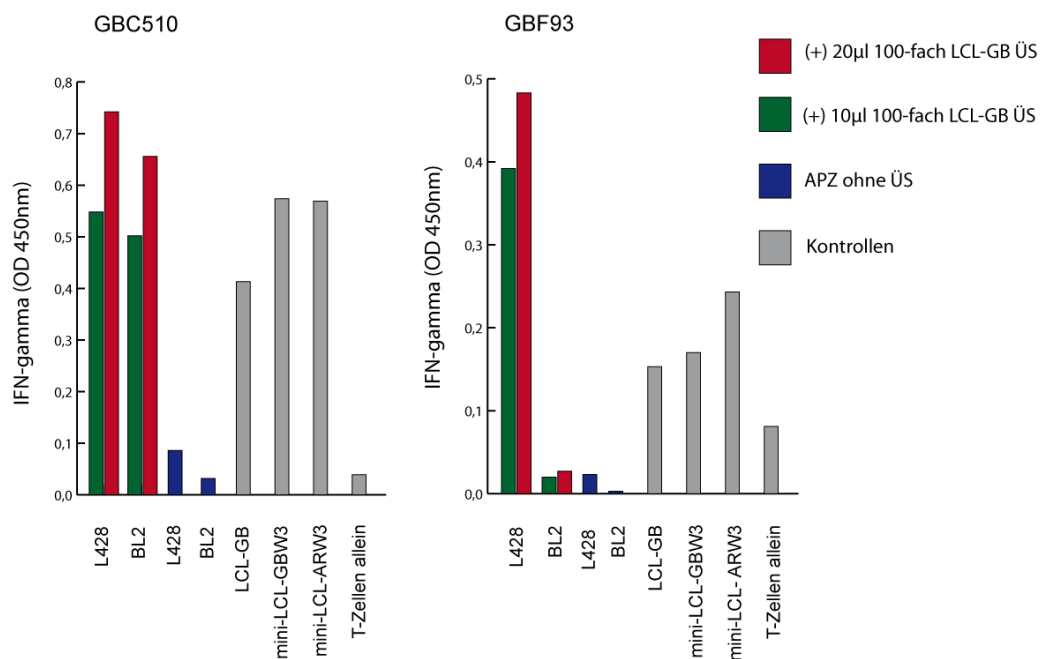
Zur Bestimmung des Restriktionselements der GBW3-T-Zelllinie wurde die DG75 Zelllinie mit verschiedenen HLA-Klasse-II-Allelen (Tabelle 14) mittels Elektroporation transfiziert. Einen Tag nach Transfektion wurden die Zellen für 24 h mit dem 100-fach aufkonzentrierten Zellkultur-Überstand der LCL-GB beladen. Anschließend wurden die Zellen für 20 h mit den GBW3 T-Zellen kokultiviert und danach die Menge an IFN $\gamma$  im Überstand bestimmt (Abbildung 15). Nur DG75 Zellen, die mit dem HLA-DRB3\*0202 Allel transfiziert worden waren, wurden von den T-Zellen erkannt. Da nur etwa 50% der DG75 Zellen mittels Elektroporation transfiziert worden waren, war das erhaltene Signal niedriger als bei den L428 Zellen, die alle dieses HLA-Allel exprimieren.



**Abbildung 15: Bestimmung des HLA-Restriktionselements der autoreaktiven GBW3 CD4<sup>+</sup> T-Zellen**  
 DG75 Zellen wurden mit verschiedenen HLA-Klasse-II-Expressionsplasmiden transfiziert und am nächsten Tag mit dem 100-fach aufkonzentrierten Zellkultur-Überstand der LCL-GB beladen. 24 h später wurden GBW3 T-Zellen zugesetzt und nach weiteren 20 h die Menge an IFN $\gamma$  im Überstand bestimmt. Da nur mit Überstand beladene DG75 Zellen, die mit dem HLA-DRB3\*0202 Expressionsplasmid transfiziert worden waren, von den T-Zellen erkannt wurden, stellte dieses HLA-Allel das Restriktionselement der T-Zellen dar.

#### 6.4.6. Generierung von Autoantigen-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellklonen

Um zu überprüfen, ob die T-Zelllinie GBW3 mehrere autoreaktive Spezifitäten enthielt, wurde eine Einzelzellklonierung (Abschnitt 5.3.7.) durchgeführt. Insgesamt wurden 45 T-Zellklone isoliert, expandiert und ihre Spezifität mittels IFN $\gamma$  ELISA untersucht. Wie für die T-Zelllinie beobachtet, erkannten auch die etablierten T-Zellklone Zielzellen, die mit ÜS von LCL-GB beladen worden waren. Wie für die T-Zellklone GBC510 und GBF93 beispielhaft dargestellt, zeigten die T-Zellklone ein unterschiedliches Erkennungsmuster gegenüber verschiedenen Zielzellen. Der T-Zellklon GBC510 erkannte ÜS-beladene L428 und BL2 Zellen, das vom T-Zellklon GBF93 erkannte Antigen wurde dagegen nur auf L428 präsentiert (Abbildung 16). Dieses Ergebnis deutete auf eine unterschiedliche Restriktion der T-Zellen und damit womöglich auf die Erkennung unterschiedlicher Antigene hin.



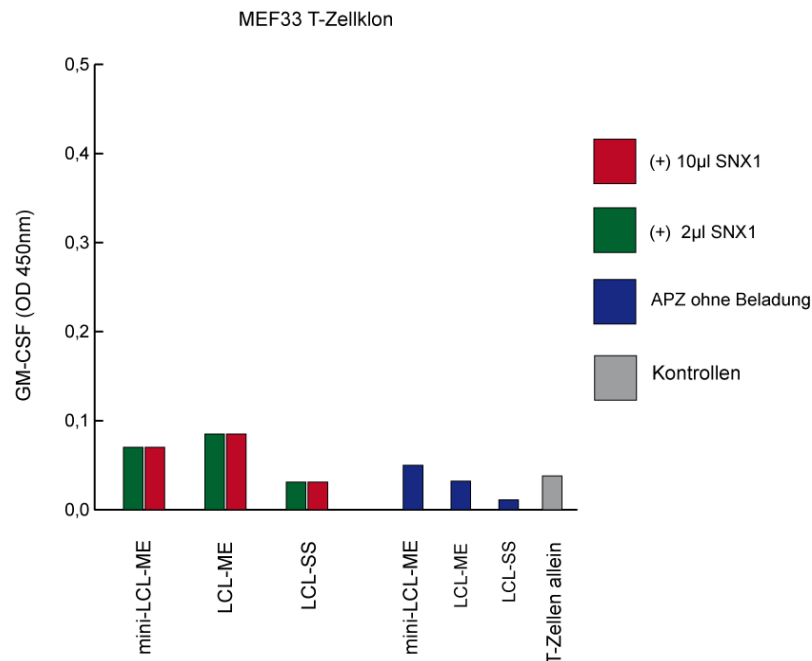
**Abbildung 16: Untersuchung der Antigen-Spezifität der T-Zellklone**

Die Spezifität der etablierten T-Zellklone wurde mittels IFN $\gamma$  ELISA bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die T-Zellklone sowohl mit ÜS-beladenen, als auch unbeladenen APZ kokultiviert. Wie hier exemplarisch für die GBF93 und GBC510 T-Zellklone gezeigt, erkannten alle Klone ein Antigen im Überstand (ÜS) von LCL-GB. Im Gegensatz zum GBC510 T-Zellklon erkannte der GBF93 T-Zellklon ÜS-beladene L428, aber nicht BL2 Zellen. Dies deutete auf ein mögliches Vorhandensein von zweiten Spezifitäten innerhalb der GBW3 T-Zelllinie hin.

---

#### **6.4.7. Untersuchung einer möglichen Erkennung von SNX1 durch die autoreaktiven T-Zellen**

Die Überstand-Transferexperimente hatten gezeigt, dass die ursprünglich als vermeintlich mHags-spezifisch angesehenen T-Zellen der Patientin in Wirklichkeit ein Autoantigen erkannten. Da in den serologischen Untersuchungen ebenfalls ein Autoantigen detektiert worden war, stellte sich die Frage, ob es sich um das gleiche Antigen handelte. Dazu wurde der komplette offene Leserahmen des SNX1 Gens, welches in den SEREX-Analysen als Antigen identifiziert worden war, mittels PCR amplifiziert und in den eukaryotischen Expressionsvektor pCMV-EHis kloniert (siehe Anhang). Das pCMV-EHis-SNX1-Plasmid wurde in HEK-293T Zellen transfiziert, und das His-Etikett-tragende, rekombinante Protein mittels Nickel-NTA-*Beads* aufgereinigt. Das aufgereinigte SNX1-Protein wurde in verschiedenen Konzentrationen auf LCL-SS beladen. Am folgenden Tag wurden die autoreaktiven MEF33 T-Zellen zugegeben und nach 20 Stunden die GM-CSF Konzentration im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt (Abbildung 17). Die SNX1-beladenen APZ wurden von den T-Zellen nicht signifikant besser erkannt als die unbeladenen Zellen. Somit stellt SNX1 nicht das von diesen T-Zellen erkannte Antigen dar.



**Abbildung 17: Das serologisch identifizierte Antigen SNX1 ist nicht das von den MEF33 T-Zellen erkannte Autoantigen**

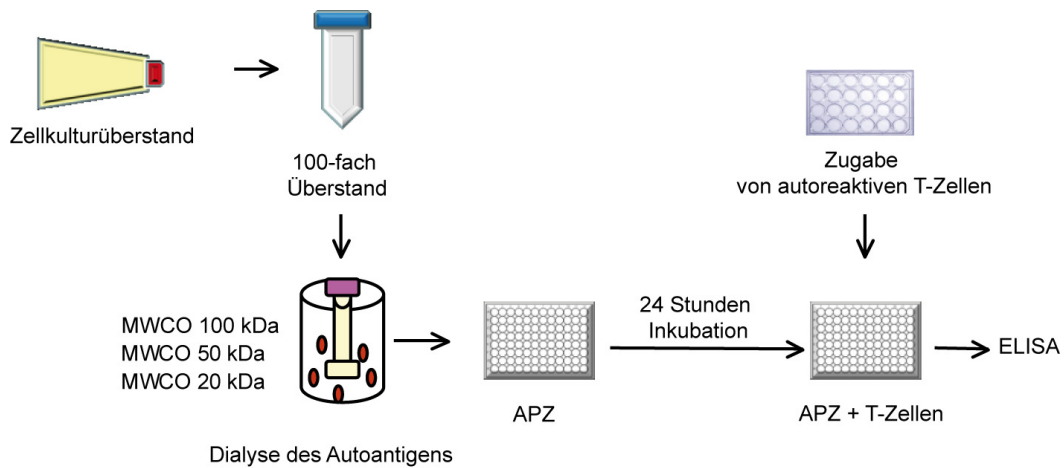
LCL des Patienten und des Spenders wurden für 24 Stunden mit unterschiedlichen Mengen an aufgereinigtem, rekombinanten SNX1 Protein inkubiert. Anschließend wurden MEF33 T-Zellen zugesetzt und die Zellen für 20 Stunden kokultiviert, bevor die GM-CSF Konzentration im Überstand mittels ELISA ermittelt wurde. Im Vergleich zu unbeladenen wurden die SNX1-beladenen Zielzellen nicht signifikant besser von den T-Zellen erkannt. Das SNX1 stellt somit nicht das von den MEF33 T-Zellen erkannte Autoantigen dar.

#### 6.4.8. Charakterisierung des Autoantigenes

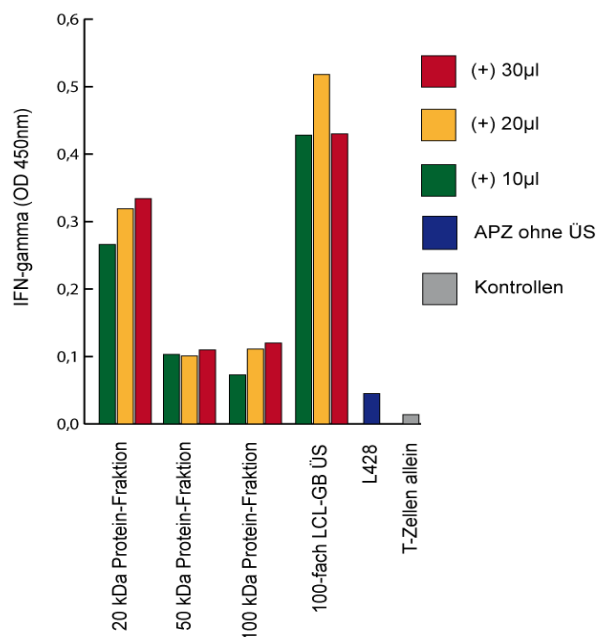
Um die Größe des von den GBW3 T-Zellen erkannten Autoantigens zu bestimmen, wurde, wie in Abbildung 18A dargestellt, LCL-GB Überstand gesammelt, 100-fach aufkonzentriert, auf drei Dialyse-Säulen der Firma Spectra aufgeteilt und über Nacht gegen PBS dialysiert. Die Dialyse-Säulen besaßen eine Molekulargewicht-Ausschlussgrenze (*molecular weight cut off*, MWCO) von 20 kDa, 50 kDa und 100 kDa. Die drei dialysierten Überstände wurden auf APZ beladen und eine mögliche Erkennung durch die T-Zellen über die Bestimmung der IFN $\gamma$ -Ausschüttung ermittelt (Abbildung 18B). Nur der ursprüngliche, aufkonzentrierte Überstand sowie der dialysierte Überstand aus der Säule mit 20 kDa MWCO wurden von den T-Zellen erkannt. Das erkannte Antigen konnte demnach die 50 und 100 kDa MWCO

Dialysemembranen passieren. Das Molekulargewicht des Autoantigens musste somit zwischen 20 kDa und 50 kDa betragen.

A)



B)



**Abbildung 18: Bestimmung des Molekulargewichts des Autoantigens**

(A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Der aufkonzentrierte Überstand der LCL-GB wurde auf drei Dialysesäulen mit den Ausschlussgrenzen 20 kDa, 50 kDa und 100 kDa geladen und über Nacht dialysiert. Anschließend wurden L428 Zellen mit den dialysierten Überständen beladen und als Zielzellen für die GBW3 T-Zellen eingesetzt. Eine mögliche T-Zell-Erkennung wurde mittels ELISA ermittelt. (B) L428 Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen an unbehandeltem oder dialysiertem Zellkultur-Überstand für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden GBW3 T-Zellen zugesetzt und nach 20 Stunden die IFN $\gamma$  Konzentration im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Nur die Dialysemembran mit 20 kDa MWCO war in der Lage, das Antigen zurückzuhalten. Demnach musste die Größe des Antigenes zwischen 20 und 50 kDa liegen.

## 7. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Transplantations-assoziierten CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort in einem Patienten mit cGvHD. Da sich die molekulare Identifikation MHC-Klasse-II-restringierter Antigene trotz jüngster methodischer Fortschritte nach wie vor als sehr aufwändig und ineffizient erweist und großer Mengen an *in vitro* expandierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen bedarf, sollte ein indirekter Nachweis der Antigene über die molekulare Identifikation der Zielstrukturen der humoralen Immunantwort erfolgen. Diese Strategie basierte auf früheren Beobachtungen der eigenen und anderer Arbeitsgruppen die zeigten, dass die Zielstrukturen der humoralen und zellulären Immunantwort zumindest teilweise überlappen (Ayyoub *et al.*, 2004; Milosevic *et al.*, 2010). Deshalb sollte die Transplantations-assoziierte Antikörper- und CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort in einem Patienten mit cGvHD parallel untersucht werden. Der Nachweis einer Transplantations-Assoziation sollte im Falle der humoralen Immunantwort über die Untersuchung der IgG-Antikörperantwort vor und nach Transplantation erfolgen. Eine Seroreaktivität gegen Kandidatenantigene sollte nur nach, aber nicht vor Transplantation oder im Stammzell-Spender nachweisbar sein. Analog galt die T-Zellerkennung von Zielzellen des Patienten, aber nicht des Spenders, als Hinweis auf eine Transplantations-assoziierte, zelluläre Immunantwort.

### 7.1. Identifizierung von Transplantations-assoziierten Antigenen im Kontext chronischer GvHD

mHags sind Peptide polymorpher Proteine des Empfängers, die auf MHC-Molekülen präsentiert und von Spender-T-Lymphozyten erkannt werden können (Goulmy, 1997). Die ersten mHags wurden mittels Antigen-spezifischer T-Zellen, die aus peripherem Blut nach allogener, hämatopoetischer Stammzelltransplantation gewonnen wurden, identifiziert und charakterisiert. Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit wurde auf die Identifizierung von mHags gelegt, die von CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt werden. Daher sollte

im ersten Teil dieser Arbeit untersucht werden, ob mit Hilfe des SEREX-Verfahrens mHags effizient identifiziert werden können.

Die SEREX-Methode wurde ursprünglich entwickelt, um die Zielstrukturen der humoralen Immunantwort in Tumorpatienten molekular zu definieren (Sahin *et al.*, 1995). Damit wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen zahlreiche Antigene in Tumorpatienten identifiziert, wie beispielweise BCP-20 im Kolonkarzinom, YB-1 im Neuroblastom und NY-ESO-1 im Ösophaguskarzinom (Shimada *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2011). Auch in unserer Arbeitsgruppe gelang mit Hilfe der SEREX-Methode erstmals die Identifikation von Tumor-assoziierten Antigenen in pädiatrischen Tumorpatienten (Behrends *et al.*, 2002; Behrends *et al.*, 2003) sowie Transplantations-assoziierten Antigenen nach aHSZT (Milosevic *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit konnten mit Hilfe des SEREX-Verfahrens jedoch keine mHags identifiziert werden. Bei dem identifizierten Antigen handelte es sich um ein Autoantigen. Dass humorale Immunantworten gegen verschiedene Autoantigene in gesunden und Tumorpatienten vorkommen können, ist schon länger bekannt. So handelt es sich bei einer Vielzahl der in Tumorpatienten mit Hilfe der SEREX-Methode identifizierten Antigene um Autoantigene (Behrends *et al.*, 2003). Auch in der Arbeit von Milosevic *et al.* wurden 15 der 18 identifizierten Antigene als Autoantigene charakterisiert (2010). Allerdings lag die Anzahl der identifizierten Antigene deutlich über den normalerweise in Tumorpatienten nachgewiesenen Autoantigenen. Diese Ergebnisse deuteten auf eine besonders hohe Frequenz Autoantigen-spezifischer Antikörper im Patienten-Serum nach allogener HSZT hin. Womöglich kommt es infolge massiver Gewebeschädigung im Rahmen der Konditionierung zu einer vermehrten Freisetzung von zellulären Bestandteilen und zu einem zumindest vorübergehenden Verlust der Selbsttoleranz durch die Elimination regulatorischer Zellen. Dafür spricht auch, dass Antikörper-Antworten gegen 14 der 15 Autoantigene nur 100 Tage nach, aber nicht vor oder ein Jahr nach Transplantation, detektiert wurden. Immunantworten gegen die in dieser Arbeit identifizierten Autoantigene waren nicht Transplantations-assoziiert, denn Antikörper gegen diese Antigene waren in Spender und Empfänger bereits vor aHSZT nachweisbar. Wieso in diesem Patienten trotz cGvHD keine

humoralen Immunantworten gegen mHags detektiert werden konnten, ist momentan unklar. Eine methodenimmanente Ursache könnte in der Expression der Antigene in Bakterien zu sehen sein. Viele eukaryotische Proteine sind in Bakterien toxisch oder werden nur in sehr geringen Mengen produziert. Darüber hinaus könnte die fehlende posttranslationale Modifikation von Proteinen in Bakterien als mögliche Ursache angesehen werden. So erkennen manche Antikörper sekundäre Modifikationen an Proteinen, wie Glykosylierung, Oxidation, oder Phosphorylierung. In höheren Eukaryoten werden etwa 50-90% aller Proteine posttranslational modifiziert (Doyle & Mamula, 2001). Da diese in Bakterien aber nicht, oder nur geringfügig stattfinden, könnten *mHags*-spezifische Antikörper im Patienten-Serum zwar vorhanden sein, aber nicht die in Bakterien exprimierten Proteine erkennen. Zudem ist die antigene Determinante mancher Antikörper konformationsabhängig. Für die korrekte Faltung von Proteinen werden oftmals weitere, spezifische Proteine benötigt, die womöglich in Bakterien fehlen. Um solche Antigene zu erfassen, wurden in der jüngeren Vergangenheit eukaryotische Expressionssysteme und alternative Nachweisverfahren entwickelt. Dazu zählen z.B. SEREX in Hefe (Mischo *et al.*, 2003), AMIDA-Technologie (Rauch *et al.*, 2004) und Expressionsklonierung in Insekten- oder Säugerzellen (Kyyamova *et al.*, 2006). Da klinisches Material von dem pädiatrischen Patienten nur begrenzt zur Verfügung stand, wurde das Patientenserum nicht wie üblich 1:100, sondern 1:300 verdünnt. Frühere Experimente der Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass Antikörper-Antworten gegen Tumorantigene häufig auch noch nach >1:1000 Verdünnung des Serums nachweisbar waren. Auch die identifizierten Autoantigene wurden mit dieser 1:300 Serumverdünnung problemlos detektiert. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass in diesem Patienten nur niedrigtitrige IgG-Immunantworten gegen mHags ausgelöst wurden, die bei dieser Serumverdünnung nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Deshalb sollten zukünftige Untersuchungen mit nicht mehr als hundertfach verdünntem Serum durchgeführt werden.



## 7.2. Charakterisierung der Transplantations-assoziierten CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden primäre T-Zellen der Patientin nach aHSZT mit autologen mini-LCL wiederholt *in vitro* stimuliert. Durch die Verwendung von mini-LCL als Stimulatorzellen konnte ein Auswachsen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen spezifisch für lytische Antigene von EBV verhindert werden. Die Spezifität der generierten CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien wurde mittels GM-CSF ELISA bestimmt. Insgesamt wurden drei CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien aus kryo-konservierten PBMC 1, 2 und 2,5 Jahre nach Transplantation generiert. Nur die CD4<sup>+</sup> T-Zelllinie III, die aus PBMC 2,5 Jahre nach Transplantation etabliert worden war, erfüllte die Kriterien für eine mHags-spezifische T-Zelllinie. Aus dieser Linie wurden deshalb T-Zellklone generiert und weiter charakterisiert. Initial zeigten einiger dieser Klone ein ähnliches, mHags-spezifisches Erkennungsmuster wie die Ausgangszelllinie. Nach längerer Kultivierungsdauer wiesen diese CD4<sup>+</sup> T-Zellklone jedoch eine veränderte Reaktivität gegenüber Zielzellen auf. So wurden LCL bzw. mini-LCL des Patienten kaum noch, die LCL des Spenders aber zunehmend von den T-Zellen erkannt. Auch das Erkennungsmuster allogener LCL veränderte sich, was die Spezifität dieser T-Zellen weiter in Frage stellte. Die unterschiedlich starke Erkennung von Zielzellen deutete darauf hin, dass das erkannte Antigen in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich hoch exprimiert wurde. Ein ähnliches Antigenerkennungsmuster wurde von der eigenen und anderen Arbeitsgruppen nach Stimulation von peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen gesunder Spender mit autologen mini-LCL beobachtet (Adhikary *et al.*, 2007; Bhaduri-McIntosh *et al.*, 2008; Long *et al.*, 2009). Diese T-Zellen erkannten interessanterweise auch EBV-negative Zielzellen, wie z.B. EBV-negative Burkitt-Lymphom-Zelllinien, was darauf hinwies, dass diese CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegen zelluläre Antigene gerichtet waren. Die unterschiedliche Erkennung der Zielzellen zu verschiedenen Zeitpunkten könnte demnach auf einer schwankenden Expression von Autoantigenen in den LCL beruhen.

Das Repertoire an T-Zellrezeptoren (TZR) in einem Individuum umfasst über 25 Millionen Spezifitäten (Walker & Abbas, 2002). Diese große Zahl an verschiedenen

TZR soll die Erkennung verschiedener Pathogene bzw. „fremder Antigene“ sicherstellen. Allerdings besteht dabei die Gefahr, dass manche T-Lymphozyten auch körpereigene Peptide erkennen und eigenes Gewebe schädigen. Zwar werden solche T-Zellen über den Prozess der negativen Selektion im Thymus eliminiert (Griesemer *et al.*, 2010), dennoch können T-Zellen, die gegen Autoantigene gerichtet sind, im peripheren Blut von gesunden Personen nachgewiesen werden (Filion *et al.*, 1996). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass diese Antigene nur in manchen Geweben, aber nicht oder kaum im Thymus exprimiert werden. T-Zellen, die für diese Selbstantigene spezifisch sind, würden somit dem Prozess der negativen Selektion entgehen (Akirav *et al.*, 2011).

Um die von den T-Zellen erkannten Antigene näher zu charakterisieren, wurde zunächst die zelluläre Lokalisation bestimmt. Durch Transferexperimente konnte das Antigen im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass es sich um eine Komponente des fötalen Kälberserums handelte, das dem Kulturmedium zugesetzt wurde, wurden die Zielzellen in Medium gehalten, dem anstelle von FCS humanes Serum zugesetzt worden war. Da auch diese Zielzellen von den T-Zellen erkannt wurden, war eine FCS-Reaktivität unwahrscheinlich. Diese Annahme wurde weiter unterstützt von der Beobachtung, dass nicht alle Zielzellen, die das restringierende HLA-Molekül exprimierten, in gleichem Maße erkannt wurden. So wurde beispielsweise die Burkitt Lymphom-Zelllinie BL30 von den JM W3 T-Zellen in Abbildung 9 sehr gut erkannt, die von dieser Zelllinie abgeleiteten, EBV-positiven Tochterzelllinien BL30-B95.8 und BL30-P3HR1 jedoch kaum. Somit handelte es sich um ein Autoantigen, das von den B-Zellen in das Kulturmedium abgegeben wurde. Ob es sich dabei um ein sezerniertes Protein, oder ein von der Oberfläche abgespaltenes Membranprotein handelt, müssen zukünftige Experimente zeigen. Sezernierte Autoantigene wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen identifiziert und charakterisiert. So wurde beispielsweise ein DNA-bindendes Protein (DEK) beschrieben (Mor-Vaknin *et al.*, 2006), das von Makrophagen sezerniert wird und als chemotaktischer Stoff für Neutrophile, Natürlich Killerzellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen fungiert. Deshalb sollte zunächst das Gewebeexpressionsmuster des Antigens

bestimmt werden. Kulturüberstand-Transfereperimente ergaben, dass das Autoantigen in verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert wurde. Zellüberstände nicht-hämatopoetischer Zelllinien enthielten dagegen keine nachweisbaren Mengen an Antigen. Ein ähnliches Gewebeverteilungsmuster wurde für das Autoantigen CLIP-170/restin beschrieben, das mit Hilfe des SEREX-Verfahrens identifiziert worden war. Dieses Autoantigen wird hauptsächlich auf dendritischen Zellen und aktivierten B-Zellen exprimiert (Sahin *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurde auch hier eine Hochregulation in verschiedenen Tumoren, beispielsweise in Hodgkin-Lymphom-Zellen beschrieben. Diese Daten stimmen zum Teil mit unseren, zuvor beschriebenen Beobachtungen überein. Jedoch erkannte die autoreaktive CD4<sup>+</sup> T-Zelllinie GBW3 die Hodgkin-Zelllinie L540 nicht, oder nur marginal (Abbildung 14A). Auch die Hodgkin-Linie L428 wurde nicht erkannt und diente aus diesen Gründen auch als APZ in den Kulturüberstand-Transfereperimenten. Hinzu kommt, dass das von den T-Zellen erkannte Autoantigen eine Größe von 20-50 kDa aufweist, wohingegen das CLIP-170/restin Protein deutlich größer ist. Dass es sich bei dem erkannten Autoantigen um CLIP-170/restin handelt, ist demnach unwahrscheinlich.

Die Bestimmung der HLA-Restriktionselemente ergab, dass das von den autoreaktiven GB W3 T-Zellen erkannte Antigen auf HLA-DRB3\*0202 präsentiert wird. Dieses HLA-Molekül steht in Verdacht, mit der Entstehung bestimmter Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang zu stehen. So wird dieses HLA-Allel von allen pädiatrischen Patienten mit Multipler Sklerose exprimiert (Oh *et al.*, 2004). Ob das erkannte Antigen zur Entstehung oder Verstärkung von Autoimmunreaktionen beiträgt, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen. Aufschlussreich wäre in diesem Zusammenhang eine nähere Untersuchung des Vorkommens und der Frequenz von Autoantigen-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in verschiedenen Individuen. Auch weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass das Antigen in zahlreichen Individuen exprimiert wird. Da bislang eine Expression nur in transformierten Zelllinien, nicht aber in untransformierten PBMC detektiert wurde, führt zudem zu der Frage, welche Zellen das Antigen *in vivo* exprimieren. Eine Möglichkeit wären EBV-infizierte B-Zellen. In EBV-seropositiven, gesunden Individuen

ist etwa 1 in  $10^4$ - $10^5$  B-Zellen latent mit EBV infiziert (Niller *et al.*, 2008). Ob diese infizierten B-Zellen das Antigen exprimieren und für die Induktion der Autoantigen-spezifischen  $CD4^+$  T-Zellantwort verantwortlich sind, ist momentan noch unklar.

Dass die Infektion mit EBV zur Induktion von Autoantigenen führen kann, wurde bereits von Van-Sechel *et al.* gezeigt. Die Autoren konnten nachweisen, dass die EBV-Infektion von B-Zellen die Expression von Stressproteinen, wie zum Beispiel  $\alpha$ -B-Crystallin (CYRAB) induzieren kann (van Sechel *et al.*, 1999). Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass Myelin-spezifische  $CD4^+$  T-Zellen aus Patienten mit Multipler Sklerose gegen  $\alpha$ -B-Crystallin kreuzreagieren. Im Vergleich zu anderen Stressproteinen, wie den Hitzeschockproteinen hsp27 und hsp60, wird  $\alpha$ -B-Crystallin in B-Zellen im nur nach 16837900 einer EBV Infektion exprimiert (van Sechel *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass es sich bei dem von den T-Zellen erkannten Autoantigen um ein durch EBV induziertes Protein handelt.

Ob EBV tatsächlich an der Induktion Autoantigen-spezifischer  $CD4^+$  T-Zellantworten beteiligt ist, ist momentan noch unklar, ließe sich aber durch die Untersuchung EBV-negativer Spender klären. In diesem Fall sollte die Frequenz solcher T-Zellen in diesen Personen zumindest deutlich erniedrigt sein. Durch die bislang nur in transformierten hämatopoetischen Zellen detektierte Expression der Autoantigene stellt sich darüber hinaus die Frage, ob diese T-Zellen zur Behandlung von hämatopoetischen Neoplasien von Nutzen sein könnten. Allerdings muss hierbei bedacht werden, dass das Antigen wahrscheinlich nicht nur von den Antigen-exprimierenden Zellen präsentiert wird, sondern auch von Nachbarzellen. Da es sich um ein lösliches Antigen handelt, könnten nicht nur Tumorzellen, sondern auch normale Zellen, die das Antigen als exogenes Protein aufgenommen und Spaltprodukte auf MHC-Klasse-II präsentieren, von den T-Zellen eliminiert werden. Die Folge wäre eine Schädigung normalen Gewebes.

Auch die T-Zelllinie III des Patienten und einige der davon abgeleiteten  $CD4^+$  T-Zellklone erkannten das Autoantigen im Zellkulturüberstand der GB-LCL-Zelllinie. Diese T-Zellen sind somit nicht mHags- sondern Autoantigen-spezifisch. Ähnlich wie bei der Charakterisierung der humoralen Immunantwort stellt sich auch hier die Frage,

wieso keine mHags-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen etabliert werden konnten. Möglicherweise war im Vergleich zu autoreaktiven T-Zellen die Frequenz und/oder das Proliferationspotential mHags-spezifischer T-Zellen niedriger, so dass die Kulturen zunehmend von autoreaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen dominiert wurden. Um erfolgreich mHags-spezifische T-Zelllinien zu etablieren, wäre es demnach wichtig, die autoreaktiven T-Zellen zu eliminieren oder zumindest zu minimieren. Dies könnte zum Beispiel über die Stimulation der T-Zellen mit LCL des Spenders und der Entfernung reaktiver und damit aktivierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen, etwa mittels FACS oder MACS, erfolgen. Da die LCL des Spenders Autoantigene aber nicht mHags exprimieren, sollte es dadurch zu einer Minimierung autoreaktiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Kultur kommen. Durch die nachfolgende Stimulation der T-Zellen mit LCL des Patienten sollte es hauptsächlich zu einer Aktivierung und Expansion von mHags-spezifischen T-Zellen kommen. Wieso das Autoantigen-Expressionsniveau initial in den LCL des Spenders deutlich unter dem in LCL des Patienten lag und dadurch eine mHags-Reaktivität der T-Zellen vorgetäuscht wurde, ist noch unklar. Erfahrungsgemäß können sich Morphologie und Wachstumsverhalten verschiedener LCL *in vitro* stark unterscheiden. Auch kann das Wachstum einer LCL über die Zeit starken Schwankungen unterliegen, die nur zum Teil durch Variabilitäten in den Kulturbedingungen erklärt werden können. Da für das Wachstum von LCL auch eine Mindestzelldichte Voraussetzung ist, scheinen für das Wachstum neben viralen auch autokrine Faktoren mitentscheidend zu sein (Miwa *et al.*, 2000). Inwiefern sich diese Faktoren gegenseitig beeinflussen und ob mit steigender Kultivierungsdauer weitere genetische und epigenetische Alterationen die Zellphysiologie einschließlich Genexpression beeinflussen, ist noch ungeklärt. Diese Betrachtungen legen aber nahe, dass die Expression bestimmter Gene in verschiedenen LCL durchaus starken Schwankungen unterliegen kann. Erste Versuche der Charakterisierung des Autoantigens ergaben, dass das Autoantigen wahrscheinlich eine Größe von 20 bis 50 kDa besitzt. Mit dem angewandten Isolierungsprotokoll gelang die Aufreinigung des Autoantigens bislang noch nicht. In weiterführenden Untersuchungen wird die molekulare Identifikation des Antigens mit

---

Hilfe massenspektroskopischer Verfahren nach verbesserter Größenfraktionierung angestrebt.

### **7.3. Die mögliche Rolle von Autoantigenen in der GvHD-Pathogenese**

Im Hinblick auf die Komplexität der GvHD-Erkrankung gibt es bislang keinen klaren Zusammenhang zwischen Autoantigenen und der Entwicklung einer GvHD. Eine vor kurzem veröffentlichte Studie an einem GvHD-Mausmodell besagt, dass nicht-hämatopoetische Autoantigene an der Entstehung einer schweren GvHD beteiligt sind (Kim *et al.*, 2010). Zudem hat die Studie auch eine Beteiligung von Spender-APZ, insbesondere von B-Zellen, an der Entstehung einer chronischen GvHD nachgewiesen, während diese in der Pathogenese der akuten GvHD keine wesentliche Rolle zu spielen scheinen. Weitere Hinweise auf eine bedeutende Rolle von Autoimmunreaktionen in der GvHD-Pathogenese lieferte auch die klinische Studie von Goral *et al.* (Goral *et al.*, 2002). Dabei wurden 29 Leukämie-Patienten bis 960 Tage nach aHSZT beobachtet. Diese Untersuchung ergab, dass die meisten Patienten bis zum neunzigsten Tag nach aHSZT einen erhöhten IgM-Antikörperspiegel gegen die Hitzeschockproteine hsp70 und hsp90 aufwiesen, während der gesamte IgM-Spiegel im Übergang zur chronischen GvHD anstieg. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine humorale Immunantwort gegen Stress-induzierte Autoantigene nach aHSZT induziert wird. Womöglich kam es aufgrund der temporären Aufhebung der peripheren Toleranz im Rahmen der Konditionierung, der Hochregulierung von Stressproteinen sowie der Übertragung immunkompetenter autoreaktiver T-Zellen im Transplantat zu einem temporären autoimmunen Erkrankungszustand (Zhao *et al.*, 2011). Nach Rekonstitution der Hämatopoese und Wiederherstellung der peripheren Toleranz kam es in den meisten Patienten zum Abklingen autoimmun-bedingter Symptome. In einigen Fällen könnte jedoch die temporäre Erkrankung in eine chronische Form der Autoimmunkrankheit übergegangen sein und zum Erscheinungsbild der chronischen GvHD geführt haben (Sostak *et al.*, 2010).

Mit Hilfe der SEREX-Methode wurden in der vorliegenden Arbeit nur IgG Immunantworten gemessen. Deshalb können keine Aussagen über mögliche IgM

Antworten gegen Hitzeschockproteine in dem untersuchten Patienten gemacht werden. Der Nachweis von IgG-Antikörper- und CD4<sup>+</sup> T-Zell-Immunantworten gegen Autoantigene spricht dennoch für das Auftreten von Autoimmunreaktionen nach aHSZT in diesem Patienten und implizieren eine entscheidende Rolle von Autoantigenen in der Entstehung der cGvHD. Da aber GvHD-Erkrankungen nicht nach syngener HSZT auftreten, müssen mHags eine essentielle Rolle in der GvHD-Entstehung spielen. Ob die Immunantwort gegen Autoantigene somit nur ein unbedeutendes Nebenprodukt mHags-spezifischer Immunreaktionen darstellt, oder ob Stress-induzierte Autoimmunreaktionen mHags-spezifische Immunreaktionen erst auslösen bzw. verstärken und somit für die Manifestation der GvHD von entscheidender Bedeutung sind, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen. Die Beantwortung dieser Fragen sollte nicht nur zum verbesserten Verständnis der GvHD-Pathogenese beitragen, sondern langfristig auch neue Ansätze zur Therapie dieser häufig letal verlaufenden Erkrankung liefern.

## 8. Zusammenfassung

Immunologische Abstoßungsreaktionen nach allogener, hämatopoetischer Stammzelltransplantation (aHSZT) können zum Erscheinungsbild der Spender-gegen-Wirt Erkrankung (*graft-versus-host disease*) führen, sind aber auch mit einer verminderten Tumorrückfallrate assoziiert. Die Zielstrukturen der T-zellvermittelten Abstoßungsreaktion nach HLA-identischer aHSZT sind Nebenhistokompatibilitätsantigene (*minor histocompatibility antigens*, mHags), Produkte polymorpher Gene in denen sich Spender und Empfänger unterscheiden. Von der Kenntnis dieser Antigene werden neue Ansätze zur Vermeidung unerwünschter Spender-gegen-Wirt- und zur Verstärkung erwünschter Spender-gegen-Tumor-Reaktionen erwartet. Aufgrund fehlender, generischer Nachweisverfahren wurden allerdings bislang nur wenige mHags identifiziert, die von CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte am Beispiel einer Patientin mit chronischer GvHD untersucht werden, ob die Transplantations-assoziierten humoralen und zellulären Immunantworten gegen die gleichen oder unterschiedliche Antigene gerichtet sind und damit, ob CD4<sup>+</sup> T-Zell-Antigene mit Hilfe serologischer Nachweisverfahren identifiziert werden können.

Mit Hilfe eines modifizierten SEREX-Verfahrens wurde SNX1 als Zielstruktur der Antikörperantwort nach aHSZT identifiziert. Da aber Antikörper gegen SNX1 bereits im Serum der Patientin vor Transplantation nachweisbar waren, handelte es sich um ein Transplantations-unabhängiges Autoantigen. Von den CD4<sup>+</sup> T-Zelllinien, die aus PBMC nach Transplantation durch wiederholte Stimulation mit Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) der Patientin vor Transplantation generiert worden waren, erkannte eine Linie die APZ der Patientin, aber nicht des Spenders. Diese vermeintliche mHags-Reaktivität der T-Zellen beruhte allerdings auf der Erkennung eines Autoantigens im Zellkulturüberstand, dessen Expressionsniveau in



verschiedenen Zelllinien und über die Zeit variierte. Da es sich hierbei nicht um SNX1 handelte, konnte keine Überlappung zwischen humoraler und zellulärer Immunantwort in diesem Patienten mit chronischer GvHD festgestellt werden.

CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Spezifität für extrazelluläre Autoantigene wurden nicht nur in dem Patienten mit GvHD, sondern auch in einem Patienten mit infektiöser Mononukleose sowie in gesunden Spendern nachgewiesen, was auf eine hohe Frequenz und Stärke dieser T-Zellimmunantwort schließen lässt.

Die nähere Charakterisierung eines dieser Antigene ergab, dass es im Überstand verschiedener hämatopoetischer, aber keiner der getesteten nicht-hämatopoetischen Zelllinien vorkam, dass es auf HLA-DRB3\*0202 präsentiert wurde und dass es ein Molekulargewicht von 20-50 kDa besaß. Um die Identität des Autoantigens molekular aufzuklären, werden momentan Aufreinigungsprotokolle entwickelt. Die Kenntnis dieses Autoantigens sollte Aufschluss über den Auslöser der Immunreaktion gegen dieses Selbstprotein, das genaue Gewebe-Expressionsmuster und den möglichen therapeutischen Nutzen liefern.

---

## 10. Literaturverzeichnis

- Adhikary, D., Behrends, U., Boerschmann, H., Pfunder, A., Burdach, S., Moosmann, A., Witter, K., Bornkamm, G.W. & Mautner, J. (2007) Immunodominance of lytic cycle antigens in Epstein-Barr virus-specific CD4<sup>+</sup> T cell preparations for therapy. *PLoS One*, **2**, e583.
- Akatsuka, Y., Nishida, T., Kondo, E., Miyazaki, M., Taji, H., Iida, H., Tsujimura, K., Yazaki, M., Naoe, T., Morishima, Y., Kodera, Y., Kuzushima, K. & Takahashi, T. (2003) Identification of a polymorphic gene, BCL2A1, encoding two novel hematopoietic lineage-specific minor histocompatibility antigens. *J Exp Med*, **197**, 1489-1500.
- Akirav, E.M., Ruddle, N.H. & Herold, K.C. (2011) The role of AIRE in human autoimmune disease. *Nat Rev Endocrinol*, **7**, 25-33.
- Alyea, E., Weller, E., Schlossman, R., Canning, C., Webb, I., Doss, D., Mauch, P., Marcus, K., Fisher, D., Freeman, A., Parikh, B., Gribben, J., Soiffer, R., Ritz, J. & Anderson, K. (2001) T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation followed by donor lymphocyte infusion in patients with multiple myeloma: induction of graft-versus-myeloma effect. *Blood*, **98**, 934-939.
- Aoki, Y., Takahashi, S., Okamoto, S. & Asano, S. (1994) Graft-versus-leukemia after second allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, **84**, 3983.
- Arora, M., Weisdorf, D.J., Spellman, S.R., Haagenson, M.D., Klein, J.P., Hurley, C.K., Selby, G.B., Antin, J.H., Kernan, N.A., Kollman, C., Nademanee, A., McGlave, P., Horowitz, M.M. & Petersdorf, E.W. (2009) HLA-identical sibling compared with 8/8 matched and mismatched unrelated donor bone marrow transplant for chronic phase chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, **27**, 1644-1652.
- Ayyoub, M., Hesdorffer, C.S., Metthez, G., Stevanovic, S., Ritter, G., Chen, Y.T., Old, L.J., Speiser, D., Cerottini, J.C. & Valmori, D. (2004) Identification of an SSX-2 epitope presented by dendritic cells to circulating autologous CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol*, **172**, 7206-7211.
- Baker, M.B., Altman, N.H., Podack, E.R. & Levy, R.B. (1996) The role of cell-mediated cytotoxicity in acute GVHD after MHC-matched allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J Exp Med*, **183**, 2645-2656.

- Ball, L.M. & Egeler, R.M. (2008) Acute GvHD: pathogenesis and classification. *Bone Marrow Transplant*, **41 Suppl 2**, S58-64.
- Barnes, D.W. & Loutit, J.F. (2001) Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow: II. 1957. *J Hematother Stem Cell Res*, **10**, 325-334.
- Barton-Burke, M., Dwinell, D.M., Kafkas, L., Lavalley, C., Sands, H., Proctor, C. & Johnson, E. (2008) Graft-versus-host disease: a complex long-term side effect of hematopoietic stem cell transplant. *Oncology (Williston Park)*, **22**, 31-45.
- Behrends, U., Jandl, T., Golbeck, A., Lechner, B., Muller-Wehrich, S., Schmid, I., Till, H., Berthold, F., Voltz, R. & Mautner, J.M. (2002) Novel products of the HUD, HUC, NNP-1 and alpha-internexin genes identified by autologous antibody screening of a pediatric neuroblastoma library. *Int J Cancer*, **100**, 669-677.
- Behrends, U., Schneider, I., Rossler, S., Frauenknecht, H., Golbeck, A., Lechner, B., Eigenstetter, G., Zobywalski, C., Muller-Wehrich, S., Graubner, U., Schmid, I., Sackerer, D., Spath, M., Goetz, C., Prantl, F., Asmuss, H.P., Bise, K. & Mautner, J. (2003) Novel tumor antigens identified by autologous antibody screening of childhood medulloblastoma cDNA libraries. *Int J Cancer*, **106**, 244-251.
- Bhaduri-McIntosh, S., Rotenberg, M.J., Gardner, B., Robert, M. & Miller, G. (2008) Repertoire and frequency of immune cells reactive to Epstein-Barr virus-derived autologous lymphoblastoid cell lines. *Blood*, **111**, 1334-1343.
- Bioley, G., Dousset, C., Yeh, A., Dupont, B., Bhardwaj, N., Mears, G., Old, L.J., Ayyoub, M. & Valmori, D. (2009) Vaccination with recombinant NY-ESO-1 protein elicits immunodominant HLA-DR52b-restricted CD4+ T cell responses with a conserved T cell receptor repertoire. *Clin Cancer Res*, **15**, 4467-4474.
- Bleakley, M., Otterud, B.E., Richardt, J.L., Mollerup, A.D., Hudecek, M., Nishida, T., Chaney, C.N., Warren, E.H., Leppert, M.F. & Riddell, S.R. (2010) Leukemia-associated minor histocompatibility antigen discovery using T-cell clones isolated by in vitro stimulation of naive CD8+ T cells. *Blood*, **115**, 4923-4933.
- Bleakley, M. & Riddell, S.R. (2011) Exploiting T cells specific for human minor histocompatibility antigens for therapy of leukemia. *Immunol Cell Biol*, **89**, 396-407.

- 
- Boon, T., Cerottini, J.C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P. & Van Pel, A. (1994) Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, **12**, 337-365.
- Bots, M. & Medema, J.P. (2006) Granzymes at a glance. *J Cell Sci*, **119**, 5011-5014.
- Brickner, A.G., Evans, A.M., Mito, J.K., Xuereb, S.M., Feng, X., Nishida, T., Fairfull, L., Ferrell, R.E., Foon, K.A., Hunt, D.F., Shabanowitz, J., Engelhard, V.H., Riddell, S.R. & Warren, E.H. (2006) The PANE1 gene encodes a novel human minor histocompatibility antigen that is selectively expressed in B-lymphoid cells and B-CLL. *Blood*, **107**, 3779-3786.
- Brickner, A.G., Warren, E.H., Caldwell, J.A., Akatsuka, Y., Golovina, T.N., Zarling, A.L., Shabanowitz, J., Eisenlohr, L.C., Hunt, D.F., Engelhard, V.H. & Riddell, S.R. (2001) The immunogenicity of a new human minor histocompatibility antigen results from differential antigen processing. *J Exp Med*, **193**, 195-206.
- Bucher, C., Koch, L., Vogtenhuber, C., Goren, E., Munger, M., Panoskaltsis-Mortari, A., Sivakumar, P. & Blazar, B.R. (2009) IL-21 blockade reduces graft-versus-host disease mortality by supporting inducible T regulatory cell generation. *Blood*, **114**, 5375-5384.
- Busca, A., Locatelli, F., Flonta, S.E., Ciccone, G., Baldi, I., D'Ardia, S., Allione, B. & Falda, M. (2011) In vivo T-cell depletion with pretransplant low-dose antithymocyte globulin is associated with reduced transplant-related mortality and improved clinical outcome in patients receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from unrelated and partially matched related donors. *Am J Hematol*, **86**, 214-217.
- Chen, B.J. (2008) Allogeneic memory T cell response. *Biol Blood Marrow Transplant*, **14**, 20-22.
- Chen, B.J., Deoliveira, D., Cui, X., Le, N.T., Son, J., Whitesides, J.F. & Chao, N.J. (2007) Inability of memory T cells to induce graft-versus-host disease is a result of an abortive alloresponse. *Blood*, **109**, 3115-3123.
- Chiang, K.Y. & Worthington-White, D. (2004) The clinical significance of different hematopoietic stem cell sources (primed marrow, mobilized blood, and steady-state marrow) in autologous and allogeneic transplantation. *Exp Hematol*, **32**, 698-699.

- Choi, S.W., Levine, J.E. & Ferrara, J.L. (2010) Pathogenesis and management of graft-versus-host disease. *Immunol Allergy Clin North Am*, **30**, 75-101.
- Chu, R., Brazauskas, R., Kan, F., Bashey, A., Bredeson, C., Camitta, B., Chiang, K.Y., Frangoul, H., Gale, R.P., Gee, A., George, B., Goldman, F.D., Gross, T.G., Gupta, V., Hale, G.A., Isola, L., Ispizua, A.U., Lazarus, H., Marsh, J., Russell, J., Sabloff, M., Waller, E.K. & Eapen, M. (2010) Comparison of Outcomes after Transplantation of G-CSF-Stimulated Bone Marrow Grafts versus Bone Marrow or Peripheral Blood Grafts from HLA-Matched Sibling Donors for Patients with Severe Aplastic Anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*.
- de Rijke, B., van Horssen-Zoetbrood, A., Beekman, J.M., Otterud, B., Maas, F., Woestenenk, R., Kester, M., Leppert, M., Schattenberg, A.V., de Witte, T., van de Wiel-van Kemenade, E. & Dolstra, H. (2005) A frameshift polymorphism in P2X5 elicits an allogeneic cytotoxic T lymphocyte response associated with remission of chronic myeloid leukemia. *J Clin Invest*, **115**, 3506-3516.
- den Haan, J.M., Meadows, L.M., Wang, W., Pool, J., Blokland, E., Bishop, T.L., Reinhardus, C., Shabanowitz, J., Offringa, R., Hunt, D.F., Engelhard, V.H. & Goulmy, E. (1998) The minor histocompatibility antigen HA-1: a diallelic gene with a single amino acid polymorphism. *Science*, **279**, 1054-1057.
- den Haan, J.M., Sherman, N.E., Blokland, E., Huczko, E., Koning, F., Drijfhout, J.W., Skipper, J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Engelhard, V.H. & et al. (1995) Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. *Science*, **268**, 1476-1480.
- Denecke, C., Bedi, D.S., Ge, X., Kim, I.K., Jurisch, A., Weiland, A., Habicht, A., Li, X.C. & Tullius, S.G. (2010) Prolonged graft survival in older recipient mice is determined by impaired effector T-cell but intact regulatory T-cell responses. *PLoS One*, **5**, e9232.
- Diehl, V., Kirchner, H.H., Schaadt, M., Fonatsch, C., Stein, H., Gerdes, J. & Boie, C. (1981) Hodgkin's disease: establishment and characterization of four in vitro cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*, **101**, 111-124.
- Dierselhuis, M. & Goulmy, E. (2009) The relevance of minor histocompatibility antigens in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*, **14**, 419-425.

- Dolstra, H., de Rijke, B., Fredrix, H., Balas, A., Maas, F., Scherpen, F., Aviles, M.J., Vicario, J.L., Beekman, N.J., Ossendorp, F., de Witte, T.M. & van de Wiel-van Kemenade, E. (2002) Bi-directional allelic recognition of the human minor histocompatibility antigen HB-1 by cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol*, **32**, 2748-2758.
- Dolstra, H., Fredrix, H., Maas, F., Coulie, P.G., Brasseur, F., Mensink, E., Adema, G.J., de Witte, T.M., Figdor, C.G. & van de Wiel-van Kemenade, E. (1999) A human minor histocompatibility antigen specific for B cell acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med*, **189**, 301-308.
- Doyle, H.A. & Mamula, M.J. (2001) Post-translational protein modifications in antigen recognition and autoimmunity. *Trends Immunol*, **22**, 443-449.
- Duffner, U.A., Maeda, Y., Cooke, K.R., Reddy, P., Ordemann, R., Liu, C., Ferrara, J.L. & Teshima, T. (2004) Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. *J Immunol*, **172**, 7393-7398.
- Ellison, C.A., Bradley, D.S., Fischer, J.M., Hayglass, K.T. & Gartner, J.G. (2002) Murine graft-versus-host disease induced using interferon-gamma-deficient grafts features antibodies to double-stranded DNA, T helper 2-type cytokines and hypereosinophilia. *Immunology*, **105**, 63-72.
- Fefer, A., Buckner, C.D., Thomas, E.D., Cheever, M.A., Clift, R.A., Glucksberg, H., Neiman, P.E. & Storb, R. (1977) Cure of hematologic neoplasia with transplantation of marrow from identical twins. *N Engl J Med*, **297**, 146-148.
- Ferrara, J.L., Levine, J.E., Reddy, P. & Holler, E. (2009) Graft-versus-host disease. *Lancet*, **373**, 1550-1561.
- Ferrara, J.L. & Yanik, G. (2005) Acute graft versus host disease: pathophysiology, risk factors, and prevention strategies. *Clin Adv Hematol Oncol*, **3**, 415-419, 428.
- Filion, M.C., Proulx, C., Bradley, A.J., Devine, D.V., Sekaly, R.P., Decary, F. & Chartrand, P. (1996) Presence in peripheral blood of healthy individuals of autoreactive T cells to a membrane antigen present on bone marrow-derived cells. *Blood*, **88**, 2144-2150.
- Ford, C.E., Hamerton, J.L., Barnes, D.W. & Loutit, J.F. (1956) Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature*, **177**, 452-454.

- Goddard, D.S., Horn, B.N., McCalmont, T.H. & Cordero, K.M. (2010) Clinical update on graft-versus-host disease in children. *Semin Cutan Med Surg*, **29**, 92-105.
- Godfrey, W.R., Krampf, M.R., Taylor, P.A. & Blazar, B.R. (2004) Ex vivo depletion of alloreactive cells based on CFSE dye dilution, activation antigen selection, and dendritic cell stimulation. *Blood*, **103**, 1158-1165.
- Goral, J., Shenoy, S., Mohanakumar, T. & Clancy, J., Jr. (2002) Antibodies to 70 kD and 90 kD heat shock proteins are associated with graft-versus-host disease in peripheral blood stem cell transplant recipients. *Clin Exp Immunol*, **127**, 553-559.
- Goulmy, E. (1996) Human minor histocompatibility antigens. *Curr Opin Immunol*, **8**, 75-81.
- Goulmy, E. (1997) Minor histocompatibility antigens: from T cell recognition to peptide identification. *Hum Immunol*, **54**, 8-14.
- Goulmy, E., Termijtelen, A., Bradley, B.A. & van Rood, J.J. (1977) Y-antigen killing by T cells of women is restricted by HLA. *Nature*, **266**, 544-545.
- Gratama, J.W., vd Nat, H., Weiland, H.T., Stijnen, T., Fibbe, W.E., Vossen, J.M., Willemze, R. & Verdonck, L.F. (1992) Intensification of GVHD prophylaxis interferes with the effects of pretransplant herpes virus serology on the occurrence of grades II-IV acute graft-versus-host disease. *Ann Hematol*, **64 Suppl**, A137-139.
- Griesemer, A.D., Sorenson, E.C. & Hardy, M.A. (2010) The role of the thymus in tolerance. *Transplantation*, **90**, 465-474.
- Griffioen, M., van der Meijden, E.D., Slager, E.H., Honders, M.W., Rutten, C.E., van Luxemburg-Heijs, S.A., von dem Borne, P.A., van Rood, J.J., Willemze, R. & Falkenburg, J.H. (2008) Identification of phosphatidylinositol 4-kinase type II beta as HLA class II-restricted target in graft versus leukemia reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 3837-3842.
- Gudgeon, N.H., Taylor, G.S., Long, H.M., Haigh, T.A. & Rickinson, A.B. (2005) Regression of Epstein-Barr virus-induced B-cell transformation in vitro involves virus-specific CD8+ T cells as the principal effectors and a novel CD4+ T-cell reactivity. *J Virol*, **79**, 5477-5488.

- Hiemenz, J.W. (2009) Management of infections complicating allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Semin Hematol*, **46**, 289-312.
- Horowitz, M.M., Gale, R.P., Sondel, P.M., Goldman, J.M., Kersey, J., Kolb, H.J., Rimm, A.A., Ringden, O., Rozman, C., Speck, B. & et al. (1990) Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*, **75**, 555-562.
- Ichiki, Y., Bowlus, C.L., Shimoda, S., Ishibashi, H., Vierling, J.M. & Gershwin, M.E. (2006) T cell immunity and graft-versus-host disease (GVHD). *Autoimmun Rev*, **5**, 1-9.
- Inamoto, Y., Murata, M., Katsumi, A., Kuwatsuka, Y., Tsujimura, A., Ishikawa, Y., Sugimoto, K., Onizuka, M., Terakura, S., Nishida, T., Kanie, T., Taji, H., Iida, H., Suzuki, R., Abe, A., Kiyoi, H., Matsushita, T., Miyamura, K., Kodera, Y. & Naoe, T. (2010) Donor single nucleotide polymorphism in the CCR9 gene affects the incidence of skin GVHD. *Bone Marrow Transplant*, **45**, 363-369.
- Ivanov, R., Aarts, T., Hol, S., Doornenbal, A., Hagenbeek, A., Petersen, E. & Ebeling, S. (2005) Identification of a 40S ribosomal protein S4-derived H-Y epitope able to elicit a lymphoblast-specific cytotoxic T lymphocyte response. *Clin Cancer Res*, **11**, 1694-1703.
- Jacobson, L.O., Simmons, E.L., Marks, E.K. & Eldredge, J.H. (1951) Recovery from radiation injury. *Science*, **113**, 510-511.
- Jameson, B.A., McDonnell, J.M., Marini, J.C. & Korngold, R. (1994) A rationally designed CD4 analogue inhibits experimental allergic encephalomyelitis. *Nature*, **368**, 744-746.
- Kawase, T., Akatsuka, Y., Torikai, H., Morishima, S., Oka, A., Tsujimura, A., Miyazaki, M., Tsujimura, K., Miyamura, K., Ogawa, S., Inoko, H., Morishima, Y., Kodera, Y., Kuzushima, K. & Takahashi, T. (2007) Alternative splicing due to an intronic SNP in HMSD generates a novel minor histocompatibility antigen. *Blood*, **110**, 1055-1063.
- Kernan, N.A., Collins, N.H., Juliano, L., Cartagena, T., Dupont, B. & O'Reilly, R.J. (1986) Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease. *Blood*, **68**, 770-773.
- Kim, J., Park, S., Kim, H.A., Jung, D., Kim, H.J., Choi, H.J., Cho, H.R. & Kwon, B. (2010) Roles of Host Nonhematopoietic Cells in Autoimmunity and Donor Cell Engraftment in Graft-versus-host Disease. *Immune Netw*, **10**, 46-54.



- Kolb, H.J., Schmid, C., Buhmann, R., Tischer, J. & Ledderose, G. (2005) DLI: where are we know? *Hematology*, **10 Suppl 1**, 115-116.
- Korngold, R. (1993) Biology of graft-vs.-host disease. *Am J Pediatr Hematol Oncol*, **15**, 18-27.
- Kyyamova, R.G., Gryshkova, V.S. & Zhyvoloup, A.M. (2006) Expression of SSX2 tumor antigen in baculovirus expression system and its application for screening of blood serum of melanoma patients. *Exp Oncol*, **28**, 110-113.
- Larsen, M.E., Kornblit, B., Larsen, M.V., Masmus, T.N., Nielsen, M., Thiim, M., Garred, P., Stryhn, A., Lund, O., Buus, S. & Vindelov, L. (2010) Degree of predicted minor histocompatibility antigen mismatch correlates with poorer clinical outcomes in nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, **16**, 1370-1381.
- Le, R.Q., Bevans, M., Savani, B.N., Mitchell, S.A., Stringaris, K., Koklanaris, E. & Barrett, A.J. (2010) Favorable outcomes in patients surviving 5 or more years after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*, **16**, 1162-1170.
- Lee, F.E., Georas, S.N. & Beck, L.A. (2010) IL-17: important for host defense, autoimmunity, and allergy? *J Invest Dermatol*, **130**, 2540-2542.
- Lee, S.J. & Williams, L.A. (2010) Patient-reported outcomes for acute graft-versus-host disease prevention and treatment trials. *Biol Blood Marrow Transplant*, **16**, 295-300.
- Long, H.M., Zuo, J., Leese, A.M., Gudgeon, N.H., Jia, H., Taylor, G.S. & Rickinson, A.B. (2009) CD4+ T-cell clones recognizing human lymphoma-associated antigens: generation by in vitro stimulation with autologous Epstein-Barr virus-transformed B cells. *Blood*, **114**, 807-815.
- Lorenz, E., Uphoff, D., Reid, T.R. & Shelton, E. (1951) Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst*, **12**, 197-201.

- Markey, K.A., Burman, A.C., Banovic, T., Kuns, R.D., Raffelt, N.C., Rowe, V., Olver, S.D., Don, A.L., Morris, E.S., Pettit, A.R., Wilson, Y.A., Robb, R.J., Randall, L.M., Korner, H., Engwerda, C.R., Clouston, A.D., Macdonald, K.P. & Hill, G.R. (2010) Soluble lymphotoxin is an important effector molecule in GVHD and GVL. *Blood*, **115**, 122-132.
- Marsh, S.G. (2011) Nomenclature for factors of the HLA system, update September 2010. *Hum Immunol*, **72**, 103-105.
- Martin, P.J. (2008) Biology of chronic graft-versus-host disease: implications for a future therapeutic approach. *Keio J Med*, **57**, 177-183.
- Martins, S.L., St John, L.S., Champlin, R.E., Wieder, E.D., McMannis, J., Molldrem, J.J. & Komanduri, K.V. (2004) Functional assessment and specific depletion of alloreactive human T cells using flow cytometry. *Blood*, **104**, 3429-3436.
- Meadows, L., Wang, W., den Haan, J.M., Blokland, E., Reinhardus, C., Drijfhout, J.W., Shabanowitz, J., Pierce, R., Agulnik, A.I., Bishop, C.E., Hunt, D.F., Goulmy, E. & Engelhard, V.H. (1997) The HLA-A\*0201-restricted H-Y antigen contains a posttranslationally modified cysteine that significantly affects T cell recognition. *Immunity*, **6**, 273-281.
- Mickelson, D.M., Sproat, L., Dean, R., Sobecks, R., Rybicki, L., Kalaycio, M., Pohlman, B., Sweetenham, J., Andresen, S., Bolwell, B. & Copelan, E.A. (2010) Comparison of donor chimerism following myeloablative and nonmyeloablative allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*.
- Mielke, S., Nunes, R., Rezvani, K., Fellowes, V.S., Venne, A., Solomon, S.R., Fan, Y., Gostick, E., Price, D.A., Scotto, C., Read, E.J. & Barrett, A.J. (2008) A clinical-scale selective alodepletion approach for the treatment of HLA-mismatched and matched donor-recipient pairs using expanded T lymphocytes as antigen-presenting cells and a TH9402-based photodepletion technique. *Blood*, **111**, 4392-4402.
- Milosevic, S., Bachnick, B., Karim, K., Bornkamm, G.W., Witter, K., Gerbitz, A., Mautner, J. & Behrends, U. (2010) Identification of MHC II-Restricted Minor Histocompatibility Antigens After HLA-Identical Stem-Cell Transplantation. *Transplantation*.

- Mischo, A., Wadle, A., Watzig, K., Jager, D., Stockert, E., Santiago, D., Ritter, G., Regitz, E., Jager, E., Knuth, A., Old, L., Pfreundschuh, M. & Renner, C. (2003) Recombinant antigen expression on yeast surface (RAYS) for the detection of serological immune responses in cancer patients. *Cancer Immun*, **3**, 5.
- Miwa, H., Kanno, H., Munakata, S., Akano, Y., Taniwaki, M. & Aozasa, K. (2000) Induction of chromosomal aberrations and growth-transformation of lymphoblastoid cell lines by inhibition of reactive oxygen species-induced apoptosis with interleukin-6. *Lab Invest*, **80**, 725-734.
- Mommaas, B., Kamp, J., Drijfhout, J.W., Beekman, N., Ossendorp, F., Van Veelen, P., Den Haan, J., Goulmy, E. & Mutis, T. (2002) Identification of a novel HLA-B60-restricted T cell epitope of the minor histocompatibility antigen HA-1 locus. *J Immunol*, **169**, 3131-3136.
- Moncrieffe, H., Coles, M. & Stockinger, B. (2008) The influence of CD4 T-cell subsets on control of CD4 T-cell-mediated graft-versus-host disease. *Immunology*, **125**, 459-468.
- Mor-Vaknin, N., Punturieri, A., Sitwala, K., Faulkner, N., Legendre, M., Khodadoust, M.S., Kappes, F., Ruth, J.H., Koch, A., Glass, D., Petruzzelli, L., Adams, B.S. & Markovitz, D.M. (2006) The DEK nuclear autoantigen is a secreted chemotactic factor. *Mol Cell Biol*, **26**, 9484-9496.
- Morris, E.S. & Hill, G.R. (2007) Advances in the understanding of acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol*, **137**, 3-19.
- Murata, M., Warren, E.H. & Riddell, S.R. (2003) A human minor histocompatibility antigen resulting from differential expression due to a gene deletion. *J Exp Med*, **197**, 1279-1289.
- Nicholls, S., Piper, K.P., Mohammed, F., Dafforn, T.R., Tenzer, S., Salim, M., Mahendra, P., Craddock, C., van Endert, P., Schild, H., Cobbold, M., Engelhard, V.H., Moss, P.A. & Willcox, B.E. (2009) Secondary anchor polymorphism in the HA-1 minor histocompatibility antigen critically affects MHC stability and TCR recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 3889-3894.
- Nikolich-Zugich, J. (2007) High specificity, not degeneracy, allows T cell alloresponses. *Nat Immunol*, **8**, 335-337.

- Niller, H.H., Wolf, H. & Minarovits, J. (2008) Regulation and dysregulation of Epstein-Barr virus latency: implications for the development of autoimmune diseases. *Autoimmunity*, **41**, 298-328.
- Nowak, J. (2008) Role of HLA in hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*, **42 Suppl 2**, S71-76.
- Oh, H.H., Kwon, S.H., Kim, C.W., Choe, B.H., Ko, C.W., Jung, H.D., Suh, J.S. & Lee, J.H. (2004) Molecular analysis of HLA class II-associated susceptibility to neuroinflammatory diseases in Korean children. *J Korean Med Sci*, **19**, 426-430.
- Olsson, R., Remberger, M., Hassan, Z., Omazic, B., Mattsson, J. & Ringden, O. (2010) GVHD prophylaxis using low-dose cyclosporine improves survival in leukaemic recipients of HLA-identical sibling transplants. *Eur J Haematol*, **84**, 323-331.
- Penas, P.F. & Zaman, S. (2010) Many faces of graft-versus-host disease. *Australas J Dermatol*, **51**, 1-10; quiz 11.
- Perreault, C. & Brochu, S. (2002) Adoptive cancer immunotherapy: discovering the best targets. *J Mol Med*, **80**, 212-218.
- Pierce, R.A., Field, E.D., den Haan, J.M., Caldwell, J.A., White, F.M., Marto, J.A., Wang, W., Frost, L.M., Blokland, E., Reinhardus, C., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Goulmy, E. & Engelhard, V.H. (1999) Cutting edge: the HLA-A\*0101-restricted HY minor histocompatibility antigen originates from DFFRY and contains a cysteinylated cysteine residue as identified by a novel mass spectrometric technique. *J Immunol*, **163**, 6360-6364.
- Ramirez-Montagut, T., Chow, A., Kochman, A.A., Smith, O.M., Suh, D., Sindhi, H., Lu, S., Borsotti, C., Grubin, J., Patel, N., Terwey, T.H., Kim, T.D., Heller, G., Murphy, G.F., Liu, C., Alpdogan, O. & van den Brink, M.R. (2007) IFN-gamma and Fas ligand are required for graft-versus-tumor activity against renal cell carcinoma in the absence of lethal graft-versus-host disease. *J Immunol*, **179**, 1669-1680.
- Rauch, J., Ahlemann, M., Schaffrik, M., Mack, B., Ertongur, S., Andratschke, M., Zeidler, R., Lang, S. & Gires, O. (2004) Allogenic antibody-mediated identification of head and neck cancer antigens. *Biochem Biophys Res Commun*, **323**, 156-162.

- Ray, W.Z., Kasukurthi, R., Papp, E.M., Moore, A.M., Yee, A., Hunter, D.A., Solowski, N.L., Mohanakumar, T., Mackinnon, S.E. & Tung, T.H. (2010) The role of T helper cell differentiation in promoting nerve allograft survival with costimulation blockade. *J Neurosurg*, **112**, 386-393.
- Richard, S., Isola, L., Scigliano, E., Singh, H., Najfeld, V., Gilbert, H., Weinberg, R.S. & Fruchtman, S. (2002) Syngeneic stem cell transplant for spent-phase polycythaemia vera: eradication of myelofibrosis and restoration of normal haematopoiesis. *Br J Haematol*, **117**, 245-246.
- Riddell, S.R., Murata, M., Bryant, S. & Warren, E.H. (2002) T-cell therapy of leukemia. *Cancer Control*, **9**, 114-122.
- Riera, C., Deroover, Y. & Marechal, M. (2010) Severe vaginal chronic graft-versus-host disease (GVHD): two cases with late onset and literature review. *Eur J Gynaecol Oncol*, **31**, 703-704.
- Romieu-Mourez, R., Francois, M., Boivin, M.N., Stagg, J. & Galipeau, J. (2007) Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN-gamma, TGF-beta, and cell density. *J Immunol*, **179**, 1549-1558.
- Rotolo, J.A., Stancevic, B., Lu, S.X., Zhang, J., Suh, D., King, C.G., Kappel, L.W., Murphy, G.F., Liu, C., Fuks, Z., van den Brink, M.R. & Kolesnick, R. (2009) Cytolytic T cells induce ceramide-rich platforms in target cell membranes to initiate graft-versus-host disease. *Blood*, **114**, 3693-3706.
- Rueff, J., Gaspar, J. & Kranendonk, M. (2002) DNA polymorphisms as modulators of genotoxicity and cancer. *Biol Chem*, **383**, 923-932.
- Rufer, N., Wolpert, E., Helg, C., Tiercy, J.M., Gratwohl, A., Chapuis, B., Jeannet, M., Goulmy, E. & Roosnek, E. (1998) HA-1 and the SMCY-derived peptide FIDSYICQV (H-Y) are immunodominant minor histocompatibility antigens after bone marrow transplantation. *Transplantation*, **66**, 910-916.
- Sahara, H. & Shastri, N. (2003) Second class minors: molecular identification of the autosomal H46 histocompatibility locus as a peptide presented by major histocompatibility complex class II molecules. *J Exp Med*, **197**, 375-385.

- Sahin, U., Neumann, F., Tureci, O., Schmits, R., Perez, F. & Pfreundschuh, M. (2002) Hodgkin and Reed-Sternberg cell-associated autoantigen CLIP-170/restin is a marker for dendritic cells and is involved in the trafficking of macropinosomes to the cytoskeleton, supporting a function-based concept of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood*, **100**, 4139-4145.
- Sahin, U., Tureci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I. & Pfreundschuh, M. (1995) Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11810-11813.
- Sangiolo, D., Storb, R., Deeg, H.J., Flowers, M.E., Martin, P.J., Sandmaier, B.M., Kiem, H.P., Nash, R.A., Doney, K., Leisenring, W.M. & Georges, G.E. (2010) Outcome of allogeneic hematopoietic cell transplantation from HLA-identical siblings for severe aplastic anemia in patients over 40 years of age. *Biol Blood Marrow Transplant*, **16**, 1411-1418.
- Shaw, P.J., Kan, F., Ahn, K.W., Spellman, S.R., Aljurf, M., Ayas, M., Burke, M., Cairo, M.S., Chen, A.R., Davies, S.M., Frangoul, H., Gajewski, J., Gale, R.P., Godder, K., Hale, G.A., Heemskerk, M.B., Horan, J., Kamani, N., Kasow, K.A., Chan, K.W., Lee, S.J., Leung, W.H., Lewis, V.A., Miklos, D., Oudshoorn, M., Petersdorf, E.W., Ringden, O., Sanders, J., Schultz, K.R., Seber, A., Setterholm, M., Wall, D.A., Yu, L. & Pulsipher, M.A. (2010) Outcomes of pediatric bone marrow transplantation for leukemia and myelodysplasia using matched sibling, mismatched related or matched unrelated donors. *Blood*.
- Shimada, H., Shiratori, T., Yasuraoka, M., Kagaya, A., Kuboshima, M., Nomura, F., Takiguchi, M., Ochiai, T., Matsubara, H. & Hiwasa, T. (2009) Identification of Makorin 1 as a novel SEREX antigen of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, **9**, 232.
- Shlomchik, W.D. (2007) Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol*, **7**, 340-352.
- Slager, E.H., Honders, M.W., van der Meijden, E.D., van Luxemburg-Heijs, S.A., Kloosterboer, F.M., Kester, M.G., Jedema, I., Marijt, W.A., Schaafsma, M.R., Willemze, R. & Falkenburg, J.H. (2006) Identification of the angiogenic endothelial-cell growth factor-1/thymidine phosphorylase as a potential target for immunotherapy of cancer. *Blood*, **107**, 4954-4960.

- Song, M.H., Ha, J.C., Lee, S.M., Park, Y.M. & Lee, S.Y. (2011) Identification of BCP-20 (FBOX39) as a cancer/testis antigen from colon cancer patients by SEREX. *Biochem Biophys Res Commun.*
- Sostak, P., Padovan, C.S., Eigenbrod, S., Roeber, S., Segerer, S., Schankin, C., Siegert, S., Saam, T., Theil, D., Kolb, H.J., Kretzschmar, H. & Straube, A. (2010) Cerebral angiitis in four patients with chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant*, **45**, 1181-1188.
- Spierings, E., Vermeulen, C.J., Vogt, M.H., Doerner, L.E., Falkenburg, J.H., Mutis, T. & Goulmy, E. (2003) Identification of HLA class II-restricted H-Y-specific T-helper epitope evoking CD4+ T-helper cells in H-Y-mismatched transplantation. *Lancet*, **362**, 610-615.
- Storb, R. & Champlin, R.E. (1991) Bone marrow transplantation for severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant*, **8**, 69-72.
- Stumpf, A.N., van der Meijden, E.D., van Bergen, C.A., Willemze, R., Falkenburg, J.H. & Griffioen, M. (2009) Identification of 4 new HLA-DR-restricted minor histocompatibility antigens as hematopoietic targets in antitumor immunity. *Blood*, **114**, 3684-3692.
- Sullivan, K.M., Weiden, P.L., Storb, R., Witherspoon, R.P., Fefer, A., Fisher, L., Buckner, C.D., Anasetti, C., Appelbaum, F.R., Badger, C. & et al. (1989) Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on relapse and survival after bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment of acute and chronic leukemia. *Blood*, **73**, 1720-1728.
- Tabbara, I.A., Zimmerman, K., Morgan, C. & Nahleh, Z. (2002) Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: complications and results. *Arch Intern Med*, **162**, 1558-1566.
- Tawara, I., Shlomchik, W.D., Jones, A., Zou, W., Nieves, E., Liu, C., Toubai, T., Duran-Struuck, R., Sun, Y., Clouthier, S.G., Evers, R., Lowler, K.P., Levy, R.B. & Reddy, P. (2010) A crucial role for host APCs in the induction of donor CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated suppression of experimental graft-versus-host disease. *J Immunol*, **185**, 3866-3872.
- Thomas, E.D., Lochte, H.L., Jr., Cannon, J.H., Sahler, O.D. & Ferrebee, J.W. (1959) Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest*, **38**, 1709-1716.

- 
- Thomas, E.D., Lochte, H.L., Jr., Lu, W.C. & Ferrebee, J.W. (1957) Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*, **257**, 491-496.
- Thompson, J.S., Chu, Y., Glass, J.F. & Brown, S.A. (2010) Absence of IL-23p19 in donor allogeneic cells reduces mortality from acute GVHD. *Bone Marrow Transplant*, **45**, 712-722.
- Tivol, E., Komorowski, R. & Drobyski, W.R. (2005) Emergent autoimmunity in graft-versus-host disease. *Blood*, **105**, 4885-4891.
- Tomblyn, M. & Lazarus, H.M. (2008) Donor lymphocyte infusions: the long and winding road: how should it be traveled? *Bone Marrow Transplant*, **42**, 569-579.
- Torikai, H., Akatsuka, Y., Miyauchi, H., Terakura, S., Onizuka, M., Tsujimura, K., Miyamura, K., Morishima, Y., Kodera, Y., Kuzushima, K. & Takahashi, T. (2007) The HLA-A\*0201-restricted minor histocompatibility antigen HA-1H peptide can also be presented by another HLA-A2 subtype, A\*0206. *Bone Marrow Transplant*, **40**, 165-174.
- Torikai, H., Akatsuka, Y., Miyazaki, M., Tsujimura, A., Yatabe, Y., Kawase, T., Nakao, Y., Tsujimura, K., Motoyoshi, K., Morishima, Y., Kodera, Y., Kuzushima, K. & Takahashi, T. (2006) The human cathepsin H gene encodes two novel minor histocompatibility antigen epitopes restricted by HLA-A\*3101 and -A\*3303. *Br J Haematol*, **134**, 406-416.
- Torikai, H., Akatsuka, Y., Miyazaki, M., Warren, E.H., 3rd, Oba, T., Tsujimura, K., Motoyoshi, K., Morishima, Y., Kodera, Y., Kuzushima, K. & Takahashi, T. (2004) A novel HLA-A\*3303-restricted minor histocompatibility antigen encoded by an unconventional open reading frame of human TMSB4Y gene. *J Immunol*, **173**, 7046-7054.
- Travnik, R., Beckers, M., Wolff, D., Holler, E., Landthaler, M. & Karrer, S. (2011a) [Graft-versus-Host Disease (GvHD) - an update : Part 1: Pathophysiology, clinical features and classification of GvHD.]. *Hautarzt*.
- Travnik, R., Beckers, M., Wolff, D., Holler, E., Landthaler, M. & Karrer, S. (2011b) [Graft-versus-Host Disease (GvHD) - an update : Part 2: Prognosis and therapy of GvHD.]. *Hautarzt*.



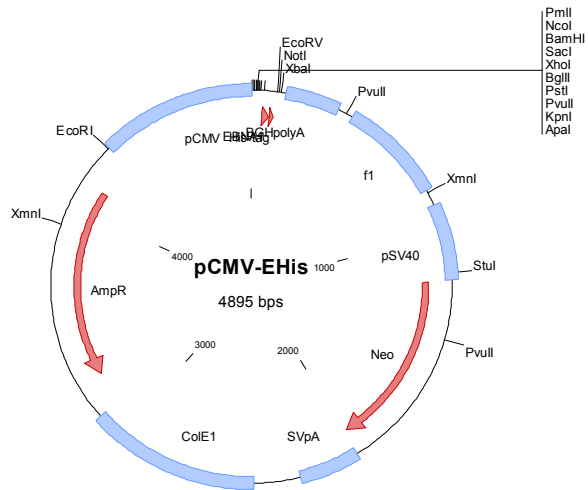
- Turtle, C.J. & Riddell, S.R. (2010) Artificial antigen-presenting cells for use in adoptive immunotherapy. *Cancer J*, **16**, 374-381.
- van Bergen, C.A., Kester, M.G., Jedema, I., Heemskerk, M.H., van Luxemburg-Heijs, S.A., Kloosterboer, F.M., Marijt, W.A., de Ru, A.H., Schaafsma, M.R., Willemze, R., van Veelen, P.A. & Falkenburg, J.H. (2007) Multiple myeloma-reactive T cells recognize an activation-induced minor histocompatibility antigen encoded by the ATP-dependent interferon-responsive (ADIR) gene. *Blood*, **109**, 4089-4096.
- Van Bergen, C.A., Rutten, C.E., Van Der Meijden, E.D., Van Luxemburg-Heijs, S.A., Lurvink, E.G., Houwing-Duistermaat, J.J., Kester, M.G., Mulder, A., Willemze, R., Falkenburg, J.H. & Griffioen, M. (2010) High-throughput characterization of 10 new minor histocompatibility antigens by whole genome association scanning. *Cancer Res*, **70**, 9073-9083.
- van Els, C., Bakker, A., Zwaan, F., van Rood, J.J. & Goulmy, E. (1989) Incidence of anti-host cytotoxic and proliferative T cell responses after HLA-identical bone marrow transplantation (BMT). *Transplant Proc*, **21**, 2987-2988.
- van Sechel, A.C., Bajramovic, J.J., van Stipdonk, M.J., Persoon-Deen, C., Geutskens, S.B. & van Noort, J.M. (1999) EBV-induced expression and HLA-DR-restricted presentation by human B cells of alpha B-crystallin, a candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Immunol*, **162**, 129-135.
- Vogt, M.H., Goulmy, E., Kloosterboer, F.M., Blokland, E., de Paus, R.A., Willemze, R. & Falkenburg, J.H. (2000) UTY gene codes for an HLA-B60-restricted human male-specific minor histocompatibility antigen involved in stem cell graft rejection: characterization of the critical polymorphic amino acid residues for T-cell recognition. *Blood*, **96**, 3126-3132.
- Vogt, M.H., van den Muijsenberg, J.W., Goulmy, E., Spierings, E., Kluck, P., Kester, M.G., van Soest, R.A., Drijfhout, J.W., Willemze, R. & Falkenburg, J.H. (2002) The DBY gene codes for an HLA-DQ5-restricted human male-specific minor histocompatibility antigen involved in graft-versus-host disease. *Blood*, **99**, 3027-3032.
- Voskoboinik, I., Dunstone, M.A., Baran, K., Whisstock, J.C. & Trapani, J.A. (2010) Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol Rev*, **235**, 35-54.

- Walker, L.S. & Abbas, A.K. (2002) The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol*, **2**, 11-19.
- Wang, W., Meadows, L.R., den Haan, J.M., Sherman, N.E., Chen, Y., Blokland, E., Shabanowitz, J., Agulnik, A.I., Hendrickson, R.C., Bishop, C.E. & et al. (1995) Human H-Y: a male-specific histocompatibility antigen derived from the SMCY protein. *Science*, **269**, 1588-1590.
- Warren, E.H., Fujii, N., Akatsuka, Y., Chaney, C.N., Mito, J.K., Loeb, K.R., Gooley, T.A., Brown, M.L., Koo, K.K., Rosinski, K.V., Ogawa, S., Matsubara, A., Appelbaum, F.R. & Riddell, S.R. (2010) Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Blood*, **115**, 3869-3878.
- Warren, E.H., Gavin, M., Greenberg, P.D. & Riddell, S.R. (1998) Minor histocompatibility antigens as targets for T-cell therapy after bone marrow transplantation. *Curr Opin Hematol*, **5**, 429-433.
- Warren, E.H., Gavin, M.A., Simpson, E., Chandler, P., Page, D.C., Disteché, C., Stankey, K.A., Greenberg, P.D. & Riddell, S.R. (2000) The human UTY gene encodes a novel HLA-B8-restricted H-Y antigen. *J Immunol*, **164**, 2807-2814.
- Warren, E.H., Vigneron, N.J., Gavin, M.A., Coulie, P.G., Stroobant, V., Dalet, A., Tykodi, S.S., Xuereb, S.M., Mito, J.K., Riddell, S.R. & Van den Eynde, B.J. (2006) An antigen produced by splicing of noncontiguous peptides in the reverse order. *Science*, **313**, 1444-1447.
- Weiden, P.L., Sullivan, K.M., Flournoy, N., Storb, R. & Thomas, E.D. (1981) Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med*, **304**, 1529-1533.
- Weiss, B., Hoffmann, M., Anders, C., Hellstern, P., Schmitz, N. & Uppenkamp, M. (2004) Gamma-irradiation of blood products following autologous stem cell transplantation: surveillance of the policy of 35 centers. *Ann Hematol*, **83**, 44-49.
- Wysoczanska, B., Bogunia-Kubik, K., Dlubek, D., Jaskula, E., Sok, A., Drabczak-Skrzypek, D., Sedzimirska, M. & Lange, A. (2007) Association with the presence of naive T cells in chronic myeloid leukemia patients after allogeneic human stem cell transplantation and the lower incidence of chronic graft-versus host disease and relapse. *Transplant Proc*, **39**, 2898-2901.

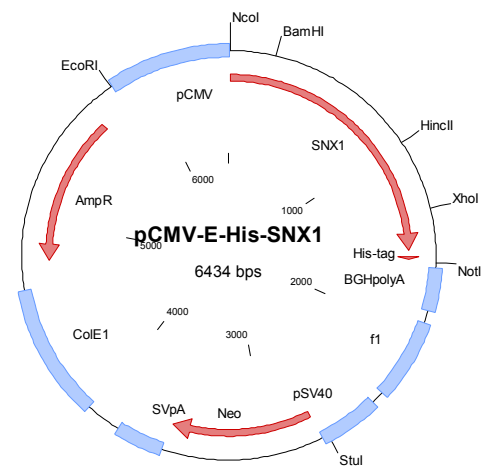
- Yakoub-Agha, I., Saule, P., Depil, S., Micol, J.B., Grutzmacher, C., Boulanger-Villard, F., Bauters, F., Jouet, J.P., Dessaint, J.P. & Labalette, M. (2006) A high proportion of donor CD4+ T cells expressing the lymph node-homing chemokine receptor CCR7 increases incidence and severity of acute graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancy. *Leukemia*, **20**, 1557-1565.
- Zhang, Y., Louboutin, J.P., Zhu, J., Rivera, A.J. & Emerson, S.G. (2002) Preterminal host dendritic cells in irradiated mice prime CD8+ T cell-mediated acute graft-versus-host disease. *J Clin Invest*, **109**, 1335-1344.
- Zhao, D., Young, J.S., Chen, Y.H., Shen, E., Yi, T., Todorov, I., Chu, P.G., Forman, S.J. & Zeng, D. (2011) Alloimmune response results in expansion of autoreactive donor CD4+ T cells in transplants that can mediate chronic graft-versus-host disease. *J Immunol*, **186**, 856-868.
- Zheng, J., Jing, W. & Orentas, R.J. (2009) Discovery of YB-1 as a new immunological target in neuroblastoma by vaccination in the context of regulatory T cell blockade. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, **41**, 980-990.
- Zittoun, R.A., Mandelli, F., Willemze, R., de Witte, T., Labar, B., Resegotti, L., Leoni, F., Damasio, E., Visani, G., Papa, G. & et al. (1995) Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Leukemia Cooperative Groups. *N Engl J Med*, **332**, 217-223.
- Zorn, E., Miklos, D.B., Floyd, B.H., Mattes-Ritz, A., Guo, L., Soiffer, R.J., Antin, J.H. & Ritz, J. (2004) Minor histocompatibility antigen DBY elicits a coordinated B and T cell response after allogeneic stem cell transplantation. *J Exp Med*, **199**, 1133-1142.
- Zur Hausen, H. (1967) Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells. *J Virol*, **1**, 1174-1185.

# Anhang:

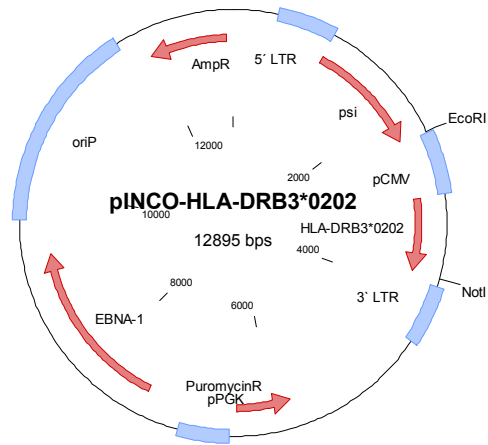
## Expressionsplasmide



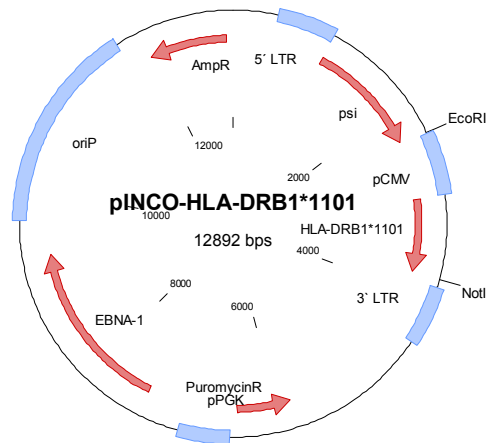
A) pCMV-E-His



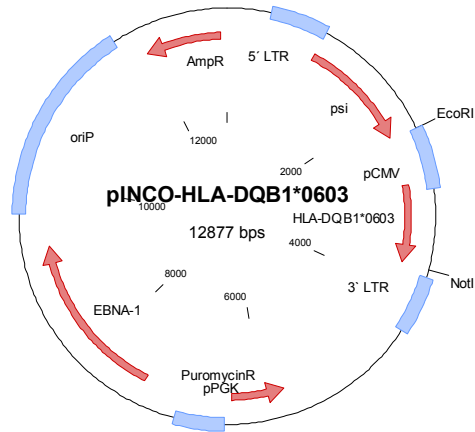
B) pCMV-E-His-SNX1



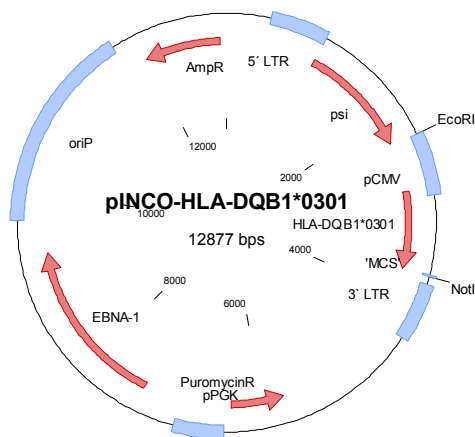
C) pINCO-HLA-DRB3\*0202



D) pINCO-HLA-DRB1\*1101



E) pINCO-HLA-DQB1\*0603



F) pINCO-HLA-DQB1\*0301

## Danksagungen

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an meinen Betreuer **Dr. Josef Mautner** richten, ohne den ich niemals ein Licht am Ende der Doktorarbeit gesehen hätte. Für seine Geduld und für die exzellente Betreuung sowie für sein immer offenes Ohr bei Problemen aller Art und nicht zuletzt für viele interessante Diskussionen.

Bei **Prof. Dr. Uta Behrends** möchte ich mich für ihre große Unterstützung bedanken und dafür, dass sie es mir ermöglicht hat, meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen.

Bei **Prof. Dr. Reinhard Zeidler** möchte ich mich für die offizielle Betreuung meiner Doktorarbeit und das Erstellen des Erstgutachtens bedanken.

Bei **Heike, Isabella, Max** und **Steffi** möchte ich mich bedanken, daß sie nicht nur meine schlechte Laune und meine Zeiten der überstrapazierten Nerven erduldet und überstanden haben, sondern mir mit Ihrem Fachwissen, ihrer konstruktiven Kritik und ihren vielen Ideen immer wieder den nötigen Anschub gegeben haben.

Bei **Frau Lechner, Frank, Conny** und allen anderen Mitarbeitern des Hämatologikums möchte ich mich für die nette Arbeitsatmosphäre und die tolle Zusammenarbeit bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, Geschwister und Freunde, die mich in vielerlei Hinsicht unterstützen haben.