

**Induktion und Selektion
allorestringierter, Peptid-spezifischer T-Zellen
für die adoptive Therapie von Tumoren**

Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Angefertigt am

Institut für Molekulare Immunologie
GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
unter der Betreuung von Prof. Dolores J. Schendel

vorgelegt von

Susanne Wilde

München, den 26.06.07

Erstgutachter:

Frau PD Dr. Christine S. Falk

Zweitgutachter:

Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Dissertation eingereicht am:

26.06.07

Tag der mündlichen Prüfung:

14.12.07

Das schönste Glück des denkenden Menschen ist,
das Erforschliche erforscht zu haben und
das Unerforschliche zu verehren.

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Immunsystem.....	1
1.2 Immunüberwachung und Tumor-Flucht.....	2
1.3 Dendritische Zellen (DZ).....	7
1.4 T-Zellentwicklung.....	9
1.5 Allorestriktion in der Immuntherapie.....	13
1.6 Generierung hoch avider T-Zellen.....	16
1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	18
2 Material.....	21
2.1 Geräte und sonstige Materialien.....	21
2.2 Enzyme und Chemikalien.....	23
2.3 Kits.....	24
2.4 Zellkulturmedien.....	25
2.5 Zellen.....	27
2.6 Antikörper.....	27
2.7 Puffer und Lösungen.....	28
2.8 Plasmide.....	29
2.9 Peptide.....	29
2.10 Tetramere und Streptamer.....	30
2.11 Primer für Bcl-2 und T-Zell-Rezeptor-Analyse.....	30
2.12 Personen.....	32

3 Methoden.....	33
3.1 Zellbiologische Methoden.....	33
3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	33
3.1.2 Bestimmung der Zellzahl.....	33
3.1.3 Einfrieren von Zellen.....	33
3.1.4 Auftauen von Zellen.....	34
3.1.5 Kultivierung adhärenter Tumorzelllinien.....	34
3.1.6 Kultivierung von Suspensionszellen.....	34
3.1.7 Kultivierung von EBV-transformierten B-Zelllinien.....	34
3.1.8 Kultivierung von etablierten T-Zellklonen.....	35
3.1.9 Generierung und Kultivierung Dendritischer Zellen (DZ).....	36
3.1.10 <i>De-novo</i> -Induktion von naïven T-Zellen mit RNS-beladenen DZ.....	36
3.1.11 Kultivierung von Peptid-spezifischen T-Zelllinien und -klonen.....	37
3.2 Magnetische Sortierung von Zellen.....	37
3.2.1 CD8 ⁺ -T-Zell-Isolierung mittels negativer Separation.....	37
3.2.2 Streptamersortierung.....	38
3.3 Durchflusszytometrie.....	38
3.3.1 Färbung von Oberflächenmolekülen.....	39
3.3.2 Färbung von intrazellulären Proteinen.....	40
3.3.3 Tetramerfärbung, -sortierung und Tetramerdissoziationsversuche.....	41
3.4 Produktion von Einzel-Spezies-RNS.....	42
3.4.1 Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNS.....	42
3.4.2 Selektion und Expansion der transformierten Bakterienzellen.....	42
3.4.3 Einfrieren der transformierten Bakterienzellen.....	43
3.4.4 Plasmid-DNS-Extraktion aus transformierten Bakterienzellen.....	43
3.4.5 <i>In vitro</i> Transkription der Einzel-Spezies-cDNS in <i>ivt</i> RNS.....	43
3.4.6 Aufreinigung der <i>ivt</i> RNS.....	44
3.4.7 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren.....	44

3.5 Elektrophorese.....	44
3.5.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNS.....	44
3.5.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNS.....	45
3.5.3 Gel-Extraktion.....	45
3.5.4 Sequenzierung.....	45
3.6 Analyse des TZR-V α β -Repertoires.....	45
3.6.1 Isolierung von zellulärer Gesamt-RNS.....	46
3.6.2 Reverse Transkription der isolierten RNS in cDNS.....	46
3.6.3 TZR-PCR zur Analyse von TZR-Sequenzen.....	47
3.6.4 TZR-PCR mit degenerierten V-Primern zur Analyse klonaler TZR-Sequenzen.....	48
3.7 Quantitative RT-PCR (“real-time”-PCR).....	49
3.8 RNS-Transfektion von DZ mittels Elektroporation.....	51
3.9 Funktionelle Versuche.....	52
3.9.1 Exogene Beladung von T2-Zellen mit Peptiden.....	52
3.9.3 Koinkubation von T-Zellen mit Stimulationszellen.....	52
3.9.3 IFN- γ -ELISA.....	53
3.9.4 Multiplex-Verfahren zur Quantifizierung von löslichen Proteinen.....	54
3.9.5 51 Chrom-Freisetzungs-Versuch.....	55
3.10 HLA-Klasse-I-Typisierung.....	56
4 Ergebnisse.....	58
4.1 Generierung von <i>ivt</i> RNS-beladenen Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) für die <i>De-novo</i> -Induktion von Immunantworten in naiven T-Zellen.....	59
4.1.1 Generierung von Dendritischen Zellen (DZ).....	59
4.1.2 Transfektion von HLA-A2-negativen DZ mit <i>in vitro</i> transkribierter HLA-A2-RNS.....	62
4.1.3 Transfektion von HLA-A2-positiven DZ mit <i>ivt</i> RNS, die für das Tumor-assoziierte Antigen Tyrosinase kodiert.....	66
4.1.4 Koexpression von HLA-A2- und Tyrosinase- <i>ivt</i> RNS in HLA-A2-negativen DZ... 68	
4.1.4.1 Koexpression von HLA-A2 und dem Tumor-assoziierten Antigen Melan-A..... 70	
4.1.4.2 Einfluss der <i>ivt</i> RNS-Konzentrationen auf die Expression von HLA-A2 und Tyrosinase.....	72

4.2 Bestimmung der Funktion und TZR-Spezifität von bereits etablierten zytotoxischen CD8 ⁺ -T-Zelllymphozyten-Klonen TyrF8 und IVS B.....	74
4.2.1 Prinzip und Etablierung der Tetramerfärbung.....	74
4.2.2 Bestimmung der Spezifität der Tetramerbindung und Avidität der TZR mittels Tetramerfärbung.....	76
4.2.3 IFN- γ -Sekretion von TyrF8- und IVS B-Zellen nach Peptid-Stimulation.....	78
4.2.4 Zytotoxische Aktivität von TyrF8 und IVS B T-Zellen.....	79
4.2.5 Oberflächenexpression von Fitnesssmarkern.....	81
4.2.6 T-Zell-Rezeptor Analyse.....	82
4.3 <i>De-novo</i> -Induktion von Antigen-spezifischen CD8 ⁺ -T-Zellen mit Hilfe von <i>ivtRNS</i> -beladenen DZ.....	83
4.3.1 Protokoll für die <i>De-novo</i> -Induktion antigen-spezifischer T-Zellen mit <i>ivtRNS</i> -beladenen DZ.....	83
4.3.2 Anreicherung der CD8 ⁺ -T-Zellen mittels negativer Separation.....	85
4.3.3 Expression der MHC-Peptid-Liganden auf <i>ivtRNS</i> -transfizierten DZ.....	87
4.3.4 Epitop-Erkennung durch den ZTL Klon TyrF8.....	88
4.3.5 Erste Suche nach HLA-A2-restringierten YMD-spezifischen T-Zellen.....	90
4.4 Selektion Peptid-spezifischer T-Zelllinien.....	91
4.4.1 Sortierung der Peptid-spezifischen T-Zellen mit Hilfe von Tetramer.....	91
4.4.2 Tetramerbindung und -dissoziation mittels Tetramer-sortierter T-Zelllinien.....	92
4.4.3 Sortierung der Peptid-spezifischen T-Zellen via Streptamer.....	96
4.4.4 Vergleich von Streptamer-sortierten gegenüber Tetramer-sortierten T-Zellen bezüglich Tetramerbindung und -dissoziation.....	96
4.4.5 IFN- γ -Sekretion der T-Zelllinien.....	98
4.4.6 Zytotoxische Aktivität der T-Zelllinien.....	99
4.4.7 Oberflächenexpression von „Fitness“-Markern.....	101
4.5 Bestimmung der Funktion und Spezifität von generierten T-Zellklonen....	103
4.5.1 Suche nach YMD-Peptid-spezifischen T-Zellen.....	103
4.5.2 Bestimmung der Spezifität der Tetramerbindung und TZR-Avidität der T-Zellklone	107
4.5.3 IFN- γ -Sekretion einiger T-Zellklone.....	113
4.5.4 Zytotoxische Aktivität einiger T-Zellklone.....	119
4.5.5 Oberflächenexpression von „Fitness“-Markern auf T-Zellklonen.....	123
4.5.6 T-Zell-Rezeptor Analyse der T-Zellklone.....	126
4.5.7 Analyse unterschiedlicher T-Zell-Zytokine ausgewählter T-Zellklone mittels Multiplex-Verfahren.....	128

5 Diskussion.....	131
5.1 <i>ivf</i> RNS-beladene DZ als APZ.....	132
5.2 Funktionalität der etablierten Tyrosinase-Peptid-spezifischen CD8 ⁺ -T-Zellklone: TyrF8 und IVS B.....	135
5.3 <i>De-novo</i> -Induktion von Tyrosinase-Peptid-spezifischen CD8 ⁺ -T-Zellen....	137
5.4 Sortierungs-Strategien Peptid-spezifischer T-Zellen.....	139
5.5 „Semi“-allogenes und autologes System im Vergleich.....	141
5.6 T-Zellklone beider Stimulationsansätze im Vergleich.....	144
5.7 Vergleich der erhaltenen Klone mit TyrF8 und IVS B T-Zellen.....	148
5.8 „Fitness“.....	149
5.9 Zytokinmuster.....	151
5.10 Gefahren des adoptiven Transfers hoch avider CD8 ⁺ -T-Zellen.....	153
5.11 Ausblick.....	154
6 Literaturverzeichnis.....	155
7 Abkürzungen.....	169
8 Danksagung.....	173
9 Lebenslauf.....	175

Zusammenfassung

Die Immuntherapie erweist sich zunehmend als viel versprechender, zur klassischen Krebstherapie alternativer Ansatz bei der Tumorbekämpfung. Dabei macht sie sich das in Lebewesen vorhandene immunologische Instrumentarium und das hierzu erlangte Verständnis zunutze, um es gezielt auf die Tumorbeseitigung auszurichten.

Unter den vielfältigen methodischen Ansätzen erwies sich der adoptive Transfer von selektierten, Tumor-spezifischen T-Zellen als besonders effektiv. Das Dilemma bei der Generierung solcher Tumor-spezifischen T-Zellen ist, dass die meisten Tumoren aus entarteten Körperzellen entstehen und somit keine körperfremden Antigene präsentieren, die von den Zellen des Immunsystems erkannt werden können. Die Tumorzellen unterscheiden sich von normalen Körperzellen häufig nur in überexprimierten Selbst-Proteinen, die über Selbst-MHC-Moleküle präsentiert werden (Selbst-Peptid + Selbst-MHC). T-Zellen mit hoch affinen T-Zell-Rezeptoren (TZR) für solche Selbst-Peptide werden während ihrer Entwicklung im Thymus durch den Prozess der negativen Selektion eliminiert, um Autoimmunität zu verhindern. Diejenigen selbst-reaktiven T-Zellen, die diesen Prozess überstehen, tragen normalerweise niedrig affine TZR für solche Selbst-Peptide. Für eine erfolgreiche Eliminierung von Tumoren durch das Immunsystem werden jedoch T-Zellen mit hoch affinen TZR benötigt, die mit geeigneten Effektorfunktionen ausgestattet sind. Die Entdeckung von Alloreaktivität im T-Zellrepertoire, d.h. T-Zellen, die fremde MHC-Moleküle Peptid-unabhängig oder -abhängig erkennen, eröffnete eine neue Quelle für T-Zellen, die nicht negativ selektiert wurden und somit hoch affine TZR für Selbst-Peptid:Fremd-MHC-Liganden besitzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe von RNS-beladenen Dendritischen Zellen (DZ) ein neuartiges System etabliert, mit dem es möglich ist, allorestingierte $CD8^+$ -T-Zellen mit hoch affinen TZR gegen Tumor-assoziierte Selbst-Peptide zu isolieren, die in der Lage sind, Tumorzellen zu töten und somit wirkungsvoll für die adoptive Therapie von Tumoren eingesetzt werden können. Zur Überprüfung des Prinzips wurde als MHC-Klasse-I-Molekül HLA-A2 und als Tumor-assoziiertes Antigen (TAA) Tyrosinase gewählt. Theoretisch könnte jedoch jedes beliebige MHC-Klasse-I- und -II-Molekül bzw. TAA, von dem die DNS-Sequenz bekannt ist, verwendet werden.

Im Folgenden wurden zwei verschiedene Ansätze in ihrer Fähigkeit verglichen, T-Zellen mit hoch affinen TZR spezifisch für Tumor-assoziierte Selbst-Peptide zu induzieren.

Im herkömmlichen autologen *De-novo*-Induktionsansatz wurden zur Stimulation von autologen T-Zellen DZ von HLA-A2-positiven Spendern verwendet, die mit *in vitro* transkribierter RNS (*ivtRNS*), kodierend für Tyrosinase-Protein, transfiziert worden waren. Erwartungsgemäß sollten auf diese Weise nur T-Zellen generiert werden, die niedrig affine TZR besitzen, da T-Zellen mit hoch affinen TZR während ihrer Entwicklung im Thymus durch den Prozess der negativen Selektion eliminiert wurden.

Im „semi“-allogenen *De-novo*-Induktionsansatz wurden DZ eines HLA-A2-negativen Spenders sowohl mit HLA-A2-*ivtRNS* als auch mit Tyrosinase-*ivtRNS* kotransfiziert und für die Stimulation autologer T-Zellen verwendet. Da die prozessierten Tyrosinase-Peptide in diesem Ansatz nicht nur über Selbst-MHC-Moleküle, sondern auch über Fremd-MHC-Moleküle präsentiert wurden, sollten auf diese Weise ein nicht negativ selektiertes T-Zellrepertoire abgegriffen und T-Zellen mit hoch affinen TZR induziert werden.

Zuerst wurden potenzielle Antigen-präsentierende Zellen (APZ), die DZ, mit *ivtRNS* transfiziert und sowohl die Expression der HLA-A2-Moleküle und Tyrosinase-Proteine als auch die Stimulationskapazität dieser *ivtRNS*-beladenen DZ nachgewiesen. Folglich standen geeignete Stimulationszellen zur Verfügung.

Um später die Qualität der T-Zellklone, die in dieser Arbeit generiert wurden, einschätzen zu können, wurden die bereits etablierten Tyrosinase-Peptid-spezifischen T-Zellklone TyrF8 und IVS B sowohl im Hinblick auf Avidität und Affinität ihrer TZR, als auch hinsichtlich ihrer Lyseeigenschaften von Melanomzellen, ihrer „Fitness“ und den von ihnen sezernierten Zytokinen untersucht.

Beim Vergleich der T-Zelllinien, die mit beiden Ansätzen generiert wurden, zeigte sich, dass T-Zellen mit höherer Avidität erhalten wurden, wenn ein nicht negativ selektiertes T-Zellrepertoire mit allogenen Peptid-MHC-Liganden abgegriffen wurde. Auch war eine funktionelle Überlegenheit der allorestingierten T-Zelllinien bezüglich ihrer IFN- γ -Sekretion und Zytotoxizität zu beobachten.

Auf Ebene der T-Zellklone wurde diese funktionelle Überlegenheit bestätigt. Auch die TZR-Affinitäten der allorestingierten, Peptid-spezifischen T-Zellklone lagen signifikant höher als die der autorestringierten Peptid-spezifischen T-Zellklone. Erstaunlicherweise setzten allorestingierte T-Zellklone eher sogenannte Tz1-Zytokine frei, die zu einer effektiven Immunantwort gegen Tumore beitragen, wohingegen autorestringierte T-Zellen eher Tz2-Zytokine ausschütteten, die keine Tumormunität vermitteln. Im Vergleich zu den bereits etablierten T-Zellklonen TyrF8 und IVS B zeigten die im autologen System generierten T-

Zellklone bessere Funktion, wurden jedoch von den im „semi“-allogenen System induzierten T-Zellklonen weit überholt.

Folglich wurden in dieser Arbeit mit Hilfe von DZ, die allogene MHC-Moleküle und Tyrosinase-Protein koexprimierten, Peptid-spezifische CD8⁺-T-Zellen eines nicht negativ selektierten T-Zellrepertoires induziert und isoliert, die hoch affine TZR gegen TAA-Selbst-Peptide trugen. Diese T-Zellklone zeigten hervorragende Effektorfunktionen sowohl im Töten von Melanomzellen als auch in der Zytokinfreisetzung und besaßen somit die besten Eigenschaften für den adoptiven T-Zelltransfer. Die *De-novo*-Induktion mit *ivt*RNS-beladenen DZ von allorestingierten T-Zellen stellte sich im Vergleich mit früheren Strategien zur Erhaltung spezifischer T-Zellen als deutlich überlegen heraus.

Für Patienten, deren Tumoren das jeweilige TAA tragen, könnten die erhaltenen T-Zellen entweder *ex vivo* für einen adoptiven T-Zelltransfer expandiert werden oder die isolierten TZR-Sequenzen dieser T-Zellen zur Herstellung TZR-transgener T-Zellen verwendet werden.

1 Einleitung

Das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem (von *immunis* (lat.) unangreifbar) bezeichnet das intelligente Zusammenspiel eines komplexen Netzwerkes, in dem mehrere Organe, Zelltypen und chemische Moleküle zielgerichtet kooperieren. Dadurch wird ein universeller Abwehrmechanismus des Körpers gegen Eindringlinge, wie Viren, Bakterien und andere Krankheitserreger etabliert und bedarfsweise aktiviert. Dabei sind hinsichtlich der stammesgeschichtlichen Entwicklung zwei Immunantworten zu unterscheiden, welche sich auf eine wirkungsvoll koordinierte Art und Weise bei der Bekämpfung von Pathogenen ergänzen: Die unspezifische, angeborene Immunität und die Antigen-spezifische, adaptive Immunität. Unabhängig vom Erreger wird die schnelle angeborene Immunität durch Komplement, Granulozyten, Makrophagen, Natürliche Killer-Zellen (NK) und Zytokine vermittelt. Auch mechanische Barrieren, wie die epidermalen Schichten der Haut, spielen hierbei eine wichtige Rolle. So stellen angeborene Abwehrmechanismen eine erste unspezifische Verteidigungslinie dar und bieten zugleich ein perfektes Zytokinmilieu für die nachfolgenden spezifischen Antworten des Immunsystems. Für eine spezifische Immunantwort sind vor allem Antigen-präsentierende Zellen (APZ, z.B. Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen (DZ), B-Zellen) und Lymphozyten (hauptsächlich bestehend aus B- und T-Zellen) zuständig. Professionelle APZ sind in der Lage, Antigene in Form von prozessierten Peptiden über sogenannte MHC („major histocompatibility complex“) -Moleküle zu präsentieren und in lymphatische Gewebe, wie Milz und Lymphknoten einzuwandern, um dort B- und T-Lymphozyten zu aktivieren. Die herausragende Eigenschaft der Lymphozyten, eine spezifische Immunantwort gegen nahezu jedes fremde Antigen aufbieten zu können, liegt darin begründet, dass sich im Laufe der Evolution ein Mechanismus zur Erkennung potenzieller Antigene entwickelt hat, was dann zu einer entsprechenden Diversifikation der Lymphozyten-Antigenrezeptoren führte. So besitzt jeder ausreifende Lymphozyt einen einzigartigen Antigenrezeptor und trägt in der B- und T-Zellpopulation zu einem riesigen Repertoire an hoch diversifizierten Rezeptoren bei, die entsprechend unterschiedliche Antigene erkennen können, beruhend auf der Information, welche die MHC-Moleküle präsentieren. Ein zusätzlicher Vorteil der adaptiven gegenüber der angeborenen Immunität besteht in deren Fähigkeit zur Bildung von Antigen-spezifischen Gedächtniszellen in der Phase der erfolgreichen Erstabwehr eines Krankheitserregers. Diese Information bleibt über lange Zeiträume erhalten und führt bei erneutem spezifischen Antigen-Kontakt zu einer schnelleren und effektiveren

Immunantwort als beim Erstkontakt. Die hohe Spezifität gegenüber Antigenen, die große Vielfalt an verschiedenen Antigenrezeptoren, die Bildung eines Antigengedächtnisses sowie die Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen, welche die Zerstörung von Normalgewebe verhindert, sind die herausragenden Eigenschaften der adaptiven Immunität.

1.2 Immunüberwachung und Tumor-Flucht

Eine besondere Herausforderung für das Immunsystem stellen körpereigene entartete Zellen dar, die eliminiert werden müssen, bevor sich Tumoren entwickeln können. Bereits vor nahezu einem Jahrhundert wurde von Paul Ehrlich postuliert, dass das Immunsystem den Wirt vor Krebs schütze (Ehrlich, 1909). Ca. 50 Jahre später modifizierten Thomas und Burnet diese Annahme dahin gehend, dass sie eine Überwachungsfunktion („Immunsurveillance“) des Immunsystems vorschlugen, die für eine Eliminierung von krebsartigen Zellen hilfreich sei (Thomas, 1959; Burnet, 1964). Ein Eckpfeiler dieser Hypothese war die Entdeckung von Tumor-spezifischen Strukturen, den Tumor-assoziierten Antigenen (TAA), da eine Immunüberwachung nur dann stattfinden kann, wenn auf Tumorzellen Strukturen vorhanden sind, die vom Immunsystem als solche erkannt werden können.

Lange Zeit wurden Funktion und Bedeutung der Immunüberwachung kontrovers diskutiert, bis sich in den 90iger Jahren zeigte, dass immundefiziente Mäuse ein höheres Risiko hatten, spontan Krebs zu entwickeln. Aber nicht nur bei Mäusen sondern auch beim Menschen konnte die wichtige Funktion der Immunüberwachung nachgewiesen werden. Immundefiziente und -supprimierte Menschen wiesen in Studien ein höheres Risiko auf, an verschiedenen Krebsarten zu erkranken als immunkompetente Menschen (Penn, 1999). Erwartungsgemäß traten mit viralen Infektionen einhergehende Krebsarten häufiger auf, aber auch nicht viral assoziierte Krebsarten zeigten eine höhere Prävalenz der Tumorentstehung, was die bedeutsame Rolle des Immunsystems bei der Bekämpfung entarteter Körperzellen unterstreicht. So erhöhte sich etwa bei Patienten mit Immunsuppression nach Organtransplantationen die Häufigkeit, *de novo* an malignem Melanom zu erkranken um das Vierfache (Sheil, 1986). Weitere Studien in dieser Richtung führten zu einer differenzierten Sichtweise der Immunüberwachung gegenüber Tumoren und unterteilte diese in drei Phasen: Eliminierung der Krebszellen durch das Immunsystem, Einstellen eines Gleichgewichts zwischen Immunsystem und Tumor sowie schließlich das Entkommen von veränderten Krebszellen, die sogenannte Tumor-Flucht („tumor escape“) (Dunn *et al.*, 2002, 2004). Während der Eliminationsphase werden entstehende Tumorzellen von Bestandteilen des angeborenen und adaptiven Immunsystems zerstört. Daran ist eine Vielzahl von Zellen beteiligt, die mit Hilfe von Mausmodellen identifiziert wurden,

welche zeigten, dass die Entfernung bestimmter Zellen zu einer höheren Prädisposition gegenüber Tumoren führte. Dazu gehören: Makrophagen, NK-Zellen, NK-ähnliche T-Zellen, B-Zellen und T-Zellen. Weitere Studien identifizierten zwei Funktionen, die Immunzellen für eine erfolgreiche Bekämpfung von Tumorzellen unbedingt benötigen: Zytotoxizität und IFN- γ -Sekretion. So zeigten einige Arbeiten mit verschiedenen Tumorarten, dass eine erhöhte Anzahl an Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) mit einer besseren Überlebens-Prognose assoziiert sind, wobei die Anti-Tumor-Antwort hauptsächlich durch zytotoxische CD8⁺-T-Zellen vermittelt wurde (Clark *et al.*, 1989; Clemente *et al.*, 1996; Naito *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 2007). Dieses Erkenntnis kann jedoch aufgrund der großen Unterschiede der Tumoren nicht unbedingt von einer Tumorart auf die andere übertragen werden. Mittlerweile deuten neuere Studien eher darauf hin, dass nicht die Quantität sondern der Typ der TIL für eine Tumorregression entscheidend sein könnte (Curiel *et al.*, 2004). So ist eine Unterscheidung der TIL zu treffen in „Freunde“, wie CD4⁺-T-Helferzellen und zytotoxische CD8⁺-T-Zellen, die eine Immunantwort gegen Tumoren auslösen können, und „Feinde“, wie regulatorische CD4⁺CD25⁺-T-Zellen, die TAA-spezifische T-Zellen supprimieren können, um eine Prognose geben zu können (Yu und Fu, 2006). Folglich ist eher die funktionelle Aktivität der TIL entscheidend. Von Shankaran und Kollegen wurde gezeigt, dass neben den Lymphozyten auch IFN- γ einen Tumorschutz bildet (Shankaran *et al.*, 2001). IFN- γ ist ein Schlüsselzytokin bei der Abstoßung in vielen Tumormodellen und kann von einer Vielzahl von Zellen des Immunsystems, wie z.B. CD4⁺-T-Zellen, CD8⁺-T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und DZ, freigesetzt werden. Anti-tumorale Wirkung des IFN- γ konnte gezeigt werden, indem Tumoren, die nach Modifizierung INF- γ sezernieren konnten, leichter abgestoßen wurden (Gansbacher *et al.*, 1990; Hock *et al.*, 1993). Des Weiteren konnte die endogene Gabe von IFN- γ den Wirt vor dem Wachstum transplantiert Tumoren und der Entstehung chemisch induzierter und spontaner Tumoren schützen (Street *et al.*, 2001). Hingegen wurde die Tumorabstoßung inhibiert, wenn endogenes IFN- γ mit Hilfe von neutralisierenden Antikörpern blockiert wurde (Dighe *et al.*, 1994). Blankenstein und Kollegen zeigten eindrucksvoll, dass IFN- γ einerseits Tumor-Stroma-Zellinteraktionen störte und so den Eintritt von TIL in den Tumor ermöglichte und zugleich die Versorgung des Tumors verschlechterte, da die Bildung neuer Blutgefäße blockiert wurde (Ibe *et al.*, 2001). Diese Studien belegen, wie wichtig sowohl zytotoxische CD8⁺-T-Zellen als auch IFN- γ in der Tumorbekämpfung sind.

Angesichts des erkannten Beitrags der Immunüberwachung zur Tumörprävention stellt sich die Frage, wie es in gesunden Individuen gleichwohl zur Entstehung von soliden Tumoren kommen kann. Können die Tumorzellen nicht vollständig eliminiert werden, so stellt sich in der darauf folgenden Phase ein Gleichgewicht zwischen Tumorzellen und Immunsystem ein, in der die

Zellen des Immunsystems die Krebszellen unter Kontrolle halten. Aus Sicht des Tumors kann der Prozess der Tumorentwicklung analog zur Darwinistischen Evolution gesehen werden. Aufgrund der großen genetischen Instabilität vieler Tumorzellen führt der große Selektionsdruck der Effektorzellen des Immunsystems zu mutierten Tumorzellen, die eine größere Resistenz gegenüber Angriffen des Immunsystems besitzen und somit einen Überlebensvorteil haben (Lengauer *et al.*, 1998). Gezeigt wurde dies in vielen Mausversuchen, bei denen z.B. Tumoren von einer immunkompetenten Maus zur anderen transplantiert und somit vielen verschiedenen Immunmechanismen ausgesetzt wurden. Auf diese Weise entstanden Tumorvarianten mit geringerer Immunogenität (Uyttenhove *et al.*, 1980; Urban *et al.* 1982). Viele dieser Tumorvarianten können zerstört werden, einige überleben jedoch. So kann vermutlich über mehrere Jahre ein Gleichgewicht aufrechterhalten werden.

Der Tumor wird folglich von seiner immunologischen Umwelt geprägt und einige Zellen verändern sich derart, dass sie nach einiger Zeit dem Immunsystem entkommen können. Meist werden Antigen-spezifische Tumor-infiltrierende T-Zellen zuerst erfolgreich aktiviert, mit voranschreitendem Tumorwachstum jedoch supprimiert oder anerg (Staveley-O'Carroll *et al.*, 1998). Häufig auftretende Veränderungen, die das Erkennen und Eliminieren der Tumorzellen durch Zellen des Immunsystems erschweren, sind z.B.:

- Verlust oder Herunterregulierung der Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen, die für die Erkennung durch CD8⁺-T-Zellen entscheidend sind,
- Verlust/Mutation von Tumor-assoziierten Antigenen,
- fehlende Expression von kostimulatorischen Signalen oder
- Sekretion von Zytokinen, die Immunzellen inhibieren (Khong und Restifo, 2002).

Diese und viele andere Veränderungen können zur Tumor-Flucht führen und eine klinisch manifeste Tumorerkrankung hervorrufen.

Da eine lang andauernde Heilung mit klassischen Krebstherapien, wie operative Entfernung des Tumors, Bestrahlung, Chemotherapie oder Knochenmarks- und Stammzelltransplantation oft nicht erfolgreich ist, wird nach anderen Möglichkeiten der Therapie gesucht. Somit stellt sich die bedeutungsvolle Frage, wie das Immunsystem verändert werden kann, damit es in die Lage versetzt wird, bestehende Tumoren zu eliminieren.

Die diesbezüglich intensiv betriebene Forschung verfolgt hierzu diverse Ansätze und Richtungen, welche sich hinsichtlich des Erkenntnisgewinns zumeist ergänzen und so ein Netz weltweiter Krebsforschung bilden. Viel versprechend erscheinen auf DZ basierende Vakzinierungsstrategien. Die meisten Vakzinierungsstudien wurden mit DZ durchgeführt, die mit Tumor-Lysaten beladen wurden, (Geiger *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005). Auch wurden z.B. für Vakzinierungsstudien an Melanom-Patienten DZ exogen mit

synthetischen TAA-Peptiden beladen (Nestle *et al.*, 1998). Sowohl die Vakzinierung mit Tumor-Lysat-beladenen DZ als auch die Vakzinierung mit synthetischen Peptiden-beladenen DZ zeigten jedoch bislang eher mäßige Erfolge. Viel versprechender scheinen Ribonukleinsäure (RNS) -beladene DZ zu sein. So konnte gezeigt werden, dass *in vitro* und *in vivo* eine Tumorspezifische Immunantwort mit Hilfe von DZ induziert werden konnte, die mit für Tumor-Antigene kodierender RNS transfiziert wurden (Gilboa und Vieweg, 2004). Nichtsdestotrotz konnten in den meisten klinischen Studien mit DZ-Vakzinierung zwar Tumor-Antigen-reaktive zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL) generiert werden, jedoch konnten Tumorregressionen nur vereinzelt beobachtet werden (Schuler-Thurner *et al.*, 2000; Andersen *et al.*, 2001). Ein Grund hierfür könnte sein, dass durch die DZ-Vakzinierung zu wenig ZTL induziert wurden, um solide Tumoren abzustößten (Andersen *et al.*, 2001; Perez-Diez und Marincola, 2002). Auch wäre denkbar, dass die ZTL *in vivo* nur suboptimale Anti-Tumor-Funktionen besitzen, da sie möglicherweise unzureichend aktiviert wurden, nicht zu den Tumoren migrieren können oder anfällig für regulatorische Mechanismen sind (Perez-Diez und Marincola, 2002).

Eine Alternative zur DZ-Vakzinierung stellt der adoptive Transfer Tumor-spezifischer T-Zellen dar, der eine hoffnungsvolle Aussicht auf Erfolg bei der Tumorbekämpfung verspricht. So zeigte schon der adoptive Transfer von Lymphozyten vor dem Hintergrund der allogenen Knochenmarks- oder Stammzelltransplantation deutlich die Fähigkeit des Immunsystems, hämatologische Tumoren zu vernichten (Kolb *et al.*, 2004). Da die transferierten Lymphozyten *in vivo* aktiviert und expandiert werden müssen und dieses einige Zeit beansprucht, funktioniert der Transfer von Lymphozyten sehr gut bei chronisch myeloischen Leukämien, deren maligne Zellen langsam wachsen. Weniger effektiv ist diese Therapie jedoch bei akuten Leukämien, da die malignen Zellen meist schneller proliferieren als die spezifischen Immunzellen. Eine Alternative zu unselektierten Spender-Leukozyten-Infusionen, um schnell wachsende Tumoren kontrollieren zu können, stellt der Transfer spezifisch selektierter Effektorzellen in großen Mengen dar. Auch können tolerogene Mechanismen umgangen werden, indem hoch reaktive T-Zellpopulationen in eine manipulierte Umgebung im Patienten gebracht werden. So wurden Antigen-spezifische TIL aus Melanomzellen *ex vivo* expandiert und für den adoptiven T-Zelltransfer in Melanompatienten transferiert, die durch nicht-myeloablative Chemotherapie den T-Zellen ein lymphodepletierte Umgebung boten. Die Vorteile einer Lymphodepletion liegen darin, dass mit allen Lymphozyten des Spenders ebenfalls regulatorische CD4⁺-CD25⁺-T-Zellen entfernt werden, die eine Anti-Tumorantwort unterbinden können. Aber auch Lymphozyten mit anderen Spezifitäten werden depletiert und konkurrierten nicht mit den transferierten TAA-spezifischen T-Zellen um homöostatische Zytokine, wie IL-7 und IL-15. Diese Umgebung erlaubt den TAA-spezifischen T-Zellen Zugriff auf wichtige Zytokine und

somit rasche Expansion (Dudley *et al.*, 2001; Dudley *et al.*, 2002; Rosenberg und Dudley, 2004). In Melanom-Patienten zeigte sich, dass der alleinige Transfer von Antigen-spezifischen CD8⁺-T-Zellen eher zu Tumorvarianten mit erniedrigter Immunogenität führte und weit weniger beeindruckend war als der Transfer gemischter TAA-spezifischer CD4⁺-T und CD8⁺-T-Zellkulturen (Walter *et al.*, 1995; Dudley *et al.*, 2001; Rosenberg *et al.*, 2004). Es werden folglich v.a. zytotoxische CD8⁺-T-Zellen und CD4⁺-T-Helferzellen für eine erfolgreiche Tumorbekämpfung benötigt. Das bestätigte auch die zusätzliche Gabe von hohen Dosen IL-2, einem typischen CD4⁺-T-Zellzytokin, das die Effizienz und Überlebensdauer der transferierten CD8⁺-T-Zellen gegen Melanome stark erhöhte (Atkins *et al.*, 2000; Rosenberg, 2000; Yee *et al.*, 2000). Auch sollten transferierte T-Zellen solange wie möglich in einem aktivierten Zustand vorliegen. Deshalb existieren Ansätze, die auf der Blockierung von CTLA-4 („Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4“) mit spezifischen Antikörpern beruhen. CTLA-4-Moleküle auf T-Zellen führen bei Bindung an CD80 und CD86 zu einer negativen Regulation von T-Zellantworten und sind an der Toleranz gegen Selbst-Antigene beteiligt (Maker *et al.*, 2005). Problematisch ist, dass nicht alle TIL ausreichende funktionelle Aktivität gegenüber malignen Zellen besitzen. So wurde gezeigt, dass die meisten aus Tumoren isolierten TIL die Fähigkeit verlieren, Perforin freizusetzen und somit Tumorzellen nicht mehr lysieren können (E. Nößner, persönliche Beobachtung). Die chronische Stimulation durch die in der Überzahl befindlichen Tumorzellen führt zu erschöpften TIL, die eher Marker des „Alterns“ zeigen, kaum expandierten und Schwierigkeiten hatten, im Tumorgewebe zu überleben und zu persistieren. Jedoch konnten auch nach adoptiven T-Zelltransfer von autologen Melanom-reaktiven TIL im Rahmen einer nicht-myeloablativen Chemotherapie nur bei 50 % der so behandelten Patienten klinische Antworten beobachtet werden. Es zeigte sich, dass eine Immunantwort mit der Anzahl an persistierenden transferierten TIL zusammenhing (Huang *et al.*, 2005). Für die erfolgreiche Tumorbekämpfung werden qualitativ hochwertige T-Zellen benötigt, die sowohl Resistenz gegenüber Zelltod zeigen als auch auf homöostatische Zytokine reagieren können. Für die „Fitness“ einer T-Zelle ist die Expression der Anti-apoptischen Gene Bcl-2 und Bcl-x_L und des Rezeptors für das homöostatische Zytokin IL-15 (IL-15R) von besonderer Bedeutung (Gett *et al.*, 2003). Folglich werden neue „fittere“ T-Zellpopulationen für den adoptiven T-Zelltransfer benötigt, die sowohl aus langlebigen zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen als auch CD4⁺-T-Helferzellen bestehen und Antigen-Rezeptoren mit vielen verschiedenen Spezifitäten tragen, um die von den TIL des Patienten selektierten Tumorvarianten mit erniedrigter Immunogenität („geflüchtete Tumorzellen“) effizient angreifen und eliminieren zu können.

1.3 Dendritische Zellen

Für die Stimulation von CD8⁺-T-Zellen, die adoptiv in Krebspatienten transferiert werden können, werden oft DZ verwendet, da sie als Wachposten des Immunsystems auf die Aufnahme und Präsentation von Antigenen spezialisiert sind (Banchereau und Steinman, 1998). Ausgereifte, sogenannte mature DZ sind besondere professionelle APZ, da sie die einzigen Zellen sind, die sogenannte naive Antigen-spezifische T-Zellen induzieren können, welche noch nie auf ihr Antigen getroffen sind. Auch wurde gezeigt, dass mature DZ bis zu 1000 mal effizienter ruhende T-Zellen aktivieren können als andere professionelle APZ, wie z. B. Monozyten, Makrophagen und B-Zellen (Bhardwaj *et al.*, 1993).

In ihrem sogenannten immaturren Zustand patrouillieren DZ in peripheren Geweben, wo sie wahllos Antigene aufnehmen, entweder über spezifische Rezeptoren oder mittels anderer Mechanismen, wie Makropinozytose, Rezeptor-vermittelter Endozytose oder Phagozytose (Banchereau, 2000). Im unreifen Zustand sorgen DZ bei T-Zellen für Toleranz, um unerwünschte Immunreaktionen zu verhindern (van Duivenvoorde *et al.*, 2006). Nach der Aufnahme von Antigenen erfolgt die Wanderung in Lymphknoten und die Reifung der DZ. Diese sogenannte Maturierung kann durch Kontakt mit Bakterien und Pilzen wie auch durch deren Produkte, wie DNS, Lipopolysaccharide (LPS), Viren und doppelsträngige RNS ausgelöst werden (Cella *et al.*, 1999). Auch Zytokine, von T-Zellen erhaltene Signale oder Zellprodukte (z.B. Tumorzelllysate) können zur Reifung von DZ führen (Banchereau, 2000). Während der DZ-Maturierung wird die Antigen-Aufnahme herunterreguliert und die Expression von MHC-Komplexen, die wichtig für die Antigen-Präsentation sind, hochreguliert. Auch kostimulatorische Moleküle, wie CD80, CD86 und CD40, die entscheidend für die Aktivierung von T-Zellen sind, werden verstärkt exprimiert. Die Expression von Chemokin-Rezeptoren (CCR7) ermöglicht reifenden DZ den Eintritt in die Lymphknoten, wo sie unter anderem auf T-Zellen treffen und mit ihnen interagieren. Gleichzeitig beginnen diese DZ mit der Sekretion von Zytokinen, die für die T-Zellentwicklung entscheidend sind (IL-12, IL-15 und IL-18).

Da T-Zellen über ihre T-Zellrezeptoren (TZR) nur Peptide in Verbindung mit MHC-Molekülen auf der Oberfläche der APZ erkennen, müssen die Antigene innerhalb der Zelle prozessiert, auf MHC-Moleküle geladen und an die Oberfläche der APZ transportiert werden (Bhardwaj, 2001). Für die Präsentation von körpereigenen und fremden Peptiden an das Immunsystem ist das HLA-System (Humanes Leukozyten Antigen) auf Chromosom 6 verantwortlich. Im HLA-Komplex gibt es zwei getrennte polygene Regionen mit verschiedenen MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Genen. Jedes Individuum besitzt eine Reihe von MHC-Molekülen, die verschiedene Eigenschaften in der Peptid-Bindung zeigen (MHC-Klasse-I: HLA-A, -B und -C; MHC-Klasse-

II: HLA-DR, -DQ und -DP). Zusätzlich ist das MHC-System hoch polymorph d.h., von jedem Gen gibt es eine Vielzahl an unterschiedlichen Allelen, die mit Nummern gekennzeichnet werden. Die Mitglieder beider Klassen sind meist in jedem Individuum in zwei kodominanten Allel-Formen vertreten, sodass eine breite Anzahl an unterschiedlichen Peptiden präsentiert werden kann.

Die Beladung der MHC-Moleküle erfolgt je nach Ursprung des Antigens auf unterschiedliche Weise (siehe Abbildung 1.1). Antigene, die exogenen Ursprungs sind, werden in Endosomen von Proteasen in Peptide (12-25 Aminosäuren) zerlegt. Vesikel mit MHC-Klasse-II-Molekülen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) fusionieren mit den Endosomen. Innerhalb dieser sogenannten MHC-Klasse-II-reichen Kompartimente (M-II-K) binden die Peptide an MHC-Klasse-II-Moleküle. Diese Peptid:MHC-Klasse-II-Komplexe werden an die Zelloberfläche transportiert und aktivieren dort $CD4^+$ -T-Helferzellen. Sie werden kurz nach Maturierung der DZ generiert, überdauern jedoch mit Halbwertszeiten von einigen Tagen über einen langen Zeitraum (Cella *et al.*, 1997).

Endogene Antigene, wie zelleigene und virale Proteine, werden von Proteasomen im Zytoplasma der Zelle gespalten und, von „Transportern assoziiert mit Antigen-Prozessierung“, (TAP-Transportern) in das ER befördert. Dort werden die Peptide (8-11 Aminosäuren) auf MHC-Klasse-I-Moleküle geladen. Die Peptid:MHC-Klasse-I-Komplexe werden ebenfalls an die Zelloberfläche exportiert und dort von $CD8^+$ -T-Zellen erkannt. Die meisten Peptid:MHC-Klasse-I-Komplexe auf immaturren DZ haben nur eine sehr kurze durchschnittliche Halbwertszeit von ca. 2,6 h. Die Maturierung der DZ führt durch erniedrigten Umsatz zu einer verlängerten Halbwertszeit von etwa 19,9 h. Dadurch ist es der DZ möglich, das Antigen-Profil des umgebenden Gewebes in Form von spezifischen Peptid:MHC-Komplexen in den lymphatischen Geweben den T-Zellen zu präsentieren (Zehn *et al.*, 2004).

Durch die unterschiedliche Präsentation wird eine intelligente Immunantwort gesteuert, da exogene Antigene über MHC-Klasse-II-Moleküle auf Immunzellen präsentiert werden und so $CD4^+$ -T-Zellen stimulieren, die lösliche Mediatoren in den extrazellulären Raum freisetzen und z.B. B-Zellen zur Antikörperproduktion anregen und $CD8^+$ -T-Zellen unterstützen. Endogene Antigene hingegen entstehen durch Proteinsynthese innerhalb der Zelle. Die Zelle selbst muss folglich zerstört werden. Da jede Zelle zum Träger endogener Antigene werden kann, z.B. durch Mutationen von Selbst-Proteinen oder Infektionen, werden MHC-Klasse-I-Moleküle in allen Körperzellen exprimiert und können in Verbindung mit antigenen Peptiden $CD8^+$ -T-Zellen mit zytotoxischem Potential aktivieren.

Aber auch exogene Antigene können über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden und ZTL-Antworten auslösen. Dieser Mechanismus wird „Cross-priming“ genannt (Bevan, 1976)

und ist z.B. bei einer Immunantwort gegen Viren, die keine DZ infizieren, Transplantations- und Tumor-Antigenen wichtig (Yewdell *et al.*, 1999). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Art der Aufnahme von exogenen Antigenen entscheidend für die Präsentation über MHC-Klasse-I- oder MHC-Klasse-II-Moleküle ist. Pinozytose und Scavenger-Rezeptor-vermittelte Endozytose führen zur MHC-Klasse-II-restringierten Peptid-Präsentation, die Mannose-Rezeptor-vermittelte Endozytose hingegen führt zu „cross priming“, d.h. zu einer MHC-Klasse-I-restringierten Peptid-Präsentation von exogenen Peptiden an $CD8^+$ -T-Zellen (Burgdorf *et al.*, 2007). Wie genau exogene Proteine und Peptide auf MHC-Klasse-I-Moleküle gelangen, ist bisher nicht vollständig geklärt. Dennoch ist dieser Mechanismus für die Immuntherapie sehr interessant, da er hilfreich ist, um Antigene verschiedener Art in DZ einzubringen, und so sowohl Antigen-spezifische $CD8^+$ -T-Zellen als auch $CD4^+$ -T-Helferzellen aktiviert werden können.

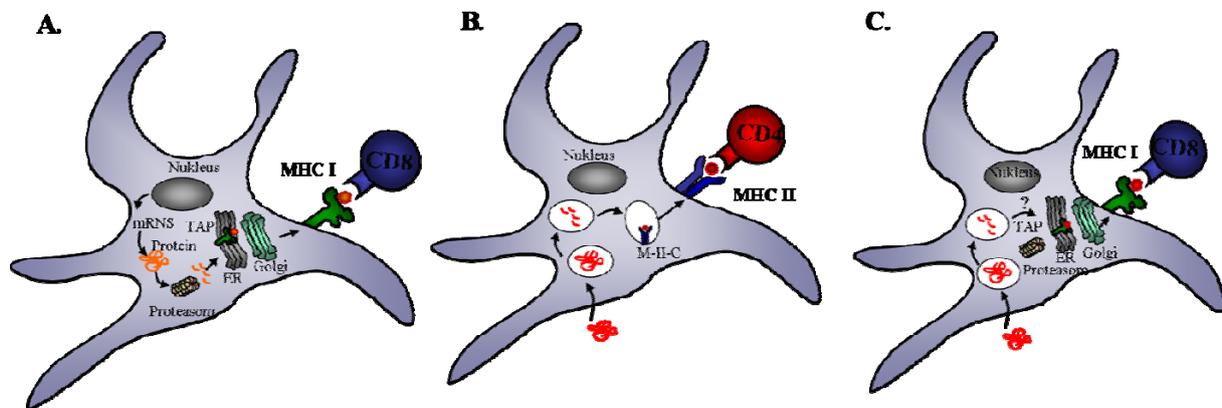


Abbildung 1.1 MHC-Klasse-I- und Klasse-II-Antigenprozessierungs- und Präsentationswege in DZ. Intrazelluläre Proteine (A) werden vom Proteasom in Peptide degradiert und in das ER transportiert. Dort binden sie an MHC-Klasse-I-Moleküle und wandern auf dem Weg zur Zelloberfläche durch den Golgi-Apparat. Auf der Zelloberfläche werden die Peptid:MHC-Klasse-I-Komplexe von zytotoxischen $CD8^+$ -T-Zellen erkannt. Exogene Proteine (B) werden von den DZ durch Phagozytose, Pinozytose oder Scavenger-Rezeptor-vermittelte Endozytose in endosomalen/lysosomalen Vesikeln aufgenommen und von Proteasen in Peptide zerstückelt. Diese Peptide binden in sogenannten MHC-II-reichen Kompartimenten (M-II-K) an MHC-Klasse-II-Moleküle und werden mit Hilfe von Transportvesikeln an die Zelloberfläche gebracht. Dort werden sie von $CD4^+$ -T-Helferzellen erkannt (Ribas *et al.*, 2003). Peptide exogenen Ursprungs (C) können jedoch auch über MHC-Klasse-I-Moleküle den $CD8^+$ -T-Zellen präsentiert werden, wenn sie von den DZ über Mannose-Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen werden. Wie genau das sogenannte „cross priming“ in der Zelle abläuft, ist noch nicht geklärt (Heath *et al.*, 2004; Burgdorf *et al.*, 2007).

1.4 T-Zellentwicklung

T-Zellen entstehen aus undifferenzierten Vorläuferzellen des Knochenmarks. Der größte Teil ihrer Entwicklung verläuft in einer spezialisierten Umgebung, dem Thymus. Bei Föten und Jugendlichen entsteht im Thymus eine große Anzahl an reifen T-Lymphozyten, die dann in die peripheren Lymphgefäße wandern. Bei Erwachsenen bildet sich der Thymus zurück. Das T-Zellrepertoire wird dann aus sowohl langlebigen T-Zellen als auch sich teilenden reifen T-Zellen der zentralen lymphoiden Gewebe aufrechterhalten.

Bis jedoch eine solche T-Zelle entsteht, muss sie mehrere Entwicklungsstadien durchlaufen. Entscheidend dabei ist die Bildung eines funktionellen TZR, da dieser an Peptid:MHC-Komplexe auf APZ binden und zur Aktivierung der T-Zelle führen kann. Die meisten peripheren T-Lymphozyten exprimieren TZR-Heterodimere, die aus einer α - und β -Kette zusammengesetzt sind. Eine kleine Subpopulation der T-Lymphozyten zeichnet sich durch die Expression von $\gamma\delta$ -TZR aus. Die Funktion und Spezifität dieser $\gamma\delta$ -T-Zellen ist noch nicht genau geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass sie an der Regulation von $\alpha\beta$ -T-Zellen beteiligt sind und eine frühe Quelle an IFN- γ in der Immunantwort gegen Tumoren darstellen (Gao *et al.*, 2003). Im Weiteren wird hauptsächlich auf $\alpha\beta$ -T-Zellen eingegangen.

Sowohl die TZR α - als auch die TZR β -Ketten bilden extrazellulär Immunglobulin (Ig) -ähnliche Strukturen aus, die über eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden sind, und deshalb zur Ig-Superfamilie gehören. Beide Ketten bestehen aus einer aminoterminalen variablen (V) -Region, die über eine sogenannte „joining“ (J) -Region mit der konstanten (C) -Region verbunden sind, welche die konstante Domäne sowie die Transmembran- und zytoplasmatische Region enthält. Bei β -Ketten liegt zwischen der V- und J-Region zusätzlich eine „diversity“ (D) -Region. Die Gene der TZR-Ketten sind nicht keimbahnkodiert, sondern werden aus verschiedenen Gensegmenten während der T-Zellentwicklung im Thymus somatisch rekombiniert. Auf diese Weise wird eine Vielzahl von verschiedenen Ketten gebildet und eine große Diversität des TZR erhalten. So setzt sich der TZR α -Lokus auf Chromosom 14 aus ca. 70-80 verschiedenen TZR α V ($V\alpha$) -Gensegmenten, ca. 60 TZR α J ($J\alpha$) -Gensegmenten und einem TZR α C ($C\alpha$) -Gen zusammen. Im TZR β -Lokus liegen 65 TZR β V ($V\beta$) -Gensegmente in einiger Entfernung von zwei separaten Gruppen, die jeweils aus einem TZR β D ($D\beta$) -Gensegment mit 6 oder 7 TZR β J ($J\beta$) - und einem TZR β C ($C\beta$) -Gensegment bestehen. Diese Gensegmente können individuell miteinander kombiniert werden. Der Komplex an Enzymen, der die somatische Rekombination vermittelt, wird V(D)J-Rekombinase genannt. Essentiell für diesen Prozess sind die RAG-1- und RAG-2-Gene („recombination-activator gene“), die nur während der frühen Entwicklungsstadien der T-Zellen exprimiert werden. Durch verschiedene Vorgänge wird eine sehr hohe Variabilität in den Verknüpfungsstellen erreicht. So werden während der somatischen Rekombination an den Verknüpfungsstellen durch Exonukleaseaktivität freie Nukleotide entfernt und matrizenunabhängig von der terminalen Desoxynukleotidyltransferase (TdT) sogenannte N-Nukleotide zufällig eingefügt. Die hohe Diversität der TZR wird folglich durch den Zusammenbau einer Vielzahl von verschiedenen Gensegmenten zu funktionsfähigen TZR α V- und TZR β V-Genen, durch Exonuklease- und TdT-Aktivität an den Verknüpfungsstellen und Paarung unterschiedlicher α - und β -Ketten erreicht. Das unselektierte TZR-Repertoire wird auf mindestens 10^{15} unterschiedliche Spezifitäten geschätzt (Davis und Bjorkman, 1988).

Dabei zeichnen sich die hypervariablen Regionen CDR1, CDR2 und CDR3 (CDR = complementarity-determining regions) der α - und β -Kette durch besondere Variabilität aus. Für die Variabilität der CDR1- und CDR2-Regionen sind genomische Sequenzunterschiede zwischen den V-Genen verantwortlich. Die CDR3-Regionen hingegen umfassen den Bereich der Gensegment-Verknüpfungen und sind deshalb besonders variabel. Kristallographische Analysen zeigten, dass im trimolekularen Komplex, bestehend aus MHC-Molekül, Peptid und TZR, diese sogenannten hypervariablen Bereiche spezifisch mit dem Peptid:MHC-Liganden interagieren (siehe Abbildung 1.2). Die CDR3-Region interagiert hauptsächlich mit der einzigartigen Peptid-Komponente des Peptid:MHC-Komplexes, die etwas weniger variablen CDR1 und CDR2-Regionen dagegen eher mit der weniger variablen MHC-Komponente des Liganden. Die V(D)J-Genumlagerungen führen oft zu Leserasterverschiebungen. T-Zellen mit nicht erfolgreichen Genumlagerungen werden entweder durch eine erfolgreiche Umlagerung auf dem anderen Chromosom gerettet oder sterben. Die Verknüpfung der VJ-Segmente der α -Kette und VDJ-Segmente der β -Kette mit der jeweiligen C-Region erfolgt nicht durch somatische Rekombination sondern auf RNS-Ebene durch das Spleißen.

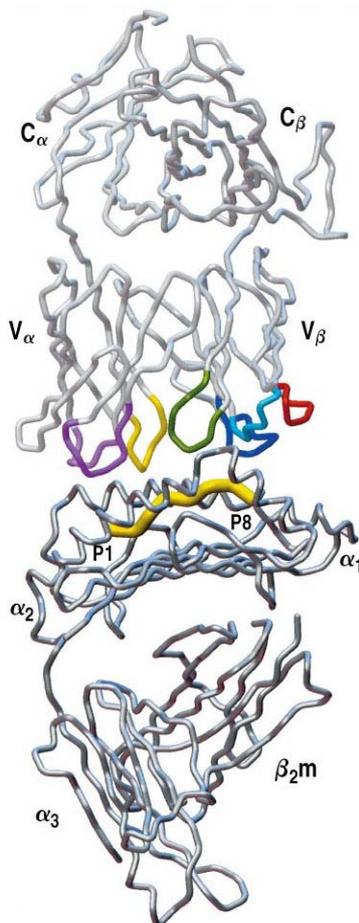


Abbildung 1.2 Dreidimensionale Struktur eines TZR-Komplexes, der mit einem Peptid:MHC-Klasse-I-Komplex interagiert. Es ist die Seitenansicht des TZR gezeigt, der an den oberen Bereich des Peptid:MHC-Komplexes (α_1 und α_2 -Domäne) bindet. Die hypervariablen CDR-Schleifen der V-Domänen des TZR ragen dem Peptid:MHC-Komplex entgegen und wurden farblich hervorgehoben: die CDR1- und CDR2-Schleifen der β -Kette in hell- und dunkelblau, die CDR1- und CDR2-Schleifen der α -Kette in hell- und dunkelviolett. Die CDR3-Schleife der α -Kette ist in Gelb, die der β -Kette in Grün dargestellt. Die hypervariable Region 4, eine Bindestelle für sogenannte Superantigene in der $V\beta$ -Domäne, ist rot markiert. Die dicke gelbe Linie P1-P8 stellt das vom MHC-Molekül präsentierte Peptid dar, das in der MHC-Bindegrube liegt. (Garcia *et al.*, 1998)

Wenn die Vorläuferzellen in den Thymus wandern, besitzen sie noch keinen der für T-Zellen typischen Oberflächenmarker. Mit der Zeit exprimieren sie einige Marker der T-Zell-Reihe,

jedoch nicht den CD3/TZR-Komplex und die Korezeptoren CD8 bzw. CD4. Da diesen Zellen CD8- und CD4-Moleküle fehlen, werden sie „doppelt-negative“ Thymozyten genannt. In diesem Entwicklungsstadium finden zuerst die D-J- und später die V-DJ-Umlagerung der β -Kette statt. Nur T-Zellen, deren funktionelle β -Kette mit einer Prä-T-Zellrezeptor α -Kette paaren kann, entwickeln sich zu den „doppelt positiven“ Thymozyten, die nun CD8- und CD4-Korezeptoren exprimieren. Erst danach erfolgt die V-J-Umlagerung der α -Kette. Die meisten der entstandenen „doppelt positiven“ Thymozyten exprimieren niedrige Mengen ihres TZR.

Diese TZR sollen verschiedene Bindeeigenschaften vereinen. Zu einem sollen sie mit niedriger Bindungsstärke an Selbst-Peptide, die über Selbst-MHC-Moleküle präsentiert werden, binden können, um sicherzustellen, dass sie Selbst-MHC-restringiert sind. Zum anderen jedoch sollen sie nicht mit zu hoher Bindungsstärke an Selbst-Peptid:Selbst:MHC-Liganden binden können, um Autoimmunreaktionen zu verhindern. Deshalb durchlaufen die $CD4^+CD8^+$ -T-Zellen im Anschluss Selektionsprozesse, die eine Ausreifung von T-Zellen erlauben, welche mit Selbst-MHC-Molekülen interagieren, aber potentiell autoreaktive T-Zellen eliminieren. Bei diesen Prozessen steht die Bindungsstärke des exprimierten T-Zell-Rezeptors zum Peptid:MHC-Komplex im Mittelpunkt. Diese Bindungsstärke eines einzelnen TZR-Moleküls für einen Peptid:MHC-Liganden, die Affinität, kann in Versuchen nicht so einfach bestimmt werden wie die Affinität eines B-Zell-Rezeptors (BZR). B-Zellen sezernieren ihren BZR in Form von löslichen Antikörpern, an denen dann die Kraft einer einzelnen Antikörper-Antigen-Bindung analysiert werden kann. Da TZR membrangebunden auf T-Zellen vorliegen und somit die Dichte der TZR-Moleküle die Bindungsstärke beeinflusst, muss im Zusammenhang mit T-Zellen eher von Avidität, also der Gesamtheit der einzelnen TZR-Affinitäten, gesprochen werden.

Viele der $CD4^+CD8^+$ -T-Zellen tragen TZR, die nicht mit Peptid:MHC-Komplexen interagieren können. Sie werden nicht positiv selektiert und sterben aufgrund ihrer geringen Lebensdauer noch im Thymus ab. Diejenigen „doppelt positiven“ T-Zellen, die an diese Peptid:MHC-Liganden mit niedriger Avidität binden können, durchlaufen den Prozess der positiven Selektion. Um Reaktionen gegen eigenes Körpergewebe zu verhindern, erfolgt anschließend der Prozess der negativen Selektion. Dabei werden diejenigen T-Zellen eliminiert, die TZR tragen, welche ihrerseits mit großer Affinität Selbst-Peptide binden, die über Selbst-MHC-Moleküle im Thymus präsentiert werden. Ungefähr 2 % der doppelt positiven Thymozyten überleben diese zweifache Selektion und reifen zu einfach positiven Thymozyten heran, die entweder CD8- oder CD4-Korezeptoren exprimieren und eine Vielzahl von unterschiedlichen Antigen-Spezifitäten besitzen. Als Folge der negativen Selektion resultieren T-Zellen mit TZR mit hohen Affinitäten für Fremd-Peptide, die über Selbst-MHC-Moleküle präsentiert werden. Hoch affine TZR auf T-Zellen gegen Selbst-Peptid:Selbst-MHC-Komplexe wurden während der T-Zellentwicklung im

Thymus eliminiert, nur T-Zellen mit TZR mit niedrigen Affinitäten gegenüber solchen Liganden gelangen in die Peripherie. Das Schicksal dieser naiven T-Zellen, die noch nie auf ihr Antigen getroffen sind, wird in sekundären lymphatischen Organen bestimmt, wo sie von professionellen APZ geschult werden (Mempel *et al.*, 2004). Nur diejenigen Antigen-spezifischen T-Zellen, die sowohl Peptid:MHC-Komplexe (Signal 1) erkennen als auch kostimulatorische Signale und Zytokine (Signal 2) erhalten, werden erfolgreich aktiviert. Dies führt zur klonalen Expansion von Antigen-spezifischen T-Zellen, die mit Effektorfunktionen ausgestattet sind. Aber auch der Ort, die Menge und die Dauer der Antigenpräsentation sowie die Qualität des Antigens beeinflussen die Immunreaktivität und Funktionalität der T-Zelle (Zinkernagel, 2000). So wurde für T-Zellen eine Art Affinitätsreifung beschrieben, die auf der Konkurrenz verschiedener T-Zellen um Peptid:MHC-Komplexe und somit um den Erhalt ausreichender Stimulation beruht. T-Zellen mit hoch affinen TZR verhindern durch starke Bindung an den Peptid:MHC-Komplex die erfolgreiche Stimulation von niedrig affinen T-Zellen, die daraufhin nicht adäquat stimuliert werden. Auf diese Weise entsteht eine Antigen-spezifische T-Zellpopulation mit höher bzw. hoch affinen TZR, die eine erfolgreiche Immunantwort auslösen können (Lanziavecchia, 2002). Bei einer Immunantwort spielen zytotoxische $CD8^+$ -T-Zellen, die in der Lage sind, infizierte Zellen zu töten und $CD4^+$ -T-Helferzellen, die wertvolle $CD8^+$ -T-Zellhilfe leisten sowie Antikörper-produzierende B-Zellen aktivieren können, in definierter Weise zusammen und bilden eine geordnete Immunabwehr.

1.5 Allorestriktion in der Immuntherapie

Eine große Herausforderung für das Immunsystem stellen entartete Körperzellen dar, die nicht von fremden Krankheitserregern infiziert wurden. So werden von den meisten Tumorzellen Selbst-Peptide, die von überexprimierten Selbst-Proteinen stammen, über Selbst-MHC-Moleküle präsentiert. T-Zellen, die diese Liganden erkennen können, tragen meist TZR mit niedrigen Affinitäten, da diejenigen T-Zellen mit hoch affinen TZR während der T-Zellentwicklung im Thymus durch den Prozess der negativen Selektion eliminiert wurden (Theobald *et al.*, 1997; Colella, *et al.*, 2000; Molldrem *et al.*, 2003). Wichtig für die Tumorerkennung und -bekämpfung sind jedoch T-Zellen mit hoch affinen TZR, die adäquate Effektorfunktionen besitzen und Tumorzellen töten können. Alloreaktive T-Zellen, die fremde MHC-Moleküle erkennen, wurden im Zusammenhang mit Transplantatabstoßung und Spender-gegen-Empfänger („Graft-versus-Host“-) -Krankheit beobachtet (Klein, 1986).

Vermutlich überstehen sie während ihrer Entwicklung im Thymus durch Kreuzreaktivität zu Selbst-MHC-Molekülen den Prozess der positiven Selektion. Ein Teil des alloreaktiven T-

Zellrepertoires erkennt Strukturen der fremden MHC-Moleküle unabhängig von gebundenen Peptiden. Der andere Teil reagiert auf allogene MHC-Moleküle in einer Peptid-abhängigen Art und Weise und ist folglich allorestingiert und Peptid-spezifisch (Rötzschke *et al.*, 1991; Sherman und Chattopadhyay, 1993). Da die negative Selektion Selbst-MHC-restringiert ist, eröffnet die Existenz eines allorestingierten T-Zellrepertoires die Möglichkeit, an T-Zellen zu gelangen, die nicht negativ selektiert wurden und folglich TZR mit hohen Affinitäten für Selbst-Peptid:Fremd-MHC-Komplexe besitzen können.

In vitro können allorestingierte, Tumor-spezifische T-Zellen mit unterschiedlichen Methoden generiert werden. In Verbindung mit Graft-versus-Host-Erkrankungen nach allogenen Knochenmarkstransplantationen konnte häufig ein starker Graft-versus-Leukämie-Effekt beobachtet werden. Dieser Effekt rührte größtenteils von Spender-erhaltenen T-Lymphozyten her, welche die autologe Immuntoleranz des Empfänger-Tumors durchbrachen (Horowitz *et al.*, 1990). So konnten gegen RCC („renal cell carcinoma“) -Zelllinien *in vitro* bessere T-Zellantworten mit allogenen T-Zellen, erhalten von einem HLA-identischen Geschwisterspender, generiert werden als mit autologen T-Zellen (Kausche *et al.*, 2006). Eine zeitliche Trennung von lymphozytendepletierter Stammzell- und Donorlymphozyten-Transplantationen von teilweise HLA-nichtidentischen („mismatched“) Spendern verminderte Graft-versus-Host-Reaktionen und zeigte größere Anti-Leukämie-Effekte als Transplantationen in HLA-identischen Kombinationen (Kolb *et al.*, 2004). So könnten mit Zellen, erhalten von nicht verwandten Spendern, die in ihrem HLA teilweise nicht identisch („mismatched“) sind, z.B. bezüglich der HLA-A2-Expression, allorestingierte Anti-Tumor-reaktive T-Zellen generiert werden.

Eine andere Möglichkeit stellen TAP-defiziente HLA-A2-positive T2-Zellen dar. Bedingt durch einen Defekt dieser Zellen, können Antigen-Peptide nicht in das ER transportiert werden. Die niedrige Menge an Peptiden im ER führt dazu, dass ein Großteil der MHC-Klasse-I-Moleküle leer bleibt oder mit niedrig affinen Peptiden assoziiert vorliegt (Wei und Cresswell, 1992). Wenn T2-Zellen exogen Peptide angeboten werden, können diese an die HLA-A2-Moleküle binden und stabile Komplexe auf der Zelloberfläche bilden. Diese Peptid-beladenen Zellen können verwendet werden, um mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC, „peripheral blood mononuclear cells“) eines HLA-A2-negativen Spenders zu stimulieren. Unter solchen Induktionsbedingungen treten *in vitro* eine Anzahl verschieden aktivierter Lymphozytenpopulationen auf. Die geringe Anzahl an gesuchten allorestingierten Peptid-spezifischen T-Zellen muss von alloreaktiven T-Zellen, die HLA-A2-Moleküle als Fremd-Antigen erkennen, selektiert werden. Eine Möglichkeit, die T-Zellen mit den gewünschten Eigenschaften zu isolieren, bieten Fluoreszenz-gekoppelte Tetramere (Molldrem *et al.*, 1999; Moris *et al.*, 2001).

Stauss und Kollegen zeigten, dass sie auf diese Weise Wilm's Tumor 1 (WT-1) -Peptid-spezifische T-Zellen mit hoch affinen TZR selektieren konnten, welche WT-1-positive Leukämiezellen effizient eliminierten, ohne Stammzellen anzugreifen (Gao *et al.*, 1999, 2000). Im Rahmen teilweise nicht kompatibler („mismatched“) Stammzell-Transplantationen kann eine Toleranz gegenüber solchen T-Zellen gebildet werden, die den adoptiven Transfer dieser Tumorspezifischer T-Zellen erlaubt (Kolb *et al.*, 2004). Die exogene Peptid-Beladung von T2-Zellen zur Induktion spezifischer T-Zellen ist jedoch auch mit Nachteilen behaftet. So exprimieren T2-Zellen keine normale Kombination an unterschiedlichen MHC-Klasse-I-Molekülen und besitzen die Fähigkeit, nicht-MHC-restringierte Zellen sehr stark zu aktivieren. Das führt zu einer parallelen Aktivierung von NK- und NK-ähnlichen T-Zellen (Falk und Schendel, 2002), die oft die Zellkultur dominieren. Dadurch ist es sehr zeit- und arbeitsaufwendig die gewünschten allorestingierten, Tumor-Peptid-spezifischen T-Zellen anzureichern. Außerdem muss die Peptid-Sequenz des TAA bekannt sein, die über HLA-A2-Moleküle präsentiert wird, da T2-Zellen, bedingt durch die TAP-Defizienz, keine prozessierten Peptide in das ER transportieren können und somit die Peptide von außen auf die HLA-A2-Moleküle geladen werden müssen. Darüber hinaus exprimieren T2-Zellen endogen nur HLA-A2-Klasse-I-Moleküle. Es besteht folglich für die Generierung allorestingierter Peptid-spezifischer T-Zellen eine Beschränkung auf Peptid:HLA-A2-Komplexe. Auch wurde gezeigt, dass die unphysiologisch hohe Dichte an Peptid:MHC-Liganden auf APZ, herbeigeführt durch die exogene Peptidbeladung, in T-Zellen mit niedrig affinen TZR resultierte (Alexander-Miller *et al.*, 1996a; Rees *et al.*, 1999; Zeh III *et al.*, 1999). Einige Probleme wurden durch die Verwendung HLA-A2-negativer, autologer B-Zellen als APZ gelöst, die mit HLA-A2-Peptid-Monomeren ausgestattet wurden (Savage *et al.*, 2004). Diese B-Zell-gebundenen HLA-A2-Peptid-Monomere waren in der Lage, allorestingierte, WT-1-spezifische T-Zellen mit hoch affinen TZR zu generieren.

Mature DZ exprimieren, wie B-Zellen, sowohl MHC-Klasse-I- als auch MHC-Klasse-II-Moleküle, jedoch sind sie die einzigen APZ, die das Potential haben, naive T-Zellen zu induzieren. Deshalb sind DZ die optimalen Zellen, um Antigen-spezifische CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen zu generieren. Da DZ den vollständigen Satz an MHC-Klasse-I-Liganden exprimieren, führen sie zu negativer Regulation der Aktivität unerwünschter NK- und NK-T-ähnlicher T-Zellen.

1.6 Generierung hoch avider T-Zellen

Eine theoretische Alternative zu den oben genannten Methoden ist die Verwendung von mDZ als Stimulationszellen für die Generierung HLA-A2-allorestingierter Peptid-spezifischer $CD8^+$ -T-Zellen. Mature DZ können gleichzeitig mit RNS transfiziert werden, die für MHC-Klasse-I oder MHC-Klasse-II-Allele kodieren und mit RNS, die für ein ausgewähltes TAA kodiert. Mit diesen RNS-transfizierten APZ können T-Zellen stimuliert werden, die aus Sicht der APZ autolog sind, also von demselben gesunden Spender erhalten wurden. Für die T-Zellen wird dadurch, dass die APZ neben Selbst-MHC-Molekülen nach Transfektion auch Fremd-MHC-Moleküle präsentieren, ein „semi“-allogenes System geschaffen, in dem es möglich sein sollte, allorestingierte Peptid-spezifische T-Zellen mit hohen Affinitäten gegen Selbst-Peptide zu generieren. Im Vergleich mit einem vollständig autologen Stimulationssystem sollten mit einem „semi“-allogenen Ansatz, bei dem ein nicht negativ selektiertes T-Zellrepertoire abgegriffen wird, T-Zellen mit höher affinen TZR erhalten werden können (siehe Abbildung 1.3).

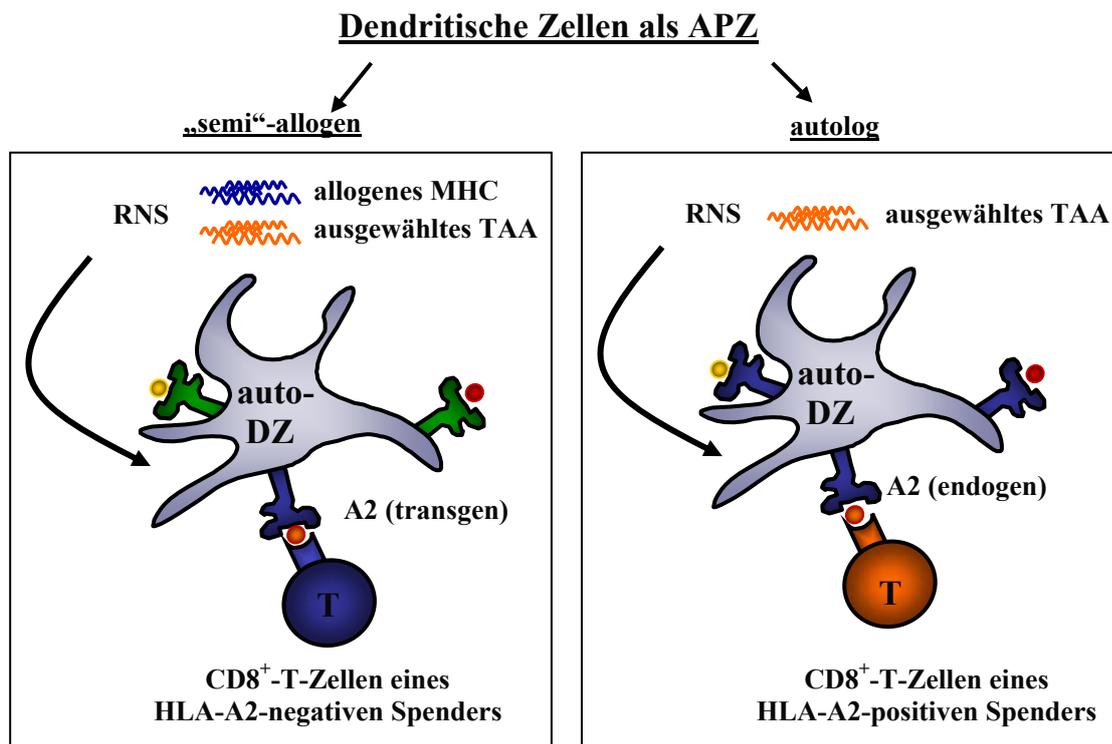


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung des „semi“-allogenen und autologen Ansatzes. Im „semi“-allogenen System werden den autologen T-Zellen die TAA-Peptide auf DZ nicht nur über Selbst-MHC-Moleküle sondern auch über Fremd-MHC-Moleküle präsentiert. Dabei wird ein nicht negativ selektiertes T-Zellrepertoire abgegriffen. Zum Vergleich der Fähigkeit hoch affine T-Zellen zu generieren, wird zusätzlich ein autologer Stimmulationsansatz gewählt, bei dem nur RNS für ein TAA in DZ transfiziert wird und somit die TAA-Peptide nur über Selbst-MHC-Peptide präsentiert werden. Hierbei werden T-Zellen induziert, die die negative Selektion überstanden haben.

Dieser Ansatz bietet eine Reihe an Vorteilen. Mature DZ stellen wichtige kostimulatorische Moleküle und Zytokine zur Verfügung und sind als einziger Zelltyp in der Lage, naive und ruhende T-Zellen zu induzieren. Mit Hilfe der RNS-Transfektion können T-Zellen mit Spezifitäten für eine Vielzahl an MHC-Molekülen generiert werden, da *in vitro* transkribierte RNS (*ivtRNS*) für jedes klonierte MHC-Klasse-I- und -Klasse-II-Allel verwendet werden kann. Auch gibt es keinen Grund, warum DZ nicht so modifiziert werden können, dass sie gleichzeitig allogene MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle exprimieren und so sowohl allorestingierte CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellen induzieren können. Interaktionen der aktivierten CD4⁺-T-Zellen mit DZ wiederum können die CD4⁺-T-Zellen mit Signalen ausstatten, die ihnen Hilfe bei der optimalen Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen erlauben (Toes *et al.*, 1998). Auch ist dieses System nicht auf bekannte TAA-Peptide beschränkt, da in den DZ das gesamte Protein für die Prozessierung und Präsentation zur Verfügung steht. DZ können so modifiziert werden, dass sie mehrere Antigene gleichzeitig exprimieren. Tatsächlich können transfizierte DZ den gesamten RNS-Gehalt einer Tumorzelle, bestehend aus Hunderten von RNS-Spezies, exprimieren. Die DZ sind in der Lage, mehrere MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Liganden zu prozessieren und gleichzeitig auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Auf diese Weise können sie viele T-Zellen mit den unterschiedlichsten Spezifitäten aktivieren (Gilboa und Vieweg, 2004; Geiger *et al.*, 2005; Schaft *et al.*, 2005). Es spricht folglich nichts gegen die Koexpression von *ivtRNS*-Spezies in DZ, die für verschiedene allogene MHC-Moleküle und TAA kodieren. Auf diese Weise könnten gleichzeitig viele unterschiedliche MHC-Peptid-Liganden erzeugt werden, die allorestingierte T-Zellen mit verschiedenen Spezifitäten induzieren könnten. Dadurch würde der Prozess der Tumor-Flucht erschwert werden.

Für die klinische Therapie könnten zwei Anwendungsmöglichkeiten interessant sein. Einerseits könnten auf diese Weise *ex vivo* T-Zellen für den adoptiven Transfer expandiert werden. Dies ist jedoch nur für Patienten relevant, die bereits eine Knochenmarks- bzw. Stammzellspende erhalten haben und dadurch eine geeignete Umgebung für allorestingierte T-Zellen bieten. Eine andere Möglichkeit besteht darin, die TZR-Sequenzen der Antigen-spezifischen T-Zellen in autologen PBMC zu exprimieren, um transgene hoch affine T-Zellen für Patienten zu generieren, deren Tumoren die entsprechenden Liganden tragen. Dies würde eine Alternative zum adoptiven Transfer allogener Lymphozyten darstellen und würde auch die Behandlung von Patienten ermöglichen, die keine Stammzelltransplantation erhalten haben und somit auch von Patienten mit nicht-hämatologischen Krebserkrankungen.

Der adoptive Transfer von TZR-Genen hat sich als attraktiver Ansatz der Immuntherapie herausgestellt. So konnte der Gen-Transfer von Melanom-reaktiven TZR, isoliert aus TIL, in Form von *ivtRNS* in nicht-reaktive PBMC sowohl die TZR-Affinität für das Antigen als auch die

Tumor-Reaktivität auf diese PBMC übertragen (Johnson *et al.*, 2006). Auch konnte mit Hilfe des Gentransfers von allorestingierten T-Zell-Rezeptoren gezeigt werden, dass so die Toleranz von autologen T-Zellen gegenüber Selbst-Tumor-Antigenen umgangen werden konnte (Stanislawski *et al.*, 2001). Zusätzlich zur Überwindung der Toleranz gegenüber definierten Selbst-Antigenen konnte in Mäusen gezeigt werden, dass der adoptive Transfer von allogenen TZR-Genen auch in teilweise HLA-, „mismatched“ Empfängern ohne messbare Graft-versus-Host-Erkrankung möglich war (de Witte *et al.*, 2006), was die standardisierte Zusammenstellung von Tumorspezifischen TZR-Genen für den adoptiven TZR-Gentransfer in T-Zellen für die Therapie größerer Patientengruppen in ersten klinischen Studien denkbar macht.

1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die große Bedeutung des Immunsystems bei der Bekämpfung von Tumoren wird mit fortlaufend neuen Ergebnissen in Form experimenteller Daten aus der Tumorforschung belegt. Die Entdeckung der Immunüberwachung und zytotoxischer T-Zellen, die Tumorzellen aufgrund von speziellen Oberflächenstrukturen, den Tumor-assoziierten Antigenen zerstören können, ermöglicht immuntherapeutische Ansätze für die Behandlung von bösartigen Tumoren. Problematisch ist, dass die meisten Tumoren keine fremden Antigene, sondern Selbst-Peptide, die von überexprimierten Selbst-Proteinen stammen, über Selbst-MHC-Moleküle präsentieren. Die meisten Tumor-reaktiven T-Zellen tragen deshalb TZR mit niedriger Affinität, da diejenigen T-Zellen mit hoher Affinität während ihrer Entwicklung im Thymus eliminiert werden, um Autoimmunität zu verhindern. Ein Beispiel für solche Tumor-reaktiven CD8⁺-T-Zellen sind die IVS B ZTL, die aus einem Melanompatienten isoliert wurden (Wölfel *et al.*, 1993). Leider zeigen solche Tumor-infiltrierenden Lymphozyten meist keine sehr große Aktivität gegenüber Tumorzellen. Deshalb wurden schon bald andere Strategien zur Generierung von Tumor-reaktiven T-Zellen gewählt. So wurden z. B. aus gesunden Spendern mit Hilfe von Peptid-beladenen APZ Melanom-reaktive T-Zellen, die TyrF8 ZTL, isoliert (Visseren *et al.*, 1995). Gleichwohl wurden mit solchen Ansätzen T-Zellen gegen Selbst-Peptide isoliert, welche die negative Selektion überstanden hatten und somit niedrig affine TZR trugen. Für eine erfolgreiche Bekämpfung durch das Immunsystem werden jedoch T-Zellen benötigt, die hoch affine TZR besitzen und mit geeigneten Effektorfunktionen ausgestattet sind. Die Entdeckung, dass 1-10 % des T-Zellrepertoires eines Individuums alloreaktiv ist und entweder fremde MHC-Moleküle Peptid-unabhängig oder -abhängig erkennt, eröffnete die Möglichkeit, an T-Zellen zu gelangen, die nicht negativ selektiert wurden und somit höhere Affinitäten gegenüber dem Selbst-

Peptid:Fremd-MHC-Liganden zeigten (Rötzschke *et al.*, 1991; Sherman und Chattopadhyay, 1993).

Das Ziel dieser Arbeit war, mit Hilfe von RNS-beladenen DZ ein System zu etablieren, mit dem es möglich ist, allorestrierte, Peptid-spezifische CD8⁺-T-Zellen mit hoch affinen TZR zu isolieren, die in der Lage sind, Tumorzellen zu töten und somit wirkungsvoll für die adoptive Therapie von Tumoren, wie akuten Leukämien, eingesetzt werden können. Im Folgenden wird Schritt für Schritt die Etablierung eines neuartigen Ansatzes vorgestellt, um T-Zellen mit hoch affinen TZR spezifisch für Tumor-assoziierte Peptide zu induzieren, die von in Tumorzellen überexprimierten Selbst-Proteinen stammen. Für die *De-novo*-Induktion solcher T-Zellen sollten DZ verwendet werden, die mit Hilfe der RNS-Technologie mit *ivtRNS*, kodierend für Fremd-MHC-Moleküle und TAA, transfiziert wurden. Als allogenes MHC-Klasse-I-Molekül wurde HLA-A2 und als TAA das Melanom-assoziierte Antigen Tyrosinase gewählt. Dieses Tumormodel wurde deshalb ausgewählt, weil es sowohl auf zellulärer als auch molekularer Ebene sehr gut charakterisiert ist. Dabei soll nach dem in Abbildung 1.4 dargestellten Prinzip vorgegangen werden.

Ein autologer und ein „semi“-allogener Ansatz sollen miteinander verglichen werden, um die Hypothese zu untersuchen, ob in einem nicht negativ selektierten, allorestrierten T-Zellrepertoire mit Hilfe von *ivtRNS*-beladenen DZ T-Zellen mit TZR mit hoher Affinität gegenüber Tumor-assoziierten Selbst-Peptiden zu finden sind. In einer autologen Situation sollen die DZ eines HLA-A2-positiven Spenders mit Tyrosinase-*ivtRNS* transfiziert und zur Stimulation autologer CD8⁺-T-Zellen verwendet werden. Erwartungsgemäß sollten auf diese Weise T-Zellen generiert werden, die niedrig affine TZR besitzen, da T-Zellen mit hoher Affinität während ihrer Entwicklung im Thymus durch den Prozess der negativen Selektion eliminiert wurden. Für den „semi“-allogenen Stimulationsansatz sollen DZ eines HLA-A2-negativen Spenders sowohl mit HLA-A2-*ivtRNS* als auch mit Tyrosinase-*ivtRNS* kotransfiziert werden. Auf diese Weise sollte es möglich werden, T-Zellen mit TZR hoher Affinität zu isolieren, da hier Zellen induziert werden, die keine negative Selektion überstehen mussten. Durch zweimalige Stimulation autologer CD8⁺-T-Zellen mit RNS-beladenen APZ der jeweiligen Spender sollen die Peptid-spezifischen T-Zellen angereichert werden und schließlich mit Hilfe der Tetramer-Technologie selektiert werden. Die so etablierten T-Zelllinien als auch T-Zellklone sollen auf vielen Ebenen analysiert werden. Sowohl ihre Fitness, ihre Zytotoxizität als auch die Zytokine, die von diesen T-Zellen sezerniert werden, sollen überprüft werden.

Überblick: *De-novo*-Induktion naïver Tumor-spezifischer T-Zellen mit *ivt*RNS-beladenen Dendritischen Zellen

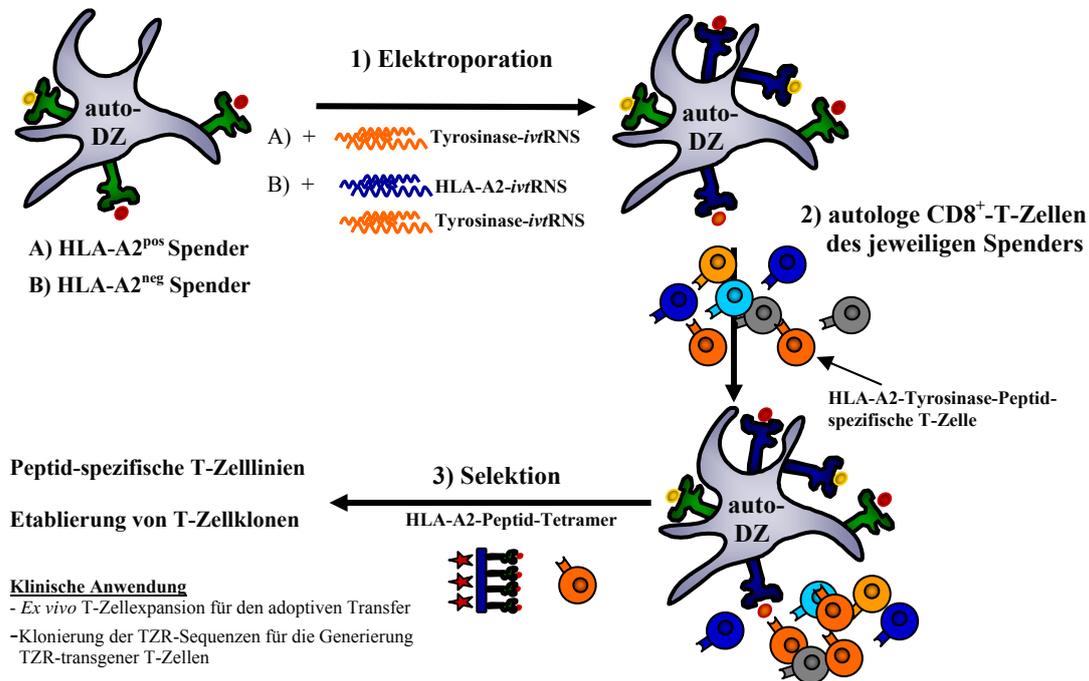


Abbildung 1.4

Konzept der *De-novo*-Induktion naïver Tumor-spezifischer T-Zellen mit *ivt*RNS-beladenen DZ.

Für den autologen Stimulationsansatz sollen DZ eines HLA-A2-positiven Spenders mit Tyrosinase-*ivt*RNS transfiziert werden (A). Für den „semi“-allogenen Stimulationsansatz sollen DZ eines HLA-A2-negativen Spenders mit HLA-A2- und Tyrosinase-*ivt*RNS kotransfiziert werden. Diese *ivt*RNS-beladenen DZ sollen zur zweimaligen Stimulation von autologen CD8⁺-T-Zellen des jeweiligen Spenders verwendet werden. HLA-A2-restringierte, Tyrosinase-Peptid-spezifische T-Zellen sollen mittels Tetramer-Technologie selektiert werden und sowohl T-Zelllinien als auch T-Zellklone etabliert werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird die Generierung geeigneter Stimulationszellen, der *ivt*RNS-beladenen DZ gezeigt. Der zweite Teil beschäftigt sich mit Funktionsuntersuchungen und den Eigenschaften der bereits etablierten, zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen TyrF8 und IVS B, die als Anhaltspunkte für die Qualität der später mit der neuen Methode generierten T-Zellen dienen sollten. Im dritten Teil wird auf die Methodik der *De-novo*-Induktion und Selektion von CD8⁺-T-Zellen mit Hilfe von *ivt*RNS-beladenen DZ eingegangen. In Teil vier und fünf dieser Arbeit wird die Funktion und Spezifität der erhaltenen T-Zelllinien und T-Zellklone gezeigt.

2 Material

2.1 Geräte und sonstige Materialien

Bestrahlungsanlage ^{137}Cs , HWM-D-2000	Gammacell, Ottawa (Kanada)
Brutschrank, CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus, München
Einfrierschachtel, <i>Cryo 1°C Freezing Container</i>	Nalgene, Hereford (Großbritannien)
Einmalpipetten, 5/10/25ml	Greiner, Frickenhausen
Eismaschine AF 100AS	Scotsman, Mailand, (Italien)
Elektroporationsküvetten <i>Gene Pulser[®] Cuvette</i>	Bio-Rad, München
Elektroporator <i>Gene Pulser Xcell[™]</i>	Bio-Rad, München
ELISA-Lesegerät, <i>SLT SPECTRA</i>	SLT, Altdorf (Österreich)
FACS [™] Röhrchen	Peske OHG, Aindling
FACSAria [™] <i>cell sorter</i>	BD Biosciences, Immunocytometry systems (USA)
Falcon-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzzytometer, FACS [™] Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
CellQuest, FACS-Software	
Gefriertruhe/-schrank	Liebherr, Ochsenhausen
Gelapparatur DNA Sub Cell	Bio-Rad, München
Gelapparatur Geltray	Renner, Dannstadt
Geldokumentationssysteme:	
Gelprint 2000i	Biophotonics, Ann Arbor (USA)
InGenius System IG-E	Synoptics, Cambridge (UK)
Heizblock Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Kapillaren (für LightCycler [®])	Roche Diagnostics, Mannheim
Kryo-Röhrchen	Nunc, Wiesbaden
Kühlblock (für LightCycler [®])	Roche Diagnostics, Mannheim
Kühlzentrifuge 2K15	Sigma, Osterode am Harz
Kulturplatten, 6-/24-/96-Loch	TPP, Trasadingen (Schweiz)
Laborwaagen B6, P 120, PC 440	Mettler, Giessen
Lichtmikroskop, Auflicht	Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop, Durchlicht	Zeiss, Göttingen
LightCycler [®] 2.0	Roche Diagnostics, Mannheim
Luminex Bio-Plex [™] System	Bio-Rad, München

MACS Zelltrennsystem	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnetrührer IKA RCT	Bachofer, Reutlingen
Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Mehrkanalpipette, Multistepper	Labsystems, Helsinki (Finnland)
Mikrowellengerät FM 3510	Moulinex, Frankreich
Milli-Q®, Reinstwasserherstellungssystem	Millipore, Schwalbach
MoFlo™ High-Performance <i>cell sorter</i>	Dako, Glostrup (Dänemark)
Neubauer-Zählkammer	neoLab, München
Nitrilhandschuhe	Semperit, Wien (Österreich)
PCR-Thermocycler T-Gradient	Biometra®, Göttingen
Pasteurpipetten	Peske OHG, München
Petrischalen (Falcon)	Becton Dickinson, Heidelberg
pH-Meter pH391	WTW, Weilheim
Pipetten Eppendorf/Gilson	GSF-Zentrallager, Neuherberg
Pipettenspitzen Gilson/Greiner	GSF-Zentrallager, Neuherberg
Pipettenstitzen, gestopft	Starlab, Ahrensburg
Pipettierhilfe, Pipetus akku	Hirschmann, Eberstadt
Plattenzentrifuge Labofuge 6000	Heraeus, München
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Schüttler TR 125	Infors, Bottmingen (Schweiz)
Schüttler Vortex Genie 2	Bachofer, Reutlingen
Spektralphotometer Ultrospec® 1100	Amersham Bioscience, Freiburg
Spitzbodenplatten (96-Loch)	Greiner, Nürtingen
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Stickstofftank <i>Chronos Biosafe</i>	Messer Griesheim, Krefeld
Tischzentrifuge Hettich Mikroliter	Bachofer, Reutlingen
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus, München
UV-Transilluminator, 366nm	Bachofer, Reutlingen
UV-Transilluminator, 302nm/365nm	Synoptics, Cambridge (UK)
Wasserbad	Memmert, Schwabbach
Zellfilter	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturflaschen (25 cm ² und 175 cm ²)	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Nunc, Wiesbaden; Greiner, Nürtingen
Zentrifuge IEC 6000B	IEC, Bedfordshire (UK)
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, München

2.2 Enzyme und Chemikalien

Agarose, Ultra Pure	Invitrogen, Karlsruhe
AIM V Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Merck, Darmstadt
β_2 -Mikroglobulin	Calbiochem, San Diego (USA)
1-Brom-3-Chlor-Propan	Sigma, Deisenhofen
^{51}Cr	ICN Biochemicals, Irvine (USA)
DEPC	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Merck, Darmstadt
1kb-plus DNS-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
DNS-Autragspuffer (6x)	Invitrogen, Karlsruhe
0.24-95 kb RNS-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
RNS-Auftragspuffer (2x)	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid, 10mg/ml	Merck, Darmstadt
FACSTM Flow und Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
Ficoll	Biochrom, Berlin
FKS	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin, 87 %ig	Merck, Darmstadt
GM-CSF	Berlex, Seattle (USA)
Hefe-tRNS („transfer“ RNS)	Roche, Penzberg
HEPES	Invitrogen, Karlsruhe
HS (Humanserum)	IMI
IL-1 β (Interleukin 1 β)	R&D Systems, Wiesbaden
IL-2 (Interleukin 2)	Chiron Behring, Marburg
IL-4 (Interleukin 4)	R&D Systems, Wiesbaden
IL-6 (Interleukin 6)	R&D Systems, Wiesbaden
IL-7 (Interleukin 7)	PromoKine, Heidelberg
IL-15 (Interleukin 15)	Reprotech, London (UK)
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
LB Broth Base	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe

Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Nichtessentielle Aminosäuren	Invitrogen, Karlsruhe
NotI Restriktionsenzym	Fermentas, Leon-Rot
One Shot TOP10F' kompetente Zellen	Invitrogen, Karlsruhe
OptiMEM I Medium	Invitrogen, Karlsruhe
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
PFA	Sigma, Deisenhofen
PGE ₂ (Prostaglandin E2)	Sigma, Deisenhofen
Propidiumjodid	ICN, Eschwege
PstI-Restriktionsenzym	Roche, Penzberg
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Saponin	Sigma, Deisenhofen
SpeI-Restriktionsenzym	New England BioLabs, Frankfurt am Main
Streptavidin-PE	Dianova, Hamburg
Substrat Reagenzien A and B	Becton Dickinson, Heidelberg
TAE (Tris Acetat EDTA) Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
TBE (Tris Borat EDTA) Puffer	Ambion, Austin (USA)
Taq-Polymerase	Promega, Mannheim
Tetracyclin	Sigma, Deisenhofen
TNF- α	R&D Systems, Wiesbaden
TRI-Reagent [®]	Molecular Research Center, Cincinnati (USA)
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	ICN, Eschwege
VLE RPMI 1640 mit L-Glutamin	Biochrom, Berlin
XbaI-Restriktionsenzym	Fermentas, Leon-Rot
Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe

2.3 Kits

BD SMART [™] „PCR cDNA Synthesis Kit“	BD Bioscience, Heidelberg
Bio-Plex [™] „Human Cytokine Th1/Th2 Assay“	Bio-Rad, München
Bio-Plex [™] „Single Plex Assay“	Bio-Rad, München
Bio-Plex [™] „Cytokine Reagent Kit“	Bio-Rad, München

„CD8 ⁺ T cell Isolation Kit II (human)“	Miltenyi, Bergisch Gladbach
„First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)“	Roche Diagnostics, Mannheim
JETstar Plasmid Purification MAXI KIT	Genomed, Löhne
LABType [®] „SSO DNA Typing system“	One Lambda, Canoga Park (USA)
LightCycler [®] „Fast Start DNA Master SYBR Green I“	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler [®] - Primer Set für Bcl-x _L	Search LC, Heidelberg
LightCycler [®] - „Telo TAGGGhTERT Quantification Kit“	Roche Diagnostics, Mannheim
mMESSAGE mMACHINE™ T7	Ambion, Austin (USA)
„OptEIA™ Human IFN-γ Set“	Becton Dickinson, Heidelberg
„Poly(A) Tailing Kit“	Ambion, Austin (USA)
„Qamp DNA Blood® Mini Kit“	Qiagen, Chatsworth (USA)
„QIAquick [®] PCR Purification Kit“	Qiagen, Chatsworth (USA)
„RNAActive™ α ₁ -, α ₂ -, α ₃ -, β-globin stabilised RNA“	CureVac, Tübingen
„RNeasy [®] Mini Kit“	Qiagen, Chatsworth (USA)

2.4 Zellkulturmedien

Einfriermedium: 10 % DMSO in hitzeinaktiviertem FKS

Standard Tumor-Medium:

500 ml	RPMI 1640	
60 ml	FKS	= 2 %
5 ml	nichtessentielle Aminosäuren (100×)	= 1×
5 ml	L-Glutamin (200 mM)	= 2 mM
5 ml	Natriumpyruvat (100 mM)	= 1 mM

RPMI III:

500 ml	RPMI 1640	
5 ml	L-Glutamin (200 mM)	= 2 mM
5 ml	Natriumpyruvat (100 mM)	= 1 mM
5 ml	Pen/Strep (10 ⁴ U/ml)	= 100 U/ml

AIM V III:

500 ml	AIM V	
5 ml	L-Glutamin (200 mM)	= 2 mM
5 ml	Natriumpyruvat (100 mM)	= 1 mM
5 ml	Pen/Strep (10 ⁴ U/ml)	= 100 U/ml

ZTL-Medium RPMI III:

15 ml	FKS	= 7,5 %
15 ml	HS	= 7,5 %
ad 200 ml	RPMI III	

ZTL-Medium AIM V III:

20 ml	HS	= 10 %
ad 200 ml	AIM V III	

T-Zellklon-Medium

20 ml	HS	= 10 %
4 ml	L-Glutamin (200 mM)	= 4 mM
2,5 ml	HEPES (1 M)	= 12,5 mM
0,2 µl	2-Mercaptoethanol (50 mM)	= 50 µM
2 ml	Pen/Strep (10 ⁴ U/ml)	= 100 U/ml
ad 200 ml	RPMI 1640	

B-Zell-Medium:

45 ml	RPMI III	
5 ml	FKS	= 10 %

Trypsin/EDTA 2x:

20 ml	PBS	
5 ml	Trypsin-EDTA (10x)	= 2x

Medium für Dendritische Zellen:

250 ml	VLE RPMI 1640 mit L-Glutamin	
1,5 %	HS	

2.5 Zellen

Name	Charakteristika	Quelle	Referenz
11/33 ZTL	Klonale ZTL-Linie; HLA-A*0201-restringiert; spezifisch für das Melan-A ₂₆₋₃₅ -Epitop	Wölfel, T.	Wölfel <i>et al.</i> , 1993
AK-EBV-B	Epstein-Barr-Virus transformierte lymphoblastoide Zelllinie eines gesunden Spenders	Wölfel, T.	Wölfel <i>et al.</i> , 1994
DZ	aus Monozyten von gesunden Spendern differenziert	im Labor generiert	
IVS B ZTL	Klonale ZTL-Linie; HLA-A*0201-restringiert; spezifisch für das Tyrosinase ₃₆₉₋₃₇₇ Epitop	Wölfel, T.	Wölfel <i>et al.</i> , 1993
JB4 ZTL	Klonale ZTL-Linie; Allo-HLA-A2-reaktiv		Milani <i>et al.</i> , 2005
LAZ388	Epstein-Barr-Virus transformierte lymphoblastoide Zelllinie	Schrier, P.	
Mel A375	Melanomzelllinie; HLA-A2-positiv; Tyrosinase- und Melan-A-negativ	ATCC (CRL-1619)	
Mel/IL-2	Melanomzelllinie; HLA-A2-positiv; Tyrosinase-positiv; stabile IL-2 Transfektante	Schrier, P.	
Mel 624.38	Melanomzelllinie; HLA-A2-positiv; Tyrosinase-positiv		Rivoltini <i>et al.</i> , 1995
RCC26/IL-2 (B2)	humane Nierenzell-Karzinomzelllinie; HLA-A2-positiv, stabile IL-2- und B2-Transfektante	Blankenstein, T.	
Sk Mel 28	Melanomzelllinie; HLA-A2-negativ; Tyrosinase-positiv		Carey <i>et al.</i> , 1979
Sk Mel 29	Melanomzelllinie; HLA-A2-positiv	Wölfel, T.	Wölfel <i>et al.</i> , 1994
T2	Hybrid aus einer lymphoblastoiden T- und B-Zelllinie; TAP-defizient	Panelli, M. C.	Salter <i>et al.</i> , 1985
TyrF8 ZTL	Klonale ZTL-Linie; HLA-A*0201-restringiert; spezifisch für das Tyrosinase ₃₆₉₋₃₇₇ Epitop	Schrier, P.	Visseren <i>et al.</i> , 1995

2.6 Antikörper

primäre Antikörper:

Spezifität	Klon	Isotyp	Konjugation	Hersteller
CCR7	2H4	IgM	aufgereinigt	Becton Dickinson, Heidelberg
CD1a	HI 149	IgG ₁	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CD3	HIT3a	IgG _{2a}	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD8	RPA-T8	IgG ₁	APC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD14	RM052	IgG _{2a}	FITC	Beckman Coulter, Fullerton (USA)
CD25	MA-251	IgG ₁	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CD28	CD28.2	IgG ₁	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD40	5C3	IgG ₁	PE	Becton Dickinson, Heidelberg

Spezifität	Klon	Isotyp	Konjugation	Hersteller
CD80	L307.4	IgG ₁	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
	MAB104	IgG ₁	PE	Beckman Coulter,
CD83	HB15e	IgG ₁	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CD86	FUN-1	IgG ₁	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CD206 (DC sign)	19	IgG ₁	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CTLA-4 (CD152)	BNI3	IgG _{2a}	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
HB82	BB7.2	IgG _{2b}	-	ATCC, Rockyville (USA)
HLA-DR	Immu-357	IgG ₁	PE	Beckman Coulter,
HLA-DR	TÜ39	IgG _{2a}	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
IL-15R α	MAB147	IgG ₁	-	R&D Systems, Wiesbaden
Isotyp Kontrolle IgG ₁	X40	IgG ₁	FITC und PE	Becton Dickinson, Heidelberg
Isotyp Kontrolle IgG ₁	MOPC-21	IgG ₁	APC	Becton Dickinson, Heidelberg
Isotyp Kontrolle IgG _{2a}	G155-178	IgG _{2a}	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
Melan-A	A103	IgG ₁	-	Dako Cytomation, Glostrup (Dänemark)
Tyrosinase	T311	IgG ₁	-	Novocastra, Newcastle (UK)
Anti-CD3	OKT-3	IgG _{2a}	-	Kremmer, E.

sekundäre Antikörper:

Spezifität	Spezies	Isotyp	Konjugation	Hersteller
Maus IgG + IgM	Ziege	F(ab') ₂	PE	Dianova, Hamburg
Maus IgG	Ratte	F(ab') ₂	Cy5	Dianova, Hamburg
Ratte IgM	Ratte	F(ab') ₂	Biotin	Becton Dickinson, Heidelberg

2.7 Puffer und Lösungen

FACS™-Puffer:

1 % FKS in PBS

DEPC-Wasser:

0,1 % DEPC in H₂Odest.

DNS-Agarose Gele:

100 ml H₂Odest.

2 ml TAE-Puffer (50 \times) = 1 \times

2 g Agarose, Ultra Pure = 2 %

8 μ l Ethidiumbromid (10 μ g/ μ l) = 0,4 μ g/ml

DNS-Elektrophorese Laufpuffer:

180 ml H₂Odest.

20 ml TAE-Puffer (50 \times) = 1 \times

RNS-Agarose Gele:

45 ml	DEPC-Wasser	
5 ml	TBE-Puffer (10×)	= 1×
1 g	Agarose, Ultra Pure	= 2 %
8 µl	Ethidiumbromid (10 µg/µl)	= 0,4 µg/ml

RNS-Elektrophorese Laufpuffer:

180 ml	DEPC-Wasser	
20 ml	TAE-Puffer (10×)	= 1×

ELISA-Ak-Puffer: 1 % Milchpulver in PBS

ELISA-Carbonatpuffer (pH 9,5): 0,2 M Natriumcarbonat

ELISA-Waschpuffer: 0,5 ‰ Tween in PBS

Waschpuffer für MACS-Kits: 10 % FKS
2 mM Na-EDTA
in PBS
nach Miltenyi, Bergisch Gladbach

Zellfixierlösung: 1 % PFA in PBS

2.8 Plasmide

	cDNS Insertion	Resistenz	Quelle
pcDNA1/Amp/Aa1.2	Melan-A	Ampicillin	Wölfel, T.
pZeoSV2+/huTyr	Tyrosinase	Zeocin	Sutter, G.
pCDM8-HLA-A2	HLA-A2	Ampicillin Tetracyclin	Weiß, E.

2.9 Peptide

Epitop	Peptid Sequenz
Influenza Matrix Protein₅₈₋₆₆	GILGFVTL
Tyrosinase₃₆₉₋₃₇₇	YMNGTMSQV und YMDGTMSQV

Alle Peptide wurden im Genzentrum synthetisiert.

2.10 Tetramere und Streptamer

	Peptid-Sequenz	Quelle
HLA-A*0201/h Tyr 369-377/H β_2 m	YMDGTMSQV	Busch, D.
HLA-A*0201/pp65 495-503/H β_2 m	NLVPMVATV	Busch, D.
HLA-B7/pp65 495-503/H β_2 m	NLVPMVATV	Busch, D.
MHC I-Strep HLA-A*0201/ h Tyr 369-377	YMDGTMSQV	IBA, Göttingen

2.11 Primer für Bcl-2 und T-Zell-Rezeptor-Analyse

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Oligonukleotide von MWG Biotech in Ebersberg hergestellt.

Sämtliche Primersequenzen sind in 5'→3'-Richtung angegeben.

Primerauswahl für die quantitative RT-PCR:

	Antigen	Primer	Sequenz	Produktlänge
Anti-apoptotisches Gen	Bcl-2	5'	5'-TTCTTTGAGTTCGGTGGGGTC-3'	304 bp
		3'	5'-TGCATATTTGTTTGGGGCAGG-3'	

TZRAV Gensegment Familien-spezifische Primer (5') für TZRAV-PCR (Arden-Nomenklatur):

Primer für die konstante Region (PCR-Kontrolle):

P-5'ST CTG TGC TAG ACA TGA GGT CT
P-3'ST CTT GCC TCT GCC GTG AAT GT

5'-Primer:

PANV α 1	AGA GCC CAG TCT GTG ASC CAG	S=C/G
PANV α 1.1	AGA GCC CAG TCR GTG ACC CAG	R=A/G
V α 2	GTT TGG AGC CAA CRG AAG GAG	
V α 3	GGT GAA CAG TCA ACA GGG AGA	
V α 4	TGA TGC TAA GAC CAC MCA GC	
V α 5	GGC CCT GAA CAT TCA GGA	
V α 6NEU	GGT CAC AGC TTC ACT GTG GCT A	
V α 7	ATG TTT CCA TGA AGA TGG GAG	
V α 8	TGT GGC TGC AGG TGG ACT	
V α 9	ATC TCA GTG CTT GTG ATA ATA	
V α 10	ACC CAG CTG CTG GAG CAG AGC CCT	
V α 11	AGA AAG CAA GGA CCA AGT GTT	
V α 12	CAG AAG GTA ACT CAA GCG CAG ACT	
V α 13	GAG CCA ATT CCA CGC TGC G	
V α 14.1	CAG TCC CAG CCA GAG ATG TC	
V α 14	CAG TCT CAA CCA GAG ATG TC	
V α 15	GAT GTG GAG CAG AGT CTT TTC	
V α 16	TCA GCG GAA GAT CAG GTC AAC	
V α 17	GCT TAT GAG AAC ACT GCG T	
V α 18	GCA GCT TCC CTT CCA GCA AT	
V α 19	AGA ACC TGA CTG CCC AGG AA	
V α 20	CAT CTC CAT GGA CTC ATA TGA	
V α 21	GTG ACT ATA CTA ACA GCA TGT	

V α 22	TAC ACA GCC ACA GGA TAC CCT TCC
V α 23	TGA CAC AGA TTC CTG CAG CTC
V α 24NEU	GAA CTG CAC TCT TCA ATG C
V α 25	ATC AGA GTC CTC AAT CTA TGT TTA
V α 26	AGA GGG AAA GAA TCT CAC CAT AA
V α 27	ACC CTC TGT TCC TGA GCA TG
V α 28	CAA AGC CCT CTA TCT CTG GTT
V α 29	AGG GGA AGA TGC TGT CAC CA
V α 30	GAG GGA GAG AGT AGC AGT
V α 31NEU	TCG GAG GGA GCA TCT GTG ACT A
V α 32	CAA ATT CCT CAG TAC CAG CA

3'-Primer:

3'T-C GGT GAA TAG GCA GAC AGA CTT GTC ACT GGA

Primer-Arbeitslösungen: 2.5 pmol/ μ l (Ausnahme: 3'T-C: 5 pmol/ μ l);Primer-Stocklösungen: 100 pmol/ μ l**TZRBV Gensegment Familien-spezifische Primer (5') für TZRBV-PCR (Arden-Nomenklatur):**Primer für die konstante Region (PCR-Kontrolle):

P-5'BST	AAG CAG AGA TCT CCC ACA C
P-3'BST	GAG GTA AAG CCA CAG TTG CT

5'-Primer:

VB1	GCA CAA CAG TTC CCT GAC TTG GCA C	
VB2	TCA TCA ACC ATG CAA GCC TGA CCT	
VB3	GTC TCT AGA GAG AAG AAG GAG CGC	
VB4	ACA TAT GAG AGT GGA TTT GTC ATT	
VB5.1	ATA CTT CAG TGA GAC ACA GAG AAA C	
VB5.2	TTC CCT AAC TAT AGC TCT GAG CTG	
VB5.2T	TTC CCT AAT TAT AGC TCT GAG CTG	
VB6.1NEU	GCC CAG AGT TTC TGA CTT ACT TC	
VB6.2	ACT CTG ASG ATC CAG CGC ACA	S=C/G
VB6.3	ACT CTG AAG ATC CAG CGC ACA	
VB7	CCT GAA TGC CCC AAC AGC TCT C	
VB8	ATT TAC TTT AAC AAC AAC GTT CCG	
VB8S3	GCT TAC TTC CGC AAC CGG GCT CCT	
VB9NEU	CCT AAA TCT CCA GAC AAA GCT	
VB10	CTC CAA AAA CTC ATC CTG TAC CTT	
VB11	TCA ACA GTC TCC AGA ATA AGG ACG	
VB12	AAA GGA GAA GTC TCA GAT	
VB12S3	GCA GCT GCT GAT ATT ACA GAT	
VB13NEU	TCG ACA AGA CCC AGG CAT GG	
VB13.1	CAA GGA GAA GTC CCC AAT	
VB13.2	GGT GAG GGT ACA ACT GCC	
VB13S5	ATA CTG CAG GTA CCA CTG GCA	
VB14	GTC TCT CGA AAA GAG AAG AGG AAT	
VB15	AGT GTC TCT CGA CAG GCA CAG GCT	
VB16	AAA GAG TCT AAA CAG GAT GAG TCC	
VB17	CAG ATA GTA AAT GAC TTT CAG	
VB18	GAT GAG TCA GGA ATG CCA AAG GAA	
VB19	CAA TGC CCC AAG AAC GCA CCC TGC	
VB20	AGC TCT GAG GTG CCC CAG AAT CTC	
VB21	AAA GGA GTA GAC TCC ACT CTC	
VB22.1	CAT CTC TAA TCA CTT ATA CT	
VB22.2	AAG TGA TCT TGC GCT GTG TCC CCA	
VB22.3	CTC AGA GAA GTC TGA AAT ATT CG	
VB23	GCA GGG TCC AGG TCA GGA CCC CCA	
VB24NEU	ATC CAG GAG GCC GAA CAC TTC T	

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Arbeiten zur Kultivierung der Zellen wurden mit sterilem Material, Lösungen und Medien unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um Kontaminationen mit Bakterien, Hefen oder Pilzen zu vermeiden. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Trypanblau-Färbung bestimmt. Der Farbstoff Trypanblau dringt nur in tote, nicht aber in lebendige Zellen ein. Es wurden nur die nicht gefärbten, lebendigen Zellen gezählt. Einer frisch suspendierten Kultur wurde ein Aliquot (10 µl) entnommen und 1:10 mit Trypanblau-Lösung (90 µl) gemischt. Ein Teil der Farbstoff-Zell-Mischung wurde in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter Verwendung eines inversen Mikroskops wurde die Anzahl der ungefärbten Zellen in mindestens 2 Großquadraten, bestehend aus je 16 Kleinquadraten, bestimmt. Die durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat wurde mit dem Kammerfaktor 1×10^4 und dem Verdünnungsfaktor 10 multipliziert und ergab die Anzahl der Zellen, die in einem Milliliter Zellkultur enthalten war. War die Zellkonzentration niedrig, so wurde eine geringere Verdünnung gewählt.

3.1.3 Einfrieren von Zellen

Abhängig von der Zellart wurden unterschiedliche Zellkonzentrationen gewählt. $2-5 \times 10^6$ Tumorzellen oder Dendritische Zellen; $0,5-3 \times 10^6$ T-Zellen bzw. $2-5 \times 10^7$ PBMC wurden abzentrifugiert, in 900 µl gekühltem Fötalen Kälberserum (FKS) aufgenommen und in ein Kryo-Röhrchen überführt. Schrittweise wurde das gleiche Volumen an kühlem 20 %igem DMSO zur Zellsuspension gegeben. Nach sorgfältigem Mischen wurden die Kryo-Röhrchen im *Nalgene*[®] *Cryo 1°C Freezing Container* ÜN bei -80°C gelagert und zur langfristigen Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

3.1.4 Auftauen von Zellen

Eingefrorene Zellen wurden bei Bedarf zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Der Inhalt eines Kryo-Röhrchens wurde, sobald nur noch ein kleines Eisstückchen vorhanden war, in ein 15 ml Falcon-Gefäß, das 5 ml FKS enthielt, überführt und 5 Min. bei 450xg zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment in dem jeweiligen auf 37°C vorgewärmten Kulturmedium aufgenommen.

3.1.5 Kultivierung adhärenter Tumorzelllinien

Die adhärenenten humanen Melanomzelllinien Mel A375, Mel/IL-2, Mel 624.38, SK Mel 28 und SK Mel 29 wurden in RPMI 1640 Medium kultiviert, dem 12 % FKS, 1x nichtessentielle Aminosäuren, 2 mM L-Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat zugesetzt worden waren. Das Medium-Volumen in einer 75cm²-Zellkulturflasche betrug 10 ml. Durchschnittlich alle 3-4 Tage wurde das Medium abgenommen und die adhärent wachsenden Zellen einmal mit PBS gewaschen. Zu Zellen in 75cm²-Flaschen wurden 2ml Trypsin/EDTA-Lösung gegeben, kurz geschwenkt und die Flasche solange im Brutschrank inkubiert, bis sich alle Zellen abgelöst hatten. Ein Teil der Zellsuspension wurde in eine neue, bereits mit Medium befüllte Flasche transferiert. Je nach Wachstum wurden die Zelllinien mit Medium im Verhältnis 1:2 bis 1:10 versehen. Eine Zellcharge wurde maximal 8 Wochen in Kultur gehalten. Dadurch sollte eine Anreicherung von Mutanten verhindert werden.

3.1.6 Kultivierung von Suspensionszellen

Die Tumor Zelllinie T2 wurde ebenfalls in RPMI 1640 Medium kultiviert, das mit 12 % FKS, 1x nichtessentielle Aminosäuren, 2 mM L-Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat versetzt worden war. Die T2-Zellen wurden in stehenden 75cm²-Zellkulturflaschen mit 10-30 ml Medium in Kultur gehalten. Ungefähr alle 3-4 Tage wurden $\frac{3}{4}$ der Zell-Suspension entfernt und dasselbe Volumen an frischem Medium zugesetzt.

3.1.7 Kultivierung von EBV-transformierten B-Zelllinien

Bei lymphoblastoiden B-Zelllinien (B-LZL) handelt es sich um humane B-Zellen, die mit dem Epstein-Barr-Virus transfiziert und dadurch immortalisiert wurden. B-LZL wurden in

RPMI 1640 Medium, dem 5 % FKS, 1x nichtessentielle Aminosäuren, 2 mM L-Glutamin und 1 mM Natrium-Pyruvat zugesetzt worden waren, kultiviert und expandiert.

3.1.8 Kultivierung von etablierten T-Zellklonen

Für Experimente wurden T-Zellklone in standardmäßigen Restimulationskulturen expandiert und in eine Vielzahl an Kryo-Röhrchen aliquotiert und eingefroren. Wenn die jeweiligen T-Zellen für ein Experiment benötigt wurden, wurde eine Ampulle vom Vorrat aufgetaut und nach dem folgenden standardisierten Protokollen restimuliert.

Restimulation von JB4 T-Zellen:

Pro Loch einer 24-Loch-Platte wurden 6×10^5 aufgetaute JB4 T-Zellen ausgesät. Als Stimulationszellen wurden Zellen der Nierenzellkarzinom-Zelllinie RCC 26/IL-2 (B2) (bestrahlt mit 100 Gy, 6×10^4 Zellen pro Loch) und als „Feederzellen“ LAZ388-Zellen (bestrahlt mit 150 Gy, 1×10^5 Zellen pro Loch) und PBMC von fünf verschiedenen Spendern (bestrahlt mit 50 Gy, 1.5×10^6 cells per well) zugegeben. Die Kultivierung erfolgte in 1,5 ml RPMI III Medium pro Loch, das mit 7,5 % HS; 7,5 % FKS und 100 IU/ml IL-2 angereichert worden war. Ungefähr alle drei Tage wurde die Hälfte des Mediums abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Während der Expansion wurden JB4 ZTL alle zwei Wochen restimuliert. Für funktionelle Versuche konnten die JB4 T-Zellen sieben bis 14 Tage nach der letzten Restimulation verwendet werden.

Restimulation von TyrF8 T-Zellen:

Pro Loch einer 24-Loch-Platte wurden 5×10^5 aufgetaute TyrF8 T-Zellen ausgesät. Mel/IL-2-Zellen dienten als Stimulationszellen (bestrahlt mit 100 Gy, 6×10^4 Zellen pro Loch) und LAZ388 Zellen (bestrahlt mit 150 Gy, 1×10^5 Zellen pro Loch) sowie PBMC von fünf verschiedenen Spendern (bestrahlt mit 50 Gy, 1.5×10^6 cells per well) als „Feederzellen“. Die genannten Restimulationszellen wurden in 1,5 ml RPMI III Medium pro Loch zugesetzt, das mit 7,5 % HS, 7,5 % FKS und 100 IU/ml IL-2 ergänzt worden war. Ungefähr alle drei Tage wurde die Hälfte des Mediums abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Während der Expansion wurden TyrF8 ZTL alle zwei Wochen restimuliert. Für funktionelle Versuche konnten die TyrF8 T-Zellen sieben bis 14 Tage nach der letzten Restimulation verwendet werden.

Restimulation von IVS B ZTL und 11/33 ZTL:

Pro Loch einer 24-Loch-Platte wurden 5×10^5 aufgetaute ZTL ausgesät. SK Mel 29 Zellen (bestrahlt mit 100 Gy, 1×10^5 Zellen pro Loch) wurden als Stimulationszellen und AK-EBV-B-Zellen (bestrahlt mit 100 Gy, 2×10^5 Zellen pro Loch) als „Feederzellen“ zugesetzt. Die T-Zell-Kultur erfolgte in AIM V III Medium (Endvolumen: 1,5 ml pro Loch), das mit 10 % HS und 500 IU/ml IL-2 ergänzt worden war. Durchschnittlich alle zwei Tage wurde die Hälfte des Mediums abgenommen und durch frisches Medium mit 250 IU/ml IL-2 ersetzt. Während ihrer Expansion wurden diese ZTL wöchentlich restimuliert. An Tag sieben nach Restimulation konnten diese T-Zellen in funktionelle Versuche eingesetzt werden.

3.1.9 Generierung und Kultivierung Dendritischer Zellen (DZ)

Mit Hilfe der Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation wurden aus Vollblut gesunder Spender PBMC isoliert. Die PBMC wurden in VLE RPMI 1640 Medium aufgenommen, das mit 1 % HS ergänzt worden war. Pro 75 cm^2 -Zellkulturflasche wurden $7,5 \times 10^6$ Zellen ausgesät. Die Flaschen wurden 1 h lang bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Zellen, die sich nicht an den Plastikboden der Platte angeheftet hatten, wurden durch vorsichtiges, dreimaliges Waschen mit PBS + 0,5 % HS entfernt. Zu den adhärenierten Monozyten wurden 15 ml VLE RPMI 1640 Medium, ergänzt mit 1 % HS, zugegeben. Am nächsten Tag wurden 100 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4 zugesetzt. Nach insgesamt drei und sechs Tagen wurden ebenfalls 100 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4 hinzugefügt. An Tag sechs wurden die mittlerweile immaturren DZ durch Zugabe folgender Zytokine maturiert: 10 ng/ml TNF- α , 10 ng/ml IL-1 β , 15 ng/ml IL-6 und 1 $\mu\text{g/ml}$ PGE $_2$. Mature DZ (mDZ) wurden an Tag acht der Zellkultur geerntet und für Versuche verwendet.

3.1.10 *De-novo*-Induktion von naiven T-Zellen mit RNS-beladenen DZ

Die mDZ von entweder HLA-A*0201-positiven oder -negativen gesunden Spendern wurden wie oben beschrieben generiert. Mit Hilfe der Elektroporation (siehe Kapitel 3.8), wie kürzlich von Javorovic und Kollegen beschrieben, wurden sie mit RNS transfiziert (Javorovic *et al.*, 2005). Mature DZ, die von HLA-A2-positiven Spendern erhalten worden waren, wurden mit 24 μg Tyrosinase-*ivt*RNS, dem ausgewählten Tumor-assoziierten Antigen (TAA), elektroporiert (siehe Methoden 3.8, S. 51). Mature DZ von HLA-A2-negativen Spendern wurden sowohl mit 24 μg Tyrosinase-*ivt*RNS als auch mit 48 μg HLA-A2-*ivt*RNS kotransfiziert. Am gleichen Tag wurden die autologen CD8 $^+$ -T-Zellen des jeweiligen Spenders, wie unter Abschnitt 3.2.1 beschrieben, mittels negativer Separation angereichert.

Die Kokultur von *ivt*RNS-beladenen DZ mit CD8⁺-T-Zellen begann 9 h nach der Elektroporation. In 24-Loch-Platten wurden 1×10^5 *ivt*RNS-beladene DZ zu 1×10^6 CD8⁺-T-Zellen hinzugefügt und in T-Zellklon-Medium, ergänzt mit 5 ng/ml IL-7, kultiviert. Das Verhältnis Effektor- zu Stimulationszellen betrug 10:1. Nach zwei Tagen und danach alle drei Tage wurden 50 IU/ml IL-2 zugesetzt. Die zweite Stimulation der *De-novo*-Induktionskulturen erfolgte ebenfalls mit frischen RNS-beladenen DZ sieben Tage nach der ersten Stimulation auf dieselbe Art und Weise. Auch die gleichen Kulturbedingungen, wie oben beschrieben, wurden verwendet.

3.1.11 Kultivierung von Peptid-spezifischen T-Zelllinien und -klonen

Eine Woche nach der zweiten Stimulation mit *ivt*RNS-beladenen DZ, wurden die HLA-A2-restringierten Tyrosinase-Peptid-spezifischen T-Zellen mit Hilfe des PE-konjugiertem HLA-A*0201/htyr369-377-Tetramers (Wölfl *et al.*, 2004; freundlicherweise von Prof. D. Busch bereitgestellt) gefärbt und wie unten beschrieben sortiert. Positiv-selektierte T-Zellen wurden entweder als T-Zelllinie expandiert oder kloniert. Für die Klonierung wurden die CD8⁺ Tetramer⁺-T-Zellen in limitierenden Verdünnungen in 96-Loch-Rundboden-Platten ausgesät: 5 Zellen, 1 Zelle und 0,3 Zellen pro Loch wurden in 200 µl/Loch T-Zellklon-Medium kultiviert. Nach 14 Tagen wurden stark proliferierende T-Zellen in 24-Lochplatten umgesetzt und unspezifisch mit Anti-CD3-Antikörper (0,1 µg/ml; freundlicherweise von Dr. Elisabeth Kremmer zur Verfügung gestellt), „Feederzellen“, bestehend aus PBMC von fünf verschiedenen Spendern (bestrahlt mit 50 Gy, 1×10^5 Zellen pro 96-Loch bzw. 1×10^6 Zellen pro 24-Loch) und EBV-transformierten allogenen B-LZL (LAZ388, bestrahlt mit 150 Gy, 1×10^4 Zellen pro 96-Loch bzw. 1×10^5 Zellen pro 24-Loch) restimuliert. Alle drei Tage wurden 50 IU/ml IL-2 zugesetzt, alle sieben Tage 5 ng/ml IL-7 und 10 ng/ml IL-15. Alle 14 Tage wurden die T-Zelllinien und T-Zellklone, wie beschrieben restimuliert und kultiviert.

3.2 Magnetische Sortierung von Zellen

3.2.1 CD8⁺-T-Zell-Isolierung mittels negativer Separation

Zytotoxische CD8⁺-T-Zellen wurden aus PBMC mit Hilfe des MACS-Systems von Miltenyi und des humanen „CD8⁺ T cell Isolation Kit II (human)“ nach Angaben des Herstellers separiert. Das Prinzip beruht auf der Inkubation der Zellsuspension mit Antikörpern (Ak), welche an superparamagnetische Partikel gekoppelt sind, und anschließende Trennung der gebundenen von nicht gebundenen Zellen am Magneten. Nicht-CD8⁺-T-Zellen, wie z.B.: CD4⁺-T-Zellen, γ/δ -T-Zellen,

B-Zellen, NK-Zellen, Dendritische Zellen, Monozyten, Granulozyten und erythroide Zellen wurden indirekt magnetisch markiert, indem die Zellsuspension mit einer Ak-Mischung bestehend aus biotinylierten Ak gegen CD4, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ , and CD235a (Glycophorin A) inkubiert wurde. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit magnetischen Anti-Biotin-Kügelchen. Die Zellsuspension wurde auf eine Säule geladen, die an einem Magneten fixiert war. Nicht-CD8⁺-T-Zellen banden an die Säule und im Durchfluss wurden die aufgereinigten, unberührten CD8⁺-T-Zellen erhalten. Die angereicherten Fraktionen wurden anschließend im Durchflusszytometer auf ihre Reinheit hin kontrolliert.

3.2.2 Streptamersortierung

Die magnetische Isolierung der HLA-A2-restringierten, Tyrosinase-Peptid-spezifischen CD8⁺-T-Zellen erfolgte mit Hilfe eines magnetisch-markierten HLA-A*0201/htyr369-377-Streptamers nach Angaben des Herstellers (IBA, Göttingen). In einem ersten Schritt wurden die spezifischen T-Zellen mit dem magnetischen Streptamer-Komplex markiert. Danach wurden die Streptamer⁺-T-Zellen im magnetischen Feld von den anderen unspezifischen Zellen getrennt. Strep-Tactin, eine modifizierte Form des Streptavidins, stellt das Rückgrat des Streptamers dar, an das mehrere MHC-I-Strep-tag-Fusionsproteine (in diesem Fall HLA-A*0201/htyr369-377-Strep-tag-Fusionsproteine) gebunden vorliegen. Da Biotin eine höhere Bindungsaffinität zu Strep-Tactin besitzt als Strep-tag, kann durch Zugabe von Biotin das Rückgrat abgelöst werden. Die monovalente MHC:TZR-Interaktion ist schwach. Deshalb dissoziieren die MHC-I-Strep-tag-Fusionsproteine spontan von den TZR. Nachdem die Streptamer⁺-T-Zellen eluiert worden waren, wurde der Streptamer-Komplex durch Zugabe von Biotin abgelöst und auf diese Weise nicht-induzierte, spezifische T-Zellen erhalten.

3.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde verwendet, um die intra- und extrazelluläre Expression ausgewählter Moleküle von Zellen zu messen. Die zu untersuchenden Molekülstrukturen können von monoklonalen Ak, an die verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, spezifisch gebunden werden. Die durchflusszytometrischen Analysen wurden im FACS™ („fluorescence-activated cell sorter“) durchgeführt. Aufgrund von unterschiedlichen Emissionsspektren können diese Farbstoffe später im Durchflusszytometer (FACS) voneinander getrennt werden. Im FACS wird die Zellsuspension durch eine Kapillare in das Durchflusszytometer eingesaugt. Durch einen Flüssigkeitsstrom innerhalb der Kapillare werden die Zellen vereinzelt und passieren

nacheinander einen Argonlaserstrahl mit der Anregungswellenlänge von $\lambda = 488\text{nm}$. Jede Zelle, die an dem Laserstrahl vorbei kommt, streut das Laserlicht und die Fluoreszenzmoleküle, mit denen die Zellen markiert wurden, werden angeregt. Die Wellenlänge des emittierten Lichts der angeregten Elektronen ist von dem jeweilig verwendeten Fluoreszenzfarbstoff abhängig. Das Licht wird von Sammellinsen eingefangen und über verschiedene Spiegel und Filter an die Detektoren weitergeleitet. Sowohl das Streulicht, das Informationen über die Größe (Vorwärtsstreuung, FSC) und Granulation (Seitwärtsstreuung, SSC) der Zelle gibt, als auch die Fluoreszenzemission, die eine Aussage über die Bindung von Fluoreszenz-gekoppelten Ak und demzufolge über die Expression des ausgewählten Moleküls ermöglicht, werden gemessen. Über die Software CellQuest oder FlowJo werden diese Informationen sichtbar und auswertbar gemacht.

Die Sortierungen der Zellen, die für diese Arbeit von Interesse waren, wurden entweder mit Hilfe eines MoFloTM High-Performance Cell Sorter am Institut für Molekulare Immunologie der GSF in München oder mit Hilfe eines FACSTTMAria-Gerätes am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München durchgeführt.

3.3.1 Färbung von Oberflächenmolekülen

Die Expression der meisten Oberflächenmoleküle wurde mit direkt konjugierten Ak gemessen. Entweder handelte es sich um FITC- oder PE-gekoppelte Ak (FITC: Fluorescein Isothiocyanat; PE: Phycoerythrin). Durch Zentrifugation wurden $0,5-3 \times 10^5$ Zellen sedimentiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 50 μl FACS-Puffer resuspendiert. Zu dieser Zellsuspension wurden fluoreszenzmarkierte monoklonale Ak gegeben, deren optimale Konzentration in Vorversuchen ermittelt worden war. Die Inkubationszeit lag, je nach Fluoreszenzmarkierung, zwischen 30 und 45 Min., die Färbung wurde bei 4°C im Dunkeln durchgeführt. Nicht gebundene Ak wurden durch Zugabe von 500 μl FACS-Puffer, anschließendem Zentrifugieren für 5 Min. bei 1500 rpm und Verwerfen des Überstandes entfernt. Schließlich wurden die Zellen entweder in 1 %iger Paraformaldehyd (PFA) -Lösung fixiert und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln gelagert. Oder die Zellen wurden in 200 μl FACS-Puffer aufgenommen und mit Hilfe der Propidiumjodid (PI) -Färbung eine Lebend/Tod-Diskriminierung durchgeführt. Hierfür wurde direkt vor der Messung PI (100 $\mu\text{g/ml}$) im Verhältnis 1:100 in den FACS-Puffer zugegeben. Da Propidium-Kationen nicht in der Lage sind, die intakte Plasmamembran von lebenden Zellen zu überwinden, reichern sie sich nur in denjenigen Zellen an, welche die Integrität der Plasmamembran bereits verloren haben. Propidium-Kationen interkalieren in die DNS toter Zellen und sind über ihr spezifisches Emissionsspektrum detektierbar.

Um die Expression von HLA-A2-Molekülen auf der Zelloberfläche nachzuweisen, wurden ca. 1×10^5 DZ zuerst mit einem primären monoklonalen Ak aus der Maus (50 μ l), spezifisch für HLA-A2, inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 500 μ l FACS-Puffer wurden die Zellen 5 Min. bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die sedimentierten Zellen in 50 μ l FACS-Puffer resuspendiert und gebundene, HLA-A2-spezifische, primäre Ak mit sekundären PE-konjugierten Ziege-Anti-Maus-Ak (Verdünnung=1:100) detektiert. Nachdem nicht gebundene Ak durch Waschen mit 500 μ l FACS-Puffer, Zentrifugation für 5 Min. bei 1500 rpm und Verwerfen des Überstandes entfernt worden waren, wurden die Zellen in 1 %iger PFA-Lösung fixiert und bis zur durchflusszytometrischen Analyse bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Die CCR7-Expression, ein Migrationsmarker auf DZ, wurde mit einem primären Anti-humanen CCR7-Ak, einem sekundären biotinyliertem Anti-IgM-Ak und tertiärem PE-gekoppeltem Streptavidin nachgewiesen. Alle Ak-Inkubationen wurden mittels Waschschritten beendet, um ungebundene Ak zu entfernen.

Die Negativkontrollen bestanden bei direkt markierten Ak aus einem Ak mit gleichem Isotyp, jedoch irrelevanter Spezifität. Bei biotinylierten Ak wurde die Negativkontrolle nur mit Streptavidin-PE inkubiert.

3.3.2 Färbung von intrazellulären Proteinen

Die Expression der intrazellulären Tyrosinase- bzw. Melan-A-Proteine in RNS-transfizierten DZ wurde mit Hilfe eines intrazellulären Färbeprotokolls nachgewiesen. Hierbei wurden die Zellen in 1 %iger PFA-Lösung fixiert und danach wurde die Zellmembran mit Hilfe von 0,1 %iger und 0,25 %iger Saponin-Lösung permeabilisiert, um den Eintritt der Ak in die Zelle zu ermöglichen. Zuerst wurden ca. $1-3 \times 10^5$ Zellen einmal gewaschen. Jeder Waschschriff schloss die Resuspension der Zellen in 500 μ l FACS-Puffer oder 0,1 %iger Saponin-Lösung, Zentrifugation für 5 Min. bei 300xg und Verwerfen des Überstandes ein. Nach dem Waschen wurden 500 μ l 1 %ige PFA-Lösung zum Zellsediment zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 4°C wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Die Zellen konnten entweder bis zu sieben Tage in 500 μ l FACS-Puffer bei 4°C gelagert werden oder das Färbeprotokoll direkt im Anschluss fortgesetzt werden. Die Zellsedimente wurden einmal mit 0,1 %iger Saponin-Lösung gewaschen und in 50 μ l 0,25 %iger Saponin-Lösung aufgenommen. Dazu wurde der Tyrosinase- bzw. Melan-A-spezifische primäre Ak gegeben und vorsichtig gemischt (Verdünnung = 1:10 bzw. 1/25). Nach einer Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur (RT) wurden ungebundene Ak mit 0,1 %iger Saponin-Lösung abgewaschen.

Anschließend wurden in 50 μl 0,25 %iger Saponin-Lösung Cyanin5 (Cy5) -gekoppelte sekundäre Ak, spezifisch für primäre Ak, zugegeben (Verdünnung = 1:100). Die Inkubation dauerte 30 Min. bei RT im Dunkeln. Danach wurden die Zellen wiederum mit 500 μl 0,1 %iger Saponin-Lösung gewaschen. Schließlich wurden die sedimentierten Zellen in 200 μl FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert.

Als Negativkontrollen dienten DZ, die nicht mit Tyrosinase- bzw. Melan-A-RNS transfiziert worden waren und mit den gleichen Ak inkubiert wurden.

3.3.3 Tetramerfärbung, -sortierung und Tetramerdissoziationsversuche

Um die Avidität der HLA-A2-restringierten, Tyrosinase-Peptid-spezifischen CD8^+ -T-Zellen bestimmen zu können und eine Sortierung dieser Zellen im FACS durchführen zu können, wurden die Zellen mit Hilfe von PE-konjugiertem HLA-A*0201/htyr369-377-Tetramer gefärbt.

Vor der Färbung wurden die Zellen zweimal gewaschen. Jeder Waschschrift schloss die Resuspension der Zellen in 500 μl PBS, ergänzt mit 0,5 % HS, Zentrifugation für 5 Min. bei 300xg und Verwerfen des Überstandes ein. Das Volumen, welches für die Inkubation gewählt wurde, war von der Zellzahl abhängig. Bis zu 1×10^6 Zellen wurden in 50 μl für 25 Min. mit Tetramer bei 4°C inkubiert (Verdünnung = 1:25). Für eine Sortierung von HLA-A2-restringierten, Tyrosinase-Peptid-spezifischen CD8^+ -T-Zellen wurden bis zu 5×10^6 Zellen in 100 μl PBS, ergänzt mit 0,5 % HS, mit Tetramer gefärbt (Verdünnung = 1:15-1:20). Danach wurde zusätzlich für 25 Min. ein APC-konjugierter Anti- CD8 -Ak im Verhältnis 1:50 zugesetzt. Nach der Färbung wurden die Zellen zweimal gewaschen und schließlich entweder in 1 %iger PFA-Lösung fixiert und im Durchflusszytometer analysiert oder für die Sortierung im FACS von Tetramer⁺ CD8^+ -T-Zellen in PBS, ergänzt mit 0,5 % HS, aufgenommen.

Kurz vor der Sortierung wurde PI zugesetzt, um die PI-negativen, lebendigen Zellen ein Fenster ("gate") gelegt und die CD8^+ Tetramer⁺-T-Zellen sortiert (MoFloTM High-Performance Cell Sorter am Institut für Molekulare Immunologie GSF, München oder FACSTTM Aria-Gerät am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Technische Universität, München).

In Tetramerdissoziationsversuchen wurde nach dem Abwaschen von ungebundenem Tetramer, das erneute Binden von sich ablösenden Tetramer-Molekülen durch die Zugabe von HLA-A2-spezifischen monoklonalen Ak im Überschuss verhindert. Der Ak erkennt HLA-A2-Moleküle unabhängig vom komplexierten Peptid. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots abgenommen, fixiert und im Durchflusszytometer auf die Intensität der Tetramerfärbung hin analysiert. Parallel zu den Tetramerfärbungen wurde der TZR-Komplex mit Hilfe von FITC-

konjugierten Anti-CD3-Ak gefärbt, da die Anzahl der TZR auf der Oberfläche die Tetramerfärbung beeinflussen kann.

3.4 Produktion von Einzel-Spezies-RNS

Die Produktion der Einzel-Spezies *ivt*RNS beinhaltet vier Schritte: Linearisierung des Plasmids, welches das cDNS („complementary“ DNS) -Insertion enthält, *in vitro* Transkription basierend auf der Promotersequenz und der cDNS-Vorlage („template“) im linearisierten Plasmid, Polyadenylierung der synthetisierten *ivt*RNS und die Aufreinigung der *ivt*RNS. Da erhebliche Mengen an cDNS-Vorlage, linearisierte Plasmid-DNS (pDNS), für die *in vitro* Transkriptionsreaktionen benötigt wurden, musste das Plasmid in kompetenten Bakterien amplifiziert werden.

3.4.1 Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNS

Um größere Mengen an pDNS zu erhalten, mussten kompetente Bakterien mit der erforderlichen pDNS transformiert und expandiert werden. Ein Aliquot der „One Shot TOP10F“ kompetenten Zellen wurde langsam auf Eis aufgetaut, ein kleines Volumen an pDNS hinzugefügt und vorsichtig mit den Bakterien gemischt. Die Zellen wurden 30 Min. auf Eis inkubiert, danach für exakt 30 Sek. auf 42°C erhitzt und schließlich 2 Min. auf Eis abgekühlt. SOC-Medium, das mit den kompetenten Zellen geliefert worden war, wurde zugesetzt und die transformierten Bakterienzellen auf LB-Medium-Agar-Platten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausgesät. Die Inkubation erfolgte ÜN bei 37°C. Da das Antibiotikum Zeocin lichtempfindlich ist und seine Aktivität bei hohen Salzkonzentrationen inhibiert wird, enthielten die Agarplatten, auf denen die mit pZeoSV2+/huTyr-pDNS transformierten Bakterienzellen ausgesät wurden, LB-Agar-Medium mit niedrigen Salzkonzentrationen und wurden im Dunkeln gelagert.

3.4.2 Selektion und Expansion der transformierten Bakterienzellen

Nur die Bakterienzellen, welche mit pDNS, kodierend für eine bestimmte Antibiotikaresistenz, transformiert worden waren, konnten auf Selektions-Platten trotz Antibiotikum wachsen und Kolonien bilden. Nach ÜN-Kultur wurden die Kolonien mit sterilen Zahnstochern gepickt. Jede Kolonie wurde mit 200-500 ml LB-Medium angeimpft, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt. Wenn die transformierten Bakterienzellen schon selektiert und eingefroren worden waren, wurden die eingefrorenen Röhrchen von -80°C auf Trockeneis überführt und zum Zweck

der Expansion ca. 5 µl der teilweise angetauten Bakteriensuspension in 200-500 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum überführt. Die Röhrchen wurden ÜN bei 37°C und 150 rpm inkubiert, um effizientes Wachstum der transformierten Bakterienzellen zu garantieren.

3.4.3 Einfrieren der transformierten Bakterienzellen

Bakterienzellen wurden am wenigsten durch den Einfrierprozess geschädigt, wenn das Einfriermedium 15 % Glycerin enthielt. Deshalb wurden 400 µl der ÜN-Bakterienkultur zu 84 µl autoklaviertem 87 %igem Glycerin hinzugefügt, mit dem Vortexer geschüttelt und zügig in flüssigem Stickstoff eingefroren. Gelagert wurden die sogenannten Gefrierstocks bei -80°C.

3.4.4 Plasmid-DNS-Extraktion aus transformierten Bakterienzellen

Nach der ÜN-Kultur wurde die Bakteriensuspension bei 5300×g und 4°C für 10 Min. zentrifugiert. Die Plasmid-DNS wurde mit dem „JETstar Plasmid Purification MAXI KIT“ nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.4.5 *In vitro* Transkription der Einzel-Spezies-cDNS in *ivt*RNA

Jedes Plasmid wurde mit dem entsprechenden Restriktionsenzym linearisiert, um eine geeignete Vorlage für die *in vitro* Transkription herzustellen. Da alle Plasmide einen T7-Promotor am 5'-Ende der cDNS, die das gewünschte Protein kodierte, enthielten, wurde die Transkription mit Hilfe der T7-RNS-Polymerase des mMESSAGING mMACHINE™ T7 Kits (Ambion) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Stabilität des RNS-Moleküls und damit die Möglichkeit, sie als Vorlage für die Translation in Protein zu verwenden, hängt von einer Cap-Struktur am 5'-Ende und einem Poly(A) -Schwanz am 3'-Ende ab. Die mRNS-Moleküle, die von Zellen produziert werden, besitzen immer einen Poly(A)-Schwanz. In der oben beschriebenen *in vitro* Transkriptionsreaktion wird jedoch nur das Cap-Analogon in die RNS eingebaut. Da der Poly(A) -Schwanz von keinem der hier verwendeten pDNS-Konstrukte kodiert wird, wurden die *ivt*RNS-Spezies im Nachhinein mit Hilfe eines „Poly(A) Tailing“ Kits (Ambion) nach Angaben des Herstellers polyadenyliert. Nach der *in vitro* Transkription und *ivt*RNS-Aufreinigung, wurden 60-70 µg pro 100 µl polyadenylierte *ivt*RNS gemessen.

3.4.6 Aufreinigung der *ivt*RNS

Die Aufreinigung der *ivt*RNS wurde nach *in vitro* Transkription und anschließender Polyadenylierung mittels RNeasy® Mini Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die polyadenylierte RNS-Lösung wurde auf eine RNeasy® Säule geladen. Die gebundene RNS wurde mit DEPC-Wasser eluiert und Aliquots bei -80°C gelagert.

3.4.7 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Das Maximum des Absorptionsspektrums von doppel- und einzelsträngigen Nukleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde deshalb mittels eines Spektralphotometers deren Extinktion (optische Dichte, OD) bei 260 nm in Quarzküvetten bestimmt und wie folgt errechnet:

$$OD_{260} (\text{dsDNS}) \times 50 \times \text{Verdünnung} = c_{(\text{dsDNS})} [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

$$OD_{260} (\text{ssDNS}) \times 33 \times \text{Verdünnung} = c_{(\text{ssDNS})} [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

$$OD_{260} (\text{RNS}) \times 40 \times \text{Verdünnung} = c_{(\text{RNS})} [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

Verunreinigungen in Nukleinsäurepräparationen stellen neben den Fällungs-Reagenzien hauptsächlich zelluläre Proteine dar. Da das Absorptionsmaximum von Proteinen bei einer Wellenlänge von 280 nm liegt, ergibt sich aus dem Quotienten der Extinktionen bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm ein Parameter für die Reinheit der Nukleinsäurelösung; üblicherweise liegt der OD_{260}/OD_{280} -Quotient für DNS-Präparationen bei 1,8 und für RNS-Präparationen bei 1,6.

3.5 Elektrophorese

3.5.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNS

DNS-Fragmente wurden mit Hilfe der Gelelektrophorese in 0,8-2 %igen Agarosegelen bei 5-10 V/cm aufgetrennt. Für die Separation kleiner Fragmente wurden höher prozentige Gele (bis 2 %) verwendet, für große Fragmente niedriger prozentige Gele.

Die Agarose wurde in dem entsprechenden Volumen 1xTAE-Puffer in der Mikrowelle aufgelöst und mit 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid versetzt. Für die Größenkontrolle der Produkte wurde eine 1kb-plus DNS-Leiter verwendet. Die Fragmentbanden wurden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und dokumentiert.

3.5.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNS

RNS-Fragmente wurden in 1 %igen Agarose-Gelen bei 5-10 V/cm aufgetrennt. Für die Herstellung des Gels, Laufpuffers und die RNS-Probe wurde nur DEPC-Wasser verwendet. Die Agarose wurde in dem entsprechenden Volumen 1xTBE-Puffer in der Mikrowelle aufgelöst und mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die RNS-Lösung wurde mit dem RNS-Auftragspuffer versetzt und um die Sekundärstruktur der RNS zu denaturieren bei 65°C für 10 Min. inkubiert. Als Größenstandard wurde eine 0,2-95 kb RNS-Leiter verwendet.

3.5.3 Gel-Extraktion

Um DNS/RNS-Fragmente aus dem Gel zu extrahieren, wurden die entsprechenden Fragmente nach der Elektrophorese ausgeschnitten und mit Hilfe des "QIAquick[®] Gel Extraction" Kits nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.5.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung der eluierten Produkte wurde kommerziell von der Firma Sequiserve in Vatterstetten durchgeführt.

3.6 Analyse des TZR-V $\alpha\beta$ -Repertoires

Das TZR-V $\alpha\beta$ -Repertoire der T-Zellen, die mit den *De-novo*-Induktions-Experimenten erhalten worden waren, wurde mit T-Zell-Rezeptor-Analysen untersucht. Hierfür wurden folgende Schritte durchgeführt: Isolierung der zellulären Gesamt-RNS, reverse Transkription der mRNS in cDNS, Amplifikation der TZRAV- und TZR BV-Gensegmente mit spezifischen Primern und Sequenzierung der PCR (poly chain reaction) -Produkte.

Verschiedene 5'-Primer repräsentieren die Gensegment-Familien der variablen (AV- bzw. BV) Regionen der humanen TZR α - bzw. β -Kette. In jedem Ansatz wurde einer der 34 5'-Primer (AV-Region spezifisch) mit einem im konstanten Bereich liegenden 3'-Primer (3'T-C) eingesetzt. So wurde ein für jede TZR α -Kette spezifisches PCR-Produkt zwischen 370 und 500 bp amplifiziert. Als interne Kontrolle wurde bei jeder Reaktion parallel ein 550 bp großes PCR-Produkt mittels zwei Primern, die in der konstanten Region der α -Kette liegen (P-5'ST und P-3'ST), vervielfältigt. Die TZR β -PCR-Produkte, die mittels spezifischer 5'-Primer für 35 BV-Regionen und dem konstanten 3'-Primer (P-3'CBII) amplifiziert wurden, waren zwischen 190

und 290 bp groß. Das Kontroll-PCR-Produkt (P-5'βST und P-3'βST) lag für die β-Kette bei 350 bp.

3.6.1 Isolierung von zellulärer Gesamt-RNS

Zelluläre Gesamt-RNS wurde aus T-Zellen mit Hilfe des RNS/DNS/Protein Isolierungs-Reagenz TRI Reagent[®] isoliert, das Phenol und Thiocyanat enthält. Mit bis zu 1×10^6 Zellen pro 200 µl Tri Reagent[®] wurde die Isolierung durchgeführt. Zuerst wurden durch 20-30 maliges Auf- und Abpipettieren die zellulären Plasmamembranen und Organellen aufgeschlossen, um ein homogenes Lysat herzustellen. Die darauf folgende Inkubation (10 Min. bei RT) führte zur Dissoziation der Nukleoprotein-Komplexe. Nach diesem Schritt konnte das Lysat entweder bei -80°C aufbewahrt oder die RNS-Isolierung direkt im Anschluss fortgesetzt werden. Bei niedrigen Zellzahlen wurden 10 µg Hefe tRNA („transfer“ RNS) zugesetzt, um eine bessere Ausbeute zu erhalten. Die Gesamt-RNS wurde extrahiert, indem zu dem homogenen Lysat 1/5 Volumen 1-Brom-3-Chlor-Propan hinzugefügt und 15 Sek. gevortext wurde. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei RT wurde die Suspension 15 Min. lang bei 12000xg und 4°C sedimentiert.

Hierbei bildeten sich drei Phasen: die Proteine enthaltene, organische Phase, die Interphase mit DNS und eine obere, farblose, wässrige Phase, welche die RNS enthielt. Die RNS-enthaltende Phase wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Präzipitation der RNS erfolgte mit einem Volumen Isopropanol, anschließender 10 minütiger Inkubation bei RT und Zentrifugation bei 12000xg für 10 Min bei 4°C. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurde das RNS-Sediment mit 0,5 ml eiskaltem 0,75 %igen Ethanol (in DEPC-Wasser) 8 Min. lang bei 12000xg und 4°C gewaschen. Anschließend wurde das RNS-Sediment 3-5 Min. luftgetrocknet und in 20 µl DEPC-Wasser aufgelöst. Isolierte und aufgereinigte RNS-Spezies wurden bei -80°C gelagert.

3.6.2 Reverse Transkription der isolierten RNS in cDNS

Reverse Transkription der zellulären Gesamt-mRNS in cDNS wurde mit Hilfe des „First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)“ nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Methode basiert auf der Fähigkeit der reversen Transkriptase des Vogel(„Avian“) - Myeloblastose-Virus (AMV), mRNS in Einzel-Strang-DNS zu transkribieren. Die erste Reaktion wird durch einen modifizierten oligo(dT) -Primer gestartet, der an den 3'-Poly(A) - Schwanz der mRNS-Spezies bindet. Wenn die reverse Transkriptase das 5'-Ende der mRNS erreicht hat, generiert die terminale Transferaseaktivität des Enzyms Dideoxy-

Terminationssequenzen. Die sogenannte “1st strand” cDNS kann dann als Vorlage in der PCR verwendet werden. Für die reverse Transkription wurde eine Mischung hergestellt, die pro Ansatz (20 µl) folgende Reagenzienmengen enthielt (Tabelle 3.1):

Tabelle 3.1 Zusammensetzung der Reagenzien für die reverse Transkription

2 µl	10x Reaktions-Puffer	1x
4 µl	25 mM MgCl ₂	5 mM
2 µl	dNTP-Mischung	1 mM
2 µl	Oligo-p(dT) ₁₅ -Primer	1,6 µg
1 µl	RNase-Inhibitor	50 U
0,8 µl	AMV Reverse Transkriptase	20 U
3,2 µl	steriles RNS-freies Wasser	variabel
5 µl	RNS	variabel (~0,5-1 µg der Gesamt-RNS)
20 µl	Gesamt-Volumen	

Der Ansatz wurde 10 Min. bei 25°C, danach 60 Min. bei 42°C inkubiert und zum Schluss für 5 Min. auf 99°C erhitzt, bevor der Ansatz auf Eis gestellt oder bei –20°C eingefroren wurde.

3.6.3 TZR-PCR zur Analyse von TZR-Sequenzen

Einzel-Strang cDNS, die mit Hilfe der reversen Transkription aus zellulärer Gesamt-RNS synthetisiert worden war, wurde mit Primer-Paaren für die TZRAV- und TZRBV-Gensegment-Familien in der PCR amplifiziert. Ein Primer-Paar band spezifisch an 5'- und 3'-Sequenzen, die in der konstanten Region des TZRs lagen. Das andere Primer-Paar bestand aus einem 3'-Primer, der ebenfalls in der konstanten Region band und einem variablen 5'-Primer, der spezifisch für die jeweiligen TZRAV- und TZRBV-Gensegment Familien war. Es existierten 34 verschiedene 5'-V α - und 35 variable 5'-V β -Primer (Sequenzen siehe Material 2.11, S. 30), die in parallelen Einzelreaktionen jeweils mit dem 3'-Primer (3`T-C bzw. P-3`C β II) kombiniert wurden.

Deshalb ergab sich nach PCR mit diesen zwei Primer-Paaren immer ein größeres Produkt, das als interne Kontrolle diente (TZRAV: 550 bp; TZRBV: 350 bp), und ein zusätzliches kürzeres Produkt nur, wenn der variable 5'-Primer binden konnte (TZRAV: 370-500 bp; TZRBV: 190-290 bp). Die Sequenzierung spezifischer PCR-Produkte wurde von der Firma Sequiserve in Vatterstetten durchgeführt. Für die Suche und den Abgleich der erhaltenen TZR-Sequenzen wurde die IMGT-Genom-Datenbank verwendet. Die Bedingungen für die PCR-Reaktion sind in Tabelle 3.2 gezeigt.

Tabelle 3.2 Zusammensetzung der Bestandteile der TZR-PCR-Reaktion und Reaktionsbedingungen

1,5 µl	cDNS
17,7 µl	HPLC-H ₂ O
4,0 µl	PCR-Puffer (10×)
0,8 µl	dNTP-Mischung
2,8 µl	5'-ST-Primer
2,8 µl	3'-ST-Primer
6,0 µl	5'-V-Primer
4,0 µl	3'-CT-Primer
0,4 µl	Taq-Polymerase
<hr/>	
40 µl	Gesamt
<p>Initiale Denaturierung bei 94°C für 2 Min., Amplifikation (35 Zyklen): 95°C für 30 Sek., 56°C für 30 Sek. und 72°C für 1 Min. Elongation bei 72°C für 10 Min. Kühlung bei 4°C.</p>	

3.6.4 TZR-PCR mit degenerierten V-Primern zur Analyse klonaler TZR-Sequenzen

Um die Analyse der TZRBV-Genumlagerungen individueller T-Zellen zu vereinfachen, wurden zwei generische Primer-Paare entwickelt (Zhou *et al.*, 2006), die 76 % bzw. 20 % der 65 V β -Region-Gensegmente abdeckten. Die Gensegmente V β 10.1 und V β 16.1 (Arden-Nomenklatur) konnten mit diesen Primern nicht amplifiziert werden. Deshalb mussten zwei zusätzliche Reaktionen mit für diese Gensegmente spezifischen Primern durchgeführt werden.

Tabelle 3.3 Zusammensetzung der Bestandteile der TZR-PCR-Reaktion und Reaktionsbedingungen modifiziert nach Zhou *et al.*, 2006

1,5 µl	cDNS
24,2 µl	HPLC-H ₂ O
4,0 µl	PCR-Puffer (10×)
1,0 µl	dNTP-Mischung
6,0 µl	5'-V-Primer-1 (bzw. V β -Primer für V β 10 und V β 16; 10 pmol/µl)
4,0 µl	3'-C-Primer (10 pmol/µl)
0,5 µl	Taq-Polymerase
<hr/>	
40 µl	Gesamt
<p>Initiale Denaturierung bei 94°C für 2 Min., Amplifikation (35 Zyklen): 94°C für 30 Sek., 50°C für 30 Sek. und 72°C für 30 Sek. Elongation bei 72°C für 10 Min. Kühlung bei 4°C.</p>	

3.7 Quantitative RT-PCR („real-time“-PCR)

Mit Hilfe der hoch sensitiven, quantitativen RT-PCR-Methode kann im LightCyclerTM-System die Ausgangsmenge an DNS einer Probe quantitativ bestimmt werden. Das Prinzip der Methode basiert darauf, dass die Zyklenzahl, nach der die PCR-Reaktion in den linear-logarithmischen Bereich eintritt (d.h. näherungsweise Verdopplung der Amplifikatmenge nach jedem Zyklus), abhängig ist von der eingesetzten DNS-Ausgangsmenge. Je größer die Ausgangsmenge, desto früher geht die PCR-Reaktion in den logarithmisch-linearen Bereich über (niedrige Zyklenzahl). Die Detektion von Signalen (PCR-Produktmenge) im RT-PCR-System beruht auf der Messung der Fluoreszenz von SYBR Green I, einem Farbstoff, der nur dann Licht emittiert, wenn er in dsDNS eingebaut wurde. Jeder Zyklus beinhaltet die Denaturierung des cDNS und Einbau des SYBR Green-Farbstoffs in den Doppelstrang während der DNS-Synthese. Die Fluoreszenz wurde nach jedem PCR-Zyklus in Echtzeit („real-time“) gemessen. Die Menge an eingebautem SYBR-Green ist proportional zur Amplifikatmenge. Nach dem PCR-Lauf wird von der LightCycler[®] Software (Version 4.05) eine typische PCR-Kurve für jede gemessene Kurve errechnet.

Einstellungen am LightCycler[®]-Gerät (siehe Tabelle 3.4) und Zusammensetzung der PCR-Reaktions-Mischungen hingen von den verwendeten Primer-Paaren ab. Die 20 µl eines Reaktionsansatzes setzten sich aus 2 µl cDNS aus T-Zellen, 2 µl der 5`- und 3`-Primer-Lösung, 4 µl einer Lösung aus SYBR Green I Fluoreszenz-Farbstoff, Puffer, Enzym und MgCl₂ sowie 12 µl sterilem HPLC-H₂O zusammen. Alle genannten Bestandteile, außer cDNS und Primer, waren im „LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I Kit“ (Roche) enthalten. Für die RT-PCR von Bcl-x_L wurden die Primer des LightCycler[®] - Primer Set für Bcl-x_L (Search LC) verwendet. Die Lösungen, die hTERT-Primer, MgCl₂ und humanen Telomerase Standard enthielten, waren Teil des LightCycler[®] „Telo TAGGGhTERT Quantification Kit“ (Roche). hTERT wurde mit diesem Kit auf RNS-Ebene nachgewiesen. Die Zusammensetzung dieses Kits erlaubte eine reverse Transkription vor dem eigentlichen RT-PCR-Lauf ohne Unterbrechung in einem Ansatz (Einstellungen nach Angaben des Herstellers).

Sequenzen der Primer und die exakte Zusammensetzung der Lösung wurden von den Herstellern nicht angegeben. Die Primer-Paare für Bcl-2 und 18s rRNS wurden von MWG Biotech in Ebersberg hergestellt. Die Arbeitslösungen enthielten 10 pmol/µl.

Tabelle 3.4 LightCycler® Einstellungen am Gerät für einen typischen RT-PCR-Lauf

	Zyklen	Analyse Modus	Temperatur	Temp. trans. Rate	Dauer	Aquisition Modus
Denaturierung	1	“none”	95°C	20°C/Sek.	600 Sek.	“none”
Amplifikation	40	Quantifizierung	95°C (Denaturierung)	20°C/Sek.	1 Sek.	“none”
			60°C (Primeranlagerung)	20°C/Sek.	10 Sek.	“none”
			72°C (Elongation)	20°C/Sek.	25 Sek.*	“single”
Schmelzen	1	Schmelzkurven	95°C	20°C/Sek.	0 Sek.	“none”
			65°C	20°C/Sek.	15 Sek.	“none”
			95°C	0.1°C/Sek.	0 Sek.	“continuous”
Kühlung	1	“none”	40°C	20°C/Sek.	30 Sek.	“none”

*hTERT 10 Sek.

Die Schmelzkurven, die von der LightCycler® Software errechnet wurden, wurden zur Kontrolle der Spezifität der verwendeten Primer verwendet. Jeder Scheitelpunkt der Schmelzkurve ist spezifisch für ein PCR-Produkt einer bestimmten Größe. Mehrere Scheitelpunkte einer PCR-Kurve zeigen eine Amplifikation irrelevanter Sequenzen neben dem eigentlichen PCR-Produkt an und sind für eine zuverlässige Quantifizierung des PCR-Produktes nicht brauchbar. Mit allen in dieser Arbeit verwendeten Primern wurde allerdings nur ein Scheitelpunkt pro Schmelzkurve beobachtet, was zudem eine hohe Primer-Spezifität bestätigte.

Die Quantifizierung der DNS erfolgte ebenfalls mit Hilfe der LightCycler® Software. Um die Ausgangsmengen an DNS in den verschiedenen Proben relativ zueinander zu vergleichen, wird mit Hilfe der sogenannten Kreuzungslinie ein bestimmter Fluoreszenzwert festgelegt. Diese Linie schneidet alle zu vergleichenden PCR-Kurven in ihrer logarithmischen Anstiegsphase und resultiert für alle Kurven in einem sogenannten Kreuzungspunkt („crossing point“, CP-Wert), der die Zyklenzahl für einen bestimmten Fluoreszenzwert aller Kurven angibt (siehe Abbildung 3.1). Je höher die Zyklenzahl, desto niedriger die Menge an Ausgangs-DNS. Die in der PCR eingesetzte cDNS-Menge aller Proben wurde immer mit Hilfe eines Haushaltsgens (18S rRNA) normiert.

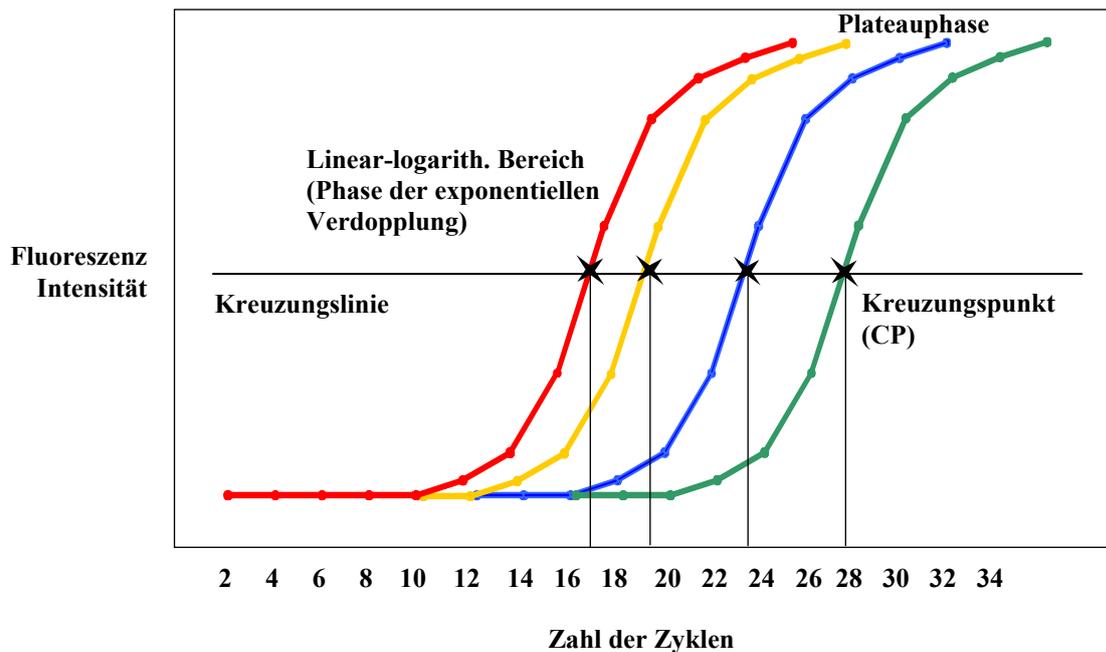


Abbildung 3.1: RT-PCR-Kurven. Das LightCycler[®]-Gerät misst die Fluoreszenzintensität jeder Probe am Ende jedes Zyklus während des PCR-Laufes in Echtzeit (“real-time”). Die Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur DNS-Menge des PCR-Produkts, da das emittierte Licht des während der DNS-Synthese eingebauten SYBR Green I Farbstoffes detektiert wird. Die LightCycler[®] Software berechnet für jede Probe eine individuelle Kurve. Ein exakter quantitativer Vergleich verschiedener Proben ist nur im linear-logarithmischen Bereich der Kurven möglich. In der Plateauphase bleibt die Amplifikatmenge konstant, da nun ein Überschuss an Amplifikaten vorliegt und Oligonukleotide, sowie Taq-Polymerase nahezu verbraucht sind. Mit Hilfe der LightCycler[®] Software wird eine Kreuzungslinie errechnet, die jede Kurve in diesem Bereich schneidet (Kreuzungspunkt, CP). Die Zyklenzahl, bei der die Fluoreszenz diesen Wert erreicht, entspricht dem Kreuzungspunkt (Abbildung aus Javorovic, 2004).

3.8 RNS-Transfektion von DZ mittels Elektroporation

Die zelluläre Plasmamembran stellt die lebensnotwendigen Funktionen der Zelle sicher, indem sie den Bereich innerhalb der Zelle von der externen Umwelt trennt. Die Membranen bestehen hauptsächlich aus amphiphilen Lipiden, die sich zu einer isolierenden Lipiddoppelschicht zusammenlagern. Immature DZ sind in der Lage verschiedene Strukturen von kleinen Molekülen bis zu apoptotischen Körpern, auch RNS, aus ihrer Umgebung über Pinozytose und Endozytose aufzunehmen. Obwohl gezeigt werden konnte, dass einfache Koinkubation von DZ mit RNS zur Aktivierung von T-Zellen führte (Cella *et al.*, 1999), hat sich herausgestellt, dass „aggressivere“ Methoden, wie die Elektroporation noch besser geeignet waren. Die Elektroporation induziert durch kurze elektrische Pulse reversible Permeabilität der Plasmamembranen. Es kommt zur Bildung hydrophiler Poren, da sich die Lipide in der Lipiddoppelschicht anders orientieren. Der genaue molekulare Mechanismus dieses Phänomens ist noch nicht geklärt. Die Anzahl der Poren und ihr Durchmesser nehmen mit Stärke und Dauer des elektrischen Pulses zu. Kleine Moleküle

diffundieren durch die Poren ins Zytoplasma der Zelle, größere Moleküle, wie Nukleinsäuren, gelangen durch elektrophoretische Kräfte ins Zellinnere.

Zuerst wurden $2\text{-}3 \times 10^6$ DZ in mindestens 170 μl OptiMEM I Medium resuspendiert, in eine Elektroporationsküvette (0,4 cm) überführt und etwa 3 Min. auf Eis inkubiert. Das Kühlen der Suspension vor der Elektroporation war von Vorteil, da der zelluläre Stoffwechsel erniedrigt wurde. Auch wurde so ein Überhitzen verhindert. Außerdem wurden Schäden, die durch den elektrischen Schock und von Molekülen toter Zellen ausgelöst wurden, minimiert.

Schließlich wurde die RNS in einem Volumen bis zu 100 μl zugegeben, so dass das Gesamtvolumen der Suspension höchstens 270 μl betrug. Die Suspension wurde kurz durch Pipettieren gemischt und zügig elektroporiert. Die Elektroporation wurde mit dem Elektroporator *Gene Pulser Xcell™* bei 250 V und 150 μF nach dem exponentiellen Protokoll durchgeführt. Sofort nach der Elektroporation wurden die Zellen in vorgewärmtes Medium für DZ transferiert. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert und in Versuche eingesetzt.

3.9 Funktionelle Versuche

In funktionellen Versuchen wurden entweder RNS-transfizierte DZ, Tumorzelllinien oder Peptid-beladene T2-Zellen als Stimulationszellen eingesetzt. Die Effektorzellen (T-Zellen) wurden 8-14 Tage nach Restimulation verwendet.

3.9.1 Exogene Beladung von T2-Zellen mit Peptiden

Für die exogene Peptid-Beladung wurden 1×10^6 T2-Zellen mit titrierten Mengen (10^{-5} M bis 10^{-10} M) an HLA-A*0201-restringiertem YMD-, YMN- oder Flu-Peptid (Tyrosinase₃₆₉₋₃₇₇: YMDGTMSQV bzw. YMNGTMSQV, Influenza Matrix Protein₅₈₋₆₆: GILGFVTL) zusammen mit jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$ human β_2 -Microglobulin inkubiert. Alle 20 Min. wurden die Zellsuspensionen aufgeschüttelt. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurde die Zellsuspension einmal gewaschen, um nicht gebundene Peptide zu entfernen. Die Peptid-beladenen T2-Zellen wurden sowohl in IFN- γ -Freisetzungs-Versuchen als auch in ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuchen verwendet.

3.9.2 Koinkubation von T-Zellen mit Stimulationszellen

Sowohl 12 h als auch 24 h nach Elektroporation wurden 100 μl der T-Zellsuspension (2×10^4 Zellen in dem jeweiligen T-Zellmedium) zu 100 μl der transfizierten DZ-Suspension (4×10^4

Zellen in DZ-Medium) hinzugefügt, so dass das Endvolumen in einem Loch einer 96-Loch-Platte 200 µl betrug und sich ein Verhältnis von Stimulations- zu Effektorzellen von 2:1 ergab. Für die Koinkubation von T-Zellen mit Melanomzellen bzw. Peptid-beladenen T2-Zellen wurden geringere Zellzahlen eingesetzt. 2×10^3 T-Zellen wurden mit 1×10^4 Stimulationszellen koinkubiert. Dadurch ergab sich ein Verhältnis von Stimulations- zu Effektorzellen von 5:1. Nach 24 stündiger Koinkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurden 150 µl des Zellkulturüberstandes geerntet und bei -20°C gelagert. Die Überstände wurden in den ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”) oder in Multiplex-Analysen zur Quantifizierung von löslichen Proteinen eingesetzt.

3.9.3 IFN- γ -ELISA

Die IFN- γ -Freisetzung der Effektorzellen wurde in 50 µl des Zellkulturüberstandes im ELISA mit Hilfe des “OptEIA™ Human IFN- γ Set” nach Angaben des Herstellers bestimmt.

Die Methode beruht darauf, dass das zu messende lösliche Protein mit Hilfe eines spezifischen Ak, der an einen festen Untergrund gebunden vorliegt, eingefangen wird. Das nun gebundene Protein kann dann von einem zweiten spezifischen markierten Ak detektiert werden.

Eine 96-Loch-Flachboden-Platte wurde mit dem entsprechenden Fänger-Ak aus der Maus, verdünnt in Carbonatpuffer, beschichtet und danach mit 1 %igem Milchpulver, gelöst in PBS, abgedeckt. Mit dem Medium, das für die vorangegangene Koinkubation verwendet wurde, wurde der im Kit enthaltene IFN- γ -Standard mit bekannter Konzentration seriell verdünnt. Nachdem die IFN- γ -Proteine der Zellüberstände oder Standard-Verdünnungen an die Fänger-Ak auf der Platte gebunden hatten, wurde ein biotinylierter Maus-Anti-IFN- γ -Detektions-Ak zusammen mit Avidin-konjugierter Rettich-Peroxidase zugesetzt. Um diese Komplexe, bestehend aus Fänger-Ak, IFN- γ , biotinyliertem Detektions-Ak und Avidin-konjugierte Rettich-Peroxidase sichtbar zu machen, wurde H₂O₂ (ein Substrat für Peroxidase) in Kombination mit Tetramethylbenzidin (Substrat Reagenz A und B) zugesetzt. Die enzymatische Reaktion, die in der Bildung eines blauen Farbstoffes zu sehen war, wurde mit 1 M Phosphorsäure gestoppt. Dadurch wurde die Farbe der Lösung gelb. Die Farbintensität war direkt proportional zu der Substrat-Menge, die umgesetzt wurde und somit indirekt proportional zur Menge an gebundenem IFN- γ . Die Extinktion wurde bei 450 nm gemessen. Die IFN- γ -Konzentrationen wurden mit Hilfe der Standard-Kurven berechnet, die auf den bekannten Konzentrationen des IFN- γ -Standards basierten. Alle gezeigten Daten sind Mittelwerte mit dazugehörigen Standardabweichungen, die sich aus Koinkubationsduplikaten oder -triplikaten ergaben.

3.9.4 Multiplex-Verfahren zur Quantifizierung von löslichen Proteinen

Mit Hilfe des Multiplex-Verfahrens können simultan mehrere Zytokine und Chemokine im Serum oder Überstand einer Zellsuspension gemessen werden. Spezifische Ak sind an Polystyren-Kügelchen gebunden, die in verschiedenen Verhältnissen mit zwei verschiedenen Fluorophoren beladen werden können. Jeweils 10 Farbabstufungen stehen pro Fluorophor zur Verfügung, so dass es 10^2 mögliche Farbkodierungen für die Kügelchen gibt, theoretisch also 100 verschiedene Zytokine gleichzeitig in dem Kulturüberstand oder Serum gemessen werden können. Prinzipiell ähnelt das Multiplex-Verfahren dem ELISA, mit dem Unterschied, dass durch die Verwendung von fluoreszierenden Kügelchen als feste Phase anstelle von beschichteten Löchern einer 96-Loch-Platte bis zu 100 verschiedene Kügelchen gemischt und gleichzeitig 100 verschiedene lösliche Proteine in nur 50 µl Analysenmaterial quantifiziert werden können.

In einem ersten Schritt bindet der monoklonale Fänger-Ak, der mit einem 5,5 µm großen Kügelchen bestimmter Eigenfluoreszenz konjugiert vorliegt, an ein bestimmtes Zytokin. In einem weiteren Schritt wird ein biotinylierter Ak, der ein anderes Epitop auf diesem Zytokin erkennt, zugesetzt. Diese Bindung kann dann mit Hilfe von PE-konjugiertem Streptavidin quantifiziert werden. Die verschiedenen Fluoreszenzen können von einer Photozelle im Messgerät ermittelt werden. Die Eigenfluoreszenz des Kügelchens gibt Aufschluss über die Art des Zytokins, die Intensität der zweiten Fluoreszenz (PE) über die Menge des sezernierten Zytokins. Im Reagenziensatz enthaltene Zytokin-Standard-Mischungen mit definierten Konzentrationen ermöglichen eine Quantifizierung jedes Analyten über seine individuelle Standardkurve.

Die Kulturüberstände der Koinkubationen von T-Zellen mit Targetzellen, die in das Multiplex-Verfahren eingesetzt werden sollten, wurden, wie in Kapitel 3.9.2 beschrieben, erhalten und bis zur Zytokinanalyse bei -20 °C aufbewahrt. Die verschiedenen Kits, die für die Analyse der Zytokine verwendet wurden, wurden kombiniert in einem Multiplex-Verfahren verwendet und sind in Tabelle 3.5 aufgeführt. Die Vorbereitung und Messung der Tests erfolgte nach dem Herstellerprotokoll.

Als Negativkontrollen wurden T-Zell-Medium und Zielzellmedium verwendet, um sicherzustellen, dass diese Zellen alleine keine der analysierten Zytokine sezerniert hatten. Die Proben wurden zusammen mit den Standards und der entsprechenden Verdünnungsreihe auf derselben 96-Loch-Analysenplatte der Fa. Bio-Rad im Bio-Plex-Arrayreader des Luminex Bio-Plex™ Systems vermessen. Der Kalibrierungsbereich für alle Zytokine lag zwischen 32.000 und

1,95 pg/ml. Die Konzentrationen der Analyten wurden automatisch von der BioPlex-Manager Software (Version 4.0) nach 5-Parameter logistischen Regressions-Algorithmen berechnet.

Tabelle 3.5 Verwendete Kits und gemessene Zytokine

Kits	Gemessene Zytokine
Bio-Plex™ Th1/Th2 Cytokine 9-Plex Panel	IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12(p70), IL-13, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α
Bio-Plex™ Cytokine Single Plex Panel	Jeweils für IL-6, IL-8 und MIP-1 β

3.9.5 ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuch

Die zytotoxischen Aktivitäten der erhaltenen Tetramer⁺CD8⁺ T-Zelllinien und T-Zellklone wurden in 4 h Standard ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuchen untersucht. Sowohl Melanomzellen als auch Peptid-beladene T2-Zellen wurden als Zielzellen, auch Targetzellen genannt, verwendet. 10⁶ Targetzellen wurden mit radioaktiv markiertem ⁵¹Cr (200 μ Ci) 1-1,5 h lang inkubiert. In dieser Zeit wurde das ⁵¹Cr von den Zielzellen inkorporiert. Um die Effizienz der Effektorzell-vermittelten Lyse bestimmen zu können, wurden die T-Zellen seriell verdünnt ausgesät und mit 10³ ⁵¹Cr-markierten Zielzellen/Loch einer 96-Loch-Spitzboden-Platte ausgesät und in 100 μ l RPMI III-Medium kokultiviert. Diese serielle Verdünnung der T-Zellen ergab unterschiedliche Effektor- zu Targetzell-Verhältnisse (E:T).

Für die Affinitätsbestimmung von T-Zellklonen wurde ein konstantes T-Zell- zu Peptid-beladenen T2-Zell-Verhältnis von 10:1 gewählt. Nach 4 h Koinkubation bei 37 °C wurden 50 μ l des Überstandes geerntet und die freigesetzte Radioaktivität gemessen. Der Prozentsatz der spezifischen Lyse wurde folgendermaßen berechnet: 100 x (experimentelle ⁵¹Cr-Freisetzung – spontane ⁵¹Cr-Freisetzung)/(maximale ⁵¹Cr-Freisetzung – spontane ⁵¹Cr-Freisetzung). Die spontane ⁵¹Cr-Freisetzung ergab sich aus der Koinkubation der Zielzellen in Abwesenheit der Effektorzellen und war generell niedriger als 14 %. Die Skalierung der Werte der relativen Lyse erfolgte über einen einheitlichen Umrechnungsfaktor, der so bemessen wurde, dass sich für den höchsten Wert der spezifischen Lyse die relative Lyse zu 100 % ergibt.

3.10 HLA-Klasse-I-Typisierung

Die HLA-Klasse-I-Allele (HLA-A, -B und -C) der Blutspender, deren Zellen für die *De-novo*-Induktion von T-Zellen verwendet wurden, sollten typisiert werden. Die HLA-Klasse-I-Typisierung erfolgte mit Hilfe des LABType™ SSO-Verfahrens. Dabei handelt es sich um eine sogenannte reverse SSO DNS-Typisierungsmethode, bei der Sequenz-spezifische Oligonukleotid-Sonden (SSO) verwendet werden, die an Polymerkügelchen (Mikrosphären) gebunden sind. Die zu untersuchende genomische DNS wurde hierfür isoliert und mittels spezifischen, biotinylierten Primern die variablen HLA-A, -B und -C-Regionen in PCR amplifiziert. Nach Denaturierung und Neutralisierung wurden die biotinylierten PCR-Produkte mit den jeweiligen komplementären SSO hybridisiert, die an farbkodierte Mikrosphären gekoppelt waren. Nicht hybridisierte PCR-Produkte wurden durch stringentes Waschen entfernt. Danach wurde die hybridisierte DNS mit R-Phycoerythrin-konjugiertem Streptavidin (SAPE) markiert, das an die biotinylierten SSO band. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte an einem Durchflussanalysegerät (LABScan™100), wobei die Fluoreszenzintensität eine Aussage über das Maß der Hybridisierung gab.

Genomische DNS aus Spender PBMC wurde mit Hilfe des „Qamp DNA Blood® Mini Kits“ unter Verwendung des „Blood and Body fluid Spin“ Protokolls nach Angaben des Herstellers isoliert. Die DNS wurde in DEPC-Wasser eluiert und in Aliquots bei -20°C gelagert. 20 ng/µl genomische DNS wurde pro PCR-Ansatz eingesetzt.

In Tabelle 3.6 ist die Zusammensetzung der PCR für die Amplifizierung der variablen HLA-A, -B und -C-Regionen gezeigt.

Tabelle 3.6 PCR-Ansatz für die HLA-Klasse-I-Typisierung

13,8 µl	DMIX
4 µl	Amplifikations-Primer Mischung*
0,2 µl	Taq-Polymerase
2 µl	genomische DNS (20 ng/µl)
<hr/>	
20 µl	Gesamt-Volumen

* jeweils spezifisch für die variable HLA-A, -B bzw. -C-Region

Die Amplifikation wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tabelle 3.7 PCR-Bedingungen

	Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	96°C	3 Min.
Amplifikation	5	96°C (Denaturierung)	20 Sek.
		60°C (Primeranlagerung)	20 Sek.
		72°C (Elongation)	20 Sek.
Amplifikation	30	96°C (Denaturierung)	10 Sek.
		60°C (Primeranlagerung)	15 Sek.
		72°C (Elongation)	20 Sek.
Elongation	1	72°C	10 Min.
Kühlung	1	4°C	Pause

Die erfolgreiche Amplifikation wurde auf einem 1,5 %igem Agarosegel überprüft und dokumentiert. Die erhaltenen PCR-Produkte konnten bis zu einem Monat bei -20°C gelagert werden.

Die Denaturierung erfolgte durch Zugabe von 2,5 µl Denaturierungspuffer zu 5 µl amplifizierter DNS auf 96-Loch-PCR-Platten. Die Proben wurden 10 Min. bei RT unter Schütteln inkubiert. Danach wurden 5 µl Neutralisierungspuffer zugegeben (Farbumschlag von violett nach blassgelb) und auf Eis weitergearbeitet.

Direkt vor der Hybridisierung wurden 4 µl der Mikrosphärenmischung (Bead-Mischung) mit 34 µl Hybridisierungspuffer verdünnt, gut gemischt und zu den Proben gegeben. Abschließend erfolgte die Hybridisierung bei 60°C für 15 Min. im vorgeheizten PCR-Block. Danach wurden durch stringentes Waschen die nicht hybridisierten PCR-Produkte entfernt (dreimal: Zugabe des Waschpuffers; Zentrifugation bei 840xg, 5 Min.; Verwerfen des Überstandes).

Anschließend wurden jeweils 50 µl 1 x SAPE-Lösung der Probe zugesetzt und weitere 5 Min. bei 60°C im PCR-Block inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 100 µl Waschpuffer wurde die Probe vorsichtig in 70 µl Waschpuffer resuspendiert und in ein Loch einer 96-Loch-Spitzboden-Platte überführt. Bis zur Messung konnte die Platte maximal 24 h bei 4°C im Dunkeln gelagert werden. Direkt vor der Messung wurden die Proben aufgeschüttelt und am LABScan™100 mit der Software 100 IS 2.3 von OneLambda analysiert. Mit Hilfe der HLA-Visual (Version 1.1.1) Software konnten die erhaltenen Daten ausgewertet werden.

4 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war, HLA-A2-allorestingierte Peptid-spezifische CD8⁺-T-Zellen zu isolieren, die T-Zell-Rezeptoren (TZR) mit hoher Affinität gegen spezifische Liganden auf Tumorzellen tragen. Diese T-Zellen sollten in der Lage sein, Tumorzellen zu töten. In den folgenden Kapiteln wird Schritt für Schritt ein Kultursystem beschrieben, mit dessen Hilfe solche T-Zellen generiert werden sollten.

Zwei Ansätze wurden dazu verglichen, um folgende Hypothese zu untersuchen: Tumorzellen präsentieren oft Selbst-Peptide, die von überexprimierten Proteinen stammen und über Selbst-MHC-Moleküle präsentiert werden (Selbst-MHC + Selbst-Peptid). T-Zellen, die Rezeptoren mit hoher Affinität für solche Selbst-Liganden besitzen, werden während ihrer Entwicklung im Thymus durch den Prozess der negativen Selektion eliminiert (siehe Abbildung 4.1). Durch diesen Mechanismus sollen Reaktionen gegen Eigengewebe verhindert werden. Nach diesem Selektionsprozess sind die T-Zellen mit der Fähigkeit zur Erkennung von Selbst-MHC + Selbst-Peptid-Liganden aus dem peripheren T-Zellrepertoire überwiegend entfernt. Deshalb ist die Bindungsstärke der T-Zell-Rezeptoren für Tumor-assoziierte Antigene (TAA), präsentiert über Selbst-MHC-Moleküle (Selbst-MHC + Selbst-Peptid), in T-Zellen, die die negative Selektion überlebt haben, normalerweise niedrig. Das T-Zellrepertoire enthält aber noch T-Zellen mit Rezeptoren, die in der Lage sind, Selbst-MHC + Fremd-Peptid-Liganden (z.B. virale Peptide, die über Selbst-MHC-Moleküle präsentiert werden) und Fremd-MHC + Selbst-Peptid-Liganden (z.B. Alloerkennung bei der Transplantatabstoßung) zu binden. Um trotzdem CD8⁺-T-Zellen mit hoher Avidität gegen körpereigene Tumor-assoziierte Peptide zu erhalten, sollte ein nicht-selektiertes Repertoire von T-Zellen abgegriffen werden, indem die Tumor-assoziierten Peptide über fremde, sogenannte allogene MHC-Moleküle den T-Zellen präsentiert werden (Fremd-MHC + Selbst-Peptid).

Erwartungsgemäß sollten deshalb einerseits T-Zellen generiert werden, die niedrig affine TZR besitzen, wenn das ausgesuchte Tumor-assoziierte Peptid über Selbst-MHC-Moleküle präsentiert wird (Selbst-MHC + Selbst-Peptid). Andererseits sollte es auch möglich sein, T-Zellen mit TZR hoher Affinität zu isolieren, wenn fremde MHC-Moleküle für die Peptid-Präsentation verwendet werden (Fremd-MHC + Selbst-Peptid). Diese beiden Ansätze werden im Folgenden verglichen.

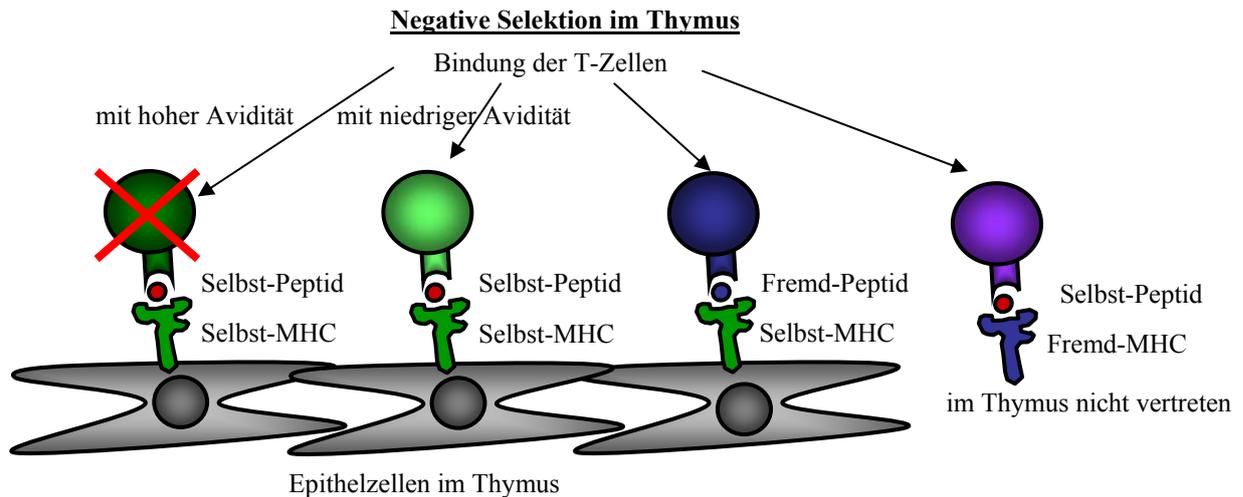


Abbildung 4.1 Negative Selektion von T-Zellen im Thymus. Während ihrer Entwicklung im Thymus werden T-Zellen eliminiert, die körpereigene Antigene, präsentiert über Selbst-MHC-Moleküle (Selbst-MHC + Selbst-Peptid), auf Epithelzellen im Thymus mit hoher Avidität erkennen. Dadurch sollen Reaktionen gegen Eigengewebe verhindert werden. Nicht selektiert werden T-Zellen mit niedriger Avidität, T-Zellen, die fremde Peptide, z.B. viralen Ursprungs, auf Selbst-MHC-Molekülen binden (Selbst-MHC + Fremd-Peptid) und T-Zellen, die Fremd-MHC + Selbst-Peptid erkennen. Fremd-MHC-Moleküle sind im Thymus nicht vertreten.

4.1 Generierung von RNS-beladenen Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) für die *De-novo*-Induktion von Immunantworten in naiven T-Zellen

4.1.1 Generierung von Dendritischen Zellen (DZ)

Um Tumor-spezifische T-Zellen hoher Avidität zu erhalten, mussten zuerst geeignete Antigen-präsentierende Zellen (APZ) generiert werden. Professionelle APZ sind beispielsweise Dendritische Zellen (DZ). Für die Generierung von DZ wurden Monozyten aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) durch Plastik-Adhärenz isoliert. Nach Zugabe der Zytokine IL-4 und GM-CSF differenzierten die Monozyten innerhalb von 6 Tagen zu immaturren DZ (iDZ). Eine Maturierung der DZ erfolgte durch Kultivierung mit den Zytokinen TNF- α , IL-1 β , IL-6 und PGE₂ für 24 bis 48 h. Immature DZ nehmen verstärkt Antigene mittels Phagozytose und Makropinozytose auf, exprimieren allerdings keine kostimulatorischen Moleküle. Mature DZ (mDZ) hingegen sind auf die Präsentation von prozessierten Antigenen spezialisiert und nehmen keine Antigene mehr auf. Sie stellen verschiedene kostimulatorische Signale zur Verfügung und können sogenannte naive T-Zellen aktivieren, die noch nie ihrem Antigen begegnet sind.

Die Differenzierung von Antigen-aufnehmenden, iDZ zu Antigen-präsentierenden, mDZ wurde mit Hilfe von Änderungen in der Expression von einigen Oberflächenmolekülen verfolgt. Zum typischen Phänotyp der *in vitro* generierten DZ zählen folgende Oberflächenmarker: CD14

(exprimiert auf Monozyten, nicht auf DZ; Rezeptor für den Komplex von LPS und LPS-Bindeprotein), CD1a (Rolle bei der Präsentation von Lipid-Antigenen), CD206 (Mannose Rezeptor), CD40 (kostimulatorisches Molekül), CD25 (α -Kette des Rezeptors für IL-2), CD80 (auch B7.1, kostimulatorisches Molekül), CD83 (Marker für die DZ-Maturierung, Funktion unbekannt), CD86 (auch B7.2, kostimulatorisches Molekül), HLA-DR (Antigen-präsentierendes Molekül der MHC-Klasse-II) und CCR7 (Chemokin-Rezeptor, wichtig für die Migration der DZ in Lymphknoten).

Der Phänotyp der iDZ und mDZ wurde nach Färbung mit Antikörpern spezifisch für die oben genannten Oberflächenmarker nach 6 bzw. 8 Tagen im FACS™ bestimmt (siehe Abbildung 4.2). Der prozentuale Anteil an positiven Zellen zeigt, wie viele Zellen das Oberflächenmolekül exprimieren. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) gibt Information über die relative Anzahl der exprimierten Moleküle pro Zelle. DZ zeigten generell keine CD14 Expression. Der Oberflächenmarker CD1a wurde nach Zugabe der Maturierungszytokine herunterreguliert. CD25, CD40, CD83, CD86, CD206 und HLA-DR wurden sowohl von iDZ als auch von mDZ exprimiert. Diese Oberflächenmarker wurden in Folge der Maturierung hochreguliert. Die CD80- und CCR7-Expression war in diesem Fall gleich bleibend. Oft wurde in weiteren Experimenten auch eine Hochregulation von CD80 und CCR7 auf mDZ beobachtet. Da die DZ aus frischem Blut verschiedener Spender generiert wurden, waren geringe spenderabhängige Unterschiede in der Expression einiger Oberflächenmarker zu sehen.

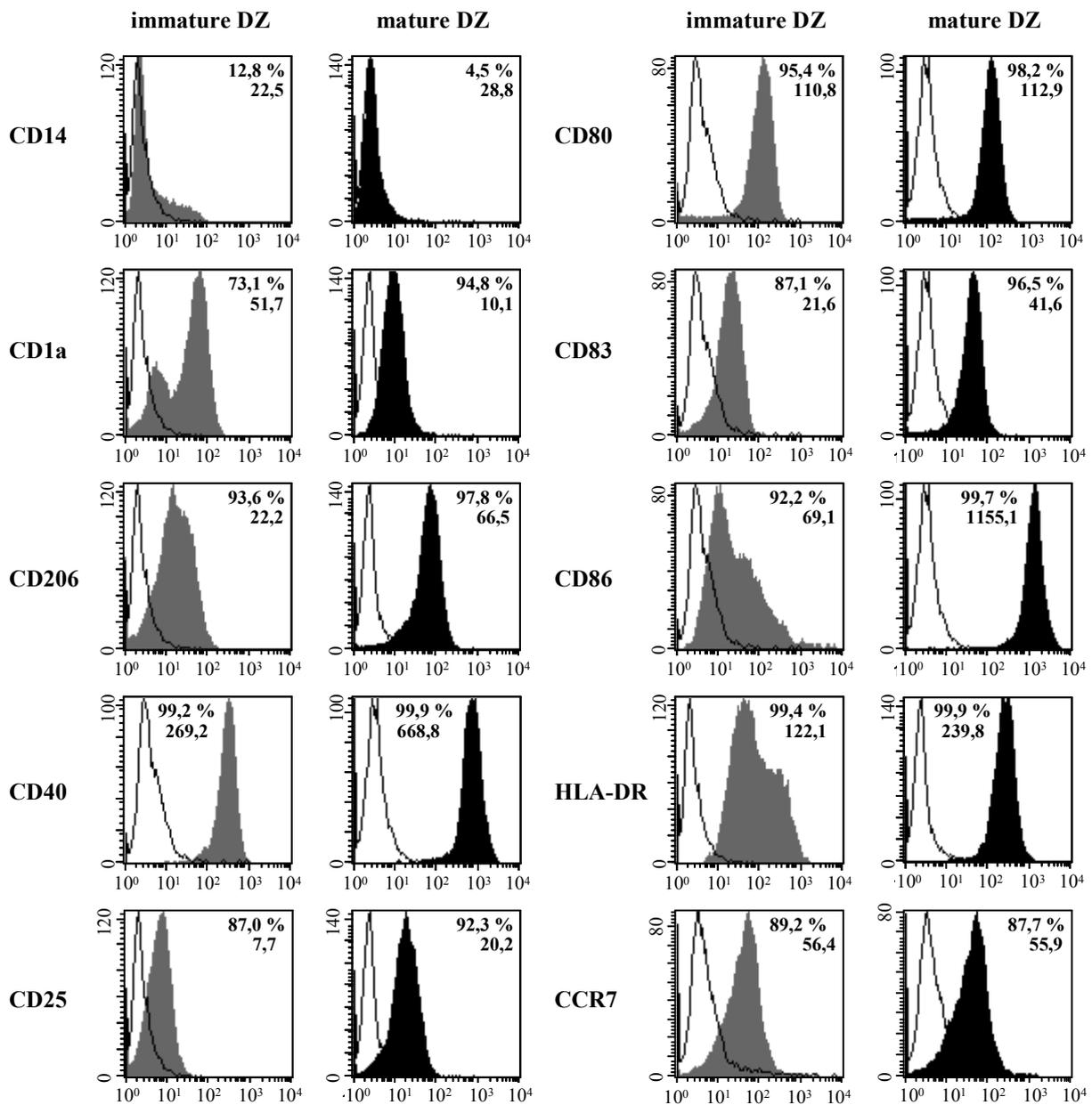


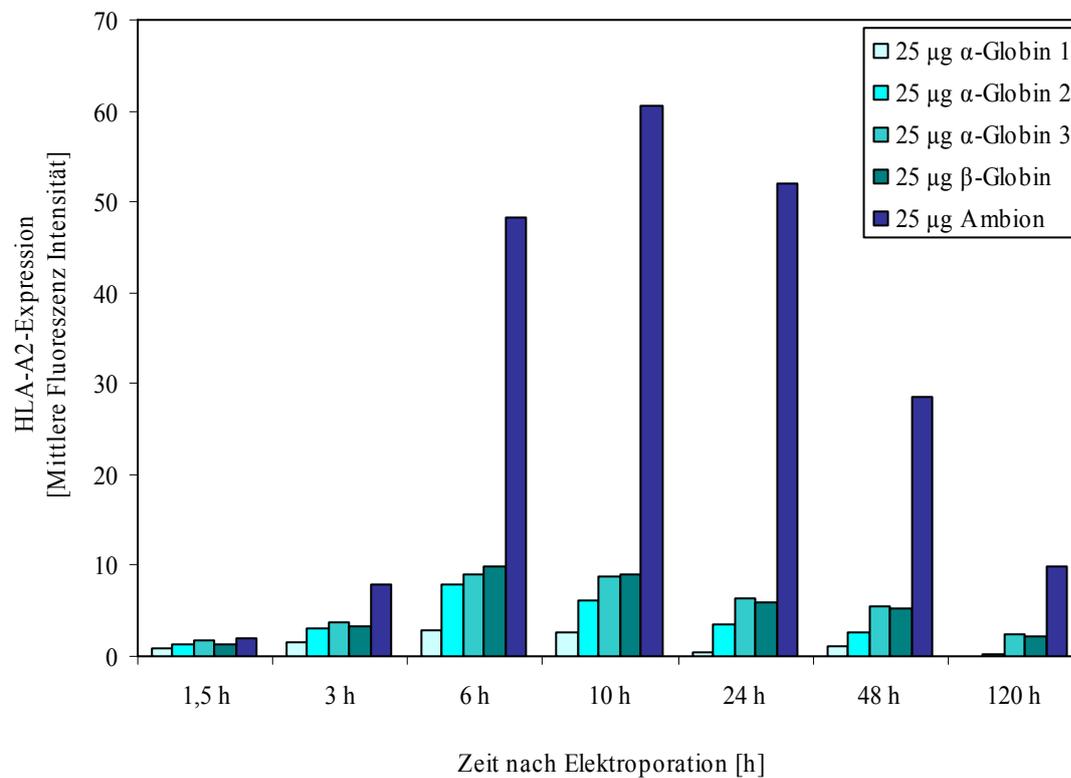
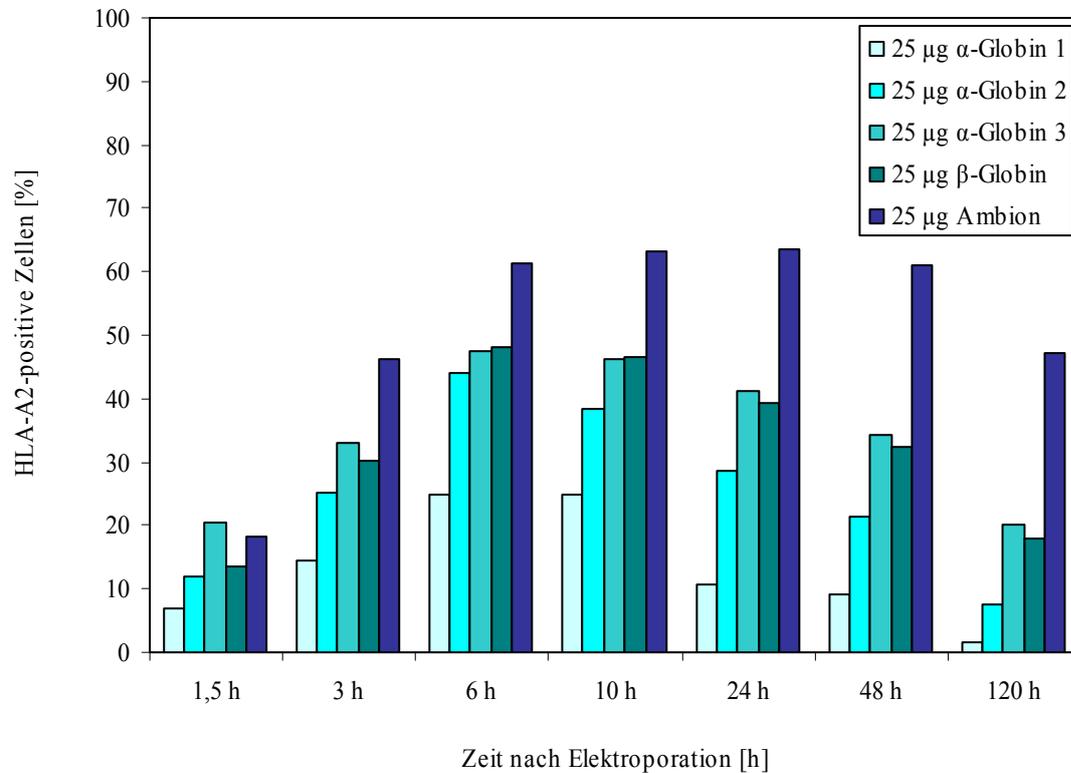
Abbildung 4.2 Phänotyp immaturer und maturer DZ, generiert aus Monozyten. 6 Tage nach Kultivierung mit IL-4 und GM-CSF wurden iDZ geerntet und gefärbt. Durch Zugabe von Maturierungszytokinen wurden aus iDZ mDZ generiert und nach insgesamt 8 Tagen geerntet und gefärbt. Die FACS™ Histogramme zeigen die Fluoreszenzintensität der DZ, die mit FITC- bzw. PE-konjugierten Antikörpern spezifisch für die genannten Oberflächenmoleküle sind (gefüllte Kurven: grau, iDZ; schwarz, mDZ) und dazugehörige Isotyp-Kontrollen (schwarze, nicht gefüllte Kurven). Für die Analyse wurde ein Fenster („gate“) um die Isotyp-Kontrollen gelegt. DZ, die außerhalb dieses Fensters lagen, wurden als positiv für den jeweiligen Oberflächenmarker angesehen. Mit Hilfe des Auswerteprogramms CellQuestPro™ wurden Histogramm-Statistiken erstellt, die für die Berechnung der Prozentanteile an positiven Zellen und ihre mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) verwendet wurden. Die obere Zahl in jedem Histogramm zeigt die positiven Zellen in Prozent, die untere Zahl zeigt die MFI.

4.1.2 Transfektion von HLA-A2-negativen DZ mit *in vitro* transkribierter HLA-A2-RNS

Des Weiteren sollten APZ generiert werden, die nicht nur über Selbst-MHC-Moleküle sondern auch über allogene MHC-Moleküle prozessierte Antigene präsentieren können. Hierfür sollten HLA-A2-negative DZ mittels bereits etablierter Technologien (Elektroporation; Javorovic *et al.*, 2005) mit *in vitro* transkribierter RNS (= *ivtRNS*) für das fremde MHC-Klasse-I-Molekül HLA-A2 transient transfiziert werden. Zusätzlich zu ihren Selbst-MHC-Molekülen sollten sie nun ebenfalls allogene HLA-A2-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren. Generell könnte jedes beliebige MHC-Klasse-I- oder MHC-Klasse-II-Allel, für das der Spender negativ und die cDNS-Sequenz bekannt ist, verwendet werden.

HLA-A2-*ivtRNS*-Chargen verschiedener Herkunft wurden auf ihre Qualität hin verglichen. Vier verschiedene HLA-A2-*ivtRNS*-Chargen wurden käuflich erworben. Da die mRNA („messenger“ RNS) von humanem α -Globin und β -Globin (Bestandteile des Hämoglobin) in der Zelle sehr stabil ist und nur langsam abgebaut wird, wurde vom Hersteller (CureVac) der 3`untranslatierte Bereich des α -Globingens bzw. des β -Globingens auf verschiedene Arten an das HLA-A2-Genkonstrukt gekoppelt und *in vitro* transkribiert. Die resultierende HLA-A2-*ivtRNS* sollte dadurch an Stabilität gewinnen. Drei verschiedene α -Globin- und eine β -Globin-stabilisierte HLA-A2-*ivtRNS*-Chargen wurden hergestellt. Des Weiteren wurde durch Polyadenylierung stabilisierte HLA-A2-*ivtRNS* (Ambion; siehe Methoden 3.4.5, S.43) für die Transfektion verwendet. Die HLA-A2-Moleküle auf der Zelloberfläche wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit einem monoklonalem Antikörper aus der Maus und sekundärem PE-konjugiertem Ziege-anti-Maus-Antikörper gefärbt und mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Die DZ wurden jeweils mit 25 μ g HLA-A2-*ivtRNS* via Elektroporation transfiziert. Als Kontrolle dienten DZ, die ohne *ivtRNS* der Elektroporation ausgesetzt waren. In Abbildung 4.3 sind die Daten in Prozent positive Zellen, die mittlere Fluoreszenzintensität und die x-fache Expression dargestellt, wobei der Term x-fache Expression sich aus dem Quotienten MFI der mit *ivtRNS* transfizierten DZ geteilt durch MFI der Kontroll-DZ zusammensetzt. Alle Werte über einfacher Expression zeigen somit eine erhöhte Expression bezogen auf die nicht transfizierten Zellen an. Die polyadenylierte HLA-A2-*ivtRNS* (Ambion), transfiziert in die DZ eines HLA-A2-negativen Spenders, zeigte die besten Ergebnisse. Der Prozentsatz an HLA-A2-positiven Zellen und die relative Anzahl der exprimierten HLA-A2-Moleküle pro Zelle waren am höchsten. Die HLA-A2-Moleküle erschienen früher auf der Oberfläche (3-6 h nach Elektroporation) und auch nach 120 h konnte noch eine Expression nachgewiesen werden. Deutliche Unterschiede sah man auch bei der x-fachen Expression. Nach 10 h wurde mit Ambion-*ivtRNS* eine 16-fache Expression

erreicht verglichen mit zwei- bis vierfacher Expression bei den anderen *ivtRNS*-Chargen. Für alle weiteren Versuche wurde deshalb Ambion-*ivtRNS* verwendet. Zu keinem Zeitpunkt konnte auf den Kontroll-DZ HLA-A2-Expression nachgewiesen werden.



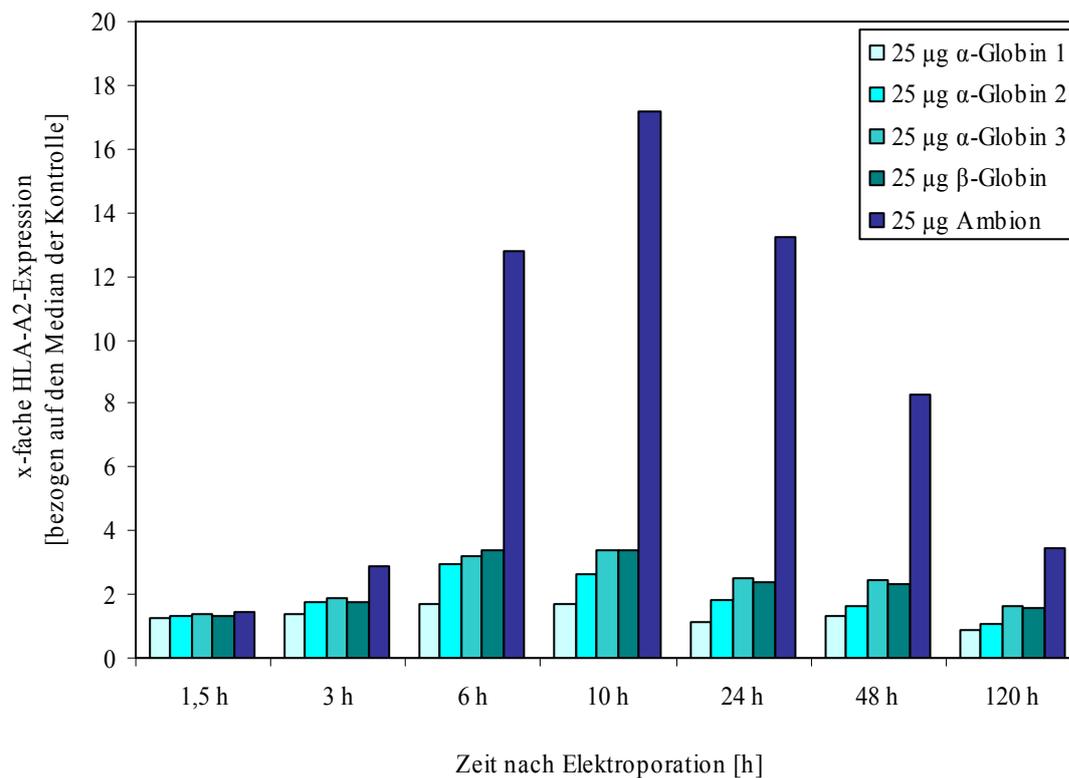


Abbildung 4.3 HLA-A2-Expression auf HLA-A2-negativen DZ, die mit HLA-A2-*ivt*RNS-Chargen unterschiedlicher Herkunft transfiziert wurden. Mature HLA-A2⁺ DZ wurden mit je 25 µg α-Globin-stabilisierter HLA-A2-*ivt*RNS 1, 2 und 3, β-Globin-stabilisierter HLA-A2-*ivt*RNS oder polyadenylierter HLA-A2-*ivt*RNS elektroporiert. Die Oberflächenfärbung erfolgte mit spezifischem monoklonalen Antikörper aus der Maus und sekundärem PE-konjugierten Ziege-anti-Maus-Antikörper. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Elektroporation wurde die Fluoreszenz der HLA-A2-*ivt*RNS-transfizierten DZ im FACSTM gemessen. Im ersten Diagramm ist der Prozentsatz der HLA-A2-positiven Zellen gezeigt. Im zweiten Diagramm sind die MFI-Werte der HLA-A2-*ivt*RNS-transfizierten DZ aufgetragen und im dritten Diagramm sind die berechneten x-fachen Expressionswerte dargestellt. Die Diagramme zeigen Werte der HLA-A2-positiven DZ aus FACSTM Histogrammen, in denen ein Fenster um die untransfizierten DZ gelegt wurde. Fluoreszenz von DZ außerhalb dieses Fensters wurde als HLA-A2-positiv angesehen.

Die Funktionalität der exprimierten allogenen HLA-A2-Moleküle wurde mit Hilfe des T-Zellklons JB4 überprüft, der HLA-A2-Moleküle als Alloantigen erkennt. Dieser T-Zellklon sezerniert IFN- γ , wenn sein TZR mit HLA-A2-Peptid-Liganden interagiert. Das exakte Peptid/e, das/die für die Erkennung benötigt wird, ist nicht bekannt. Es wird von DZ und allen bisher getesteten Zellen exprimiert und scheint von einem ubiquitären Protein zu stammen. Wenn JB4 T-Zellen mit nicht transfizierten HLA-A2-negativen DZ kokultiviert wurden, konnte kaum IFN- γ -Sekretion nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.4). Alle DZ, transfiziert mit HLA-A2-*ivt*RNS unterschiedlicher Herkunft, waren in der Lage, JB4 T-Zellen zur IFN- γ -Sekretion zu stimulieren, wobei die DZ, die mit Hilfe von Ambion-Reagenzien selbst hergestellter HLA-A2-*ivt*RNS elektroporiert worden waren, eine deutlich bessere IFN- γ -Sekretion bei JB4 T-Zellen auslösten. JB4 T-Zellen ohne Stimulationszellen sezernierten kein IFN- γ und zeigten, dass T-

Zellen durch den geeigneten MHC-Peptid-Liganden zur IFN- γ -Freisetzung aktiviert werden müssen.

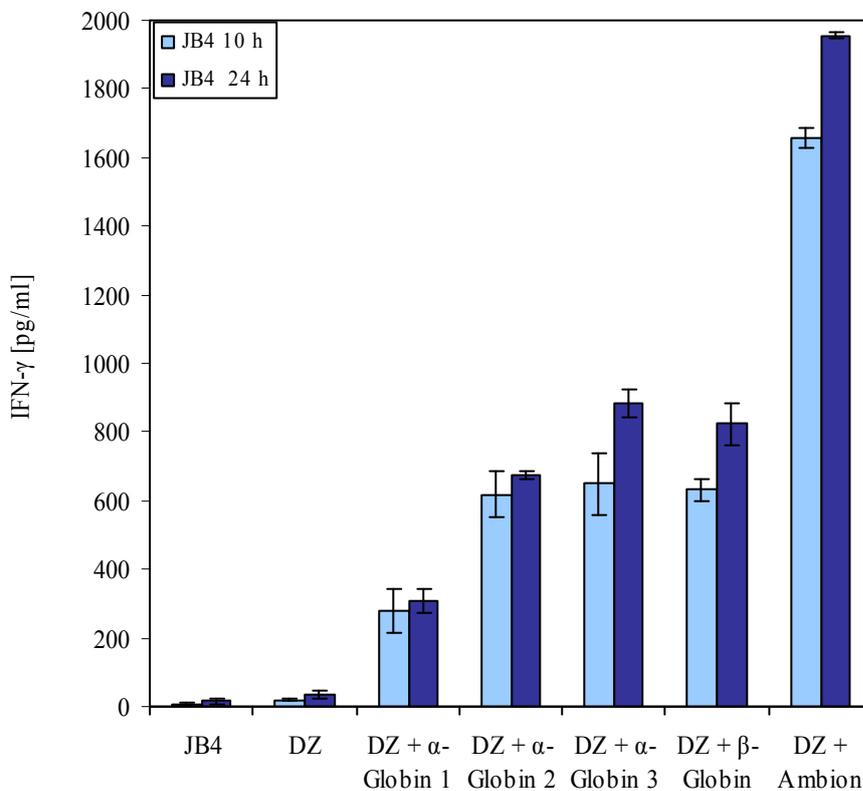
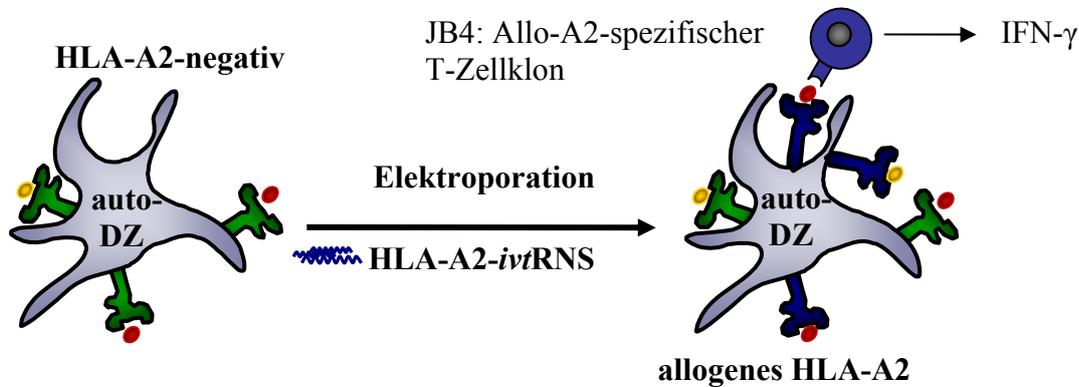


Abbildung 4.4 Kapazität HLA-A2-ivtRNS-exprimierender DZ zur Stimulation von JB4. Mature DZ wurden mit je 25 μ g α -Globin-stabilisierter HLA-A2-ivtRNS 1, 2 und 3, β -Globin-stabilisierter HLA-A2-ivtRNS oder polyadenylierter HLA-A2-ivtRNS elektroporiert. 10 h und 24 h nach Elektroporation wurden die transfizierten DZ mit den JB4 T-Zellen gemischt. Das Diagramm zeigt die Menge an IFN- γ , die von 2×10^4 aktivierten T-Zellen während der 24 h langen Koinkubation mit 4×10^4 transfizierten DZ sezerniert wurde. IFN- γ wurde in den Überständen mittels ELISA gemessen. Mittelwerte und ihre Standardabweichungen rühren von Koinkubationstriplikaten her.

4.1.3 Transfektion von HLA-A2-positiven DZ mit *ivt*RNS, die für das Tumor-assoziierte Antigen Tyrosinase kodiert

Als Modellantigen wurde das Tumor-assoziierte Tyrosinase-Protein gewählt. Das Tyrosinase-Enzym (529 Aminosäuren) spielt eine wichtige Rolle bei der Synthese von Melanin in Melanozyten und Retina-Zellen. Es ist in der Transmembran lokalisiert und in Melanomen überexprimiert. Es könnte auch jedes andere TAA, von dem die cDNS-Sequenz bekannt ist, verwendet werden.

DZ eines HLA-A2-positiven Spenders wurden mit 24 µg bzw. 48 µg Tyrosinase-*ivt*RNS elektroporiert. Das Tyrosinase-Protein wird nicht wie z.B. HLA-A2-Moleküle auf der Oberfläche exprimiert und musste deshalb mittels einer intrazellulären Färbemethode nachgewiesen werden, bei der die Zellmembran permeabilisiert wurde. Dadurch können spezifische, monoklonale Antikörper gegen Tyrosinase in die Zelle gelangen. Die Expression des Tyrosinase-Proteins wurde zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen (siehe Abbildung 4.5). Die nicht gefüllten, schwarzen Kurven zeigen die Färbung der untransfizierten DZ und die gefüllten, grauen Kurven stellen die Expression des Tyrosinase-Proteins in den Zellen dar. Die höchste Tyrosinase-Expression konnte 6 h nach Elektroporation detektiert werden.

Die Fluoreszenzintensität war höher, wenn mehr *ivt*RNS (48 µg) transfiziert wurde. Dies ließ vermuten, dass größere *ivt*RNS-Mengen in die Zellen gelangen konnten und somit mehr Tyrosinase-Protein transkribiert werden konnte.

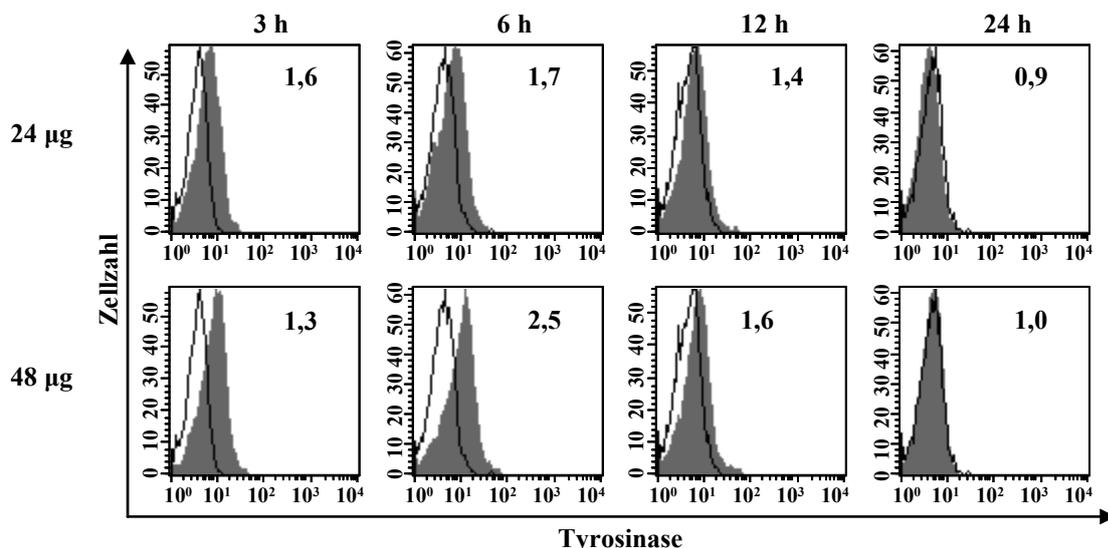


Abbildung 4.5 Intrazelluläre Färbung von DZ, die mit Tyrosinase-*ivt*RNS transfiziert wurden. Mature DZ wurden mit 24 µg bzw. 48 µg Tyrosinase-*ivt*RNS elektroporiert. 3 h, 6 h, 12 h und 24 h nach Elektroporation wurde die Expression des Tyrosinase-Proteins mittels intrazellulärer Färbung mit monoklonalem Antikörper, spezifisch für das Tyrosinase-Protein, nachgewiesen. In den Histogrammen zeigt die schwarze, nicht gefüllte Kurve die Färbung untransfizierter DZ und stellt somit den Hintergrund dar. Die graue, gefüllte Kurve stellt die Expression des Tyrosinase-Proteins in den mit *ivt*RNS-elektroporierten DZ dar. Die Zahlen zeigen die x-fache Expression bezogen auf die Fluoreszenzintensität der gefärbten Kontroll-DZ.

Mit Hilfe des TyrF8 T-Zellklons wurde die Kapazität der mit Tyrosinase-*ivt*RNS transfizierten DZ zur Stimulation von T-Zellen überprüft. TyrF8 T-Zellen erkennen das Tyrosinase-Peptid YMN (Tyrosinase₃₆₉₋₃₇₇, Epitop YMNGTMSQV), wenn es über HLA-A2-Moleküle präsentiert wird, und sezernieren daraufhin IFN- γ . TyrF8 ist somit ein HLA-A2-restringierter YMN-spezifischer T-Zellklon. Nicht transfizierte HLA-A2-positive DZ konnten keine IFN- γ -Freisetzung aus TyrF8 T-Zellen induzieren (siehe Abbildung 4.6). Wenn die DZ aber mit Tyrosinase-*ivt*RNS transfiziert wurden, waren sie in der Lage, TyrF8 T-Zellen zur Sekretion von IFN- γ zu stimulieren. T-Zellen alleine setzten kein IFN- γ frei, konnten jedoch durch Melanomzellen (Mel/IL-2), die Tyrosinase und HLA-A2 exprimieren, aktiviert werden. Dies zeigt, dass die Transfektion von DZ mit Tyrosinase-*ivt*RNS zu einer Prozessierung und Präsentation des MHC-Peptid-Liganden führte, der vom TZR des TyrF8 T-Zellklons erkannt wurde und die T-Zellen aktivierte, IFN- γ zu sezernieren. Die mit *ivt*RNS-transfizierten DZ hatten 12 h und 24 h nach Elektroporation eine vergleichbare stimulatorische Kapazität, die allerdings nur 20 % bzw. 18 % der Stimulations-Kapazität von Tumorzellen (Mel/IL-2) ausmachte.

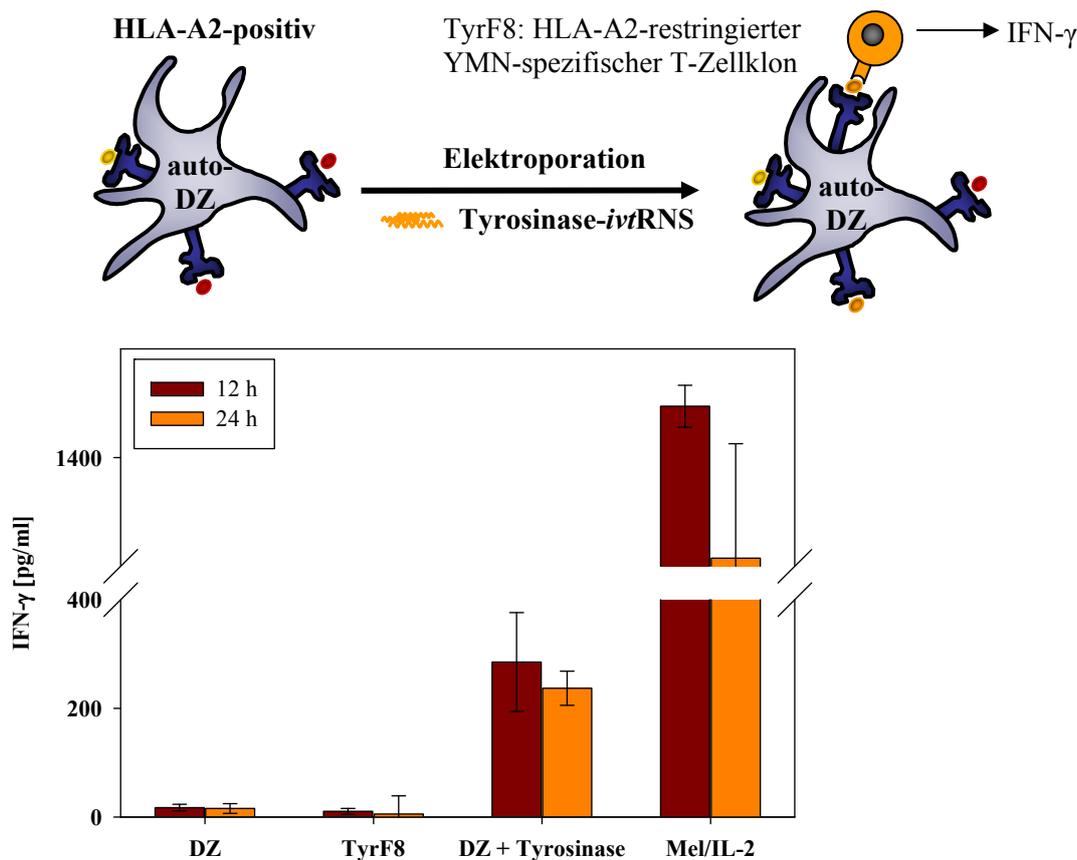


Abbildung 4.6 Stimulatorische Kapazität von HLA-A2-positiven DZ, die mit Tyrosinase-*ivt*RNS transfiziert wurden. Mature DZ wurden mit 24 μ g bzw. 48 μ g Tyrosinase-*ivt*RNS elektroporiert. 12 h und 24 h nach Elektroporation wurden die transfizierten DZ mit den TyrF8 T-Zellen gemischt. Das Diagramm zeigt die Menge an IFN- γ , die von 2×10^4 aktivierten T-Zellen während der 24 h langen Koinkubation mit 4×10^4 transfizierten DZ sezerniert wurde. IFN- γ wurde in den Überständen mittels ELISA gemessen. Mittelwerte und ihre Standardabweichungen rühren von Koinkubationstriplikaten her.

4.1.4 Koexpression von HLA-A2 und Tyrosinase-*ivt*RNS in HLA-A2-negativen DZ

DZ eines HLA-A2-negativen Spenders wurden mit *ivt*RNS für Tyrosinase und HLA-A2 transfiziert. Entweder wurde jede *ivt*RNS einzeln oder beide in Kombination elektroporiert (siehe Abbildung 4.7). In Blautönen ist die HLA-A2-Expression auf der Oberfläche und in Orange-Rottönen die intrazelluläre Tyrosinase-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Auf der linken Hälfte des Diagramms sind die Färbungen von DZ gezeigt, die nur mit einer Art von *ivt*RNS transfiziert wurden und rechts die HLA-A2- und Tyrosinase-Färbung von DZ, die mit beiden *ivt*RNS gleichzeitig elektroporiert wurden. Optimale Expression konnte 12 h nach Elektroporation detektiert werden. Die HLA-A2-Expression schien nach Kotransfektion mit Tyrosinase-*ivt*RNS erniedrigt zu sein.

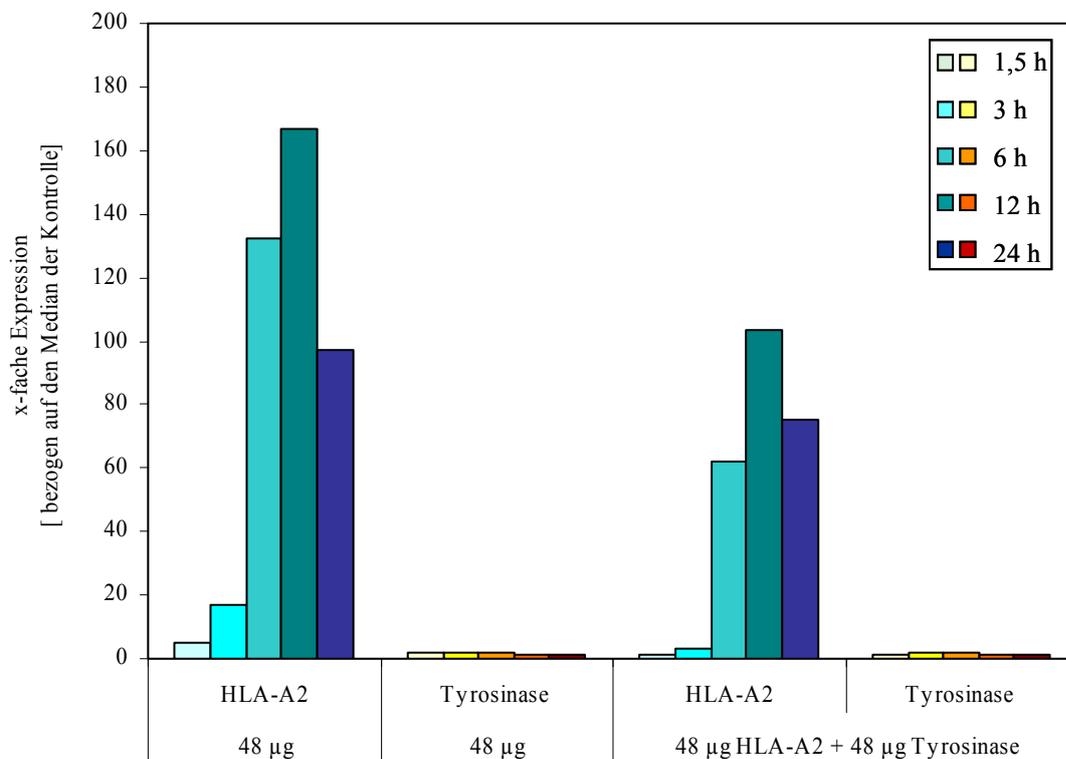


Abbildung 4.7 Expressionskinetik von HLA-A2- und Tyrosinase-*ivt*RNS in HLA-A2-negativen DZ. Mature DZ wurden entweder mit 48 µg einer Art *ivt*RNS oder mit je 48 µg HLA-A2- und Tyrosinase-*ivt*RNS in Kombination transfiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde mittels Antikörper-Färbung die Expression von HLA-A2 und Tyrosinase nachgewiesen. In Blautönen ist die HLA-A2-Expression auf der Zelloberfläche und in Orange-Rottönen die intrazelluläre Tyrosinase-Expression in x-facher Expression bezogen auf die gefärbten untransfizierten DZ gezeigt. Auf der linken Hälfte des Diagramms sind die Expression von HLA-A2 und Tyrosinase in mit einer *ivt*RNS-Spezies transfizierten DZ und rechts die Expression beider Proteine in DZ, die mit beiden *ivt*RNS elektroporiert wurden, dargestellt.

Ob Tyrosinase-Peptide zusammen mit HLA-A2-Molekülen auf der Oberfläche präsentiert wurden, wurde wiederum mit Hilfe des TyrF8 T-Zellklons überprüft (siehe Abbildung 4.8). DZ des HLA-A2-negativen Spenders alleine, oder nur mit HLA-A2- oder Tyrosinase-*ivt*RNS transfizierte DZ konnten TyrF8 T-Zellen nicht stimulieren. Nur DZ, die beide *ivt*RNS-Spezies koexprimierten, konnten den TyrF8 T-Zellklon zur Sekretion von IFN- γ aktivieren. Auch hier wurde verglichen zur Stimulation mit den Tumorzellen nur ca. 13 % der IFN- γ -Menge von den TyrF8-Zellen ausgeschüttet.

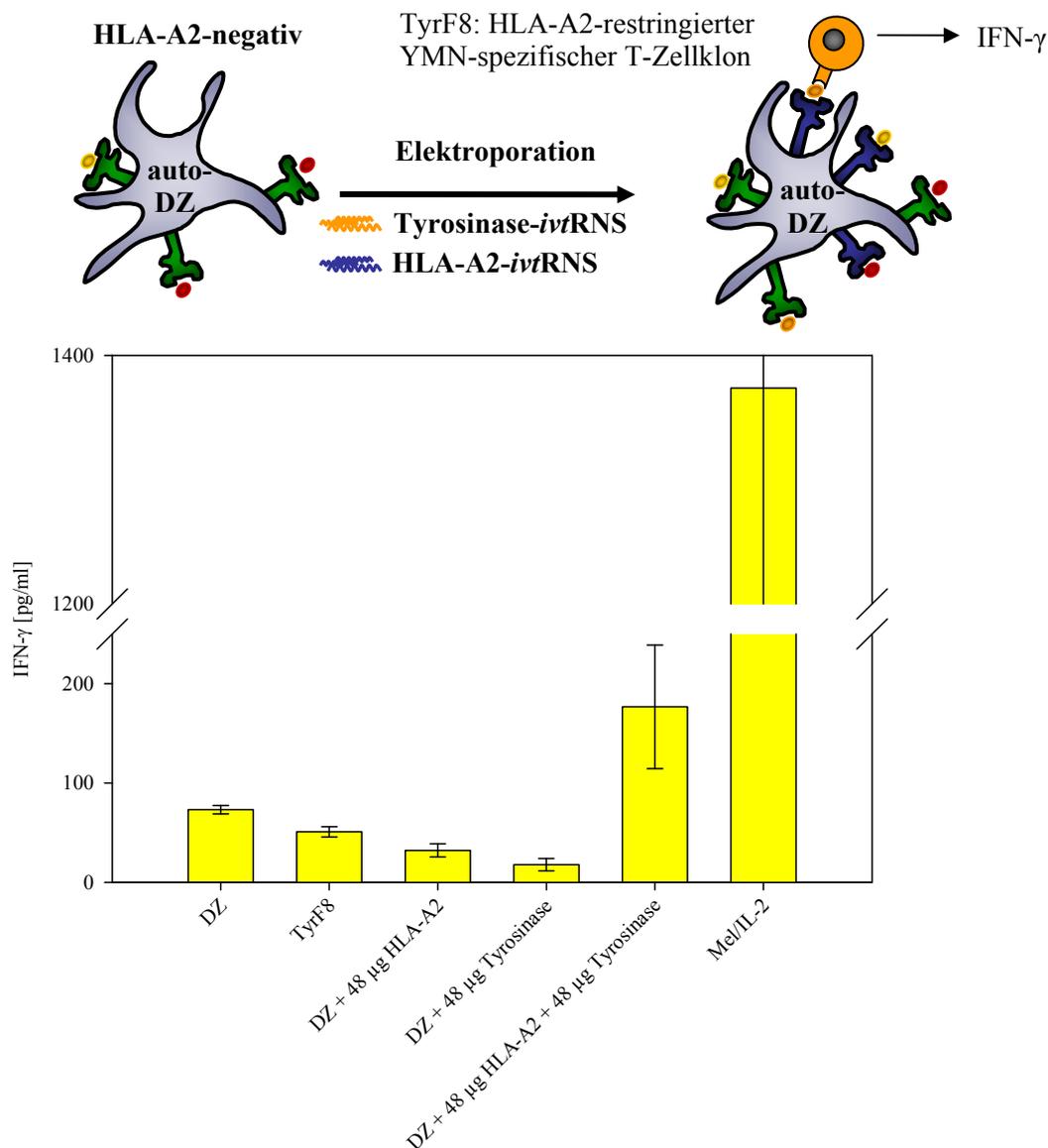


Abbildung 4.8 Stimulatorische Kapazität von HLA-A2-negativen DZ, die mit HLA-A2- und Tyrosinase-*ivt*RNS transfiziert wurden. Mature DZ wurden nur mit 48 μ g HLA-A2- oder 48 μ g Tyrosinase-*ivt*RNS elektroporiert oder mit beiden *ivt*RNS-Spezies in Kombination. 24 h nach Elektroporation wurden die transfizierten DZ mit den TyrF8 T-Zellen gemischt. Das Diagramm zeigt die Menge an IFN- γ , die von 2×10^4 aktivierten T-Zellen während der 24 h langen Koinkubation mit 4×10^4 transfizierten DZ sezerniert wurde. IFN- γ wurde in den Überständen mittels ELISA gemessen. Mittelwerte und ihre Standardabweichungen rühren von Koinkubationstriplikaten her.

4.1.4.1 Koexpression von HLA-A2 und dem Tumor-assoziierten Antigen Melan-A

Um zu überprüfen, ob die reduzierte HLA-A2-Expression nach Kotransfektion mit Tyrosinase-*ivt*RNS auf das TAA Tyrosinase zurückzuführen war, wurde der gleiche Versuch mit einem anderen Melanom-assoziierten Antigen, dem Melan-A, wiederholt. Auch hier wurden je 48 µg der HLA-A2- bzw. 48 µg Melan-A-*ivt*RNS alleine oder in Kombination in HLA-A2-negative DZ transfiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Elektroporation wurden HLA-A2-Moleküle mittels Oberflächenfärbung (blau) und die Expression von Melan-A (orange-rot) intrazellulär nachgewiesen (siehe Abbildung 4.9). Auch hier konnte eine Reduktion der HLA-A2-Expression nach Kotransfektion beider *ivt*RNS-Spezies beobachtet werden. Hinzu kam, dass auch die Melan-A-Expression erniedrigt war. Die Tyrosinase-Expression war nach Kotransfektion von HLA-A2- und Tyrosinase-*ivt*RNS dagegen nicht erniedrigt.

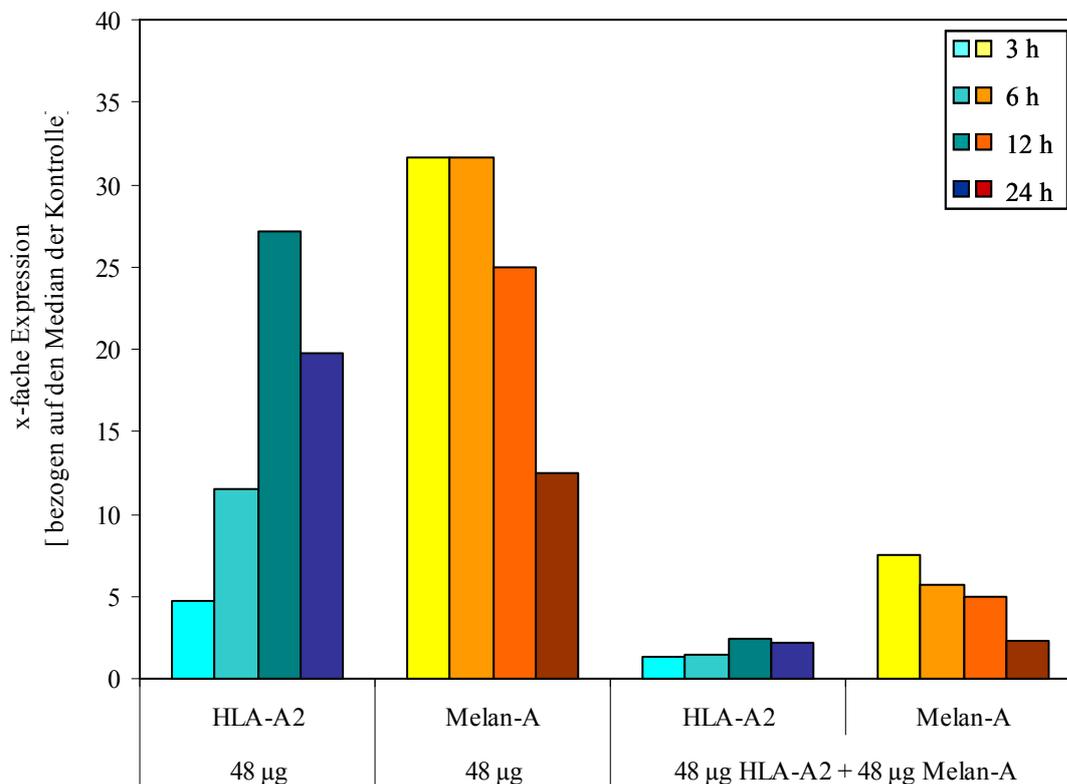


Abbildung 4.9 Expressionskinetik von HLA-A2- und Melan-A-*ivt*RNS in HLA-A2-negativen DZ. Mature DZ wurden entweder mit 48 µg einer *ivt*RNS-Spezies transfiziert oder mit 48 µg HLA-A2- und Melan-A-*ivt*RNS in Kombination elektroporiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde mittels Antikörper-Färbung die Expression beider Proteine nachgewiesen. In Blautönen ist die HLA-A2-Expression und in Orange-Rottönen die Melan-A-Expression in x-facher Expression bezogen auf die gefärbten nicht transfizierten DZ gezeigt. Auf der linken Hälfte des Diagramms sind die Expression von HLA-A2 und Melan-A in mit einer *ivt*RNS-Spezies-transfizierten DZ und rechts die Expression beider Proteine in DZ, die mit beiden *ivt*RNS-Spezies elektroporiert wurden, dargestellt.

Ebenso konnte ein HLA-A2-restringierter Melan-A-spezifischer T-Zellklon (11/33 ZTL (zytotoxische T-Lymphozyten), Wölfel T *et al.* 1993) nur durch den HLA-A2-Melan-A-Peptid-Komplex zur IFN- γ -Sekretion stimuliert werden (siehe Abbildung 4.10). Melanomzellen (Mel/IL-2), die HLA-A2 und Melan-A exprimieren, führten bei 11/33 ZTL zu einer höheren IFN- γ -Freisetzung.

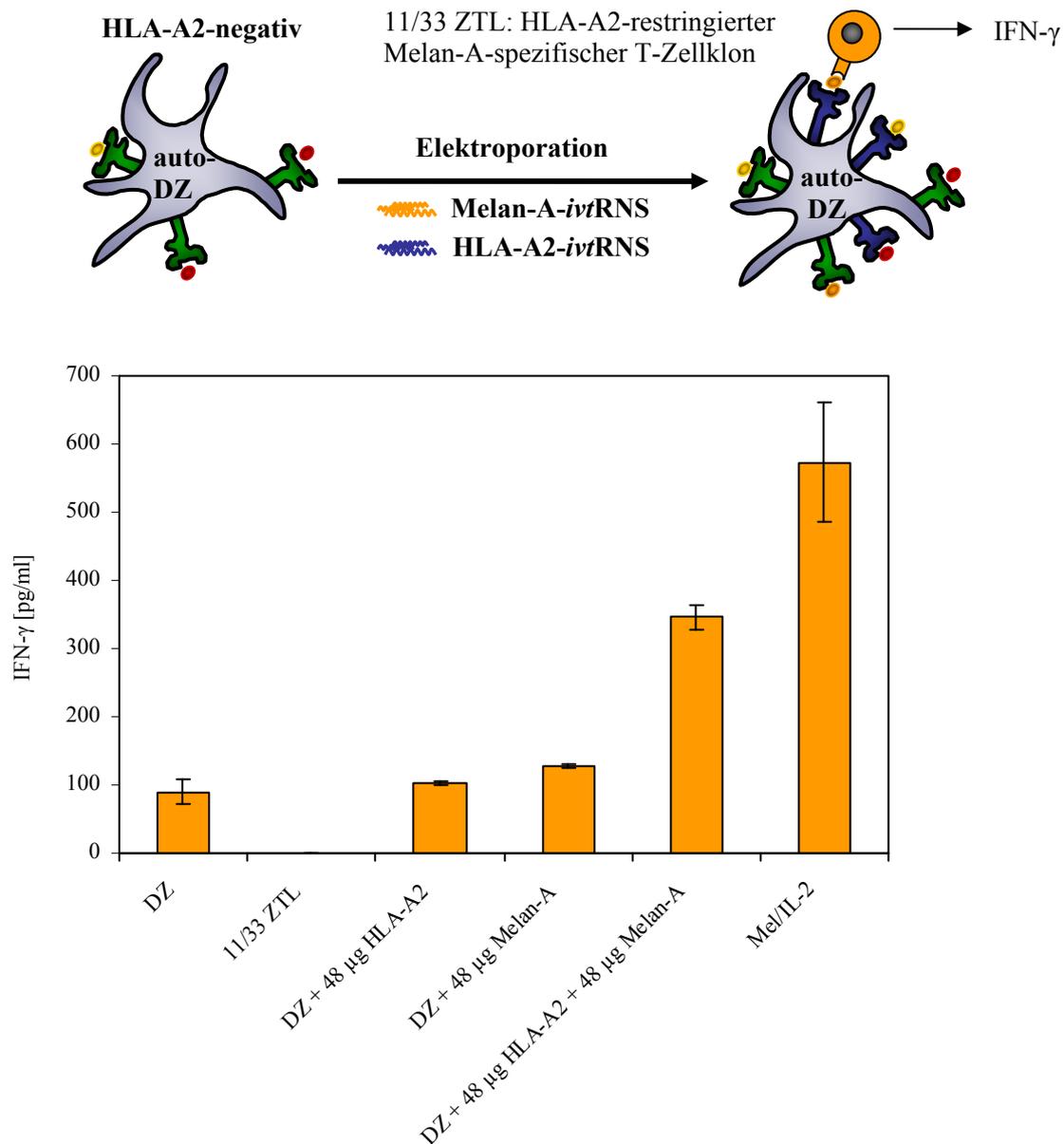


Abbildung 4.10 Fähigkeit von HLA-A2-negativen DZ, die mit HLA-A2- und Melan-A-ivtRNS transfiziert wurden, 11/33 ZTL zu stimulieren. Mature DZ wurden nur mit 48 μ g HLA-A2- oder 48 μ g Melan-A-ivtRNS elektroporiert und mit beiden ivtRNS-Spezies in Kombination. 24 h nach Elektroporation wurden die transfizierten DZ mit Melan-A-spezifischen 11/33 T-Zellen gemischt. Das Diagramm zeigt die Menge an IFN- γ , die von 2×10^4 aktivierten T-Zellen während der 24 h Koinkubation mit 4×10^4 transfizierten DZ sezerniert wurde. IFN- γ wurde in den Überständen mittels ELISA gemessen. Mittelwerte und ihre Standardabweichungen rühren von Koinkubationstriplikaten her.

4.1.4.2 Einfluss der *ivt*RNS-Konzentrationen auf die Expression von HLA-A2 und Tyrosinase

Im nächsten Schritt sollte die optimale *ivt*RNS-Konzentration für HLA-A2 und Tyrosinase zur Stimulierung des TyrF8 T-Zellklons ermittelt werden. Da die gleichzeitige Transfektion mit beiden *ivt*RNS-Spezies zu einer Reduktion der HLA-A2-Expression führte, wurden verschiedene Konzentrationskombinationen getestet (siehe Abbildung 4.11). Die x-fache Expression, bezogen auf die Fluoreszenzintensität der gefärbten untransfizierten DZ, wurde 6 h nach Elektroporation gemessen. Die beste HLA-A2-Expression wurde erreicht, wenn 48 µg HLA-A2- in Kombination mit 24 µg Tyrosinase-*ivt*RNS transfiziert wurde. Die Tyrosinase-Expression war gleich bleibend zweifach erhöht.

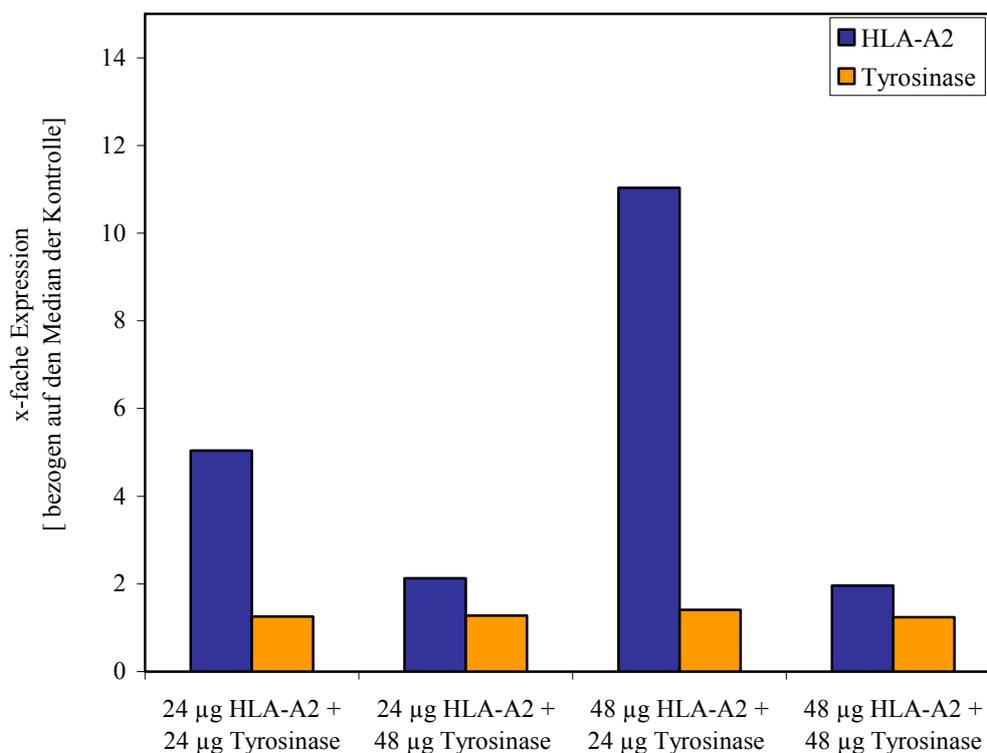


Abbildung 4.11 Expression unterschiedlicher Mengen an HLA-A2- und Tyrosinase-*ivt*RNS in HLA-A2-negativen DZ. Mature DZ wurden mit vier verschiedenen *ivt*RNS-Kombinationen elektroporiert. 24 µg HLA-A2- + 24 µg Tyrosinase-, 24 µg HLA-A2- + 48 µg Tyrosinase-, 48 µg HLA-A2- + 24 µg Tyrosinase- oder 48 µg HLA-A2- + 48 µg Tyrosinase-*ivt*RNS wurden gemischt und in HLA-A2-negative DZ transfiziert. 6 h nach Elektroporation wurde mittels Antikörperfärbung und durchflusszytometrischer Analyse die x-fache Expression bestimmt, in Blau für die HLA-A2-Expression und in Orange für die Tyrosinase-Expression.

6 h nach Elektroporation konnten sowohl die HLA-A2-Moleküle auf der Oberfläche als auch Tyrosinase-Proteine in der Zelle sehr gut mittels Antikörperfärbung nachgewiesen werden. Danach wurden die Tyrosinase-Proteine vermutlich prozessiert und konnten nicht mehr gefärbt werden. Die Koinkubation mit TyrF8 T-Zellen erfolgte erst 24 h nach Elektroporation, nachdem

alle MHC-Peptid-Komplexe an die Oberfläche transportiert worden waren. Alle DZ, die mit unterschiedlichen Mengen beider *ivtRNS*-Spezies elektroporiert worden waren, konnten IFN- γ -Freisetzung in den TyrF8 T-Zellen induzieren (siehe Abbildung 4.12). Untransfizierte DZ (linke Säule) und TyrF8 T-Zellen alleine zeigten nur Hintergrundmengen an IFN- γ . Die Melanomzellen Mel/IL-2 dienten wieder als Positivkontrolle und führten zu starker IFN- γ -Sekretion aus TyrF8 T-Zellen.

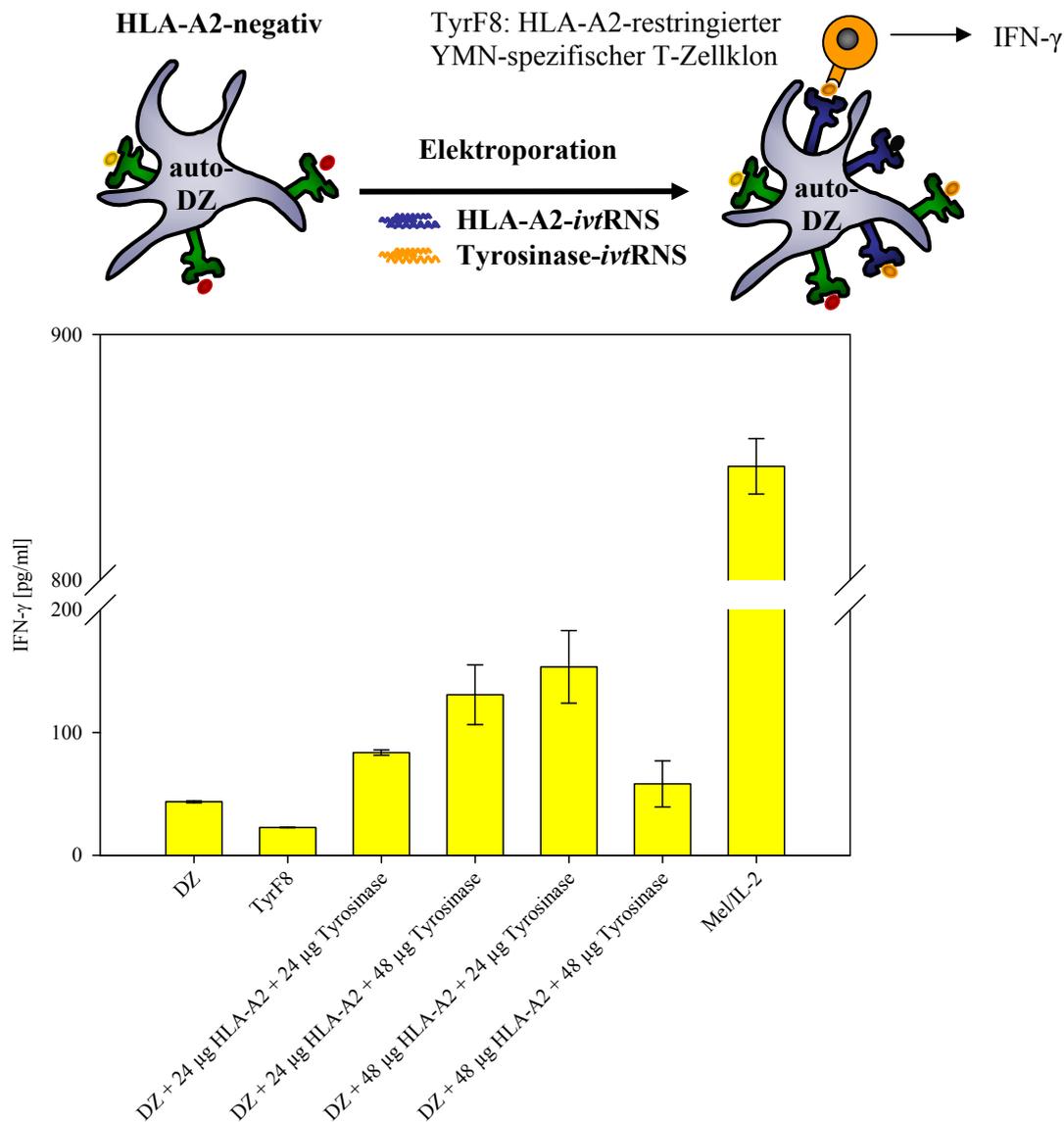


Abbildung 4.12 Stimulatorische Kapazität von HLA-A2-negativen DZ, die mit unterschiedlichen Mengen an HLA-A2- und Tyrosinase-*ivtRNS* transfiziert worden waren. Mature DZ, die mit 24 μ g HLA-A2- + 24 μ g Tyrosinase-, 24 μ g HLA-A2- + 48 μ g Tyrosinase-, 48 μ g HLA-A2- + 24 μ g Tyrosinase oder 48 μ g HLA-A2- + 48 μ g Tyrosinase-*ivtRNS* elektroporiert worden waren, wurden 24 h nach Elektroporation mit TyrF8 T-Zellen gemischt. Das Diagramm zeigt die Menge an IFN- γ , die von 2×10^4 aktivierten T-Zellen während der 24 h Koinkubation mit 4×10^4 transfizierten DZ sezerniert wurde. IFN- γ wurde in den Überständen mittels ELISA gemessen. Mittelwerte und ihre Standardabweichungen rühren von Koinkubationstriplikaten her.

Von allen durchgeführten Versuchen (N=4) dieser Art, zeigten die DZ, die mit 48 µg HLA-A2- und 24 µg Tyrosinase-*ivt*RNS transfiziert wurden, in drei von vier Experimenten die beste stimulatorische Kapazität. In Tabelle 4.1 ist die IFN- γ -Sekretion von TyrF8 T-Zellen, induziert durch Kokultivierung mit DZ von HLA-A2-negativen Spendern, die mit unterschiedlichen Mengen an HLA-A2- und Tyrosinase-*ivt*RNS transfiziert wurden, in Zahlen dargestellt. Die IFN- γ -Sekretion von TyrF8 T-Zellen während Koinkubation mit diesen DZ wurde in [%] bezogen auf die IFN- γ -Ausschüttung durch Koinkubation von TyrF8 T-Zellen mit der Melanomzelllinie Mel/IL-2 angegeben und lag zwischen 10 und 18 %. Die Mittelwerte aller vier Versuche deuten darauf hin, dass die Kombination von 48 µg HLA-A2 *ivt*RNS mit 24 µg Tyrosinase-*ivt*RNS in DZ am besten für die Stimulation von TyrF8 T-Zellen geeignet ist (ca. 15 % IFN- γ -Freisetzung verglichen zur Stimulation mit Mel/IL-2-Tumorzellen) und dass insgesamt weniger *ivt*RNS für eine erfolgreiche Aktivierung von T-Zellen viel versprechender sein könnte.

Tabelle 4.1 IFN- γ -Sekretion von TyrF8 T-Zellen (in Prozent), bezogen auf die Positivkontrolle Mel/IL-2

N=4	IFN- γ -Sekretion bezogen auf Mel/IL-2 [%]				
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Mittelwert
DZ alleine	3,6	5,2	2,2	4,0	3,8
TyrF8 alleine	0,0	2,7	1,5	4,1	2,1
DZ + 24 µg HLA-A2 + 24 µg Tyrosinase	14,0	9,9	3,6	9,9	9,4
DZ + 24 µg HLA-A2 + 48 µg Tyrosinase	8,6	15,5	7,9	7,5	9,9
DZ + 48 µg HLA-A2 + 24 µg Tyrosinase	14,0	18,1	14,7	12,1	14,7
DZ + 48 µg HLA-A2 + 48 µg Tyrosinase	7,4	6,9	17,5	7,8	9,9
Mel/IL-2	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

4.2 Bestimmung der Funktion und TZR-Spezifität von bereits etablierten zytotoxischen CD8⁺-T-Zelllymphozyten-Klonen TyrF8 und IVS B

4.2.1 Prinzip und Etablierung der Tetramerfärbung

Als Tetramere werden kürzlich entwickelte MHC-Multimere bezeichnet, mit denen es möglich ist, Antigen-spezifische T-Zellen zu färben und zu isolieren. Die Affinität der Interaktion zwischen TZR und monomeren MHC-Peptid-Komplex ist so niedrig, dass keine stabile Bindung mit monomeren Reagenzien möglich ist. Durch die Verwendung von MHC-Peptid-Multimeren wird die Avidität der Interaktion erhöht. MHC-Moleküle mit Biotin-Sequenzen in der α_3 -Region werden konstruiert und produziert, gefaltet und mit Peptiden beladen. Verbunden werden diese MHC-Peptid-Monomere mit Hilfe von Avidin, das vier Bindestellen mit sehr hoher Affinität für Biotin trägt und das Rückgrat des Multimers darstellt. Das Ergebnis ist die Bildung von MHC-Peptid-Tetrameren, vier spezifischen MHC-Peptid-Komplexen, die an ein PE-konjugiertes

Avidin-Molekül gebunden sind. In dieser Arbeit wurde PE-markiertes HLA-A*0201/htyr369-377-Tetramer (Wölfl *et al.*, 2004; freundlicherweise von Prof. D. Busch bereitgestellt) verwendet, mit dessen Hilfe HLA-A2-restringierte YMD-spezifische T-Zellen (Tyrosinase₃₆₉₋₃₇₇, Epitop YMDGTMSQV) gefärbt werden konnten.

Für die Etablierung der Färbung mit diesem Tetramer wurde der bereits bestehende HLA-A2-restringierte YMD-spezifische T-Zellklon IVS B verwendet. Bei der späteren *De-novo*-Induktion naïver T-Zellen waren aufgrund von Ergebnissen aus anderen Publikationen 0,1-1 % YMD-spezifische T-Zellen zu erwarten. Um zu testen, ob die Tetramer-Technologie für die Färbung und Isolierung dieser geringen Prozentanteile an spezifischen Zellen geeignet war, wurden IVS B T-Zellen in definierten Prozentanteilen unter PBMC gemischt und mit Tetramer und CD8-Antikörper gefärbt (siehe Abbildung 4.13). Oben rechts im Streudiagramm erscheinen die Tetramer-positiven CD8-positiven T-Zellen, oben links die CD8-positiven PBMC und unten links die CD8-negativen PBMC. Die obere Zahl über dem jeweiligen Streudiagramm zeigt den titrierten Prozentanteil an IVS B an, die untere Zahl den Prozentanteil an IVS B, der mit dem Tetramer gefärbt wurde. Der Bereich, in dem noch gute Tetramerfärbung möglich war, lag zwischen 0,5 und 0,1 % an Antigen-spezifischen Zellen. Die Tetramer-Technologie konnte somit für die spätere Isolierung von sehr geringen Prozentanteilen an YMD-spezifischen Zellen sehr gut verwendet werden.

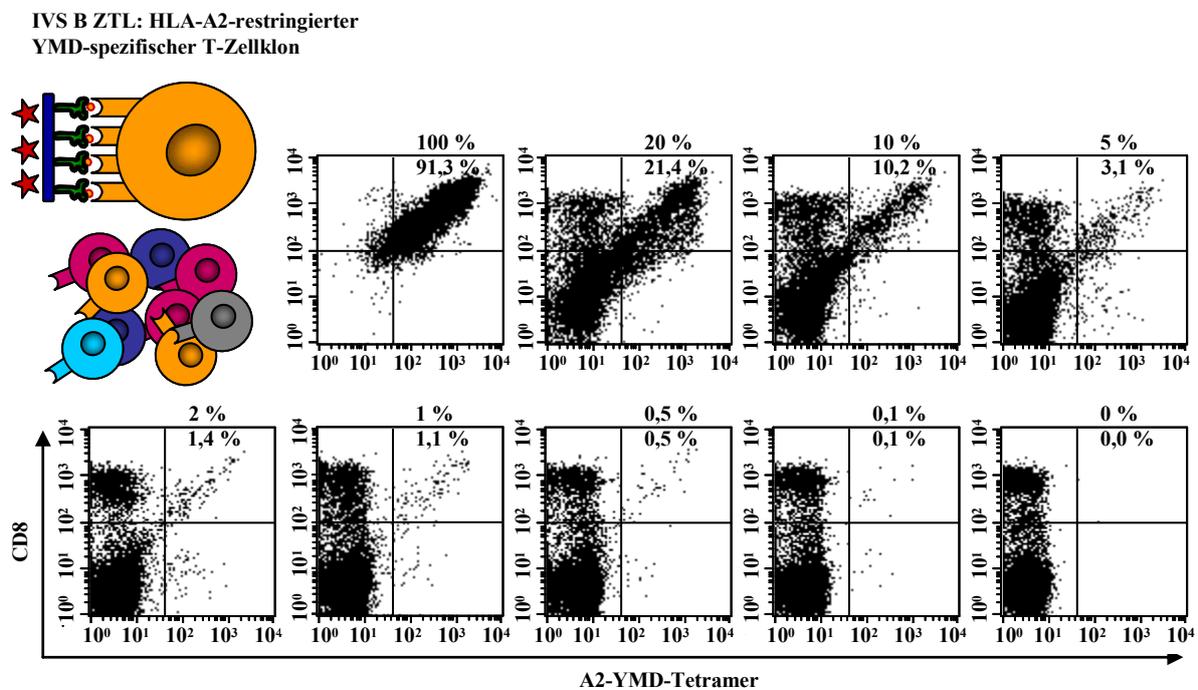


Abbildung 4.13 Tetramerfärbung von IVS B T-Zellen, die unter PBMC gemischt wurden. IVS B T-Zellen wurden zu PBMC in definierten Prozentanteilen zugegeben. Anschließend wurden diese Zellgemische mit PE-markiertem HLA-A*0201/htyr369-377-Tetramer und CD8-APC gefärbt und im FACSTM analysiert. Oben rechts im Streudiagramm erscheinen die Tetramer-positiven CD8-positiven T-Zellen, oben links die CD8-positiven PBMC und unten links die CD8-negativen PBMC. Die obere Zahl über dem jeweiligen Streudiagramm zeigt den titrierten Prozentanteil an IVS B, die untere Zahl den Prozentanteil an CD8-Tetramer-positiven IVS B T-Zellen.

4.2.2 Bestimmung der Spezifität der Tetramerbindung und Avidität der TZR mittels Tetramerfärbung

Die zwei genannten Tyrosinase-Peptid-spezifischen T-Zellklone TyrF8 und IVS B wurden mit dem Tetramer gefärbt und analysiert. Diese beiden Klone erkennen unterschiedliche Peptide, die das gleiche Tyrosinase-Epitop (Aminosäureposition: 369-377) verkörpern. YMNNGTMSQV (YMN) ist die HLA-A2-Bindepeptidsequenz, die aus der Primärstruktur des Tyrosinase-Proteins vorhergesagt wurde. Massenspektrometrische Analysen von Peptiden, die von einer HLA-A*0201 Melanomzelllinie eluiert worden waren, zeigten jedoch, dass die Sequenz des natürlicherweise präsentierten Peptids tatsächlich YMDNGTMSQV (YMD) war (Wölfel T *et al.*, 1994). Der Unterschied beruht auf einer posttranskriptionalen Modifikation des Asparagins (N) zur Asparaginsäure (D). Der HLA-A2-restringierte TyrF8 T-Zellklon ist YMN-, der HLA-A2-restringierte IVS B T-Zellklon dagegen YMD-spezifisch.

In Abbildung 4.14 ist die Tetramerfärbung und -dissoziation beider T-Zellklone gezeigt. Sowohl die Fluoreszenzintensität der Tetramerfärbung (Yee *et al.*, 1999) als auch die Dauer der Bindung des Tetramers (Palermo *et al.*, 2005) geben eine Aussage über die Avidität (= Bindungsstärke des TZR multipliziert mit der Anzahl an TZR) der T-Zelle zu einem bestimmten MHC-Peptid-Liganden. T-Zellen wurden mit HLA-A*0201/htyr369-377- Tetramer (A2-YMD) inkubiert und nach Abwaschen ungebundener Tetramer-Moleküle wurde HLA-A2-spezifischer Antikörper zugesetzt. Dieser Antikörper verhindert, dass abgelöste Tetramer-Moleküle wieder an die Oberfläche der T-Zellen binden können. Die Fluoreszenzintensität wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Waschen bestimmt: 0 h; 0,5 h; 1 h; 2 h; 3 h und 4 h. Wenn die Fluoreszenzintensität der Tetramerfärbung gering ist und das Tetramer schnell dissoziiert, so spricht dies für eine niedrige Avidität der T-Zelle zu den MHC-Peptid-Liganden des Tetramers. Ist dagegen die Tetramerbindung über einen längeren Zeitraum stabil, zeigt die T-Zelle eine höhere Avidität. TyrF8 T-Zellen zeigten zum Zeitpunkt 0 h eine niedrigere Fluoreszenzintensität der Tetramerfärbung (MFI = 182,3) im Vergleich zu IVS B T-Zellen, die das Tetramer mit höherer Intensität banden (MFI = 593,0). Nach 2 h waren nur noch 4,2 % der TyrF8 T-Zellen Tetramer-positiv, im Gegensatz zu 69,4 % Tetramer-positiven IVS B ZTL. Der YMN-spezifische T-Zellklon TyrF8 zeigte somit eine niedrigere Avidität zu dem A2-YMD-Tetramer als der YMD-spezifische T-Zellklon IVS B. Die Spezifität der Tetramerfärbung wurde mit Hilfe zweier Kontrolltetramere überprüft. Eines bestand aus HLA-B7-Molekülen, die ein Peptid vom Zytomegalovirus präsentieren (B7pp65- Tetramer, freundlicherweise von Prof. D. Busch zur Verfügung gestellt). Zusätzlich wurde ein HLA-A2-pp65-Kontrolltetramer (A2pp65-Tetramer, ebenfalls von Prof. D. Busch) verwendet. Es konnte keine Bindung dieser Kontrolltetramere

beobachtet werden. Dieses Experiment verdeutlichte sehr eindrucksvoll, dass der YMN-Peptid-spezifische T-Zellklon TyrF8 A2-YMD-Tetramere schlechter binden konnte als der YMD-spezifische T-Zellklon IVS B. Die Spezifität des T-Zellklons für Tyrosinase-Peptid mit einer einzelnen veränderten Aminosäure führte zu unterschiedlichem Bindeverhalten des A2-YMD-Tetramers. Mit Hilfe der Tetramerverfärbung konnte gezeigt werden, dass YMN-spezifische TyrF8 T-Zellen TZR mit niedriger Avidität für den A2-YMD-Liganden trugen als YMD-spezifische IVS B T-Zellen. Das Tetramer stellte sich somit als ein gutes Werkzeug für die Analyse der Avidität weiterer T-Zellklone heraus.

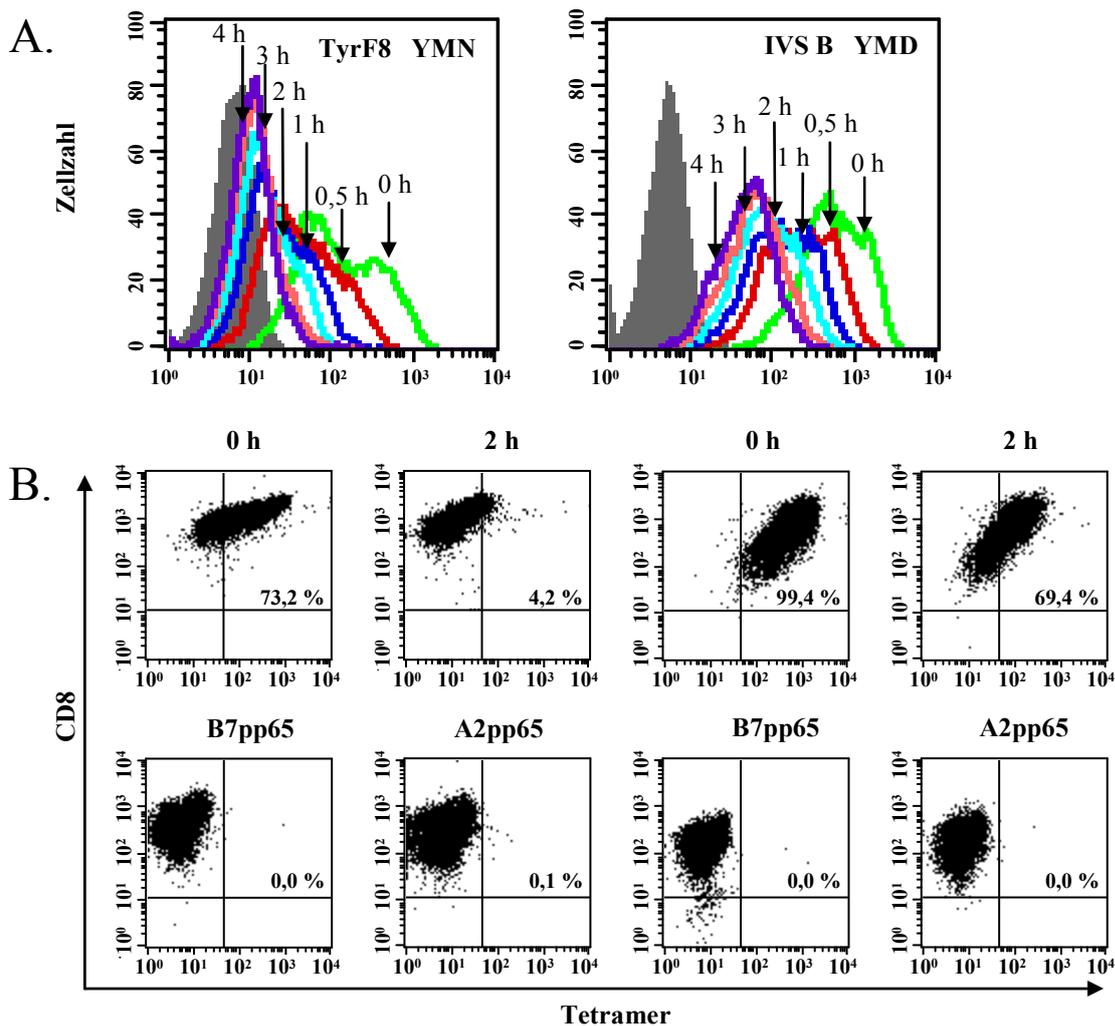


Abbildung 4.14 Tetramerverfärbung und -dissoziation von TyrF8 und IVS B T-Zellen. **A.** TyrF8 und IVS B T-Zellen wurden mit PE-konjugiertem HLA-A*0201/htyr369-377-Tetramer (A2-YMD) und APC-konjugiertem CD8-Antikörper gefärbt. Nach Inkubation wurde überschüssiges Tetramer abgewaschen und ein HLA-A2-spezifischer Antikörper zugesetzt, der erneutes Binden von Tetramer an die Zelloberfläche verhindern sollte. In den Histogrammen sind für beide T-Zellklone die Fluoreszenzintensitäten der Tetramerverfärbung zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Waschen dargestellt: 0 h (grüne Kurve); 0,5 h (rote Kurve); 1 h (blaue Kurve); 2 h (türkise Kurve); 3 h (pinkfarbene Kurve) und 4 h (lila Kurve). **B.** In der oberen Reihe der Streudiagramme sind die CD8/Tetramer-Doppelfärbungen zum Zeitpunkt 0 h und 2 h mit Angabe der Prozentanteile doppelt positiver Zellen gezeigt. In der darunter liegenden Reihe sind die dazugehörigen Färbungen mit den beiden Kontrolltetrameren B7pp65 und A2pp65 zu sehen.

4.2.3 IFN- γ -Sekretion von TyrF8- und IVS B-Zellen nach Peptid-Stimulation

Der HLA-A2-spezifische TyrF8 T-Zellklon wurde mit Hilfe von YMN-Peptid-beladenen APZ generiert. IVS B T-Zellen wurden aus einem Melanom-Patienten isoliert und durch mehrmalige Stimulation mit Melanomzellen erhalten. In diesem Teil sollte nun die Funktionalität dieser bereits bestehenden Melanom-Antigen-spezifischen T-Zellen überprüft werden und später mit den im Rahmen dieser Arbeit neu generierten T-Zellklonen verglichen werden.

Um die Spezifität dieser beiden T-Zellklone für ihre MHC-Peptid-Liganden zu untersuchen, wurden synthetische YMN- bzw. YMD-Peptide auf T2-Zellen geladen. T2-Zellen exprimieren wegen eines Defekts im „Transporter assoziiert mit Antigen-Prozessierung“ (TAP) hauptsächlich leere HLA-A2-Moleküle auf der Oberfläche. Diese leeren HLA-A2-Moleküle können exogen mit Peptiden beladen werden. Auf diese Weise werden homogene HLA-A2-Tyrosinase-Peptid-Liganden präsentiert.

Wie in Abbildung 4.15 gezeigt, erkannten TyrF8 ZTL beide Tyrosinase-Peptide, das natürliche YMD- und das vorhergesagte YMN-Peptid, sezernierten allerdings mehr IFN- γ bei Kontakt mit YMN-Peptid, gegen das sie induziert worden waren (118 pg/ml verglichen mit 809 pg/ml). IVS B ZTL hingegen setzten nur kleine Mengen IFN- γ frei und erkannten nur die natürliche Form des Peptids (44 pg/ml). Nicht beladene oder mit irrelevantem Influenza-Peptid (Flu-Peptid) beladene T2-Zellen führten zu keiner IFN- γ -Ausschüttung.

Diese Ergebnisse zeigten, dass minimale Unterschiede im präsentierten Peptid schon zu einer Verminderung oder sogar einem Verlust der Funktionalität der T-Zellklone führen konnten.

Neben diesem artifiziellen T2-System sollte nun die Reaktivität gegenüber verschiedenen Melanomzelllinien getestet werden. Zu diesem Zweck wurden die ZTL-Klone mit Sk Mel 28 (HLA-A2⁻, Tyrosinase⁺), Mel A375 (HLA-A2⁺, Tyrosinase⁻), Mel 624.38 (HLA-A2⁺, Tyrosinase⁺) und Mel/IL-2 (HLA-A2⁺, Tyrosinase⁺) kokultiviert und die IFN- γ -Freisetzung mittels ELISA gemessen. Die Melanomzelllinien Sk Mel 28 und Mel A375 dienten als Kontrollen und führten zu keiner IFN- γ -Freisetzung. Bei Kontakt mit HLA-A2-Tyrosinase-Peptid präsentierenden Zellen (Mel 624.38 und Mel/IL-2) wurden von TyrF8 und IVS B ZTL ähnliche Mengen IFN- γ sezerniert (TyrF8 144 bzw. 129 pg/ml; IVS B 90 bzw. 106 pg/ml).

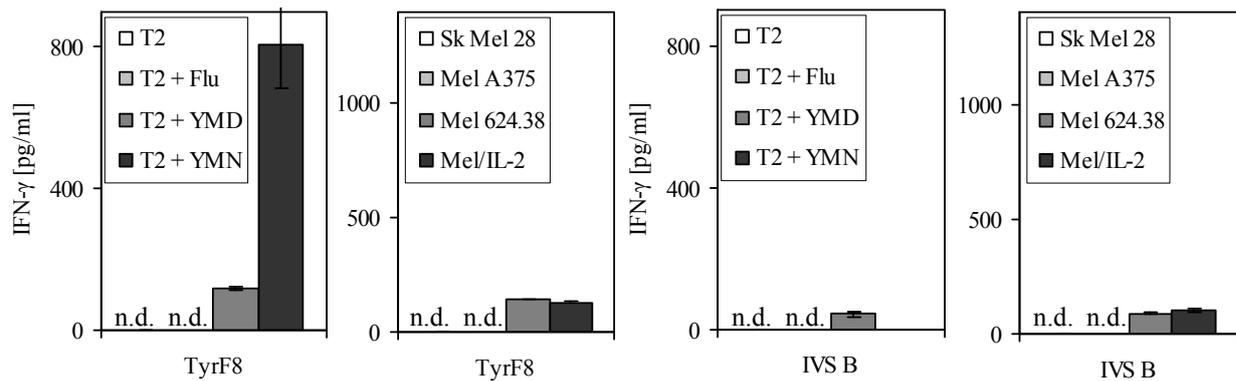


Abbildung 4.15 IFN- γ -Freisetzung von TyrF8 und IVS B ZTL. Vor Zugabe der entsprechenden T-Zellklone wurden T2-Zellen (mit hauptsächlich leeren HLA-A2-Molekülen auf der Oberfläche) 2 h lang exogen entweder mit 10 μ M irrelevanten Influenza-Peptid (Flu) oder Tyrosinase-Peptid YMDGTMSQV (YMD) bzw. YMN \overline{N} GTMSQV (YMN) beladen. In den beiden linken Balkendiagrammen ist die INF- γ -Sekretion vom TyrF8 T-Zellklon, in den beiden rechten Balkendiagrammen die INF- γ -Sekretion vom IVS B T-Zellklon zu sehen. Das jeweils linke Balkendiagramm zeigt die Menge IFN- γ , die von 2×10^3 aktivierten ZTL während 24 h langer Koinkubation mit 1×10^4 Peptid-beladenen T2-Zellen sezerniert wurde. Das jeweils rechte Balkendiagramm zeigt die Reaktionen von 2×10^3 auf 1×10^4 Zellen der verschiedenen Melanomzelllinien: Sk Mel 28 (HLA-A2⁻, Tyrosinase⁺), Mel A375 (HLA-A2⁺, Tyrosinase⁻), Mel 624.38 (HLA-A2⁺, Tyrosinase⁺) und Mel/IL-2 (HLA-A2⁺, Tyrosinase⁺). IFN- γ in den Überständen wurde mittels ELISA nachgewiesen. Mittelwerte und ihre Standardabweichung stammen von Koinkubations-Duplikaten. Es konnte keine IFN- γ -Sekretion nach Koinkubation mit unbeladenen, Flu-beladenen T2-Zellen oder Kontrollmelanomzelllinien detektiert werden (n.d. = nicht detektierbar).

4.2.4 Zytotoxische Aktivität von TyrF8 und IVS B T-Zellen

Als Nächstes sollte die Fähigkeit beider T-Zellklone getestet werden, verschiedene Zielzellen zu töten. Aktivierte CD8⁺-T-Zellen töten Zellen, die spezifische Peptid-MHC-Klasse-I-Komplexe auf ihrer Oberfläche präsentieren. Daher kann die CD8⁺-T-Zell-Funktion, das Zerstören von Zielzellen, mit Hilfe von ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuchen nachgewiesen werden. Lebende Zellen nehmen radioaktives Natrium-Chromat (Na₂⁵¹CrO₄) auf und setzen spontan nur sehr geringe Mengen wieder frei. Wenn diese Zellen getötet und somit lysiert werden, so wird das radioaktive Chrom in den Überstand freigesetzt und kann gemessen werden.

Sowohl TyrF8 ZTL als auch IVS B ZTL waren in der Lage, HLA-A2⁺Tyrosinase⁺ Melanomzellen (Mel/IL-2) zu töten (siehe Abbildung 4.16). HLA-A2⁺Tyrosinase⁻ Tumorzellen (Mel A375) wurden nicht zerstört. Dies zeigte die Spezifität beider T-Zellklone für HLA-A2-Tyrosinase-Peptid-Liganden.

Die Affinität der TZR der beiden T-Zellklone wurde mit Hilfe der T2-Peptid-Titration ermittelt. T2-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen an YMN- bzw. YMD-Peptid beladen (10^{-5} M bis 10^{-10} M) und als Zielzellen in ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuche eingesetzt. Die halbmaximale Lyse gibt Information über die Affinität eines TZR des getesteten T-Zellklons gegenüber dem präsentierten Peptid-MHC-Komplex. TyrF8 ZTL waren in der Lage YMN- und YMD-beladene T2-Zellen zu töten, wobei T2-Zellen mit HLA-A2-YMN-Liganden auf der Oberfläche etwas besser lysiert wurden. IVS B hingegen tötete nur YMD-beladene T2-Zellen. Der TZR des TyrF8

T-Zellklons hat somit eine höhere Affinität zum HLA-A2-YMN-Liganden als zum HLA-A2-YMD-Komplex (halbmaximale Lyse: 4×10^{-8} M vs. 1×10^{-7} M). Am niedrigsten affin ist der TZR des IVS B T-Zellklons, der eine halbmaximale Lyse von 3×10^{-7} M zeigt. Unbeladene oder Flu-beladene T2-Zellen wurden nicht erkannt (Daten nicht gezeigt).

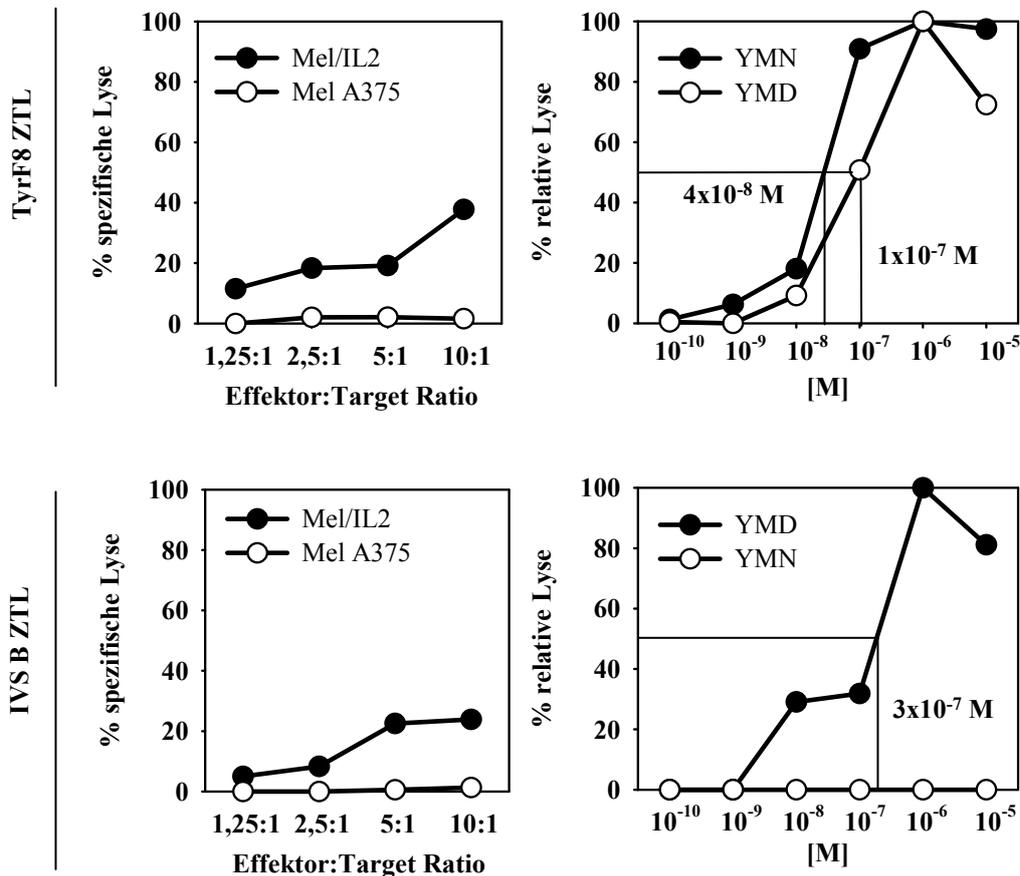


Abbildung 4.16 Zytotoxische Aktivität von TyrF8 und IVS B ZTL. Mit unterschiedlichen Mengen an YMN- bzw. YMD-Peptid-beladene T2-Zellen und Melanomzellen (Mel A375: $A2^+Tyr^-$ und Mel/IL-2: $A2^+Tyr^+$) wurden mit radioaktiven ^{51}Cr markiert und als Targetzellen in ^{51}Cr -Freisetzungs-Versuche eingesetzt. Die Melanomzellen wurden mit verschiedenen Zellzahlen an TyrF8 und IVS B Effektorzellen 4 h lang zusammen inkubiert. 10.000 Peptid-beladene T2-Zellen wurden mit 1.000 Effektorzellen kultiviert. Das freigesetzte radioaktive ^{51}Cr wurde gemessen und % spezifische bzw. % relative Lyse berechnet.

In Tabelle 4.2 wird die lytische Aktivität beider T-Zellklone gezeigt. Mit Hilfe von Regressionsanalysen wurde bestimmt, wie viele Effektorzellen für 35 % Lyse der Zielzellen benötigt würden. Die Anzahl der Effektorzellen für 35 % Lyse wird als eine lytische Einheit (LE) bezeichnet. Beispielsweise werden 9.412 TyrF8 bzw. 13.860 IVS B T-Zellen benötigt, um 35 % der Mel/IL-2-Zellen zu lysieren. Um 10^6 der Zielzellen zu töten, würden vom TyrF8 T-Zellklon 106 LE ($10^6/9.412$), vom IVS B T-Zellklon 72 LE ($10^6/13.860$) benötigt (siehe auch Tabelle 4.2). Diese Zahlen zeigen, dass etwas weniger TyrF8 als IVS B T-Zellen zu 35 %igen

Lyse von Mel/IL-2 führen. TyrF8 war somit besser in der Lage, die Melanomzelllinie Mel/IL-2 zu töten.

Tabelle 4.2 Lytische Aktivität von TyrF8 und IVS B ZTL

Klone	halbmaximale relative Lyse		LE (35 %)		LE/10 ⁶	
	YMN [M]	YMD [M]	Mel A375	Mel/IL-2	Mel A375	Mel/IL-2
TyrF8	4x10 ⁻⁸	1x10 ⁻⁷	-	9.412	-	106
IVS B	n.d.*	3x10 ⁻⁷	-	13.860	-	72

*n.d. = nicht detektierbar

4.2.5 Oberflächenexpression von „Fitness“-Markern

Da die beiden T-Zellklone TyrF8 und IVS B unterschiedlich stark proliferierten, wurde die Expression einiger Oberflächenmarker analysiert, die mit der „Fitness“ von T-Zellen in Verbindung gebracht werden. Der Begriff „Fitness“ bezeichnet in diesem Zusammenhang die Fähigkeit induzierter T-Zellen, in Antigen-freier Umgebung zu überleben. Zusätzlich wurde die Expression einiger regulatorischer Moleküle und einiger T-Zellmarker analysiert. Folgende Oberflächenmoleküle wurden in Abbildung 4.17 mit spezifischen Antikörpern gefärbt: CD25 (α -Kette des IL-2-Rezeptors), IL-15R (Rezeptor für das Zytokin IL-15), CTLA-4 (auch CD152, Rezeptor für CD80 und CD86, negative Regulation von T-Zellen), CD28 (ebenfalls Rezeptor für CD80 und CD86, positive Regulation naiver T-Zellen), CCR7 (Chemokinrezeptor, zuständig für die Wanderung der T-Zellen in die Lymphknoten), CD3 (assoziiert mit dem TZR) und CD8 (Ko-Rezeptor für MHC-Klasse-I-Moleküle).

Beide T-Zellklone zeigten vergleichbare Mengen an CD3 und CD8 auf der Oberfläche. Auch CTLA-4-Moleküle, die bei Bindung an CD80 und CD86 zu negativer Regulation aktivierter T-Zellen führen, konnten nachgewiesen werden (ca. zweifache Expression). Sowohl der Rezeptor für IL-15 als auch CD28, wichtig für die Aktivierung naiver T-Zellen, wurden nicht exprimiert. Die Expression der α -Kette des Rezeptors für IL-2 (CD25) und von CCR7 unterschied sich zwischen TyrF8 und IVS B T-Zellen. Bei TyrF8 konnten etwas mehr Moleküle beider Rezeptoren auf der Oberfläche nachgewiesen werden als bei IVS B. CD25-Expression zeigt die Fähigkeit, auf sezerniertes Zytokin IL-2 reagieren zu können. CCR7 ist für die T-Zelle wichtig, um in infiziertes Gewebe zu gelangen und in die Lymphknoten zurückzukehren.

Daher ließen die Unterschiede in der Oberflächenexpression dieser beiden Moleküle auf eine bessere Fitness der TyrF8 ZTL schließen.

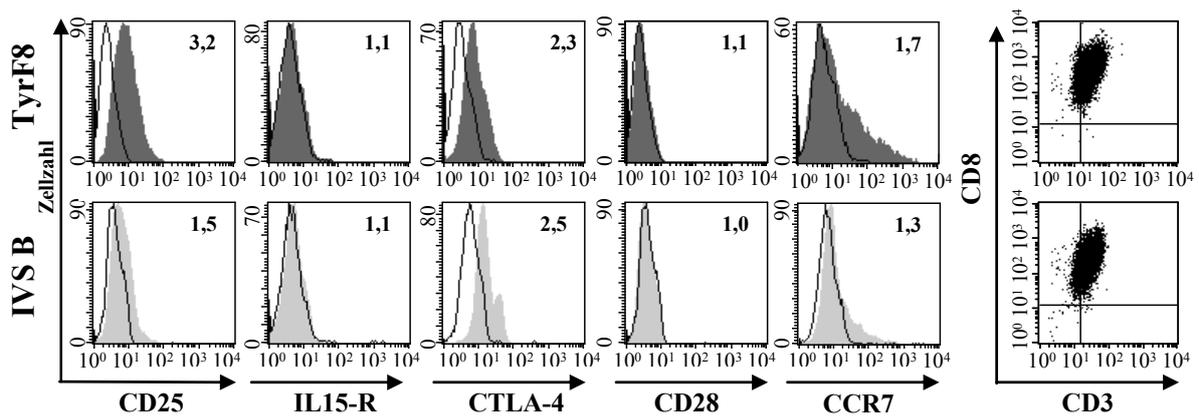


Abbildung 4.17 Expression einiger „Fitness“- und Oberflächenmarker auf TyrF8 und IVS B T-Zellen. TyrF8 und IVS B T-Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen folgende Fitnessmarker gefärbt: CD25, IL-15-Rezeptor (IL-15R), CTLA-4, CD28, CCR7, CD3 und CD8. In den Histogrammen ist die Expression dieser Oberflächenmoleküle für TyrF8 ZTL als gefüllte, dunkelgraue Kurven und für IVS B ZTL als gefüllte, hellgraue Kurven dargestellt. Die schwarzen Kurven zeigen die jeweiligen Isotyp-Kontrollen. Die Zahlen in den Histogrammen zeigen die x-fache Expression. Die Doppelexpression von CD3 und CD8 ist in den daneben abgebildeten Streudiagrammen zu sehen.

4.2.6 T-Zell-Rezeptor Analyse

Um zu überprüfen, ob es sich bei TyrF8 und IVS B um T-Zellklone handelte, wurde eine T-Zell-Rezeptor Analyse durchgeführt. Von einem Klon wird gesprochen, wenn alle T-Zellen den gleichen Ursprung haben, d.h. aus einer einzelnen T-Zelle entstanden sind. Jede T-Zelle trägt viele identische Antigen-spezifische Rezeptor-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Diese Rezeptoren bestehen aus zwei unterschiedlichen Polypeptid-Ketten, der α - und β -Kette, die mittels Disulfid-Brücken verbunden sind. Momentan sind ca. 100 verschiedene Gene für die variable Region der α -Ketten ($V\alpha$) und ca. 80 unterschiedliche Gene für die variable Region der β -Kette ($V\beta$) bekannt. Eine T-Zelle kann ein oder zwei TZR α -Ketten in Kombination mit nur einer TZR β -Kette tragen. Das TZR-Repertoire einer T-Zelle kann mittels PCR mit geeigneten Primern (siehe Material 2.11, S. 30) amplifiziert und anschließend sequenziert werden. In den variablen Bereichen der α - und β -Kette, die mit dem Antigen in Kontakt treten, befinden sich die hochvariablen Regionen CDR1, CDR2 und CDR3 (CDR = „complementary-determining regions“), die für die große Diversität der TZR verantwortlich sind.

In Tabelle 4.3 sind die α - und β -Ketten (Nomenklatur nach Arden *et al.*, 1995) mit den jeweiligen Aminosäuresequenzen der CDR3-Regionen aufgeführt. Sowohl IVS B ZTL als auch TyrF8 ZTL tragen jeweils nur eine α - und eine β -Kette. In IVS B ZTL konnten $V\alpha 3$ - und $V\beta 14$ -Ketten, in TyrF8 ZTL $V\alpha 2$ - und $V\beta 5$ -Ketten nachgewiesen werden.

Es handelt sich folglich um verschiedene Klone, die unterschiedliche α - und β -Ketten exprimieren. Die CDR3-Regionen zeigten ebenfalls unterschiedliche Aminosäure-Sequenzen.

Tabelle 4.3 TZR-Repertoire von TyrF8 und IVS B

T-Zellklone	TZR	CDR3
TyrF8	AV2S1AJ28	DLSGAGSYQL
	BV5S2BD1.1BJ1.1	SSPRDSHTEA
IVS B	AV3S1AJ47	DAGEYGNKL
	BV14S1BD2.1BJ2.1	KLLGNEQ

4.3 *De-novo*-Induktion von Antigen-spezifischen CD8⁺-T-Zellen mit Hilfe von *ivtRNS*-beladenen DZ

Um HLA-A2-restringierte Tyrosinase-Peptid-spezifische T-Zellen zu erhalten, wurde ein Protokoll für eine *De-novo*-Induktion dieser Zellen entwickelt. Es sollte die Fähigkeit von *ivtRNS*-transfizierten DZ untersucht werden, Tumor-spezifische T-Zellen zu induzieren. Parallel wurden Zellen HLA-A2-positiver (Spender A: HLA-A*01/02, -B*08/*44, -Cw*05/*07; Spender C: HLA-A*02/*03, -B*35/*37, -Cw*04/*06) und HLA-A2-negativer Spender (Spender B: HLA-A*01/*26; -B*07/*57; -Cw*06/*07; Spender D: HLA-A*24/*26, -B*07/*44, -Cw*07/*16) verwendet, da die Peptid-Präsentation über Selbst-MHC-Moleküle im Gegensatz zur Peptid-Präsentation durch allogene MHC-Moleküle in ihrer Fähigkeit verglichen werden sollten, hoch avide T-Zellen zu generieren.

4.3.1 Protokoll für die *De-novo*-Induktion Antigen-spezifischer T-Zellen mit *ivtRNS*-beladenen DZ

Im Grunde sollten mit Hilfe des Protokolls für die *De-novo*-Induktion Antigen-spezifische CD8⁺-T-Zellen in zwei aufeinander folgenden Stimulationsrunden mit *ivtRNS*-beladenen DZ angereichert werden (siehe Abbildung 4.18). Acht Tage vor Beginn der *De-novo*-Induktion (Tag -8), wurden aus frischem Blut PBMC und aus ihnen mittels Plattenadhärenz Monozyten isoliert. Diese angereicherten Monozyten wurden zur Generierung von DZ nach etabliertem Protokoll verwendet (siehe Methoden 3.1.9, S.36). An Tag 0 der *De-novo*-Induktion wurden die DZ mit *ivtRNS* elektroporiert. Die DZ eines HLA-A2-positiven Spenders wurden mit 24 µg Tyrosinase-*ivtRNS*, dem ausgewählten Tumor-Antigen, transfiziert. Ausgehend von dieser *ivtRNS* sollte translatiertes Tyrosinase-Protein prozessiert und über Selbst-HLA-A2-Moleküle auf der Oberfläche der DZ präsentiert werden. Die DZ eines HLA-A2-negativen Spenders wurden mit 24 µg Tyrosinase-*ivtRNS* und 48 µg HLA-A2-*ivtRNS* elektroporiert. In diesem Ansatz stellen

die von der transferierten *ivt*RNS kodierten HLA-A2-Moleküle fremde MHC-Klasse-I-Moleküle dar, die nun auf diesen DZ exprimiert werden. Die prozessierten Tyrosinase-Peptide sollten also nicht nur über Selbst-MHC-Moleküle sondern auch über allogene HLA-A2-Moleküle präsentiert werden.

Ebenfalls an Tag 0 wurden autologe CD8⁺-T-Lymphozyten, d.h. T-Zellen des jeweils gleichen Spenders, mittels negativer Separation (siehe Methoden 3.2.1, S.37) angereichert. Diese negativ selektierten CD8⁺-T-Zellen wurden das erste Mal stimuliert, als sie 9 h nach Elektroporation zu den *ivt*RNS-beladenen mDZ in einem Verhältnis von 10:1 zugegeben wurden. Die *De-novo*-Induktion fand in Anwesenheit von IL-7 (10 ng/ml) statt. IL-2 (20 IU/ml) wurde zwei Tage später und dann alle drei Tage zugesetzt. Die zweite Stimulation der T-Zellkulturen erfolgte sieben Tage (Tag 7) nach der *De-novo*-Induktion wiederum mit *ivt*RNS-beladenen DZ. Nach weiteren sieben Tagen (Tag 14) wurden die HLA-A2-restringierten YMD-spezifischen T-Zellen mit Hilfe des PE-konjugierten HLA-A*0201/htyr369-377-Tetramers und eines Zellsortiergerätes (FACS) angereichert. Einige der sortierten T-Zellen wurden mittels limitierender Verdünnungen in 96-Loch-Rundboden-Platten ausgesät (5 Zellen/Loch; 1 Zelle/Loch; 0,3 Zellen/Loch). Die restlichen Tetramer-positiven Zellen wurden als Zelllinien kultiviert. Alle drei Tage wurde 50 IU/ml IL-2 und alle 7 Tage 5 ng/ml IL-7 und 10 ng/ml IL-15 zugesetzt. Beruhend auf eigenen Erfahrungen unseres Labors müssen CD8⁺-T-Zellen alle zwei Wochen restimuliert werden, um zu überleben und weiterhin proliferieren zu können. T-Zellklone und T-Zelllinien wurden deshalb alle 14 Tage unspezifisch mit Anti-CD3-Antikörper (freundlicherweise von Dr. E. Kremmer zur Verfügung gestellt, Institut für Molekulare Immunologie, GSF, München, Deutschland), bestrahlten PBMC (Pool aus fünf Spendern) und Zytokinen restimuliert.

Protokoll für die *De-novo*-Induktion Antigen-spezifischer T-Zellen mit *ivr*RNS-beladenen DZ

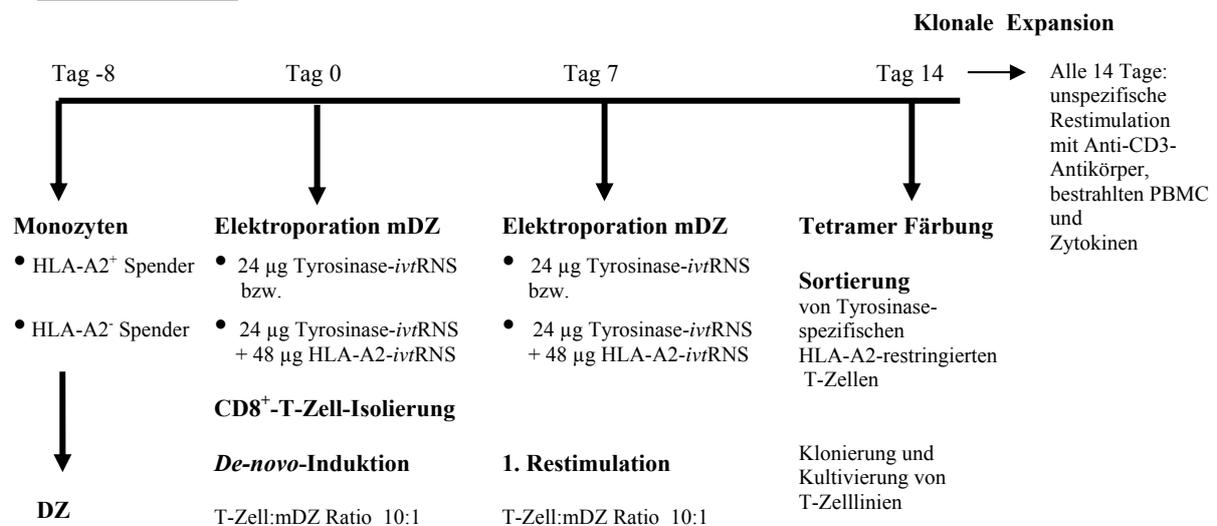


Abbildung 4.18 Protokoll für die *De-novo*-Induktion Antigen-spezifischer CD8⁺-T-Zellen mit *ivr*RNS-beladenen DZ. In dieser Abbildung ist der zeitliche Verlauf der *De-novo*-Induktion Antigen-spezifischer T-Zellen gezeigt. An Tag -8 wurde mit der Differenzierung von Monozyten der verschiedenen Spender, entweder HLA-A2-positiv oder HLA-A2-negativ, zu DZ (8 Tage) angefangen. Die reifen DZ wurden an Tag 0 mit den jeweiligen *ivr*RNS-Spezies elektroporiert. Anschließend wurden angereicherte autologe CD8⁺-T-Zellen mit diesen *ivr*RNS-beladenen DZ im Verhältnis 10:1 stimuliert. Die zweite Stimulation (1. Restimulation) erfolgte sieben Tage später (Tag 7). An Tag 14 nach der 1. Stimulation wurden die Zellkulturen mit Tetramer gefärbt und via Fluoreszenzaktivierter-Zellsortierung (FACS) isoliert. Die Zellen wurden entweder mittels limitierender Verdünnung ausgesät (5 Zellen/Loch; 1 Zelle/Loch; 0,3 Zellen/Loch) oder als Zelllinien kultiviert. Alle drei Tage wurden 50 IU/ml IL-2 und alle sieben Tage 5 ng/ml IL-7 und 10 ng/ml IL-15 zugesetzt. Die unspezifische Restimulation mit Anti-CD3-Antikörper, bestrahlten PBMC (Pool aus fünf verschiedenen Spendern) und Zytokinen erfolgte alle zwei Wochen.

4.3.2 Anreicherung der CD8⁺-T-Zellen mittels negativer Separation

PBMC könnten auch direkt mit Antigen-präsentierenden DZ kokultiviert werden, um T-Zelllinien zu erhalten. Die PBMC bestehen aus verschiedenen Zellarten, beispielsweise aus CD4⁺-T-Helferzellen und zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen, B-Zellen, NK- und NK-ähnlichen Zellen sowie Monozyten. Die von uns gewünschten Zellen sind die Antigen-spezifischen CD8⁺-T-Zellen mit der Eigenschaft, Melanomzellen zu töten. Nach *De-novo*-Induktion mit Hilfe von zwei Stimulationsrunden ist vermutlich nur ein sehr kleiner Anteil der CD8⁺-T-Zellen spezifisch für das Antigen Tyrosinase. Deshalb war der Gedanke, die CD8⁺-T-Zellen vor der 1. Stimulation vorzugsweise ohne Aktivierung durch Antikörperbindung anzureichern. Diese sogenannten „unberührten“ CD8⁺-T-Zellen können mittels negativer Separation erhalten werden. In einem käuflich erhältlichen Reagenz sind spezifische Antikörper enthalten, die fast alle Nicht-CD8⁺-T-Zellen anfärben. Diese spezifischen Antikörper werden dann mit einem sekundären Antikörper gefärbt, der an magnetische Kügelchen gekoppelt ist. Auf diese Weise wurden Nicht-CD8⁺-T-Zellen magnetisch markiert und konnten an eine magnetische Säule gebunden werden. Der Durchfluss enthielt die Antikörper-negativen CD8⁺-T-Zellen. Um die Anreicherung der CD8⁺-T-

Zellen zu überprüfen, wurde eine kleine Probe der Zellen vor und nach negativer Separation abgenommen und mit Antikörpern gegen CD3 und CD8 gefärbt. Nach negativer Selektion waren mehr als 80 % der Zellen CD8-positiv (siehe Abbildung 4.19).

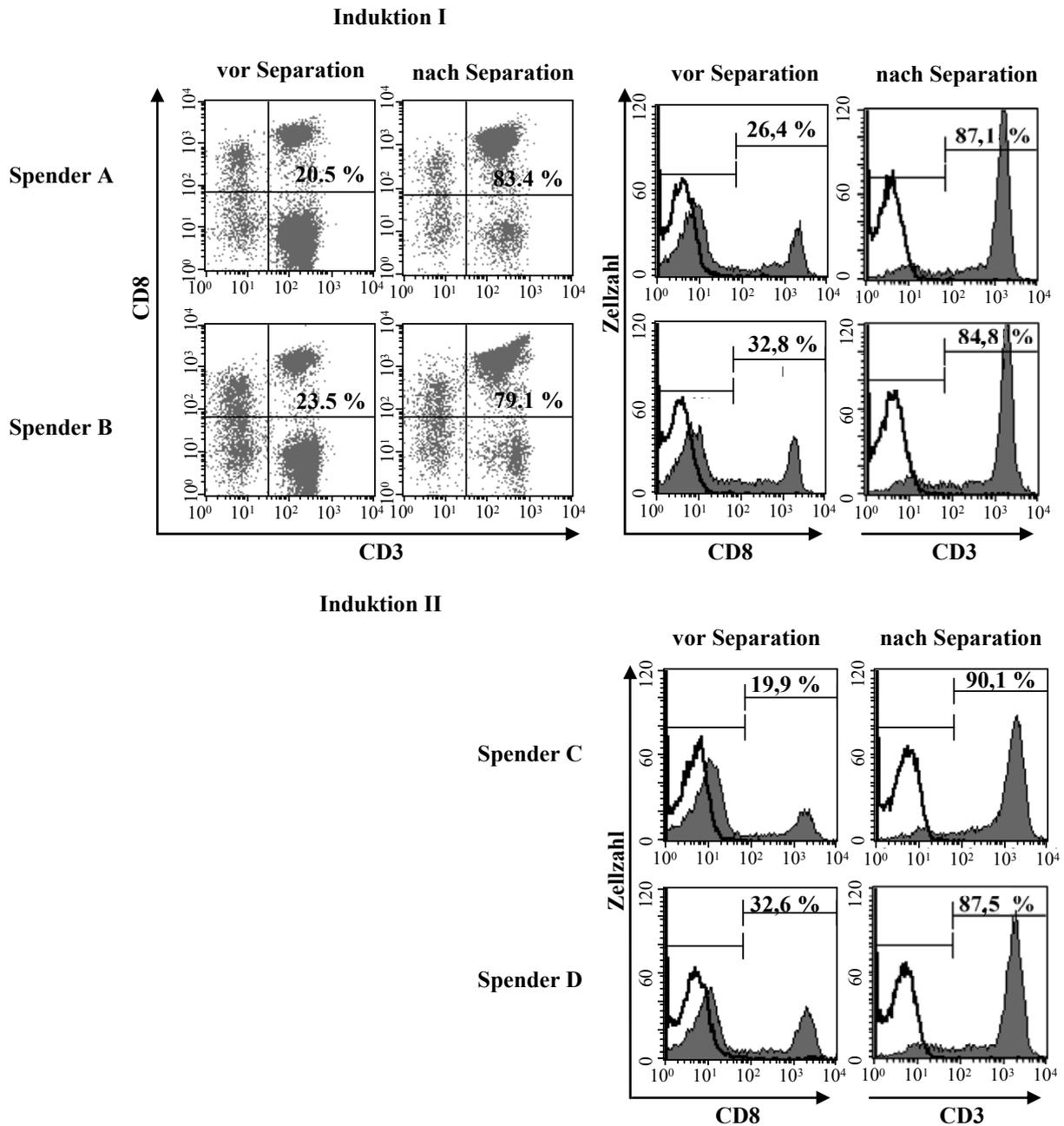


Abbildung 4.19 Anteil der CD8⁺-T-Zellen vor und nach negativer Separation. CD8⁺-T-Zellen wurden aus PBMC mit Hilfe käuflich erhältlicher magnetisch-markierter Antikörper angereichert (negative Separation). Eine kleine Menge an Zellen wurde von jedem Spender vor und nach negativer Separation abgenommen und mit CD3- und CD8-Antikörpern gefärbt. In den oberen beiden Reihen sind die Anreicherungen von CD8-positiven T-Zellen für die Spender A und B (*De-novo*-Induktion I) gezeigt. Im FACSTM Streudiagramm ist der Prozentanteil an CD3/CD8-doppelt positiven Zellen in jeweils oberen rechten Quadranten dargestellt. Auf der rechten Hälfte der Abbildung sind in FACSTM Histogrammen die Anteile an CD8-positiven Zellen (gefüllte, graue Kurven) mit den dazugehörigen Isotyp-Kontrollen (nicht gefüllte, schwarze Kurven) für alle Spender (A, B, C und D) beider *De-novo*-Induktionen I+II zu sehen.

4.3.3 Expression der MHC-Peptid-Liganden auf *ivt*RNS-transfizierten DZ

Als Nächstes wollten wir wissen, ob die *ivt*RNS-transfizierten DZ, die für die *De-novo*-Induktionen verwendet werden sollten, die Proteine der transferierten *ivt*RNS-Spezies exprimierten. Die HLA-A2-Expression wurde 7-8 h nach Elektroporation auf der Zelloberfläche (blau), die Tyrosinase-Expression nach 3 h intrazellulär (orange) mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen (siehe Abbildung 4.20). Dabei konnte eine Koexpression von HLA-A2-Molekülen und Tyrosinase-Protein in den DZ aller vier Spender detektiert werden.

Die Mengen an intrazellulärem Tyrosinase-Protein waren in allen DZ vergleichbar, die sowohl aus HLA-A2-positiven als auch aus HLA-A2-negativen Monozyten generiert worden waren. Die HLA-A2-Oberflächenexpression war auf den DZ höher, die von HLA-A2-positiven Spendern erhalten worden waren. Da die HLA-A2-Expression in diesem Fall von einem endogenen Gen kodiert wird und nicht transient von transferierter *ivt*RNS herrührt, war dieses Ergebnis nicht überraschend. Aus diesem Grund sind die Mengen an transgenen HLA-A2-Molekülen auf der Oberfläche von DZ, die aus Monozyten HLA-A2-negativer Spender generiert wurden, auch variabler. Die Expression der Proteine beider transfizierten *ivt*RNS-Spezies konnte somit in DZ nachgewiesen werden. Die Antigen-präsentierenden DZ konnten folglich für die *De-novo*-Induktion Antigen-spezifischer T-Zellen verwendet werden.

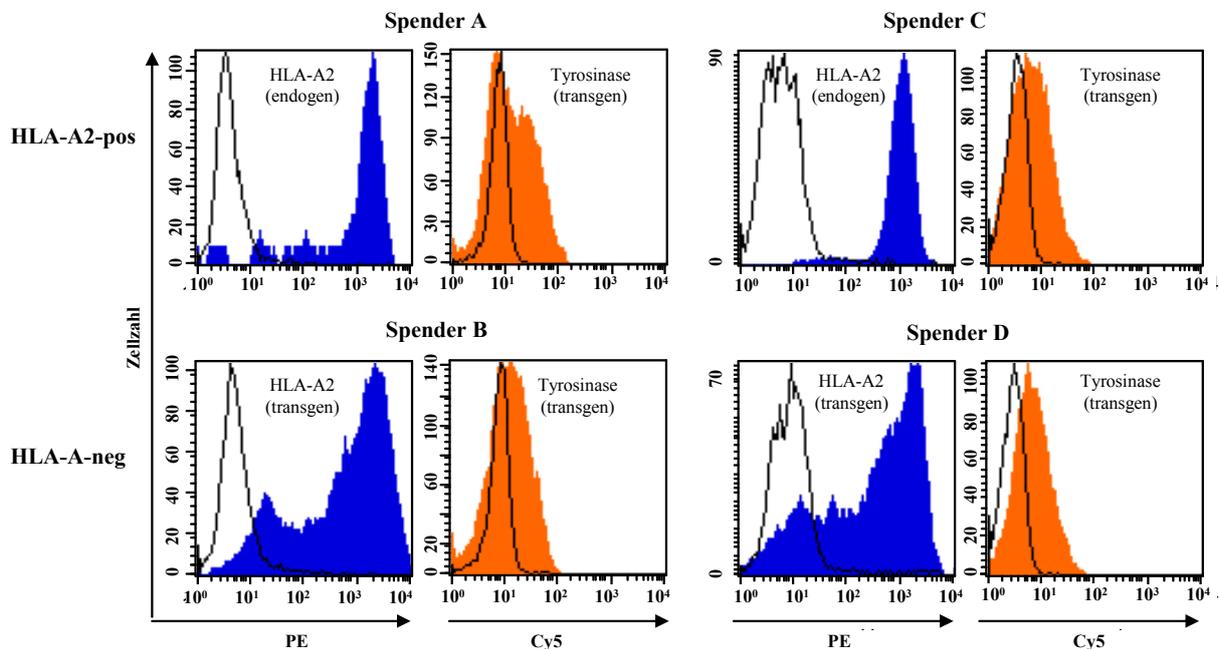


Abbildung 4.20 Expression von MHC-Peptid-Liganden auf *ivt*RNS-transfizierten DZ. Mature DZ von HLA-A2-positiven und -negativen Spendern wurden entweder nur mit 24 μ g Tyrosinase-*ivt*RNS oder mit beiden 24 μ g Tyrosinase-*ivt*RNS und 48 μ g HLA-A2-*ivt*RNS elektroporiert. Die Expression wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Antikörperfärbung und anschließender durchflusszytometrischer Analyse gemessen. 3 h nach Elektroporation wurde das Tyrosinase-Protein intrazellulär in allen vier Spendern A, B, C und D detektiert (orange gefüllte Kurven). Mittels Oberflächenfärbung wurde 7-8 h nach Elektroporation die HLA-A2-Expression gezeigt (blaue gefüllte Kurven). Die schwarzen Kurven zeigen die Färbungen der jeweiligen Isotyp-Kontrollen.

4.3.4 Epitop-Erkennung durch den ZTL-Klon TyrF8

Da die Expression beider Proteine erfolgreich mittels Antikörper-Färbung nachgewiesen werden konnte, sollte nun gezeigt werden, dass diese DZ in der Lage waren, T-Zellen zu aktivieren. So sollte geprüft werden, ob der MHC-Peptid-Komplex richtig prozessiert und auf der Oberfläche präsentiert wurde.

Zu diesem Zweck wurden die bekannten T-Zellklone JB4 und TyrF8 mit den *ivtRNS*-beladenen DZ der vier verschiedenen Spender kokultiviert. Die Fähigkeit der DZ, diese T-Zellklone zur IFN- γ -Sekretion zu stimulieren, wurde mittels ELISA gemessen (siehe Abbildung 4.21). Mit dem JB4 T-Zellklon, der HLA-A2 als ein Alloantigen erkennt, wurde die HLA-A2-Expression auf den DZ nachgewiesen (blaue Balken). Die korrekte Präsentation der HLA-A2-Tyrosinase-Peptid-Liganden wurde mit dem HLA-A*0201-restringierten Tyrosinase-Peptid-spezifischen TyrF8 ZTL-Klon gezeigt (orange Balken). Die Koinkubation der T-Zellen mit den *ivtRNS*-beladenen DZ begann 10 h nach Elektroporation, nachdem die MHC-Komplexe bereits gebildet worden waren.

T-Zellen alleine sezernierten kein IFN- γ . Die von HLA-A2-positiven Spendern erhaltenen DZ (für Spender A nicht durchgeführt (n.d.), nur für Spender C gezeigt) führten bei JB4 T-Zellen zur IFN- γ -Freisetzung. Aus Monozyten HLA-A2-negativer Spender generierte DZ zeigten keine Aktivierung von JB4 T-Zellen.

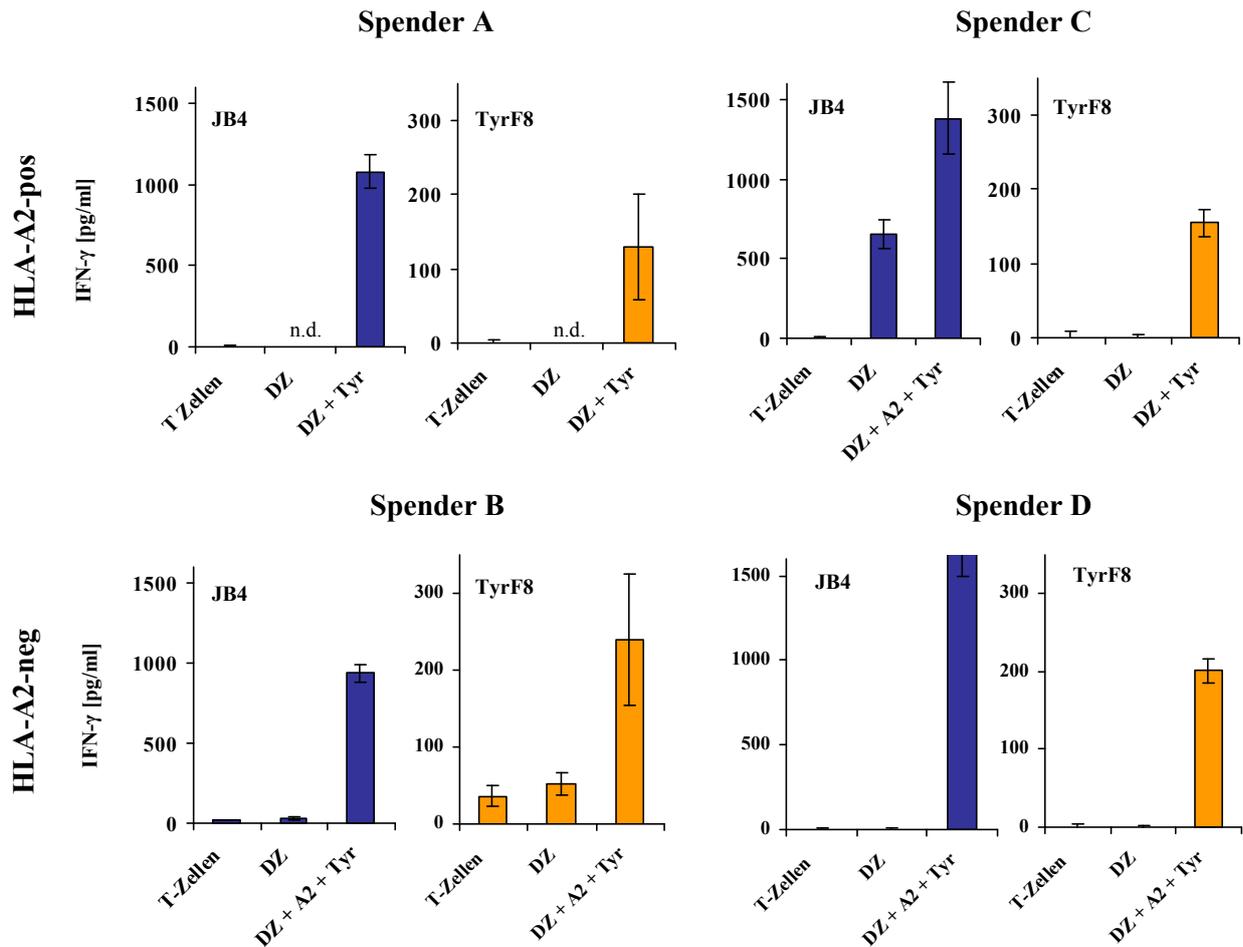


Abbildung 4.21 Stimulatorische Fähigkeiten *ivt*RNS-beladener DZ. Mature DZ von HLA-A2-positiven Spendern wurden mit 24 µg Tyrosinase-*ivt*RNS transfiziert. 24 µg Tyrosinase- und 48 µg HLA-A2-*ivt*RNS wurden in DZ von HLA-A2-negativen Spendern transfiziert. 10 h nach Elektroporation wurden die DZ sowohl mit JB4 als auch mit TyrF8 T-Zellen kokultiviert. Die Balkendiagramme zeigen die Mengen an IFN-γ, die von 2×10^4 aktivierten ZTL während 24 h langer Koinkubation mit 4×10^4 transfizierten DZ (Ratio 1:2) sezerniert wurden. Die blauen Balken stehen für die IFN-γ-Freisetzung von JB4 T-Zellen. In Orange ist die IFN-γ-Sekretion von TyrF8 T-Zellen gezeigt. IFN-γ wurde in den Überständen mittels ELISA gemessen. Mittelwerte und ihre Standardabweichungen rühren von Koinkubationsduplikaten her. n.d. steht für nicht durchgeführt.

*Ivt*RNS-beladene DZ aller Spender (HLA-A2-positiv und -negativ) waren in der Lage, TyrF8 ZTL zur Sekretion von IFN-γ in vergleichbaren Mengen zu stimulieren. Sowohl T-Zellen alleine als auch untransfizierte DZ zeigten keine IFN-γ-Sekretion und somit, dass die IFN-γ-Freisetzung auf der Präsentation von Tyrosinase-Peptiden über HLA-A2-Moleküle beruhte. Diese DZ wurden in den *De-novo*-Induktionen I und II verwendet.

4.3.5 Erste Suche nach HLA-A2-restringierten YMD-spezifischen CD8⁺-T-Zellen

Vor der Fluoreszenz-aktivierten-Zellsortierung sollte geprüft werden, ob die *De-novo*-Induktion zur Anreicherung Antigen-spezifischer T-Zellen mit *ivt*RNS-beladenen DZ erfolgreich war. An Tag 0 vor der 1. Stimulierung mit DZ wurde ein kleiner Teil an T-Zellen abgenommen und mit A2-YMD-Tetramer gefärbt, um die ursprüngliche Frequenz an HLA-A2-restringierten YMD-spezifischen T-Zellen zu bestimmen (siehe Abbildung 4.22). Einen Tag vor der Sortierung (Tag 6 nach 2. Stimulierung) wurde wiederum gefärbt. Für alle vier Spender konnte ein erhöhter Prozentsatz YMD-spezifischer T-Zellen gezeigt werden. Vor der ersten Stimulation konnten ca. 0,4-0,5 % der T-Zellen mit dem spezifischen Tetramer gefärbt werden. Am Tag 6 nach der 2. Stimulation war eine Erhöhung der Frequenz Antigen-spezifischer Zellen auf ca. 0,7-1,4 % zu sehen. In den Ansätzen mit Zellen, die von HLA-A2-negativen Spendern erhalten worden waren, lag die Frequenz etwas höher als in den Zellkulturen der HLA-A2-positiven Spender. Eine erfolgreiche Anreicherung YMD-spezifischer T-Zellen war also möglich und eine Sortierung dieser Zellkulturen erschien deshalb viel versprechend.

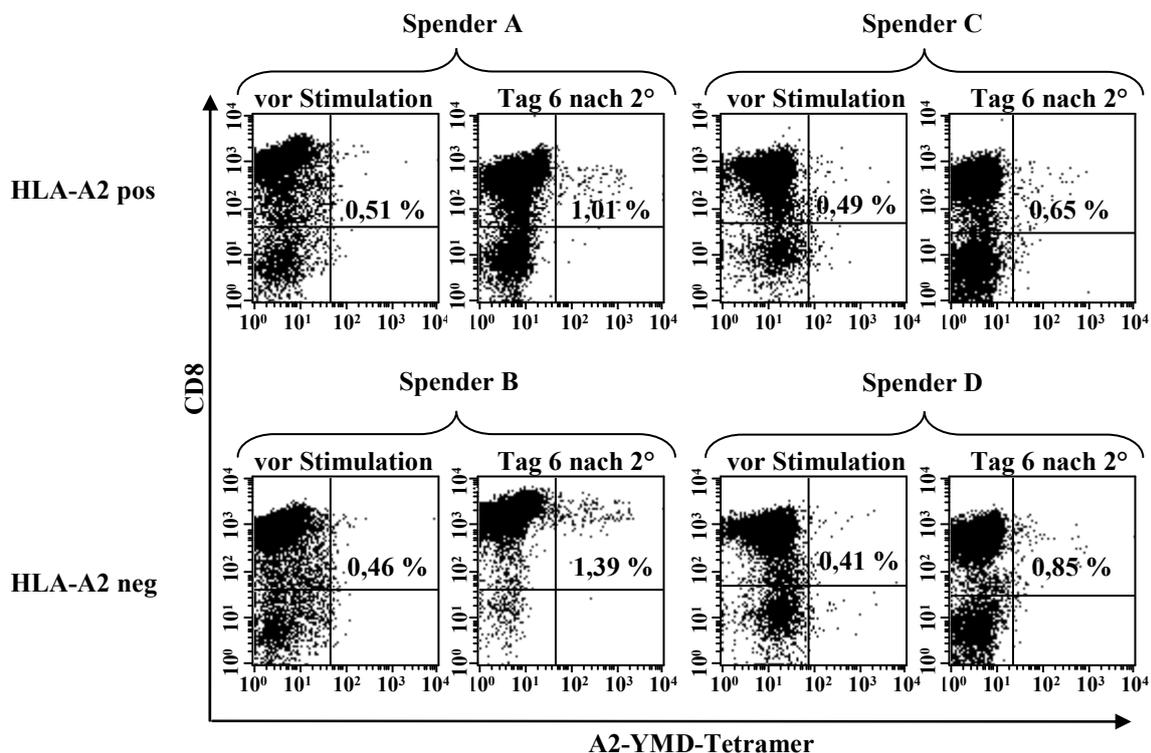


Abbildung 4.22 Anreicherung HLA-A2-restringierter YMD-spezifischer CD8⁺-T-Zellen nach zwei Stimulationsrunden. Wenige Zellen der Kulturen aller Spender (Spender A und C: HLA-A2-positiv; Spender B und D: HLA-A2-negativ) wurden vor der 1. Stimulierung und an Tag 6 nach der 2. Stimulierung abgenommen, mit CD8-Antikörper und dem A2-YMD-Tetramer gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Doppeltpositive Zellen sind in den oberen rechten Quadranten zu sehen und als Zahlen in Prozent angegeben.

4.4 Selektion Peptid-spezifischer T-Zelllinien

Jeder einzelne Schritt des *De-novo*-Induktions-Protokolls war geprüft worden, um sicherzustellen, dass die Antigen-spezifischen T-Zellen erfolgreich stimuliert werden konnten. Für weitere Analysen wurden nun diejenigen T-Zellen, die T-Zellrezeptoren für HLA-A2-Tyrosinase-Peptid trugen, aus den induzierten T-Zellkulturen isoliert. Insgesamt wurden zwei *De-novo*-Induktionen I+II mit unabhängigen Spendern (jeweils ein HLA-A2-positiver und ein -negativer Spender) und eine weitere Sortierung (III) einer „aufgetauten“ Zellkultur des HLA-A2-negativen Spenders B der *De-novo*-Induktion I durchgeführt.

4.4.1 Sortierung der Peptid-spezifischen T-Zellen mit Hilfe von Tetramer

20-50 x 10⁶ T-Zellen einer jeden *De-novo*-Induktions-Kultur wurden mit PE-konjugiertem HLA-A*0201/htyr369-377-Tetramer und APC-konjugiertem CD8-Antikörper gefärbt. Zusätzlich wurde eine Färbung mit Propidiumjodid (PI) durchgeführt, um zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden zu können. PI ist eine fluoreszierende Substanz, die in die DNS toter Zellen interkaliert und somit tote Zellen färbt. Im FACS (IMI: MoFlo, TU: Avian) wurde ein Fenster („gate“) um die CD8⁺Tetramer⁺-Zellen gelegt. Die vereinzelt doppelt positiven T-Zellen passieren ein elektrisches Feld und werden in ein separates Auffang-Reagenzgefäß abgelenkt. Im Fall der *De-novo*-Induktion I und der Sortierung III wurde jeweils nur ein Fenster gelegt (siehe Abbildung 4.23). Bei der *De-novo*-Induktion II wurden die CD8⁺Tetramer⁺-Zellen markiert und zwei Populationen der Zellen von Spender D mit unterschiedlicher Fluoreszenzintensität selektiert: eine, die das Tetramer mit mittlerer Fluoreszenzintensität band (intermediär; MFI = 5,9) und eine, die das Tetramer mit hoher Fluoreszenzintensität band (hoch; MFI = 25,2).

Die CD8⁺Tetramer⁺-Zellpopulationen der *De-novo*-Induktionsansätze mit Zellen von HLA-A2-positiven Spendern (Spender A und C), bei denen Tumor-assoziierte Peptide über endogene MHC-Moleküle präsentiert wurden, zeigten dagegen Tetramerbindung von niedriger Fluoreszenzintensität. Im Gegensatz dazu waren bei CD8⁺Tetramer⁺-Zellen, die von HLA-A2-negativen Spendern (Spender B und D) erhalten worden waren, von deren DZ auch allogene HLA-A2-Tyrosinase-Peptid-Komplexe präsentiert wurden, höhere Fluoreszenzintensitäten detektierbar (MFI: 94 vs. 257; 3.963 vs. 5.887 bzw. 25.196). Einerseits zeigten diese mit Hilfe der Tetramerfärbung erhaltenen Sortierungsergebnisse, dass die *De-novo*-Induktionen T-Zellen hervorgebracht hatten, die in der Lage waren, HLA-A2-Tyrosinase-Peptid-Komplexe zu binden, andererseits deuteten die höheren Fluoreszenzintensitäten der Tetramerfärbungen der *De-novo*-

Induktionen, bei denen RNS-beladene DZ von HLA-A2-negativen Spendern verwendet worden waren, auf eine bessere Stimulation von T-Zellen mit vermutlich höher affinen TZR durch allogene HLA-A2-Peptid-Komplexe hin. Für weitere Analysen wurde ein Teil der sortierten Tetramer⁺-Zellen kloniert und die restlichen T-Zellen als Zelllinie kultiviert.

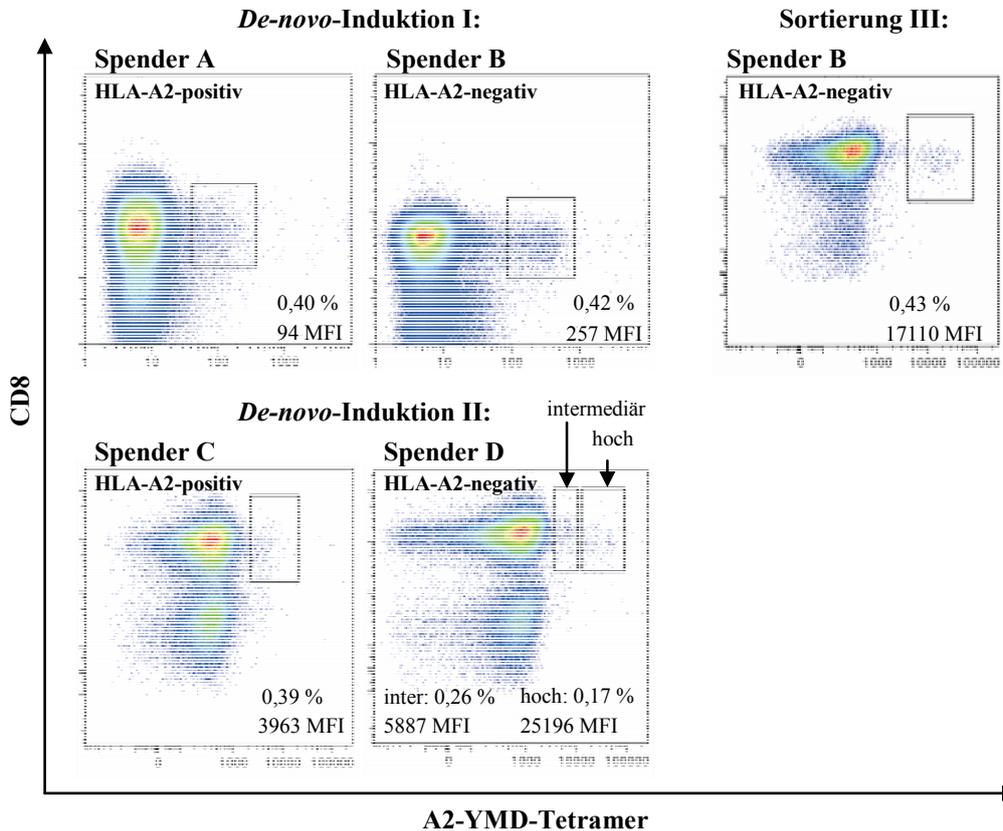


Abbildung 4.23 Tetramerfärbungen und Sortierungsdaten der induzierten T-Zellkulturen von HLA-A2-positiven und -negativen Spendern. Die Streudiagramme zeigen die Färbungen der *De-novo*-Induktions-Zellkulturen mit CD8-Antikörper und HLA-A2-YMD-Tetramer während der Fluoreszenz-aktivierten-Zellsortierung (FACS: MoFlo IMI, Avian TU). 50.000 Zellen wurden aufgenommen. Auf der linken Seite der Abbildung sind die *De-novo*-Induktionsansätze der HLA-A2-positiven Spender gezeigt (oben: Induktion I, unten: Induktion II). Auf der rechten Seite sind die Ansätze mit HLA-A2-negativen Spendern zu sehen (oben: Induktion I + Sortierung III, unten: Induktion II).

4.4.2 Tetramerbindung und -dissoziation mittels Tetramer-sortierter T-Zelllinien

Die sortierten, nicht klonierten T-Zelllinien wurden ca. acht Tage nach der zweiten unspezifischen Restimulation mittels erneuter Tetramerfärbung analysiert. Zwei wichtige Fragen waren zu beantworten: (1) sind die erhaltenen T-Zellen spezifisch für den HLA-A2-Tyrosinase-Peptid-Liganden und (2) wie hoch ist die Avidität der TZR dieser T-Zellen bestehend aus Bindungsstärke und Anzahl an TZR-Molekülen auf der Zelloberfläche?

In Abbildung 4.24 und 4.25 sind die gleichen Tetramerfärbungen, wie bei TyrF8- und IVSB T-Zellen schon gezeigt, dargestellt. Hierfür wurden wieder die beiden Parameter Fluoreszenzintensität der Tetramerfärbung und Tetramerdissoziation betrachtet. Eine höhere Intensität deutet auf eine bessere Interaktion des TZR mit seinem Liganden hin und je langsamer das Tetramer sich vom TZR ablöst, desto höher ist die Avidität dieser T-Zellen. Die Spezifität der Tetramerfärbung wurde wiederum mit den beiden irrelevanten Kontrolltetrameren B7pp65 und A2pp65 überprüft.

Die Tetramerfärbungen der Zelllinien (*De-novo*-Induktion I) des HLA-A2-positiven Spenders A und des HLA-A2-negativen Spenders B sind in Abbildung 4.24 gezeigt. Die Frequenz an Tetramer⁺-Zellen betrug 8,3 % in der Zellkultur, die mit autologen HLA-A2-positiven DZ induziert worden waren. Diese Zellen zeigten niedrige bis intermediäre Fluoreszenzintensitäten der Tetramerfärbung (MFI = ca. 200), wohingegen 80,6 % der T-Zellen des HLA-A2-negativen Spenders das Tetramer mit höherer Intensität banden (MFI = ca. 3000). Ein Vergleich beider T-Zelllinien ergab, dass nach 2 h nur noch 20 % der ursprünglich Tetramer-gefärbten Zellen in der Zelllinie des HLA-A2-positiven Spenders A Tetramer-positiv waren (1,7 % vs. 8,3 %). Im Gegensatz dazu waren in der Zelllinie des HLA-A2-negativen Spenders B noch 75 % der Zellen Tetramer-positiv (60,5 % vs. 80,6 %). Beide Zelllinien zeigten kaum Bindung des B7pp65-Tetramers (0,3-0,4 %). Zusätzlich wurde ebenfalls mit dem A2pp65-Tetramer gefärbt. Nur 0,4 % der Zellen des HLA-A2-positiven Spenders A banden das Tetramer, wohingegen 12,7 % der Zellen des HLA-A2-negativen Spenders B positiv waren. Die Färbung der PBMC dieses Spenders mit A2pp65-Tetramer vor der *De-novo*-Induktion zeigte keine Bindung und somit, dass es sich um T-Zellen handeln musste, die HLA-A2-Moleküle unabhängig von gebundenem Peptid als Alloantigen erkannten (Daten nicht gezeigt).

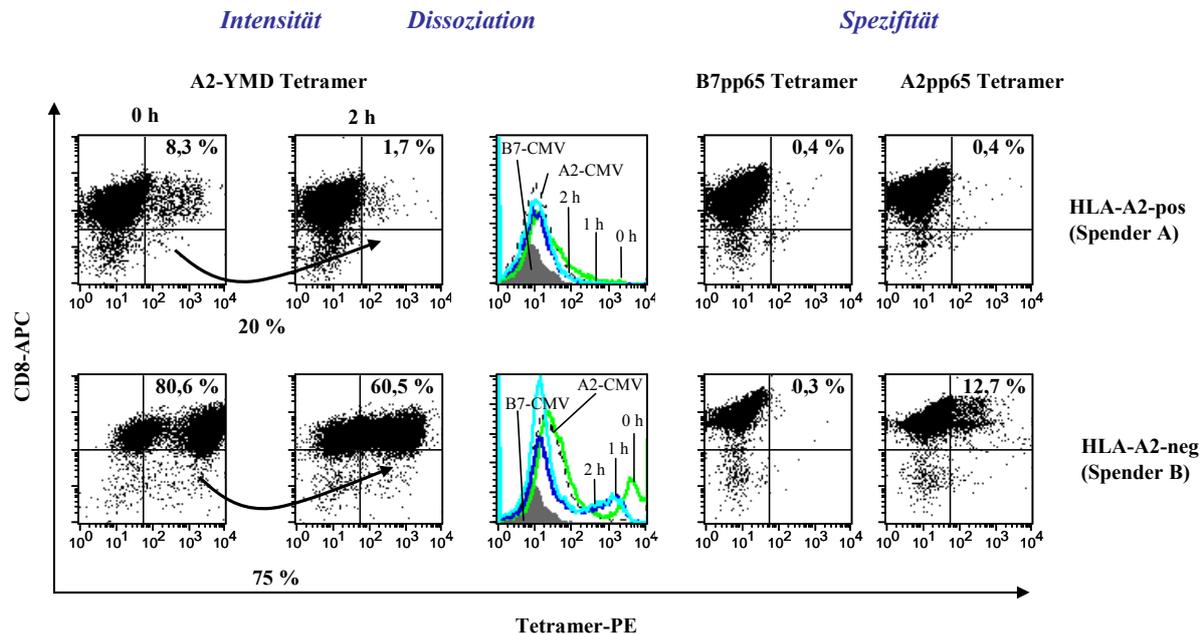
De-novo-Induktion I

Abbildung 4.24 Tetramerfärbung und -dissoziation von sortierten T-Zelllinien eines HLA-A2-positiven und -negativen Spenders. Beide Zelllinien wurden mit PE-konjugiertem HLA-A*0201/htyr369-377 Peptid/human β_2m Tetramer (A2-YMD) und APC-konjugiertem CD8-Antikörper gefärbt. Nach Inkubation wurde überschüssiges Tetramer abgewaschen und ein HLA-A2-spezifischer Antikörper zugesetzt, der erneutes Binden von Tetramer an die Zelloberfläche verhindern sollte. In der oberen Reihe sind die Tetramerfärbungen für den HLA-A2-positiven Spender A, in der unteren Reihe für den HLA-A2-negativen Spender B gezeigt. Links sind die CD8/Tetramer-Doppelfärbungen in Streudiagrammen zum Zeitpunkt 0 h und 2 h mit Angabe der Prozent doppelt positiver Zellen zu sehen. In den Histogrammen sind für beide T-Zelllinien die Fluoreszenzintensitäten der Tetramerfärbung zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Waschen dargestellt: 0 h (grüne Kurve); 1 h (blaue Kurve) und 2 h (türkise Kurve). Die gefüllte graue Kurve zeigt die Färbung mit dem Kontrolltetramer B7pp65, die gestrichelte schwarze Kurve die A2pp65-Färbung. Die Kontroll Tetramerfärbungen sind auf der rechten Hälfte der Abbildung ebenfalls in Streudiagrammen mit Angabe der Prozent gefärbter Zellen dargestellt.

In Abbildung 4.25 sind die Tetramerfärbungen der Zelllinien, die aus der *De-novo*-Induktion II erhalten wurden, gezeigt (Spender C: HLA-A2-positiv; Spender D: HLA-A2-negativ). Bei der Sortierung der Zellkultur des Spender D wurde eine andere Strategie verfolgt und eine Zelllinie mit intermediärer und eine mit hoher Fluoreszenzintensität selektiert und kultiviert.

Ca. 11 % der T-Zellen des HLA-A2-positiven Spenders C waren Tetramer-positiv und zeigten mittlere Fluoreszenzintensitäten (MFI = ca. 200). In den Zelllinien des HLA-A2-negativen Spenders D zeigten 22 % der T-Zellen mit intermediärer MFI und 78 % der T-Zellen mit hoher MFI eine spezifische Anfärbung mit dem Tetramer. Die mittlere Fluoreszenzintensität für letztgenannte T-Zell-Population lag wesentlich höher (MFI: 1000 bzw. 3000). Nach 2 h waren noch 55 % der ursprünglich Tetramer-gefärbten Zellen in der Zelllinie des HLA-A2-positiven Spenders C Tetramer-positiv (6,2 % vs. 11,2 %). 31 % der Zellen mit intermediärer Fluoreszenzintensität und 77 % der Zellen, die aufgrund hoher Intensität sortiert worden waren,

zeigten nach 2 h noch Tetramerfärbung (intermediär: 6,8 % vs. 21,7 %; hoch: 60,3 % vs. 78,2 %). Mit beiden Kontrolltetrameren konnten nur wenige T-Zellen gefärbt werden (0,1 %- 0,4 %). Die Menge an TZR auf der Zelloberfläche als wichtiger Faktor für die Avidität der TZR wurde mittels CD3-Antikörper-Färbung bestimmt. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten der CD3-Färbung der Zelllinien lagen zwischen 38 und 57 und unterschieden sich somit nur gering.

De-novo-Induktion II

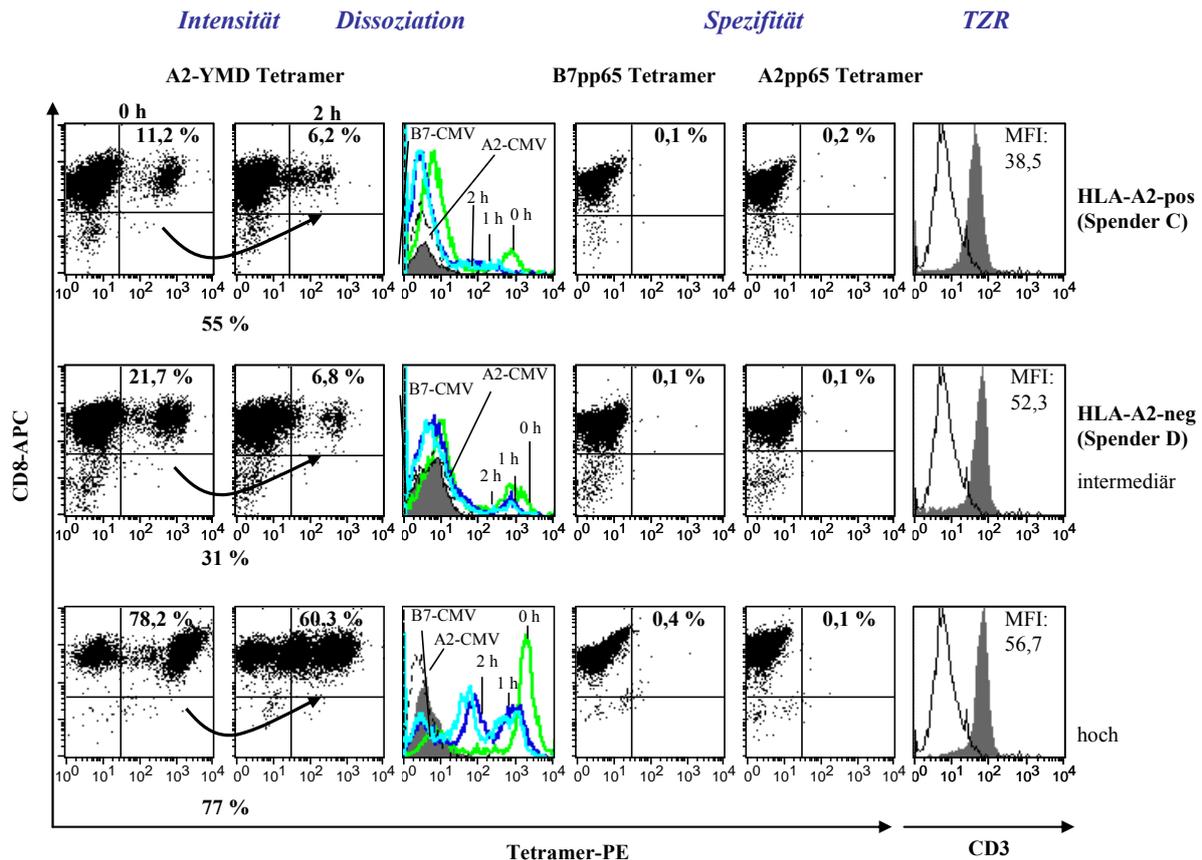


Abbildung 4.25 Tetramerfärbung und -dissoziation von sortierten T-Zelllinien eines HLA-A2-positiven und -negativen Spenders. Die Zelllinie des HLA-A2-positiven Spenders C und die beiden aufgrund ihrer Fluoreszenzintensität sortierten Zelllinien des Spenders D (intermediär und hoch) wurden mit PE-konjugiertem HLA-A*0201/htyr369-377 Peptid/human β_2m Tetramer (A2-YMD) und APC-konjugiertem CD8-Antikörper gefärbt. Die verschiedenen Färbeansätze und der Aufbau der Darstellung sind in Abbildung 4.24 beschrieben. Ganz rechts sind die Histogramme der jeweiligen CD3-Färbungen mit MFI gezeigt.

Diese Ergebnisse zeigten deutlich, dass T-Zellen mit TZR höherer Avidität, definiert durch Intensität der Tetramerfärbung und langsamer Dissoziation des Tetramers, in *De-novo*-Induktionskulturen von HLA-A2-negativen Spendern nicht aber in Kulturen von HLA-A2-positiven Spendern erhalten wurden. Dies deutet auf einen Vorteil bei der Isolierung hoch avider T-Zellen hin, wenn ein nicht negativ selektiertes T-Zell-Repertoire mit allogenen Peptid-HLA-Liganden stimuliert wird.

4.4.3 Sortierung Peptid-spezifischer T-Zellen via Streptamer

Da die T-Zellen aller bisher erhaltenen Zelllinien relativ schnell starben, und zwar Zelllinien mit Tetramerfärbung höherer Fluoreszenzintensität früher als Zelllinien, die mit niedrigeren Intensitäten gefärbt wurden, musste geprüft werden, ob eventuell die lange und starke Tetramerbindung an die T-Zellen Apoptose induziert hatte. Quervernetzungen der TZR, wie sie bei der Tetramerfärbung der Fall sind, können zur Aktivierung, Überstimulierung und Zelltod von T-Zellen führen. Deshalb wurde eine weitere Methode der Zellsortierung, die Streptamer-Technologie, mit der bisher verwendeten Tetramer-Technologie verglichen. Mit Hilfe von magnetisch-markierten Streptamer-Molekülen ist die reversible Färbung Antigen-spezifischer T-Zellen möglich. Die MHC-Monomere sind reversibel über sogenannte Strep-Tags an das Rückgrat (Strep-Tactin) gekoppelt. Durch Zugabe von Kompetitoren (D-Biotin), die mit wesentlich höherer Affinität an Strep-Tactin binden können als die MHC-Monomere, werden diese verdrängt. Einzelne MHC-Peptid-Komplexe lösen sich sehr schnell von den TZR. Der Phänotyp und die Funktion Streptamer-sortierter T-Zellen unterscheiden sich nicht von unbehandelten T-Zellen (Knabel *et al.*, 2002).

4.4.4 Vergleich von Streptamer-sortierten gegenüber Tetramer-sortierten T-Zellen bezüglich Tetramerbindung und -dissoziation

Um die beiden genannten Technologien vergleichen zu können, wurden bereits *De-novo*-induzierte eingefrorene T-Zellkulturen des HLA-A2-negativen Spenders B aufgetaut und einige Tage mit Zytokinen kultiviert. Die eine Hälfte der Zellen wurde mit Tetramer gefärbt und, wie in vorangegangenen Experimenten beschrieben, sortiert. Die andere Hälfte der Zellen wurde mit magnetisch-markierten Streptamer-Molekülen gefärbt und die Antigen-spezifischen T-Zellen über magnetische Säulen isoliert. Nach Eluierung der gebundenen Zellen wurde durch Zugabe von D-Biotin das Tetramer monomerisiert. Einige HLA-A2-restringierte, Tyrosinase-Peptid-spezifische T-Zellen wurden klonal ausgesät, die restlichen Zellen wurden als Zelllinien kultiviert.

Acht Tage nach der ersten unspezifischen Restimulation wurden die erhaltenen T-Zelllinien mit den verschiedenen Tetrameren analysiert (siehe Abbildung 4.26). In der Zelllinie, die aus der Streptamersortierung resultierte, waren 76 % der T-Zellen Tetramer⁺ und zeigten MFI von ca. 600. Die mittels Tetramer-sortierte Zelllinie zeigte 93 % Tetramer-positive Zellen und auch die Intensität der Tetramerfärbung lag höher (MFI = ca. 1000). Bei der Streptamer-sortierten Linie

waren nach 2 h noch 52 % (39,1 % vs. 75,8 %) bei der Tetramer-sortierten Linie sogar noch 73 % (68,3 % vs. 93,1 %) der Zellen Tetramer⁺. Mit dem B7pp65 Kontrolltetramer konnten kaum Zellen gefärbt werden (0,5-0,6 %). Die Streptamer-sortierte Zelllinie zeigte, verglichen mit der Tetramer-sortierten Zelllinie, einen höheren Anteil an A2pp65-positiven Zellen (5,3 % vs. 1,0 %). Dies deutete darauf hin, dass in der Streptamer-sortierten Zelllinie mehr T-Zellen enthalten sein könnten, die HLA-A2 als Alloantigen erkannten. Die CD3-Färbung war in ihrer Intensität identisch.

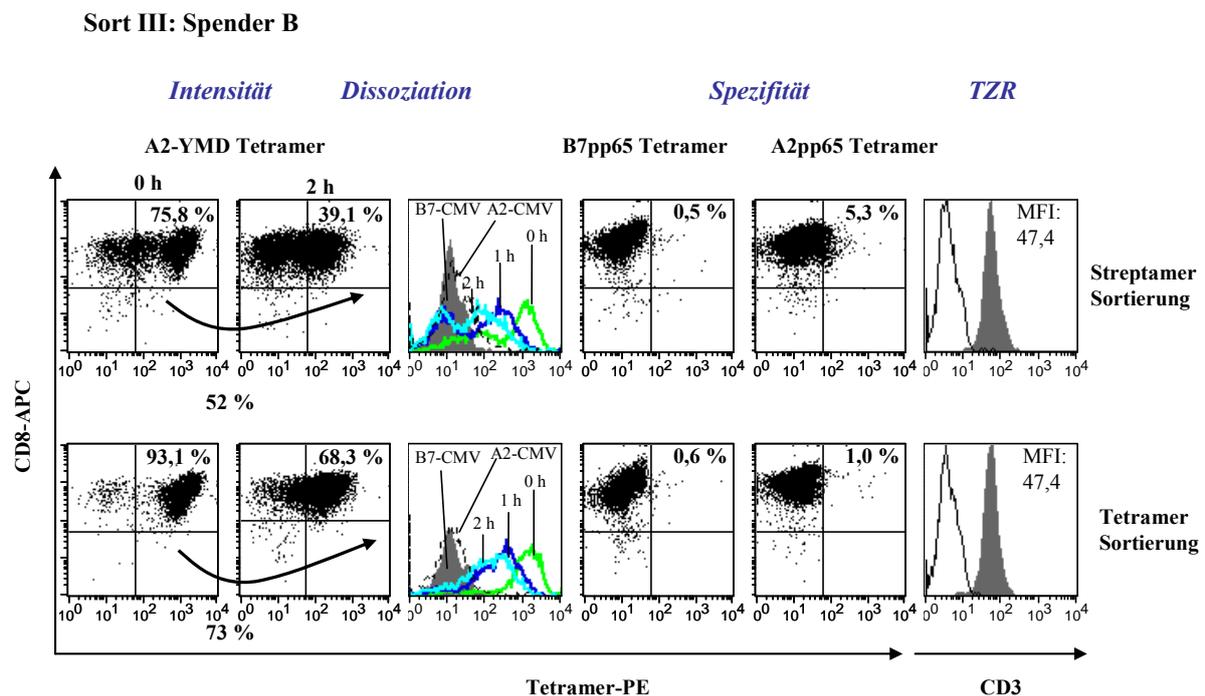


Abbildung 4.26 Vergleich Streptamer- versus Tetramer-sortierte T-Zelllinien bezogen auf Tetramerbindung und -dissoziation. Beide Zelllinien wurden mit PE-konjugiertem HLA-A*0201/htyr369-377 Tetramer (A2-YMD) und APC-konjugiertem CD8-Antikörper gefärbt. Nach Inkubation wurde überschüssiges Tetramer abgewaschen und ein HLA-A2-spezifischer Antikörper zugesetzt, der erneutes Binden von Tetramer an die Zelloberfläche verhindern sollte. In der oberen Reihe sind die Tetramerfärbungen für die mittels Streptamersortierung erhaltene Zelllinie dargestellt, in der unteren Reihe die Ergebnisse für die Tetramer-sortierte Zelllinie. Links sind die CD8/Tetramer-Doppelfärbungen in Streudiagrammen zum Zeitpunkt 0 h und 2 h mit Angabe der Prozent doppelt positiver Zellen zu sehen. In den Histogrammen sind für beide T-Zelllinien die Fluoreszenzintensitäten der Tetramerfärbung zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Waschen dargestellt: 0 h (grüne Kurve); 1 h (blaue Kurve) und 2 h (türkise Kurve). Die gefüllte graue Kurve zeigt die Färbung mit dem Kontrolltetramer B7pp65, die gestrichelte schwarze Kurve die A2pp65-Färbung. Die Kontroll Tetramerfärbungen sind auf der rechten Hälfte der Abbildung ebenfalls in Streudiagrammen mit Angabe der Prozent gefärbter Zellen dargestellt. Ganz rechts sind die Histogramme der jeweiligen CD3-Färbungen mit MFI gezeigt.

4.4.5 IFN- γ -Sekretion der T-Zelllinien

Alle erhaltenen T-Zelllinien wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, bei Kontakt mit Zielzellen IFN- γ zu sezernieren. Aus der *De-novo*-Induktion I und II wurden die HLA-A2-positiven Zelllinien A und C sowie die HLA-A2-negativen Zelllinien B, Di (aufgrund der Tetramerfärbung mit intermediärer Intensität) und Dh (Tetramerfärbung mit hoher Fluoreszenzintensität) generiert. Die Streptamer- und Tetramer-sortierten T-Zelllinien stammten beide aus dem HLA-A2-negativen Spender B.

Als Zielzellen wurden nicht beladene T2-Zellen, mit YMD-Peptid beladene T2-Zellen sowie die vier verschiedenen Melanomzelllinien Sk Mel 28 (HLA-A2⁻ Tyrosinase⁺), Mel A375 (HLA-A2⁺ Tyrosinase⁻), Mel 624.38 (HLA-A2⁺ Tyrosinase⁺) und Mel/IL-2 (HLA-A2⁺ Tyrosinase⁺) verwendet (siehe Abbildung 4.27). Da die T-Zellen der Linien oft zu einem sehr frühen Zeitpunkt starben, konnte nicht jede Zelllinie mit allen Zielzellen getestet werden. Die T-Zellen der HLA-A2-positiven Zelllinien A und C waren nach Kontakt mit keiner dieser Zelllinien in der Lage, IFN- γ zu sezernieren. Die Zelllinie B, die aus Zellen des HLA-A2-negativen Spenders B generiert worden war, zeigte Erkennung der unbeladenen und YMD-beladenen T2-Zellen, wobei die IFN- γ -Freisetzung bei Präsentation des spezifischen HLA-A2-YMD-Liganden höher war. Diese Differenz rührte von den Antigen-spezifischen T-Zellen her, der Hintergrund stammte von Allo-HLA-A2-spezifischen T-Zellen, die bei der *De-novo*-Induktion gegen die allogenen HLA-A2-Moleküle generiert worden waren. Die HLA-A2-negative, Tyrosinase-positive Sk Mel 28-Zelllinie führte zu keiner IFN- γ -Sekretion. Die IFN- γ -Freisetzung nach Kontakt mit HLA-A2⁺ Tyrosinase⁻ Mel A375 zeigte wieder den Allo-A2 Hintergrund. Mel 624.38 (A2⁺, Tyr⁺) und Mel/IL-2 (A2⁺, Tyr⁺) führten sogar zu höheren Mengen an sezerniertem IFN- γ in den Überständen. Die beiden Zelllinien Di und Dh waren in der Lage, während Koinkubation mit unbeladenen und YMD-beladenen T2-Zellen IFN- γ auszuschütten, wobei die Menge bei Präsentation des spezifischen HLA-A2-YMD-Komplexes wiederum höher war. Die T-Zelllinie Dh, die aufgrund hoher Intensität der Tetramerfärbung sortiert worden war, zeigte auch eine höhere IFN- γ -Freisetzung.

Diese Ergebnisse zeigten sehr schön, dass die T-Zelllinien der HLA-A2-negativen Spender zusätzlich zur Bindung und Dissoziation von Tetramer auch funktionell in Bezug auf ihre IFN- γ -Sekretion nach Erkennung des Peptid-HLA-Liganden überlegen waren.

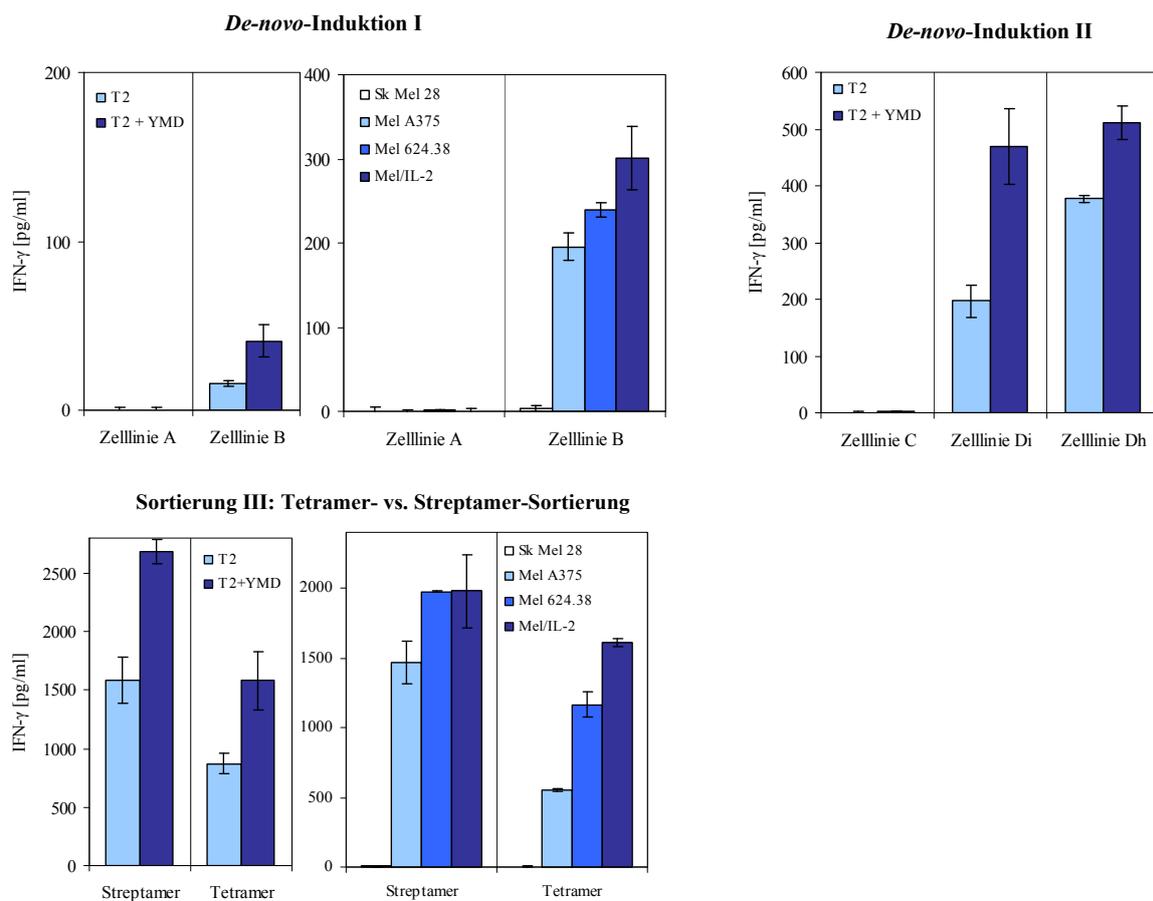


Abbildung 4.27 IFN- γ -Freisetzung aller erhaltenen Zelllinien. Orange Balken stehen für die IFN- γ -Sekretion HLA-A2-positiver Zelllinien, blaue Balken für die IFN- γ -Sekretion HLA-A2-negativer Zelllinien. Oben links ist die IFN- γ -Freisetzung der Zelllinien A und B der *De-novo*-Induktion I bei Kontakt mit unbeladenen und mit 10 μ M YMD-Peptid beladenen T2-Zellen gezeigt. Daneben ist die Kokultur mit den Melanomzellen Sk Mel 28 (HLA-A2⁻ Tyrosinase⁻), Mel A375 (HLA-A2⁺ Tyrosinase⁻), Mel 624.38 (HLA-A2⁺ Tyrosinase⁻) und Mel/IL-2 (HLA-A2⁺ Tyrosinase⁺) zu sehen. Oben rechts ist die IFN- γ -Sekretion der Zelllinien C, Di und Dh während Kokultur mit unbeladenen und YMD-beladenen T2-Zellen dargestellt. Darunter sind die Mengen an IFN- γ gezeigt, die von den via Streptamer- oder Tetramer-sortierten Zelllinien bei Kontakt mit allen genannten Zielzellen ausgeschüttet wurden. IFN- γ in den Überständen wurde mittels ELISA nachgewiesen. Mittelwerte und ihre Standardabweichung stammen von Koinkubationsduplikaten.

4.4.6 Zytotoxische Aktivität der T-Zelllinien

Als Nächstes sollte die Fähigkeit der T-Zelllinien untersucht werden, verschiedene Zielzellen zu töten. In ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuchen sollte die Erkennung der HLA-A2⁺Tyrosinase⁻ Melanomzelllinie Mel A375 und HLA-A2⁺Tyrosinase⁺ Melanomzelllinie Mel/IL-2 getestet werden. Die HLA-A2-positiven Zelllinien A und C konnten die Zielzellen nicht lysieren (siehe Abbildung 4.28). Die Zelllinien B, Di und Dh, die aus HLA-A2-negativen Spendern generiert worden waren, konnten dagegen beide Zielzellen töten. Auch die Streptamer- und Tetramer-sortierten T-Zelllinien konnten beide Zielzellen zerstören. Wobei diejenigen Zielzellen, die HLA-A2-Tyrosinase-Peptid-Komplexe präsentierten, zu einem höheren Prozentsatz lysiert

wurden. Die Differenz in der Lyse von Mel/IL-2 und Mel A375 beruhte auf den Reaktionen HLA-A2-restringierter Tyrosinase-Peptid-spezifischer T-Zellen.

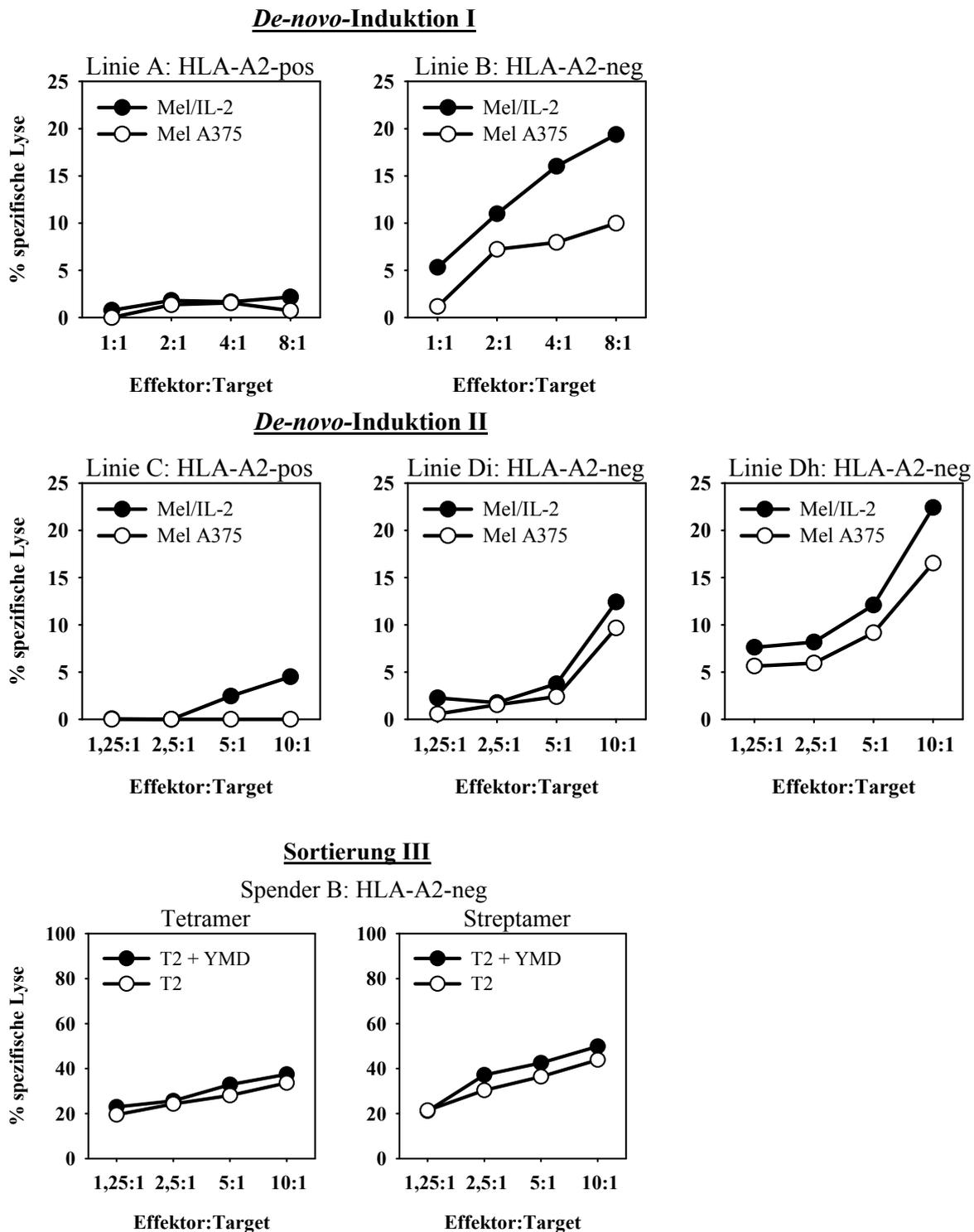


Abbildung 4.28 Zytotoxische Aktivität aller T-Zelllinien. Unbeladene bzw. mit 10 μ M YMD-Peptid-beladene T2-Zellen und Melanomzellen (Mel A375: A2⁺Tyr⁻ und Mel/IL-2: A2⁺Tyr⁺) wurden mit radioaktivem ⁵¹Chrom markiert und als Targetzellen in ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuche eingesetzt. Die Melanomzellen wurden mit verschiedenen Zellzahlen der Zelllinien A und B (*De-novo-Induktion I*) und C, Di und Dh (*De-novo-Induktion II*) 4 h lang zusammen inkubiert. Die unbeladenen und mit YMD-beladenen T2-Zellen wurden mit unterschiedlichen Zellzahlen der Tetramer- und Streptamer-sortierten Zelllinien kokultiviert. Das freigesetzte radioaktive ⁵¹Cr wurde gemessen und % spezifische Lyse wurde berechnet.

In Tabelle 4.4 werden die lytischen Aktivitäten aller T-Zelllinien gezeigt. Mit Hilfe von Regressionsanalysen wurde bestimmt, wie viele Effektorzellen für eine 35 %ige Lyse der Zielzellen benötigt werden. Die hierfür benötigte Anzahl an Effektorzellen wird als lytische Einheit (LE) bezeichnet. Von den HLA-A2-negativen Zelllinien B und Dh müssten ca. 16.000 T-Zellen eingesetzt werden, um zu 35 %iger Lyse der HLA-A2⁺Tyrosinase⁺ T-Zelllinie Mel/IL-2 zu führen. Die intermediäre T-Zelllinie zeigte schlechtere Funktion bezüglich ihrer Fähigkeit Zielzellen zu lysieren, hier würden 28.000 T-Zellen zu 35 %iger Lyse führen. Von der Streptamer-sortierten Zelllinie müssten ca. 3.600 Zellen eingesetzt werden, um YMD-beladene T2-Zellen zu 35 % zu lysieren, von der mittels Tetramer-sortierten Linie 8.000 T-Zellen. Um 10⁶ der Zielzellen zu töten, würden von der Linie B 63 LE, von der Linie Di 35 LE und von Linie Dh 59 LE benötigt. Von der Streptamer-sortierten Linie müssten 274 LE, von der Tetramer-sortierten Linie 125 LE eingesetzt werden.

Tabelle 4.4 Lytische Aktivität der Zelllinien

<i>De-novo-Induktion I+II</i>	LE (35 %)		LE/10 ⁶	
	Mel A 375	Mel/IL-2	Mel A375	Mel/IL-2
Zelllinie A: HLA-A2-pos	-	-	-	-
Zelllinie B: HLA-A2-neg	32.941	15.882	30	63
Zelllinie C: HLA-A2-pos	-	-	-	-
Zelllinie Di: HLA-A2-neg	35.294	28.235	28	35
Zelllinie Dh: HLA-A2-neg	23.824	17.059	42	59

Sortierung III	LE (35 %)		LE/10 ⁶	
	T2	T2 + YMD	T2	T2 + YMD
Streptamer	5.500	3.647	182	274
Tetramer	10.353	8.000	97	125

4.4.7 Oberflächenexpression von „Fitness“-Markern

Da die T-Zellen der Zelllinien unterschiedlich stark proliferierten und nach einigen wenigen Restimulationen starben, wurde die Expression einiger „Fitness“-Marker auf der Zelloberfläche der T-Zellen betrachtet. In diesem Zusammenhang bezeichnet der Begriff „Fitness“ die Fähigkeit induzierter T-Zellen, in Antigen-freier Umgebung zu überleben. Auch wurde die Expression einiger regulatorischer Moleküle und einiger genereller T-Zellmarker analysiert. In Abbildung 4.29 wurden Zellen der HLA-A2-positiven und -negativen Zelllinien C und Di der *De-novo-Induktion II* mit Antikörpern für folgende Oberflächenmarker gefärbt: CD25, IL-15R, CD28, CCR7, IL-7R (Rezeptor für das Zytokin IL-7), CD3 und CD8.

Beide T-Zelllinien zeigten vergleichbare Mengen an CD3 (Bestandteil des TZR-Komplexes) und CD8 (Ko-Rezeptor des MHC-Komplexes) auf der Oberfläche. Die α -Kette des Rezeptors für IL-2 (CD25) und CD28, wichtig für die Aktivierung naiver T-Zellen, wurden nicht exprimiert. CCR7 und IL-7R wurde von Zellen beider Linien exprimiert und unterschieden sich in ihrer x-fachen Expression kaum. Die HLA-A2-positive Zelllinie C zeigte, verglichen mit der HLA-A2-negativen Zelllinie Di, eine höhere IL-15-R-Expression. Die höhere Expression von IL-15 sprach für eine bessere Fitness der Linie C. Die Zellen dieser Linie konnten auch länger kultiviert werden.

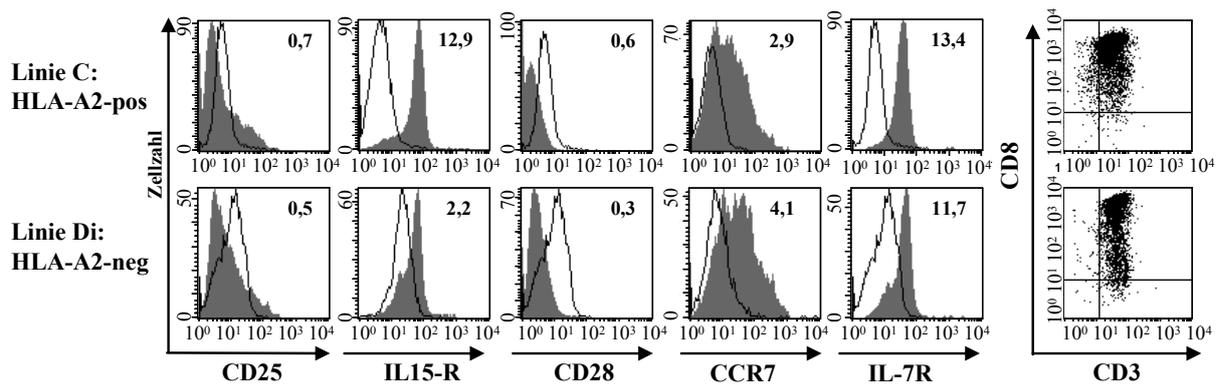


Abbildung 4.29 Expression einiger „Fitness“- und Oberflächenmarker auf den Zelllinien der *De-novo-Induktion II*. Die HLA-A2-positive Zelllinie C und die HLA-A2-negative Zelllinie Di wurden mit spezifischen Antikörpern gegen folgende Fitnessmarker gefärbt: CD25, IL-15R, CD28, CCR7, IL-7-Rezeptor (IL-7R), CD3 und CD8. In den Histogrammen ist die Expression dieser Oberflächenmoleküle für beide Zelllinien als gefüllte graue Kurven dargestellt. Die schwarzen Kurven zeigen die jeweiligen Isotyp-Kontrollen, die Zahlen in den Histogrammen die x-fache Expression. Die Doppelexpression von CD3 und CD8 ist in den daneben abgebildeten Streudiagrammen zu sehen.

Die Expression der Oberflächenmarker CD25, IL-15R, CD28, CTLA-4, CD3 und CD8 der Tetramer- und Streptamer-sortierten HLA-A2-negativen Zelllinien des Spenders B sind in Abbildung 4.30 gezeigt. Die Frage war, ob sich die über unterschiedliche Sortierungs-Methoden erhaltenen Zelllinien des gleichen Spenders in der Expression der oben genannten „Fitness“- und Oberflächenmarker unterscheiden würden. Zumal die lange Tetramerfärbung während der Tetramersortierung auf eine Quervernetzung der TZR mit einer daraus möglichen Aktivierung, Überstimulierung und evtl. Zelltod der T-Zellen schließen ließ. Der einzige wesentliche Unterschied dieser beiden Zelllinien lag in der Expression von CTLA-4. Die x-fache Expression der CTLA-4-Moleküle, die bei Bindung an CD80 und CD86 zu negativer Kostimulation von T-Zellen führen, war bei der Tetramer-sortierten Zelllinie doppelt so hoch wie bei der Streptamer-sortierten Zelllinie (28,9 vs. 14,6). Unterschiede in der Expression der „Fitness“-Marker CD25 und IL-15R waren nicht zu beobachten. Die durch reversible Streptamerfärbung sortierten T-Zellen trugen weniger negativ-regulierende CTLA-4-Moleküle auf der Oberfläche und schienen somit zumindest einen Proliferationsvorteil zu besitzen.

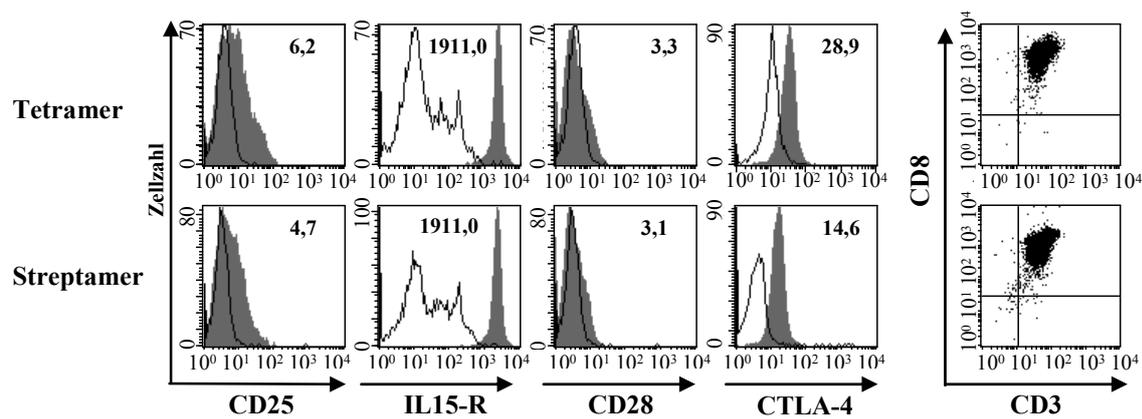


Abbildung 4.30 Oberflächenexpression einiger Fitnessmarker auf den Tetramer- und Streptamer-sortierten Zelllinien. Die Tetramer- und Streptamer-sortierten Zelllinien des HLA-A2-negativen Spenders B wurden mit spezifischen Antikörpern gegen folgende Fitnessmarker gefärbt: CD25, IL-15R, CD28, CTLA-4, CD3 und CD8. In den Histogrammen ist die Expression dieser Oberflächenmoleküle für beide Zelllinien als gefüllte graue Kurven dargestellt. Die schwarzen Kurven zeigen die jeweiligen Isotyp-Kontrollen, die Zahlen in den Histogrammen die x-fache Expression. Die Doppelexpression von CD3 und CD8 ist in den rechts abgebildeten Streudiagrammen zu sehen.

4.5 Bestimmung der Funktion und Spezifität von generierten T-Zellklonen

Das wesentliche Ziel dieser Arbeit war, T-Zellen mit hoch affinen TZR zu erhalten. Im vorangegangenen Kapitel waren die aus den *De-novo*-Induktionen erhaltenen T-Zelllinien analysiert worden. Im Folgenden sollten die aus diesen Linien generierten T-Zellklone auf ihre Funktion und Spezifität hin getestet werden.

4.5.1 Suche nach YMN-Peptid-spezifischen T-Zellen

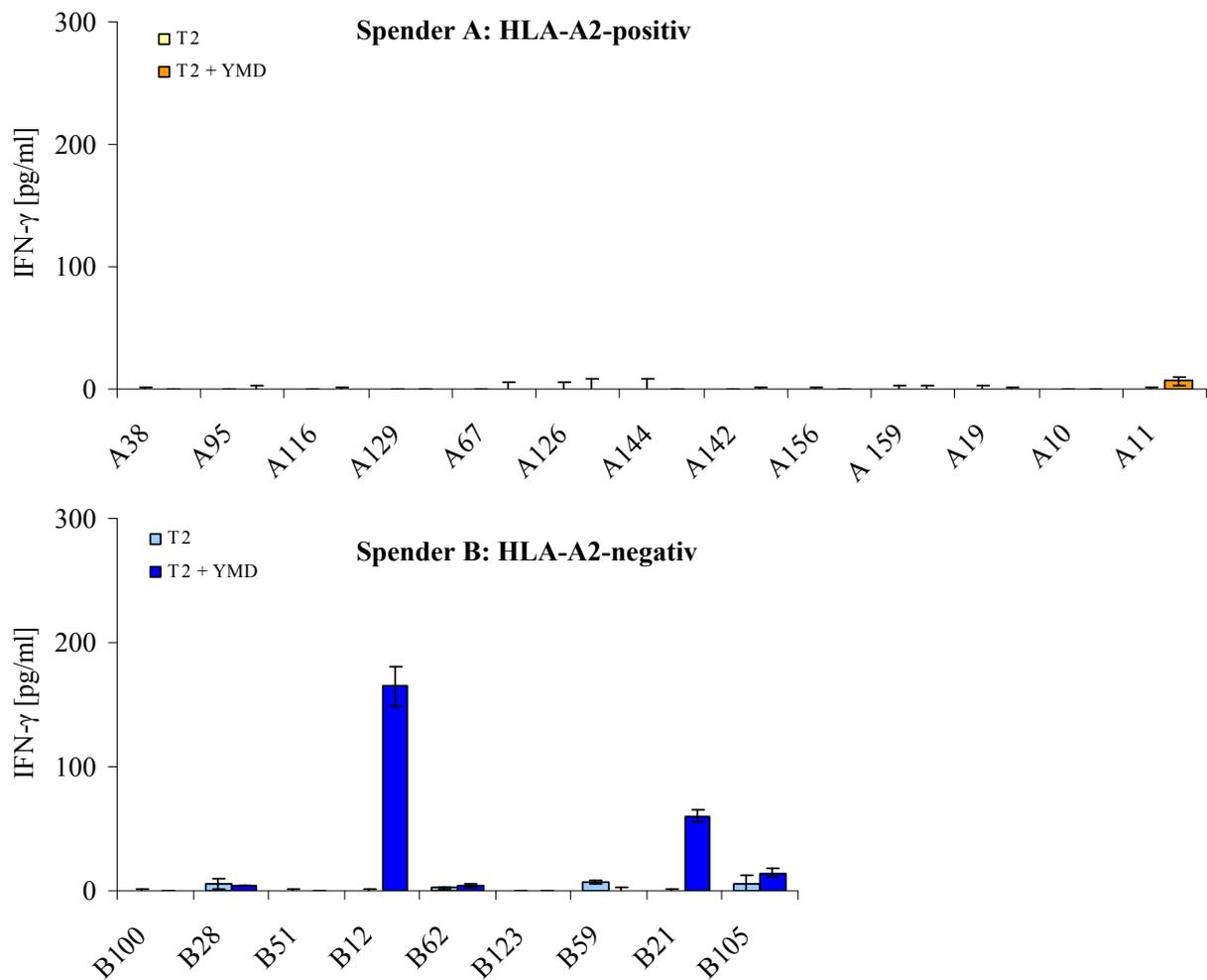
Ein Teil der aus den Sortierungen erhaltenen T-Zellen war in limitierenden Verdünnungen ausgesät worden, um T-Zellklone zu erhalten. Um an die gesuchten Tyrosinase-Peptid-spezifischen T-Zellen zu kommen, musste zuerst eine schnelle und effiziente Methode zur Unterscheidung von unspezifischen, Allo-A2-spezifischen und YMD-spezifischen T-Zellen gefunden werden. Alle proliferierenden vermeintlichen T-Zellklone wurden in dieser ersten Suche analysiert.

Von der *De-novo*-Induktion I und II wurden alle Klone auf IFN- γ -Sekretion hin untersucht. Die IFN- γ -Freisetzung bei Koinkubation mit unbeladenen T2-Zellen (hauptsächlich leere HLA-A2-Moleküle auf der Zelloberfläche) wurde mit der IFN- γ -Ausschüttung während Kokultur mit YMD-Peptid-beladenen T2-Zellen (HLA-A2 + YMD-Peptid) für jeden T-Zellklon verglichen. Wurde kein IFN- γ sezerniert, so konnte davon ausgegangen werden, dass der getestete T-Zellklon nicht YMD-Peptid spezifisch war. Wurde während Koinkubation mit beiden Zielzellen

IFN- γ freigesetzt, so handelte es sich um einen Allo-A2-spezifischen T-Zellklon, der HLA-A2-Moleküle als Fremd-Antigen erkannte. Zeigte jedoch nur die Kokultur mit den YMD-beladenen T2-Zellen IFN- γ -Ausschüttung durch den getesteten T-Zellklon, so wurde angenommen, dass es sich um einen der gesuchten HLA-A2-restringierten YMD-spezifischen T-Zellklone handelte. In Abbildung 4.31 sind die ersten Tests mit den T-Zellklonen gezeigt, die aus den *De-novo*-Induktionen I und II resultierten. In Gelb und Orange sind die IFN- γ -Mengen zu sehen, die von HLA-A2-positiven T-Zellklonen sezerniert wurden (gelb: unbeladene T2-Zellen; orange: YMD-beladene T2-Zellen). Hellblaue (HLA-A2-Liganden) und blaue Balken (HLA-A2-YMD-Liganden) stellen die IFN- γ -Freisetzung aus HLA-A2-negativen T-Zellen nach Koinkubation mit den genannten Zielzellen dar.

A.

De-novo-Induktion I



B.

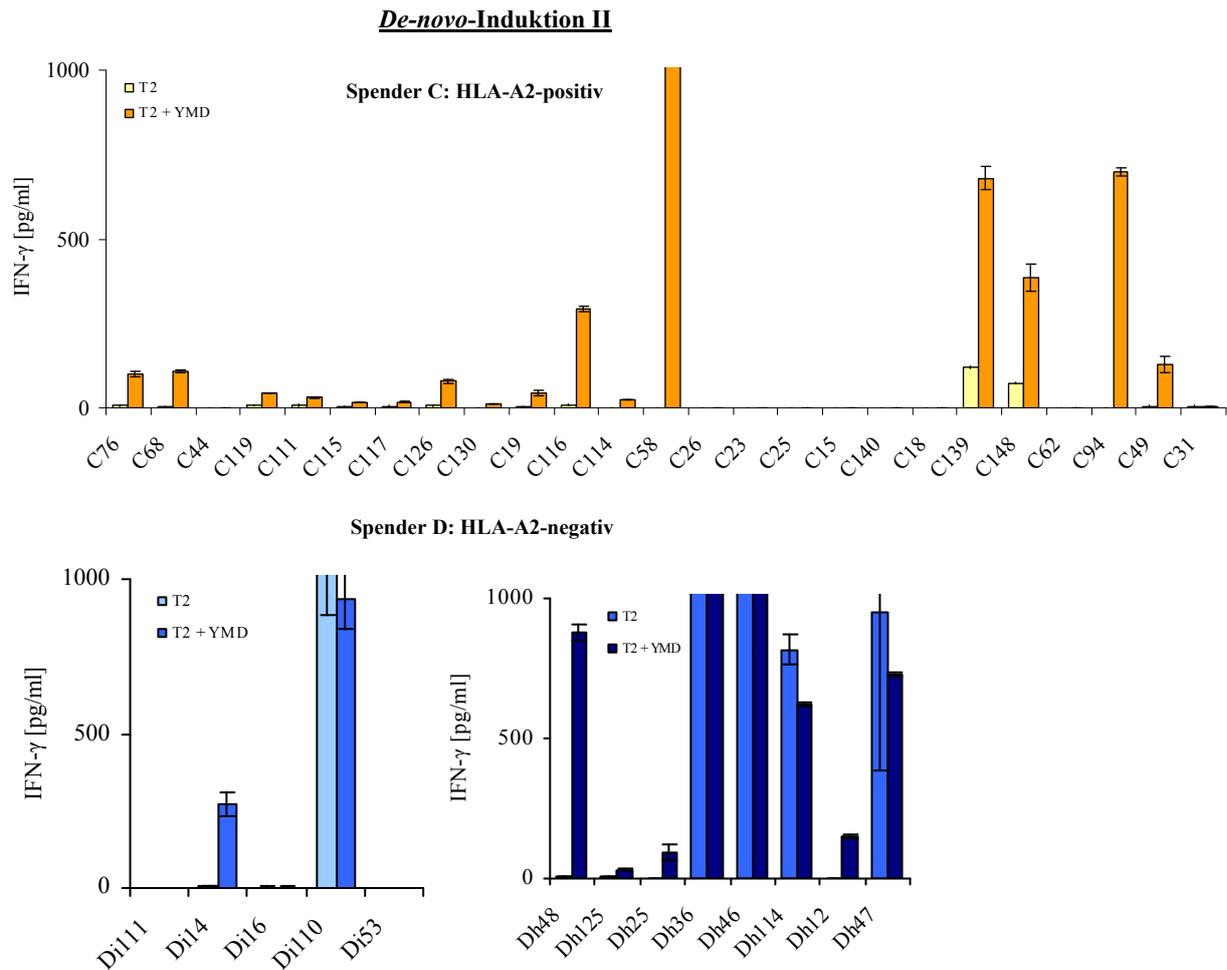


Abbildung 4.31 Suche nach HLA-A2-restringierten YMD-spezifischen T-Zellen mittels ELISA. A. T-Zellklone der *De-novo*-Induktion I. B. T-Zellklone der *De-novo*-Induktion II. Um YMD-spezifische T-Zellen von unspezifischen oder Allo-A2-spezifischen T-Zellen unterscheiden zu können, wurden 2.000 T-Zellen mit 10.000 unbeladenen oder YMD-beladenen (10 μ M) T2-Zellen 24 h lang kokultiviert (Ratio 1:5). In Gelb-Orangetönen ist die IFN- γ -Freisetzung von HLA-A2-positiven T-Zellen und in Blautönen die IFN- γ -Sekretion von HLA-A2-negativen T-Zellklonen dargestellt (gelb und hellblau: Kokubation der T-Zellklone mit unbeladenen T2-Zellen; orange und dunkelblau: Kokultur mit YMD-beladenen T2-Zellen). IFN- γ wurde mittels ELISA in den Überständen gemessen. Mittelwerte und ihre Standardabweichungen rühren von Kokubationsduplikaten her.

Da die wichtigste Eigenschaft der gesuchten T-Zellklone nicht die IFN- γ -Sekretion sondern das Töten von Melanomzellen war, wurde in der späteren Sortierung III mittels 51 Chrom-Freisetzungs-Versuchen die Erkennung von HLA-A2⁺Tyrosinase⁻ Melanomzellen Mel A375 und HLA-A2⁺Tyrosinase⁺ Melanomzellen Mel/IL-2 getestet. Fand keine Lyse statt, so handelte es sich um einen unspezifischen T-Zellklon, wurden beide Melanomzelllinien getötet, so beruhte die Erkennung auf den von beiden Zelllinien präsentierten HLA-A2-Molekülen und nicht auf der Präsentation des HLA-A2-Tyrosinase-Peptid-Liganden. Dieser untersuchte T-Zellklon erkannte folglich HLA-A2 als Fremd-Antigen. Wurden jedoch nur die Mel/IL-2-Zellen lysiert, so handelte es sich um den gesuchten HLA-A2-restringierten Tyrosinase-Peptid-spezifischen T-Zellklon (siehe Abbildung 4.32).

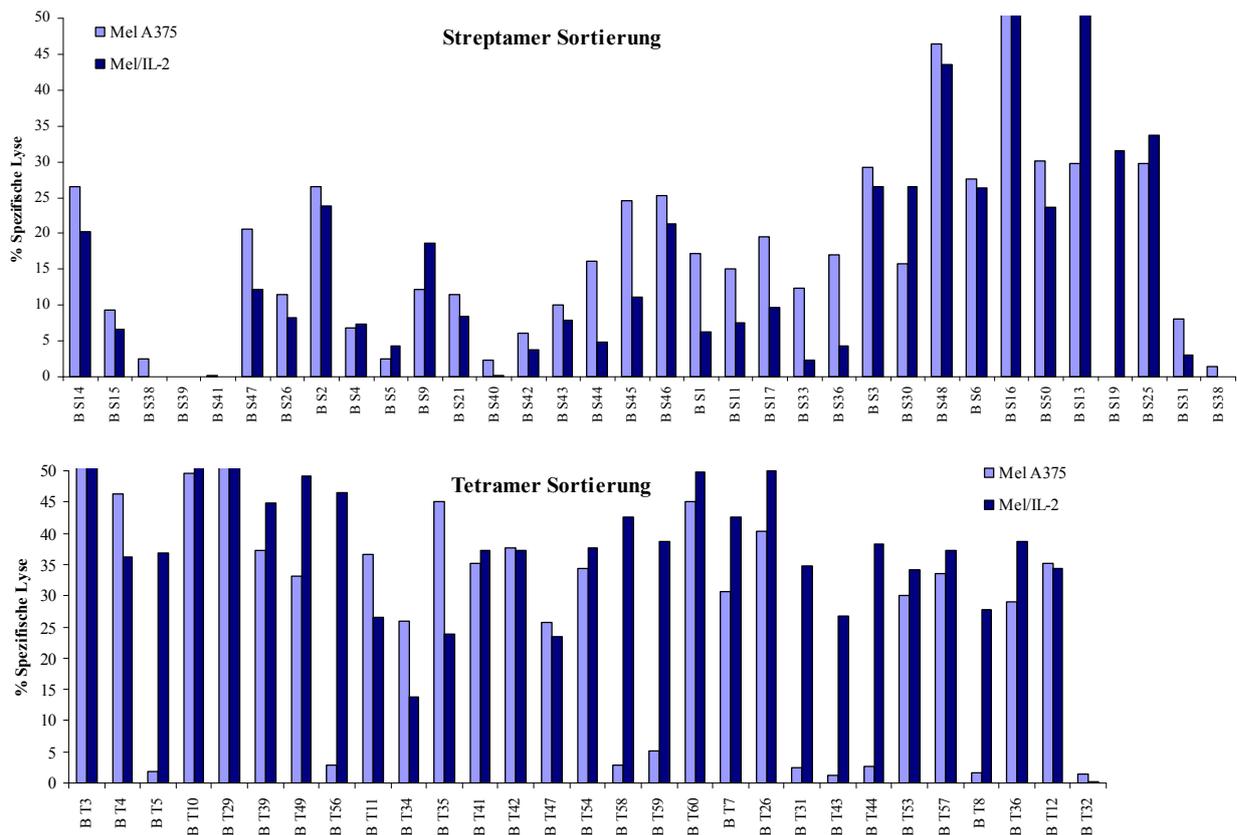


Abbildung 4.32 Suche nach HLA-A2-restringierten YMD-spezifischen T-Zellen mittels $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungs-Versuchen. Untersucht wurden T-Zellklone, die nach der Sortierung III mittels Tetramer bzw. Streptamer proliferierten. Melanomzellen (Mel A375: $\text{A2}^+\text{Tyr}^-$ und Mel/IL-2: $\text{A2}^+\text{Tyr}^+$) wurden mit radioaktivem $^{51}\text{Chrom}$ markiert und als Targetzellen in $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungs-Versuchen eingesetzt. Die Melanomzellen wurden mit einer kleinen Menge an T-Zellen 4 h lang koinkubiert. Das freigesetzte radioaktive $^{51}\text{Chrom}$ wurde gemessen und die % spezifische Lyse wurde berechnet.

In Tabelle 4.5 sind alle getesteten Klone aufgeführt. Die *De-novo*-Induktionen, durchgeführt mit Zellen von HLA-A2-positiven Spendern, ergaben, wie erwartet, keine Allo-A2-reaktiven T-Zellen. HLA-A2 ist bei diesen Spendern ein Selbst-Molekül. Tyrosinase-Peptide wurden über Selbst-MHC-Moleküle präsentiert (Selbst-MHC + Selbst-Peptid). Viele HLA-A2-negative T-Zellen hingegen erkannten HLA-A2 als Fremd-Antigen. Bei diesen *De-novo*-Induktionsansätzen wurden Tyrosinase-Peptide über allogene HLA-A2-Moleküle präsentiert (Fremd-MHC + Selbst-Peptid). Deshalb war zu erwarten, dass vermutlich einige der T-Zellen HLA-A2 unabhängig vom gebundenen Peptid erkennen würden und auf diese Weise an Tetramer bzw. Streptamer binden konnten und sortiert wurden. Beim Vergleich Streptamer- vs. Tetramersortierung fiel auf, dass mittels Streptamersortierung nur Allo-A2-reaktive T-Zellen isoliert wurden. Bei 38 % der mittels Tetramersortierung erhaltenen T-Zellklone hingegen konnte spezifische Erkennung des HLA-A2-YMD-Liganden beobachtet werden. Ein Blick auf alle isolierten Klone zeigt, dass es mit beiden zu vergleichenden *De-novo*-Induktionsansätzen möglich war, Peptid-spezifische T-Zellklone zu generieren. Diese T-Zellklone sollten im Folgenden weiter analysiert werden.

Tabelle 4.5 Übersicht der getesteten T-Zellklone

Induktion I	N	keine Reaktivität	Allo-A2	Peptid-spezifisch	% Peptid-spezifisch
HLA-A2-pos	13	12	0	1	8
HLA-A2-neg	9	4	2	3	33
Induktion II					
HLA-A2-pos	25	9	0	16	64
HLA-A2-neg intermediär	5	3	1	1	20
hoch	8	0	4	4	50
Induktion I aufgetaut					
HLA-A2-neg Streptamer-Sort.	34	5	29	0	0
Tetramer-Sort.	29	1	20	8	38
Klone gesamt					
HLA-A2-pos	38	21	0	17	45
HLA-A2-neg	51	8	27	16	31

4.5.2 Bestimmung der Spezifität der Tetramerbindung und TZR-Avidität der T-Zellklone

Diejenigen T-Zellklone, die gut proliferierten, konnten weiter charakterisiert werden. Aus der *De-novo*-Induktion I gingen die HLA-A2-positive T-Zelle A11 und die HLA-A2-negativen T-Zellen B12 und B62 hervor (siehe Abbildung 4.33). A11 T-Zellen, erhalten von dem HLA-A2-positiven Spender A, zeigten mittlere Intensität der Tetramerfärbung (MFI = 167) und schnelle Dissoziation des A2-YMD-Tetramers nach 2 h (0,79 % vs. 80,25 %). Der T-Zellklon B12 des HLA-A2-negativen Spenders B hingegen zeigte eine wesentlich höhere Fluoreszenzintensität (MFI = 1009) und auch das A2-YMD-Tetramer wurde stabiler gebunden. Nach 2 h waren noch annähernd alle T-Zellen Tetramer-positiv (94 %). Bei B62 handelte es sich um ein T-Zellgemisch aus CD8-negativen Zellen und ca. 10 % spezifischen CD8⁺Tetramer⁺-Zellen. Betrachtet man nur die Tetramer⁺ T-Zellen, so erkennt man, dass diese Population eine Tetramerfärbung mittlerer Fluoreszenzintensität (MFI = 379) zeigten und nach 2 h immer noch 9 % von anfänglich 9,7 % (93,9 %) der Zellen Tetramer⁺ waren. Das A2pp65-Kontrolltetramer führte nur zur Färbung von 0,14 bis 0,38 % der T-Zellen. Dieses Muster der Tetramerfärbung zeigte, dass diese T-Zellen bzw. T-Zellpopulation spezifisch für den HLA-A2-YMD-Komplex waren. Diese Ergebnisse deuteten ebenfalls darauf hin, dass der T-Zellklon B12 und die Tetramer-positiv T-Zellpopulation von B62, definiert durch höhere Intensität der Tetramerbindung und langsamere Dissoziation des Tetramers, TZR mit höherer bis mittlerer Avidität trugen.

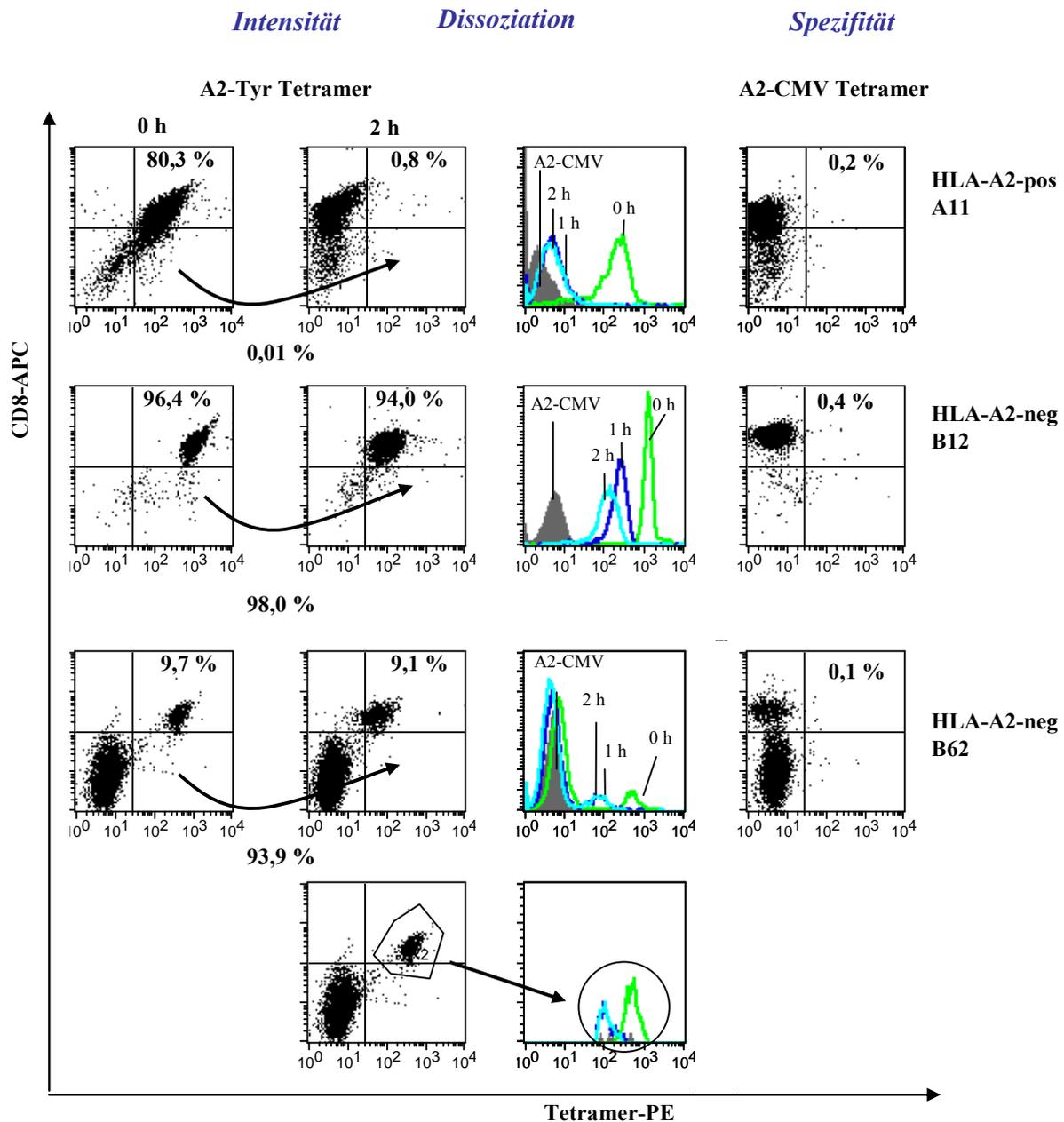
De-novo-Induktion I

Abbildung 4.33 Tetramerbindung und -dissoziation von erhaltenen T-Zellen aus der *De-novo-Induktion I*. Die isolierten T-Zellen A11, B12 und B62 wurden mit A2-YMD-Tetramer und APC-konjugiertem CD8-Antikörper gefärbt. Nach Inkubation wurde überschüssiges Tetramer abgewaschen und ein HLA-A2-spezifischer Antikörper zugesetzt, der erneutes Binden von Tetramer an die Zelloberfläche verhindern sollte. In der oberen Reihe sind die Tetramerfärbungen für die A11 T-Zellen, in der Reihe darunter für den T-Zellklon B12 gezeigt. Links sind die CD8/Tetramer-Doppelfärbungen in Streudiagrammen zum Zeitpunkt 0 h und 2 h mit Angabe der Prozent doppelt positiver Zellen zu sehen. In den Histogrammen sind für alle T-Zellen die Fluoreszenzintensitäten der Tetramerfärbung zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Waschen dargestellt: 0 h (grüne Kurve); 1 h (blaue Kurve) und 2 h (türkise Kurve). Die gefüllte, graue Kurve zeigt die Färbung mit dem Kontrolltetramer A2pp65. Die Kontroll Tetramerfärbung ist auf der rechten Hälfte der Abbildung ebenfalls in Streudiagrammen mit Angabe der Prozent gefärbter Zellen dargestellt. In den unteren beiden Reihen ist das T-Zellgemisch B62 gezeigt. Um die Tetramer-positiven Zellen wurde zusätzlich ein Fenster („gate“) gelegt, um im Histogramm die Dissoziation des Tetramers nur von den Tetramer-positiven Zellen zeigen zu können.

Aus der *De-novo*-Induktion II werden als Beispiele für HLA-A2-positive T-Zellklone C18 und C19 des Spenders C und der HLA-A2-negative T-Zellklon Di111 mit intermediärer Fluoreszenzintensität gezeigt (siehe Abbildung 4.34). Das A2-YMD-Tetramer färbte den T-Zellklon C18 mit niedriger Intensität (MFI = 86) und löste sich schnell wieder ab. Nur noch 0,01 % der anfänglich gefärbten T-Zellen waren nach 2 h noch Tetramer⁺. Der T-Zellklon C19 zeigte hohe Intensität (MFI = 914) und langsame Dissoziation. Nach 2 h waren noch 98 % der T-Zellen mit Tetramer gefärbt. Der intermediär sortierte HLA-A2-negative T-Zellklon Di111 zeigte Tetramerfärbung bei niedriger bis mittlerer Fluoreszenzintensität (MFI = ca. 100). Ebenfalls nur 0,01 % der anfänglich Tetramer-positiven T-Zellen waren nach 2 h noch Tetramer⁺. Es wurden kaum T-Zellen mit den beiden Kontrolltetrameren B7pp65 und A2pp65 gefärbt (0,1 % - 0,2 %), was die Spezifität der getesteten T-Zellklone bestätigte. Die CD3-Färbung als Anhaltspunkt für die relative Anzahl an TZR-Molekülen auf der Oberfläche war zwischen den drei Klonen sehr unterschiedlich, was eine Aussage zur Avidität der T-Zellen erschwert.

De-novo-Induktion II

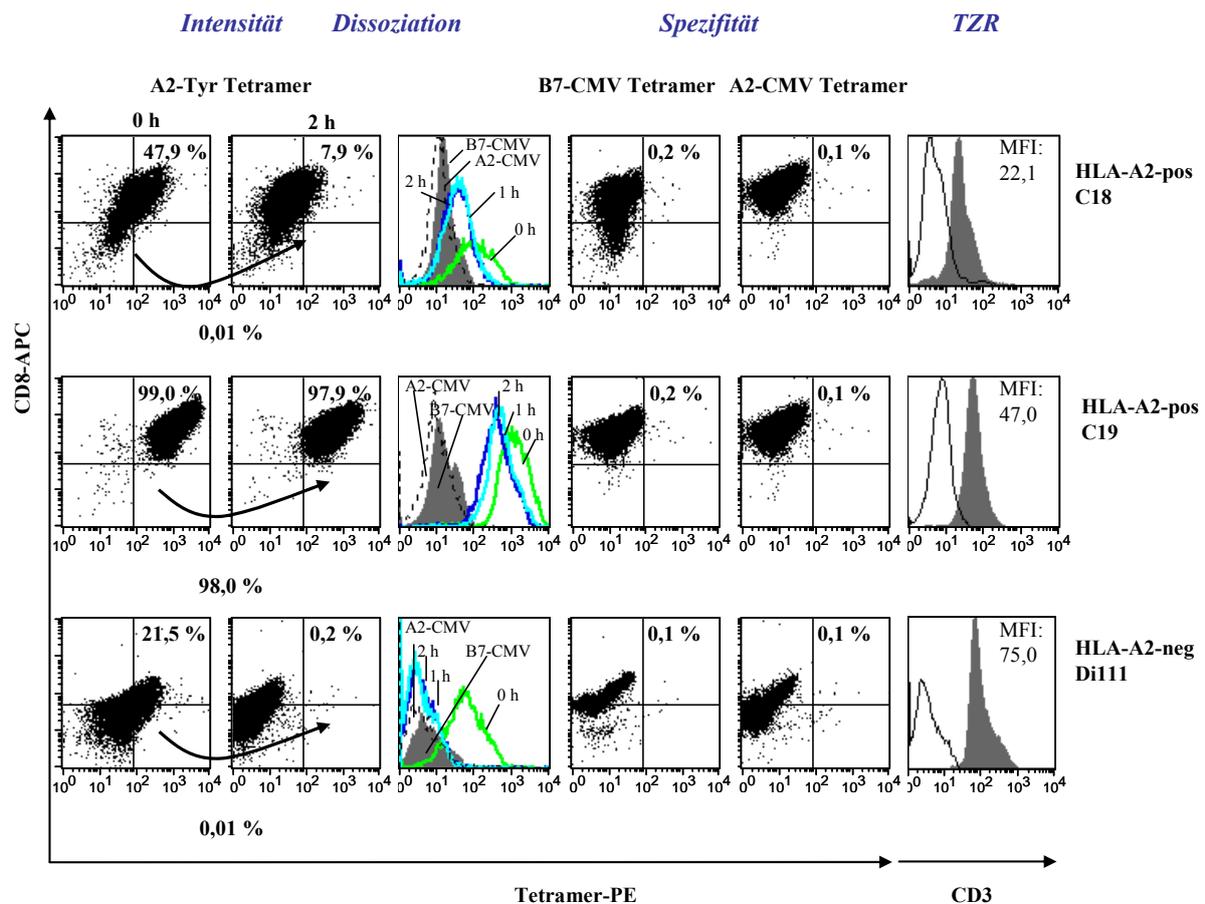


Abbildung 4.34 Tetramerbindung und -dissoziation von erhaltenen T-Zellklonen der *De-novo*-Induktion II. Die selektierten T-Zellklone C18, C19 und Di 111 wurden, wie in Abbildung 4.33 beschrieben, gefärbt und behandelt. Auch der Aufbau stimmt größtenteils überein. In den mittleren Histogrammen zeigen die gefüllten grauen Kurven die Färbungen mit dem Kontrolltetramer B7pp65, die gestrichelten schwarzen Kurven die Färbungen mit A2pp65. Die Kontroll Tetramerfärbungen sind auf der rechten Hälfte der Abbildung ebenfalls in Streudiagrammen mit Angabe der Prozent gefärbter Zellen dargestellt. Ganz rechts sind zusätzlich die CD3-Färbungen mit Angabe der MFI-Werte zur Bestimmung der relativen Anzahl an TZR auf der Zelloberfläche gezeigt.

Bei der Sortierung III wurden Antigen-spezifische T-Zellen der *De-novo*-Induktionszellkultur des HLA-A2-negativen Spenders B mittels Tetramer- und Streptamerfärbungen sortiert, um hoch avide T-Zellen gegen das Tumor-assoziierte Antigen Tyrosinase zu erhalten und diese beiden Sortierungsmethoden zu vergleichen. Der Klon B S9 stammte aus der Streptamersortierung, die anderen gezeigten T-Zellklone B T49, B T43 und B T58 aus der Tetramersortierung (siehe Abbildung 4.35). Beim Klon B S9 konnte kaum A2-YMD- Tetramerbindung festgestellt werden und die Färbung mit A2pp65-Kontrolltetramer führte zu einer Verschiebung der Gesamt-Population vergleichbar mit der A2-YMD-Färbung zum Zeitpunkt 0 h. Das A2-YMD-Tetramer färbte B T49 mit mittlerer Intensität (MFI = 557) und löste sich nur langsam, nach 2 h waren noch 96 % der T-Zellen Tetramer⁺. Auch bei diesem Klon war eine starke Bindung des A2pp65-Kontrolltetramers (44 % positive Zellen) zu beobachten. Sowohl B S9 als auch B T49 schienen an HLA-A2 unabhängig von den präsentierten Peptiden zu binden, sie waren vermutlich Allo-A2-reaktiv. Der T-Zellklon B T43 zeigte zum Zeitpunkt 0 h mittlere Fluoreszenzintensität (MFI = 365) und eine mittlere Dissoziation. Nach 2 h waren noch 55 % der anfänglich Tetramer-positiven Zellen gefärbt (50,8 % vs. 95 %). B T58 T-Zellen zeigten ebenfalls mittlere Intensität an Tetramerfärbung (MFI = 319) jedoch eine stabilere Bindung. Nach 2 h konnten noch 77 % der ursprünglich Tetramer-positiven T-Zellen detektiert werden (75,7 % vs. 98,0 %). Sowohl B T43- als auch B T58-T-Zellen wurden von keinem der beiden Kontrolltetramere gefärbt. Die CD3-Färbungen unterschieden sich zwischen allen analysierten T-Zellklonen deutlich.

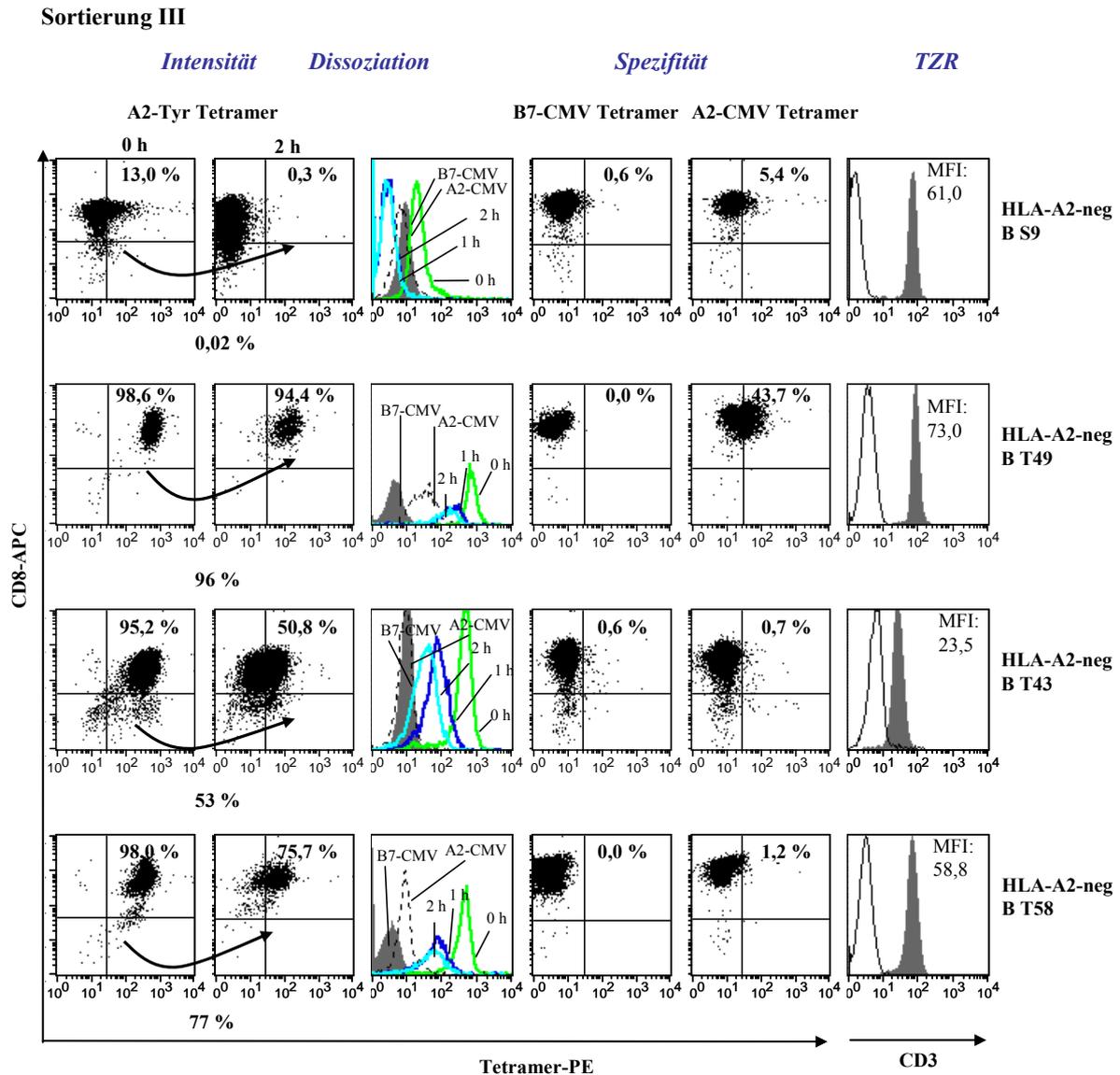


Abbildung 4.35 Tetramerbindung und -dissoziation von erhaltenen T-Zellklonen der Sortierung III. Die isolierten T-Zellklone B S9, B T49, B T43 und B T58 wurden, wie in Abbildung 4.33 beschrieben, gefärbt und behandelt. Auch der Aufbau stimmt größtenteils überein. In den mittleren Histogrammen zeigen die gefüllten, grauen Kurven die Färbungen mit B7pp65-, die gestrichelten, schwarzen Kurven die Färbungen mit A2pp65-Kontrolltetramer. Die Kontroll Tetramerfärbungen sind auf der rechten Hälfte der Abbildung ebenfalls in Streudiagrammen mit Angabe der Prozent gefärbter Zellen dargestellt. Ganz rechts sind zusätzlich die CD3-Färbungen mit Angabe der MFI-Werte zur Bestimmung der relativen Anzahl an TZR auf der Zelloberfläche gezeigt.

Alle durchgeführten Tetramer-Analysen der T-Zellklone beider Induktionen und der Sortierung III sind in Tabelle 4.6 aufgeführt. Der Mittelwert der Tetramerfärbung zum Zeitpunkt 0 h wurde mit 100 % Färbung gleichgesetzt und berechnet, wie viel Prozent der T-Zellen nach 1 h noch gefärbt waren. Beide Gruppen, die HLA-A2-positiven wie auch die HLA-A2-negativen Klone, zeigten ähnliche Dissoziationswerte zwischen 3 % und 49 %, verglichen mit 5 % und 36 % (Mittelwerte: 24,9 % vs. 17,9 %) nach 1 h, bezogen auf die Färbung zum Zeitpunkt 0 h. Ebenfalls gezeigt sind diese Werte für die beiden T-Zellklone TyrF8 und IVS B, die im Kapitel 4.2 schon näher beschrieben worden waren. 11,7 % der TyrF8 T-Zellen und 18,3 % der IVS B T-Zellen waren nach 1 h Tetramer-positiv.

Tabelle 4.5 Übersicht der mittels Tetramer-Analyse untersuchten T-Zellklone

			Mittelwert 0 h	Mittelwert 1 h	0 h [%]	1 h [%]	
Klone mit spezifischer Erkennung	HLA-A2-positiv	A11	167,0	4,3	100%	2,6	
		C25	170,2	11,8	100%	6,9	
		C31	8,5	4,2	100%	49,2	
		C18	85,9	28,3	100%	32,9	
		C19	920,7	322,7	100%	35,1	
		C115	879,4	242,0	100%	27,5	
		C49	156,5	31,7	100%	20,3	
		HLA-A2-negativ	B62	378,6	59,4	100%	6,4
	B12		1009,0	196,3	100%	5,1	
	B T43		376,1	70,7	100%	18,8	
	B T5		369,7	87,6	100%	23,7	
	B T56		350,7	92,1	100%	26,3	
	B T31		343,9	63,4	100%	18,4	
	B T58		319,9	54,5	100%	17,0	
	B T59		414,1	149,1	100%	36,0	
	B T44		313,3	65,9	100%	21,0	
	Di111		51,3	3,3	100%	6,3	
	Allo-A2 + "Peptid"		HLA-A2-negativ	B T39	330,2	100,5	100%
		HLA-A2-negativ	B T49	532,5	140,3	100%	26,4
Allo-A2	HLA-A2-negativ	B S9	18,4	2,7	100%	14,4	
APC + „Peptid“ Patient	HLA-A2-positiv	Tyr F8	104,4	12,2	100%	11,7	
	HLA-A2-positiv	IVS B	388,9	71,3	100%	18,3	

4.5.3 IFN- γ -Sekretion einiger T-Zellklone

Eine wichtige Effektorfunktion von T-Zellen ist die Sekretion von IFN- γ während Kontakt mit Zielzellen. Für die im vorhergegangenen Kapitel genannten Klone wird nun beispielhaft die Fähigkeit zur IFN- γ -Freisetzung gezeigt.

Als Zielzellen wurden, wie schon bei der Analyse der T-Zelllinien, nicht-beladene T2-Zellen, mit YMD-Peptid-beladene T2-Zellen sowie die vier verschiedenen Melanomzellen Sk Mel 28 (HLA-A2⁻ Tyrosinase⁺), Mel A375 (HLA-A2⁺ Tyrosinase⁻), Mel 624.38 (HLA-A2⁺ Tyrosinase⁺) und Mel/IL-2 (HLA-A2⁺ Tyrosinase⁺) verwendet (siehe Abbildung 4.36).

Die HLA-A2-positiven A11 T-Zellen waren generell nicht in der Lage, IFN- γ zu sezernieren. Der ebenfalls HLA-A2-positiv T-Zellklon C18 schüttete zwar während der Kokultur mit YMD-beladenen T2-Zellen kein IFN- γ aus, konnte jedoch bei Kontakt mit den doppelt positiven Melanomzellen IFN- γ freisetzen (ca. 150 pg/ml). Da unbeladene und einfach positive Melanomzellen nicht erkannt wurden, zeigte der T-Zellklon somit Spezifität für HLA-A2-Tyrosinase-Peptid-Liganden. Der T-Zellklon C19 sezernierte IFN- γ , sowohl während Koinkubation mit YMD-Peptid beladenen T2-Zellen (ca. 40 pg/ml) als auch mit doppelt positiven Melanomzellen IFN- γ in höheren Mengen (Mel 624.38: ca. 600 pg/ml; Mel/IL-2: ca. 1000 pg/ml).

Der HLA-A2-negative T-Zellklon B12 zeigte eine noch bessere Erkennung: Ca. 160 pg/ml wurde bei Kokultur mit YMD-beladenen T2-Zellen und ca. 860 bzw. 1400 pg/ml bei Kontakt mit den doppelt positiven Melanomzellen Mel 624.38 und Mel/IL-2 sezerniert. Di111 T-Zellen, die aufgrund ihrer intermediären Intensität nach Tetramertifärbung sortiert worden waren, setzten auch nur mittelmäßige Mengen an IFN- γ frei. Kein IFN- γ wurde während Kokultur mit unbeladenen und YMD-beladenen T2-Zellen ausgeschüttet, bei Kontakt mit den doppelt positiven Melanomzellen wurden jedoch mittlere Mengen an IFN- γ sezerniert (Mel 624.38: ca. 600 pg/ml; Mel/IL-2: ca. 670 pg/ml). Die einfach positive Melanomzelllinie Sk Mel 28 führte zu keiner IFN- γ -Freisetzung und Mel A375-Zellen zu Hintergrundmengen an IFN- γ .

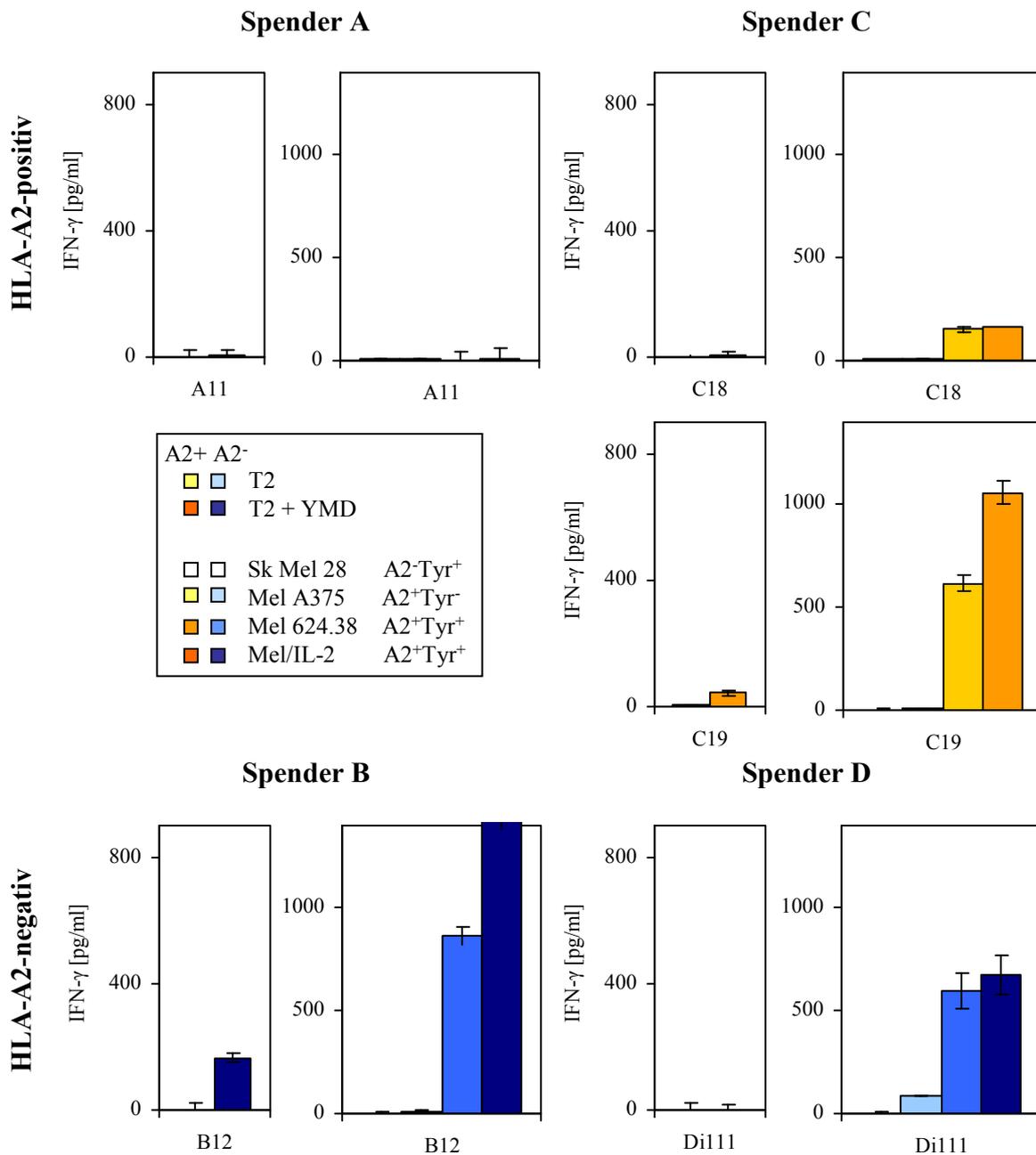


Abbildung 4.36 IFN- γ -Freisetzung einiger isolierter T-Zellklone der *De-novo*-Induktionen I + II. Orange-farbene Balken stehen für die IFN- γ -Sekretion HLA-A2-positiver T-Zellen, blaue Balken für die IFN- γ -Freisetzung HLA-A2-negativer T-Zellklone. Im mittleren Kasten ist die Farbverteilung der Zielzellen gezeigt: unbeladene und mit 10 μ M YMD-Peptid-beladene T2-Zellen und die Melanomzellen Sk Mel 28 (HLA-A2⁻ Tyrosinase⁺), Mel A375 (HLA-A2⁺ Tyrosinase⁻), Mel 624.38 (HLA-A2⁺ Tyrosinase⁺) und Mel/IL-2 (HLA-A2⁺ Tyrosinase⁺). In den jeweils linken schmaleren Balkendiagrammen sind die Reaktionen auf T2-Zellen, in den breiteren Diagrammen daneben die Reaktionen auf die genannten Melanomzellen zu sehen. IFN- γ in den Überständen wurde mittels ELISA nachgewiesen. Mittelwerte und ihre Standardabweichung stammen von Koinkubations-Duplikaten.

In Abbildung 4.37 sind Beispiele von T-Zellklonen unterschiedlicher Spezifität gezeigt, die aus der Sortierung III mittels Tetramer- bzw. Streptamersortierung erhalten worden waren. Bei dem T-Zellklon B S9 handelte es sich um einen Allo-A2-spezifischen T-Zellklon, da dieser HLA-A2⁺ Tyrosinase⁻ Melanomzellen genauso gut erkannte wie die Melanomzellen, die HLA-A2-Tyrosinase-Peptid-Komplexe präsentierten. Bei Koinkubation mit unbeladenen und YMD-beladenen T2-Zellen kam es zu keiner IFN- γ -Freisetzung. Der T-Zellklon B T49 zeigte sowohl spezifische Reaktionen auf HLA-A2-YMD-Liganden (ca. 100 pg/ml IFN- γ) als auch Ausschüttung von IFN- γ mittlerer Mengen während Kokultur mit HLA-A2⁺ Tyrosinase⁻ Mel A375-Zellen sowie höhere IFN- γ -Mengen bei Kontakt mit HLA-A2⁺ Tyrosinase⁺ Melanomzellen (ca. 270 pg/ml verglichen mit ca. 540-640 pg/ml). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass dieser T-Zellklon eine Allo-A2-reaktive und eine Peptid-spezifische Komponente besitzen könnte. Die beiden Klone B T43 und B T58 zeigten beide spezifische Erkennung von YMD-beladenen T2-Zellen und doppelt positiven Melanomzellen in Form von Freisetzung hoher Mengen IFN- γ , wobei der B T58 T-Zellklon noch mehr IFN- γ sezernierte als der Klon B T43 (T2 + YMD: ca. 750 vs. 700 pg/ml; Mel 624.38: ca. 1050 vs. 630 pg/ml; Mel/IL-2: ca. 1230 vs. 1090 pg/ml).

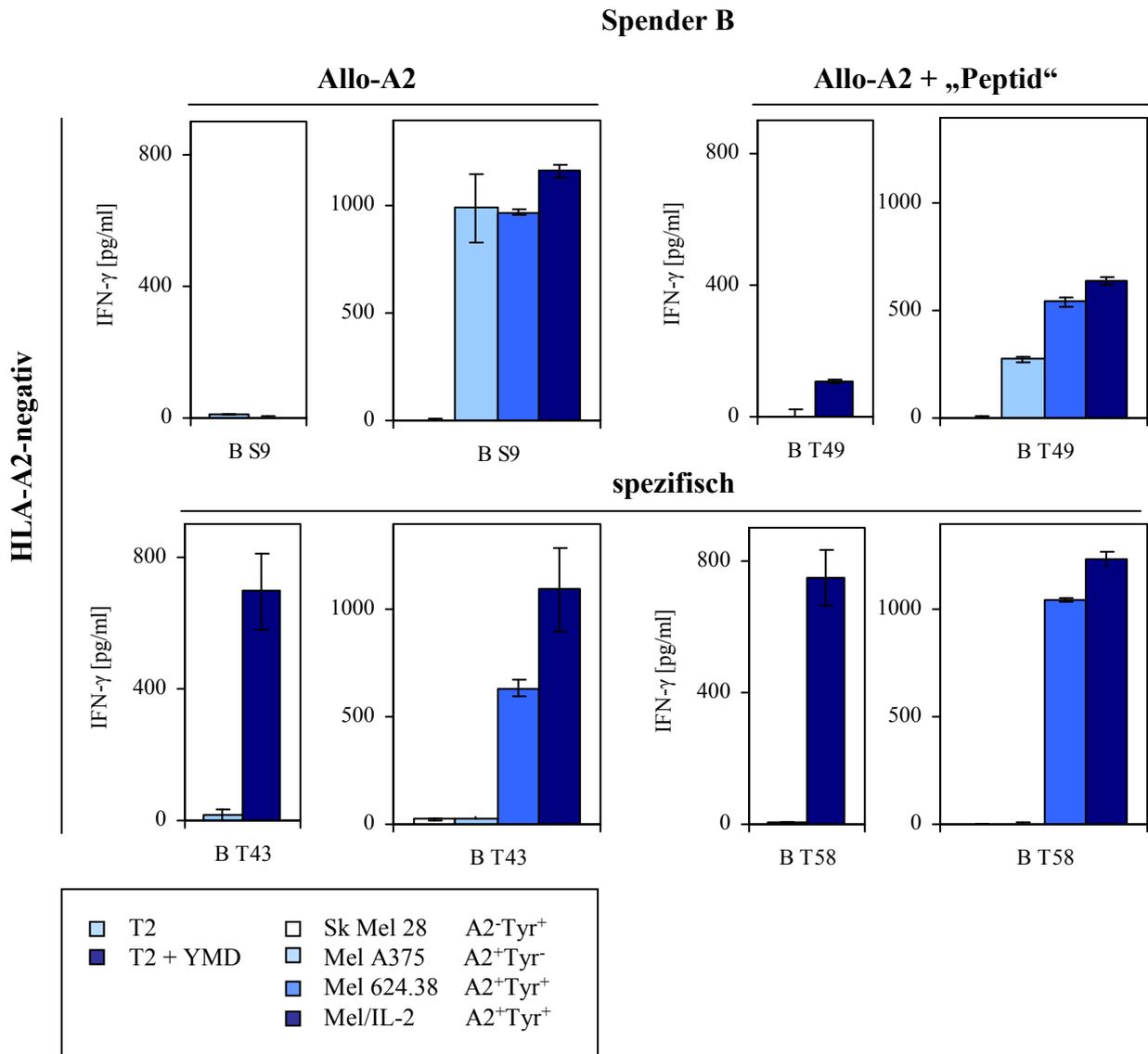


Abbildung 4.37 IFN- γ -Freisetzung einiger isolierter T-Zellklone der Sortierung III. In Blautönen ist die IFN- γ -Sekretion HLA-A2-negativer T-Zellklone während Kokultur mit den folgenden Zielzellen gezeigt: unbeladene und mit 10 μ M YMD-Peptid beladene T2-Zellen und die Melanomzellen Sk Mel 28 (HLA-A2⁻ Tyrosinase⁺), Mel A375 (HLA-A2⁺ Tyrosinase⁻), Mel 624.38 (HLA-A2⁺ Tyrosinase⁺) und Mel/IL-2 (HLA-A2⁺ Tyrosinase⁺). In den jeweils linken schmalere Balkendiagrammen sind die Reaktionen auf T2-Zellen, in den breiteren Diagrammen daneben die Reaktionen auf die genannten Melanomzellen zu sehen. IFN- γ in den Überständen wurde mittels ELISA nachgewiesen. Mittelwerte und ihre Standardabweichung stammen von Koinkubationsduplikaten.

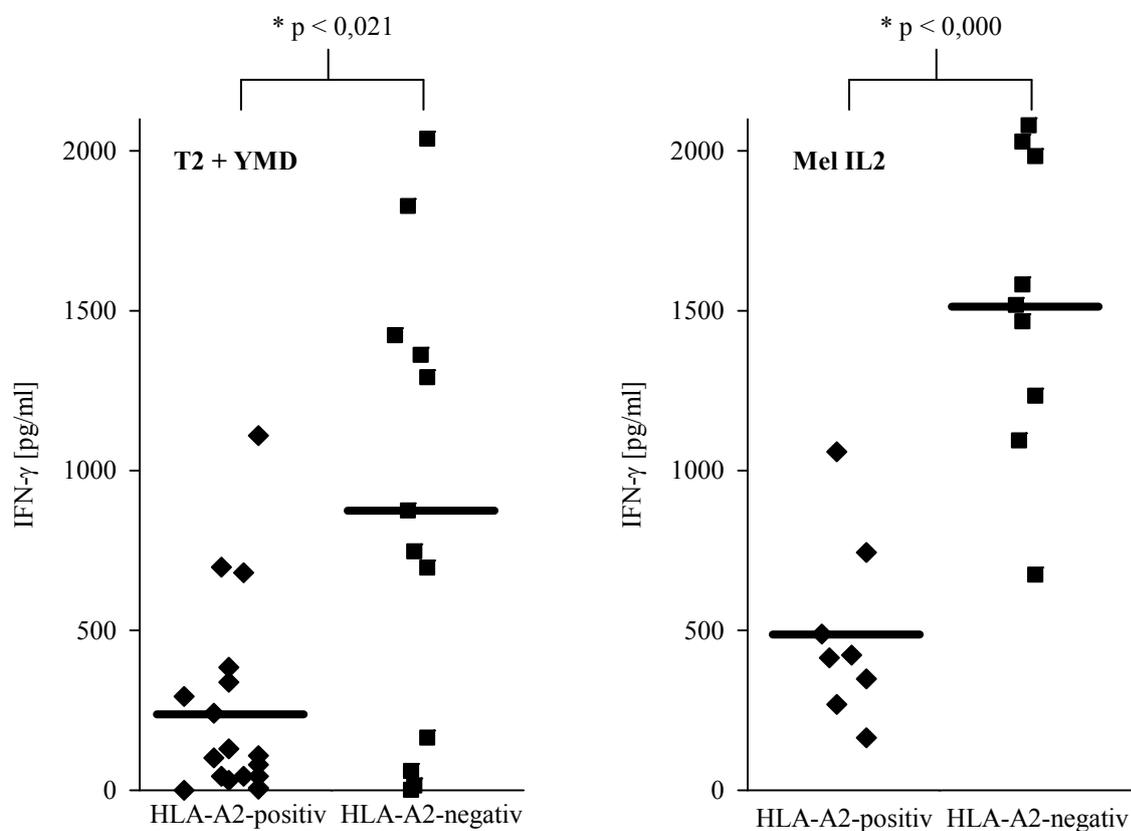
In Tabelle 4.6 sind die Mengen an IFN- γ , die von jedem getesteten HLA-A2-restringierten YMD-spezifischen T-Zellklon während Koinkubation mit YMD-beladenen T2-Zellen und den HLA-A2⁺ Tyrosinase⁺ Melanomzellen Mel/IL-2 sezerniert wurden, zusammengefasst.

Tabelle 4.5 Übersicht der IFN- γ -Freisetzung von Peptid-spezifischen untersuchten T-Zellklonen

			IFN- γ T2 + YMD	IFN- γ Mel/IL-2
Klone mit spezifischer Erkennung	HLA-A2-positiv	A11	6,6	n.d.
		C119	43,7	n.d.
		C111	30,3	n.d.
		C126	79,6	n.d.
		C116	293,3	n.d.
		C58	1108,9	n.d.
		C139	679,9	n.d.
		C148	384,6	n.d.
		C76	101,1	n.d.
		C68	107,8	n.d.
		C94	697,5	348,2
		C25	337,8	414,6
		C31	3,5	268,5
		C18	0,0	164,2
		C19	43,3	1058,5
	C115	43,5	743,6	
	C49	129,0	422,8	
	HLA-A2-negativ	B12	164,7	n.d.
		B21	60,1	n.d.
		B105	14,4	n.d.
		B T43	696,4	1094,8
		B T5	1423,4	2029,3
		B T56	1292,1	1984,0
		B T31	1362,3	1467,5
		B T58	747,6	1234,4
		B T59	1827,7	2080,5
B T44		2038,2	1582,2	
Di 111		1,6	674,7	

* n.d. steht für nicht durchgeführt

In den beiden Streudiagrammen in Abbildung 4.38 sind die Werte graphisch für die HLA-A2-restringierten, Tyrosinase-Peptid-spezifischen T-Zellklone von HLA-A2-positiven bzw. HLA-A2-negativen Spendern dargestellt. Die Zusammenfassung aller spezifischen T-Zellklone zeigt, dass die HLA-A2-positiven T-Zellklone während Kokultur mit HLA-A2-Tyrosinase-Peptid-Liganden in Form von YMD-beladenen T2-Zellen und HLA-A2⁺ Tyrosinase⁺ Melanomzellen Mel/IL-2 wesentlich weniger IFN- γ sezernierten als die Klone, die von HLA-A2-negativen Spendern erhalten wurden. Die Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen waren hochsignifikant (*).



	HLA-A2-positiv	HLA-A2-negativ
Mittelwert	240,62	875,33
Median	101,08	747,59

	HLA-A2-positiv	HLA-A2-negativ
Mittelwert	488,62	1518,42
Median	414,59	1524,88

Abbildung 4.38 Vergleich der IFN- γ -Werte HLA-A2-positiver vs. HLA-A2-negativer T-Zellen. Die IFN- γ -Sekretion der HLA-A2-positiven T-Zellklone (\blacklozenge) unterscheidet sich von der IFN- γ -Freisetzung HLA-A2-negativer T-Zellklone (\blacksquare). Die schwarzen Balken stellen die jeweiligen Mittelwerte dar. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen sind hochsignifikant (*). In den Tabellen sind die Mittelwerte und Mediane gezeigt.

4.5.4 Zytotoxische Aktivität einiger T-Zellklone

Die wichtigste Eigenschaft von zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen ist es, Tumorzellen töten zu können. Deshalb wurde in ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuchen die Reaktion auf die HLA-A2⁺ Tyrosinase⁻ Melanomzellen Mel A375 und HLA-A2⁺ Tyrosinase⁺ Melanomzellen Mel/IL-2 getestet.

Die HLA-A2-positiven A11 T-Zellen, die zu keiner IFN- γ -Freisetzung in der Lage gewesen waren (siehe Kapitel 4.5.3), konnten HLA-A2⁺ Tyrosinase⁺ Mel/IL-2-Zellen töten aber nicht die HLA-A2⁺ Tyrosinase⁻ Mel A375-Zellen (siehe Abbildung 4.39). Die spezifische Lyse betrug 14-16 % bei einem Effektor- zu Targetzell-Verhältnis (E:T) von 8:1. Damit zeigten A11 T-Zellen Spezifität für HLA-A2-Tyrosinase-Peptid-Liganden. Der HLA-A2-negative T-Zellklon B12 lysierte ebenfalls nur die Melanomzellen mit HLA-A2-Tyrosinase-Peptid-Komplexen (spezifische Lyse bei E:T-Verhältnis 8:1 = 19 %). Dieser Klon war zusätzlich in der Lage, IFN- γ zu sezernieren (siehe Kapitel 4.5.3) und somit A11 funktionell überlegen, da er zusätzlich zur Lyse von Melanomzellen auch die Fähigkeit besaß, IFN- γ freizusetzen.

Die gemischte T-Zellpopulation, die 10 % CD8⁺Tetramer⁺ T-Zellen beinhaltete, zeigte nur geringe, fast nicht detektierbare Lyse beider Tumorzelllinien. Ein funktioneller Effekt bei einem Anteil von nur 10 % an Peptid-spezifischen T-Zellen konnte nicht detektiert werden.

Der aus der *De-novo*-Induktion II erhaltene HLA-A2-positive Klon C18 zeigte 19 % spezifische Lyse der HLA-A2-Tyrosinase-Peptid-Komplexe präsentierenden Melanomzelllinie Mel/IL-2, C19 T-Zellen lysierten 39 % der Mel/IL-2-Zellen (E:T = 10:1). Der HLA-A2-negative T-Zellklon Di111, der aufgrund seiner mittleren Fluoreszenzintensität sortiert worden war, zeigte eine mittlere spezifische Lyse von 35 %.

Die Affinität dieser T-Zellklone, die aus der *De-novo*-Induktion II erhalten worden waren, konnte mit Hilfe der T2-Peptid-Titration ermittelt werden. Die T-Zellen der *De-novo*-Induktion I konnten nicht auf die Affinität ihrer TZR hin untersucht werden, da für die T2-Peptid-Titration große Zellzahlen benötigt werden, die von diesen Klonen nicht zur Verfügung standen. Für die Affinitätsbestimmung wurden T2-Zellen mit unterschiedlichen Mengen an YMD-Peptid beladen (10^{-5} M bis 10^{-10} M) und als Zielzellen in ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuche eingesetzt. Die halbmaximale relative Lyse gibt dann Information über die Affinität der TZR des getesteten T-Zellklons zu dem präsentierten HLA-A2-Peptid-Komplex. Alle getesteten T-Zellklone waren in der Lage, YMD-beladene T2-Zellen zu lysieren. Erstaunlicherweise zeigte der TZR des T-Zellklons C18 die höchste Affinität der hier untersuchten T-Zellklone (8×10^{-8} M), obwohl er kaum in der Lage war, Melanomzellen zu lysieren, gefolgt vom TZR der C19 T-Zellen

(halbmaximale relative Lyse: 1×10^{-7} M). Die schlechteste Affinität zeigte der TZR des Klons Di111 (6×10^{-7} M).

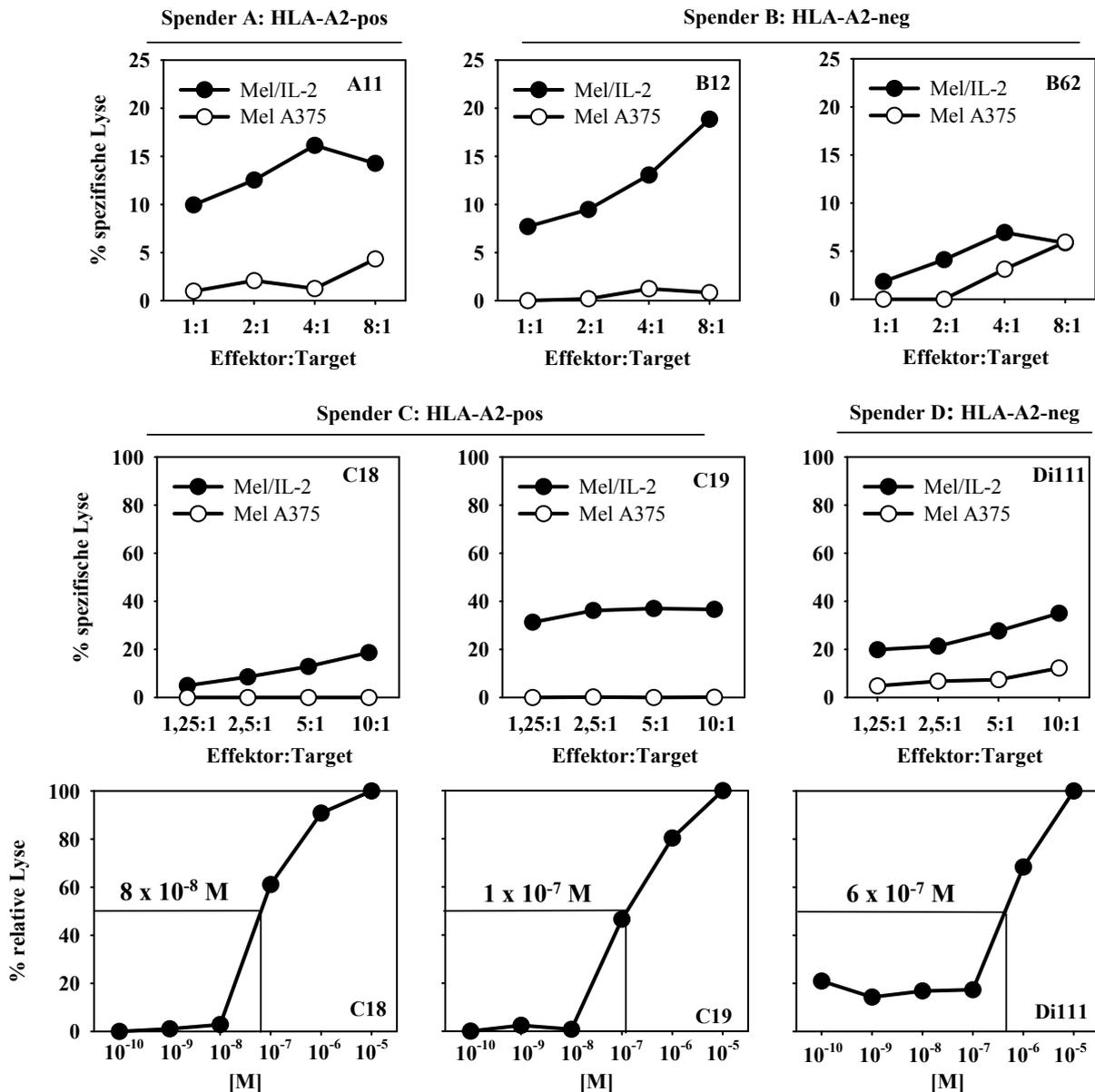


Abbildung 4.39 Zytotoxische Aktivität einiger T-Zellklone der *De-novo*-Induktionen I + II. Melanomzellen (Mel A375: A2⁺Tyr⁻ und Mel/IL-2: A2⁺Tyr⁺) und mit unterschiedlichen Mengen an YMD-Peptid-beladene T2-Zellen (10^{-5} M bis 10^{-10} M) wurden mit radioaktivem ^{51}Cr markiert und als Targetzellen in ^{51}Cr -Freisetzungs-Versuchen eingesetzt. Die Melanomzellen wurden mit verschiedenen Zellzahlen der T-Zellklone 4 h lang kokultiviert (Effektor:Targetzellen (E:T): 1:1; 2:1; 4:1 und 8:1 oder 1,25:1; 2,5:1; 5:1 und 10:1). Für die T2-Peptid-Titration wurden 10.000 bzw. 5.000 Peptid-beladene T2-Zellen mit 1.000 Effektorzellen kokultiviert (E:T=10:1 bzw. 5:1). Das freigesetzte radioaktive ^{51}Cr wurde gemessen und % spezifische bzw. bei der Titration % relative Lyse berechnet.

Die T-Zellklone, die mit der Sortierung III isoliert werden konnten, wurden ebenfalls auf ihre Fähigkeit untersucht, Mel A375- und Mel/IL-2-Zellen zu töten. Sie zeigten, wie schon bei der IFN- γ -Freisetzung, unterschiedliche Reaktivitäten (siehe Abbildung 4.40). Die Allo-A2-Spezifität des B S9 Klons bestätigte sich, da sowohl 80 % der HLA-A2⁺ Tyrosinase⁻ als auch

der HLA-A2⁺ Tyrosinase⁺-Zielzellen lysiert (E:T = 10:1). YMD-Peptid-beladene T2-Zellen wurden besser erkannt, je weniger YMD-Peptid geladen worden war. Das könnte eventuell darauf hindeuten, dass der Klon B S9 endogene(s) T2-Peptid/e erkennt, die von YMD-Peptiden bei Beladung mit höheren Konzentrationen (10^{-5}) verdrängt werden.

Der T-Zellklon B T39 tötete die Mel/IL-2-Zellen, die HLA-A2-Tyrosinase-Peptid-Liganden auf der Oberfläche präsentieren, besser als die HLA-A2⁺Tyrosinase⁻ Mel A375-Zellen (75 % vs. 51 % spezifische Lyse bei E:T von 10:1). Die T2-Peptid-Titration ergab eine Affinität für den TZR von 6×10^{-9} M, das Niveau der relativen Lyse sank jedoch nicht auf 0 % wie bei den anderen spezifischen Klonen, sondern hielt sich durchweg bei 20 %, auch noch bei YMD-Beladungen von bis zu 10^{-13} M (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass dieser Klon Eigenschaften aus einer Allo-A2-reaktiven und einer Peptid-spezifischen Komponente vereint (Allo-A2 + „Peptid“). Die T-Zellklone B T43 und B T58 hingegen zeigten deutlich ihre Tyrosinase-Peptid-Spezifität, weil sie nur die HLA-A2⁺ Tyrosinase⁺-Zielzellen Mel/IL-2 lysierten, B T58- etwas besser als B T43-T-Zellen (76 % vs. 54 % spezifische Lyse bei E:T= 10:1). Auch der TZR des B T58-T-Zellklons zeigte eine höhere Affinität als der TZR des B T43-T-Zellklons (halbmaximale relative Lyse: 8×10^{-10} M vs. 1×10^{-8} M).

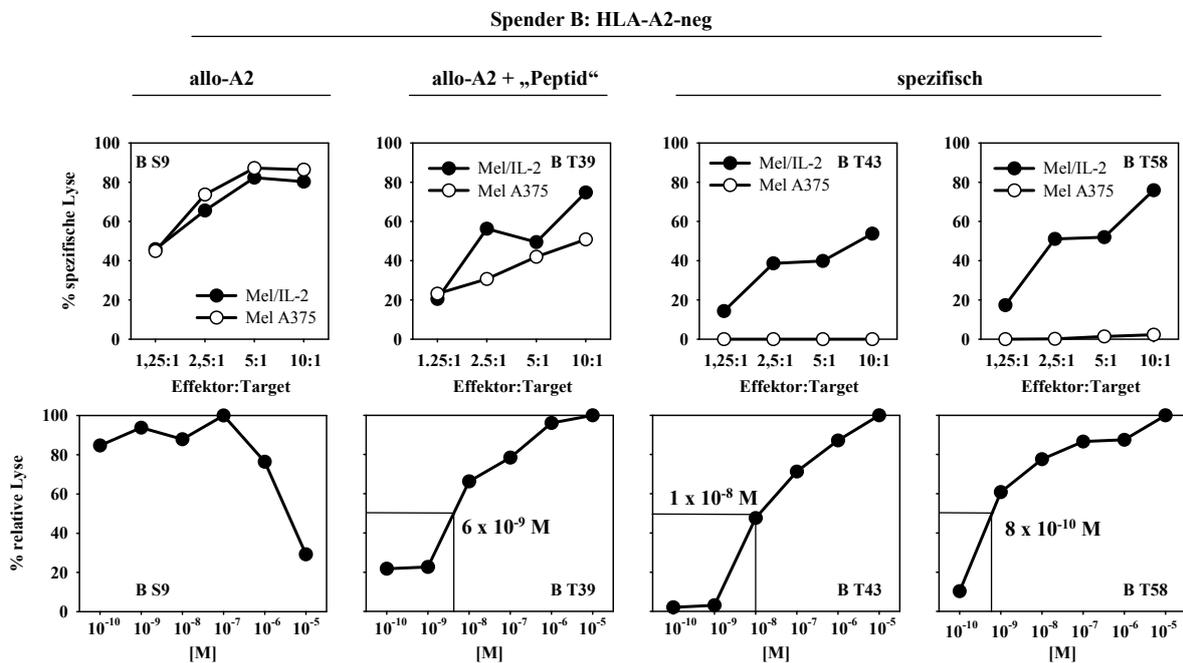


Abbildung 4.40 Zytotoxische Aktivität einiger T-Zellklone der Sortierung III. Melanomzellen (Mel A375: A2⁺Tyr⁻ und Mel/IL-2: A2⁺Tyr⁺) und mit unterschiedlichen Mengen an YMD-Peptid-beladene T2-Zellen (10^{-5} M bis 10^{-10} M) wurden mit radioaktiven ⁵¹Chrom markiert und als Targetzellen in ⁵¹Chrom -Freisetzungs-Versuche eingesetzt. Die Melanomzellen wurden mit verschiedenen Zellzahlen der HLA-A2-negativen T-Zellklone 4 h lang zusammen inkubiert (Effektor:Targetzellen (E:T): 1,25:1; 2,5:1; 5:1 und 10:1). Für die T2-Peptid-Titration wurden 10.000 bzw. 5.000 Peptid-beladene T2-Zellen mit 1.000 Effektorzellen kokultiviert (E:T=10:1 bzw. 5:1). Das freigesetzte radioaktive ⁵¹Cr wurde gemessen und % spezifische bzw. bei der Titration % relative Lyse berechnet.

In Tabelle 4.6 wurden die zytotoxischen Aktivitäten aller getesteten T-Zellklone zusammengefasst.

Tabelle 4.6 Übersicht der zytotoxischen Aktivitäten der untersuchten T-Zellklone

		Klone	halbmaximale relative Lyse [M]	LE (35 %)		LE/10 ⁶	
				Mel A375	Mel/IL-2	Mel A375	Mel/IL-2
Klone mit spezifischer Erkennung	HLA-A2-positiv	A11	n.d.	-	44.706	-	22
		C94	1 x 10 ⁻⁷	-	15.000	-	67
		C25	1 x 10 ⁻⁷	-	keine Lyse	-	-
		C18	8 x 10 ⁻⁸	-	20.667	-	48
		C19	1 x 10 ⁻⁷	-	4.000	-	250
		C115	1 x 10 ⁻⁷	-	3.294	-	304
		C49	1 x 10 ⁻⁸	-	5.647	-	177
	HLA-A2-negativ	B12	n.d.	-	18.214	-	55
		B T43	1 x 10 ⁻⁸	-	4.235	-	236
		B T5	4 x 10 ⁻⁹	-	5.177	-	193
		B T56	1 x 10 ⁻⁹	-	1.000	-	1.000
		B T31	2 x 10 ⁻⁹	-	1.000	-	1.000
		B T58	8 x 10 ⁻¹⁰	-	2.000	-	500
		B T59	8 x 10 ⁻¹⁰	-	2.000	-	500
		B T44	8 x 10 ⁻¹⁰	-	1.000	-	1.000
		Di111	6 x 10 ⁻⁷	-	10.000	-	100
Allo A2 + "Peptid"	HLA-A2-negativ	B T39	6 x 10 ⁻⁹	4.000	1.412	250	708
		B T49	3 x 10 ⁻⁹	2.352	588	425	1.701
Allo-A2	HLA-A2-negativ	B S9	keine Titration	-	-	-	-

* n.d. steht für nicht durchgeführt

In Abbildung 4.41 sind die Werte für die halbmaximale relative Lyse graphisch für die HLA-A2-restringierten, Tyrosinase-Peptid spezifischen T-Zellklone dargestellt, die von HLA-A2-positiven und HLA-A2-negativen Spendern erhalten wurden. Die Zusammenfassung aller spezifischen T-Zellklone zeigte, dass die HLA-A2-positiven T-Zellklone TZR mit niedrigerer Affinität besaßen als die Klone, die von HLA-A2-negativen Spendern erhalten wurden. Die Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen waren hochsignifikant (*).

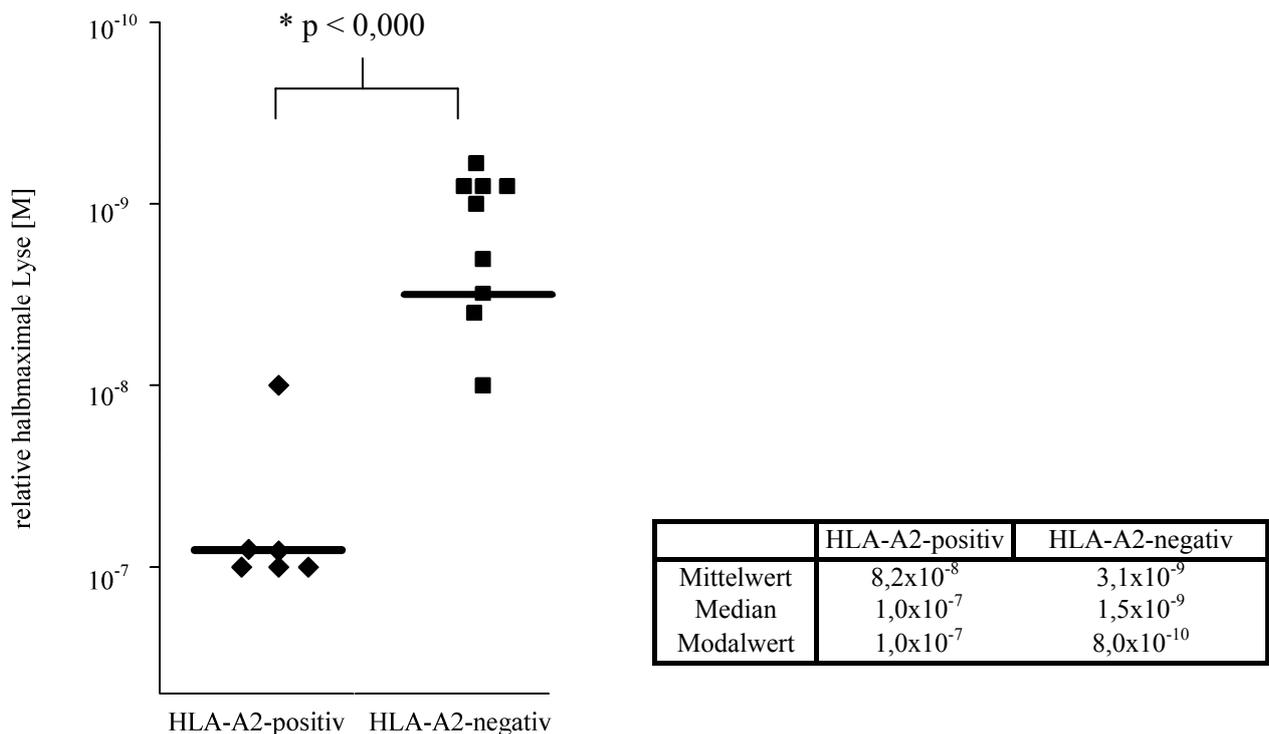


Abbildung 4.41 Vergleich der Affinitäten der TZR HLA-A2-positiver vs. HLA-A2-negativer T-Zellklone. Die Affinitäten der TZR der HLA-A2-positiven T-Zellklone (◆) unterscheiden sich von den Affinitäten der TZR HLA-A2-negativer T-Zellklone (■). Die schwarzen Balken stellen die jeweiligen Mittelwerte dar. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen sind hochsignifikant (*). In den Tabellen sind die Mittelwerte, Mediane und Modalwerte gezeigt.

4.4.5 Oberflächenexpression von „Fitness“-Markern auf T-Zellklonen

Da manche T-Zellklone sehr stark proliferierten, andere kaum oder gar nicht, wurden die Expression einiger „Fitness“-Marker und andere generelle Oberflächenmarker auf der Zelloberfläche der T-Zellen betrachtet. In Abbildung 4.42 wurden die HLA-A2-positiven T-Zellklone C18 und C19 aus der *De-novo*-Induktion II mit Antikörpern für folgende Oberflächenmarker gefärbt: CD25, IL-15R, IL-7R, CD28, CCR7, CD3 und CD8.

Beide T-Zellklone zeigten vergleichbare Mengen an CD3 auf der Oberfläche, C19 T-Zellen exprimierten etwas mehr CD8 als C18 T-Zellen. Unterschiede zwischen diesen beiden HLA-A2-positiven T-Zellklonen zeigten sich bei der CD25-, IL-15R- und IL-7R-Expression. C18-T-Zellen exprimierten mehr CD25 verglichen mit C19-T-Zellen. Im Gegensatz dazu konnten mehr IL-15R und IL-7R-Moleküle auf C19-T-Zellen detektiert werden. Diese Rezeptoren sind für das Binden der Wachstums-Faktoren IL-2, IL-7 und IL-15 verantwortlich. CD28- und CCR7-Moleküle konnten nicht auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

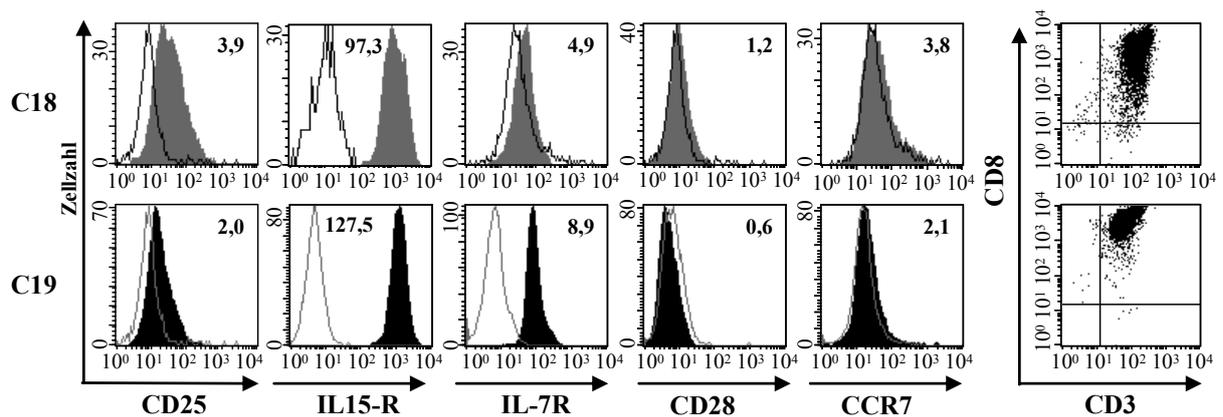


Abbildung 4.42 Oberflächenexpression einiger „Fitness“- und Oberflächenmarker auf HLA-A2-positiven T-Zellklonen der *De-novo*-Induktion II. Die HLA-A2-positiven T-Zellklone C18 und C19 wurden mit spezifischen Antikörpern gegen folgende Oberflächenmarker gefärbt: CD25, IL-15R, IL-7R, CD28, CCR7, CD3 und CD8. In den Histogrammen ist die Expression dieser Oberflächenmoleküle für beide T-Zellklone als gefüllte graue Kurven (C18) und gefüllte schwarze Kurven (C19) dargestellt. Die schwarzen bzw. grauen leeren Kurven zeigen die jeweiligen Isotyp-Kontrollen, die Zahlen in den Histogrammen die x-fache Expression. Die Doppelexpression von CD3 und CD8 ist in den rechts abgebildeten Streudiagrammen zu sehen.

Die Expression der Oberflächenmarker CD25, IL-15R, CD28, CTLA-4, CD3 und CD8 der Tetramer- und Streptamer-sortierten HLA-A2-negativen T-Zellklone des Spenders B sind in Abbildung 4.43 gezeigt. Für die Expression keiner der genannten Oberflächenmarker konnten Unterschiede beobachtet werden. Erstaunlicherweise zeigte der mittels Streptamersortierung erhaltene T-Zellklon B S9 kein verändertes Expressionsmuster, verglichen mit den aus der Tetramersortierung stammenden T-Zellklonen.

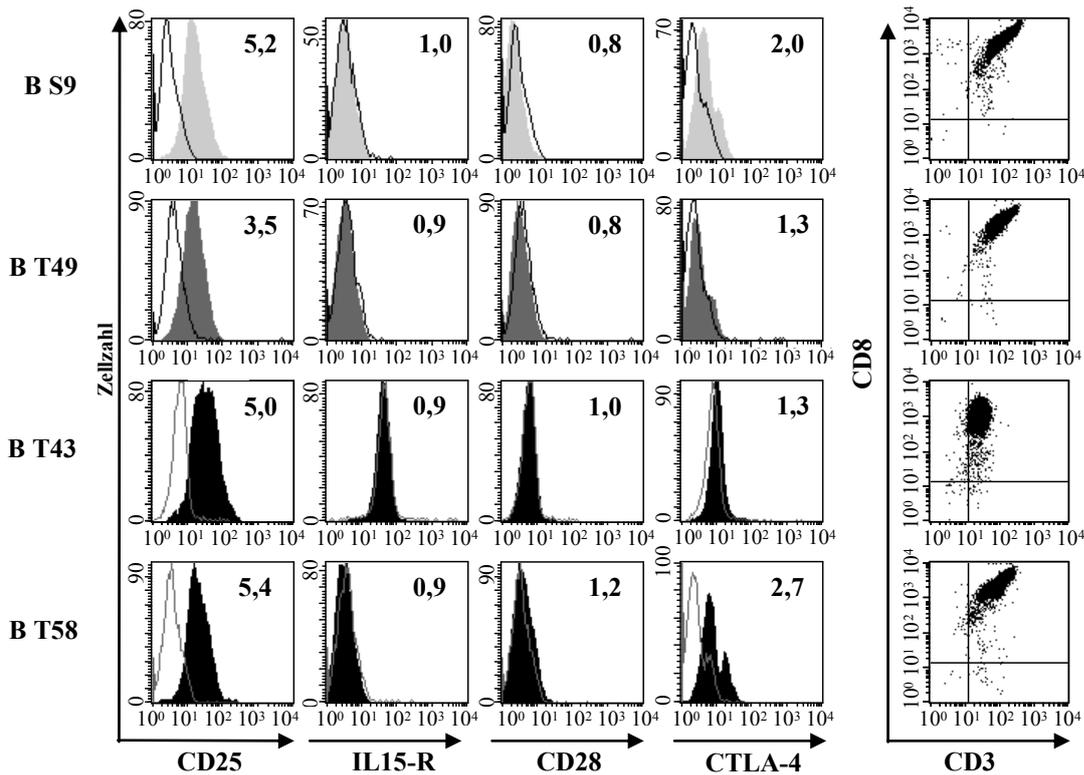


Abbildung 4.43 Expression ausgewählter Oberflächenmarker auf Tetramer- und Streptamer-sortierten T-Zellklonen. Einige Tetramer- und Streptamer-sortierte T-Zellklone des HLA-A2-negativen Spenders B wurden mit spezifischen Antikörpern gegen folgende Fitnessmarker gefärbt: CD25, IL-15R, CD28, CTLA-4, CD3 und CD8. In den Histogrammen ist die Expression dieser Oberflächenmoleküle für den T-Zellklon B S9 als gefüllte hellgraue Kurven, für den T-Zellklon B T49 als gefüllte dunkelgraue Kurven und für B T43 und B T58-T-Zellen als gefüllte schwarze Kurven dargestellt. Die schwarzen bzw. grauen leeren Kurven zeigen die jeweiligen Isotyp-Kontrollen, die Zahlen in den Histogrammen die x-fache Expression. Die Doppelexpression von CD3 und CD8 ist in den rechts abgebildeten Streudiagrammen zu sehen.

Die Expression der wichtigen Apoptose-Inhibitoren Bcl- x_L und Bcl-2 wurde auf RNS-Ebene mittels quantitativer Echtzeit-PCR („real-time“-PCR, RT-PCR) nachgewiesen (siehe Tabelle 4.7). Um die Menge an eingesetzter RNS mit einzuberechnen, wurde Neben Primern spezifisch für Bcl- x_L und Bcl-2 wurden zur Normalisierung der eingesetzten RNS-Menge auch spezifische Primer für die 18s rRNS (Haushaltsgen) verwendet. Alle erhaltenen CP-Werte („crossing point“, CP) wurden dann mittels der 18s rRNS-CP-Werte normalisiert.

Es konnten keine großen Unterschiede nachgewiesen werden. Alle T-Zellklone enthielten vergleichbare Mengen an Bcl- x_L - und Bcl-2-RNS. Die Expression der humanen Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT) konnte in keinem T-Zellklon gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 4.7 Bcl-x_L- und Bcl-2-Expression in einigen T-Zellklonen

	Klone	Bcl-x _L	Bcl-2
HLA-A2-positiv	C 19	9,6	10,2
	C 18	9,8	10,3
	C 44	8,4	8,2
HLA-A2-negativ	D 110	10,1	10,0
	B S9	7,0	10,2
	B T5	7,7	9,5
	B T31	8,3	11,2
	B T39	7,5	10,3
	B T44	6,9	10,2
	B T49	9,1	10,5
	B T56	6,7	9,9
	B T58	9,6	10,7
	B T59	8,8	10,5

4.5.6 T-Zell-Rezeptor Analyse der T-Zellklone

Um zu überprüfen, ob es sich bei den sortierten und mittels limitierender Verdünnung ausgesäten T-Zellen, um T-Zellklone handelte, wurden T-Zell-Rezeptor-Analysen durchgeführt.

In Tabelle 4.8 sind die α - und β -Ketten der Klone mit den jeweiligen hochvariablen CDR3-Regionen gezeigt. Bei den HLA-A2-positiven A11 T-Zellen handelte es sich nicht um einen T-Zellklon, da mittels PCR mehrere β -Ketten amplifiziert werden konnten. Die funktionellen Daten und vor allem die Tetramerfärbungen deuteten jedoch darauf hin, dass entweder ein YMD-spezifischer T-Zellklon über die anderen dominierte oder alle T-Zellklone YMD-Spezifität besaßen. Die HLA-A2-negativen B12 T-Zellen trugen zwei α - und eine β -Kette, es handelte sich bei B12 T-Zellen also um einen Klon. B62 war, wie aus den funktionellen Daten ersichtlich, nicht klonal. Fünf α - und vier β -Ketten konnten nachgewiesen werden.

Sowohl die HLA-A2-positiven T-Zellen C18, C19, C115, C94 und C49 als auch die HLA-A2-negativen Di111 T-Zellen waren klonalen Ursprungs (*De-novo*-Induktion II), wobei Di111 zwei α -Ketten besaß.

Bei den T-Zellklonen, die aus der Sortierung III (*De-novo*-Induktion I, Spender B) stammten, wird eine Unterteilung in vier Gruppen gezeigt. Die HLA-A2-restringierten YMD-Peptid-spezifischen B T5, B T31, B T44, B T56, B T58 und B T59-T-Zellen wurden zwar unabhängig getestet, stammten jedoch aus ein und derselben Ursprungs-T-Zelle, die während der *De-novo*-Induktion proliferierte, da alle diese Klone dieselbe α - und β -Kette (V α 7 und V β 23) mit derselben CDR3-Region trugen. B T39- und B T49-T-Zellen waren ebenfalls klonal und selben Ursprungs. Bei diesen beiden Klonen konnten eine α -Ketten und eine β -Kette nachgewiesen werden (V α 15 und V β 23). Die B T39- und B T49-T-Zellen hatten in der funktionellen Analyse gezeigt, dass sie eine Allo-A2-spezifische und ein Peptid-spezifische Komponente vereinten. Bei

B T43 T-Zellen handelte es sich um einen YMD-spezifischen T-Zellklon, der die α -Kette Va16 und β -Kette V β 21 trug. Die Allo-A2-reaktiven B S9 T-Zellen waren ebenfalls klonalen Ursprungs (Va22 und V β 6).

Tabelle 4.8 TZR-Repertoire einiger ZTL

De-novo-Induktion I	T-Zellen	TZR	CDR3
HLA-A2-pos	A11	kein Klon, β -Repertoire +/- vollständig	
HLA-A2-neg	B12	AV7S2AJ38 AV14S2AJ28 BV6S4BD2.1BJ2.3	RPVNAGNNRKL INSGAGSYQL SSISLPSTDTQ
	B62	AV2S1AJ20 AV3S1AJ31 AV7S2AJ38 AV12S1AJ32 AV16S1AJ29 BV2S1BD1.1BJ1.4 BV6S4BD1.1BJ1.1 BV7S1BD2.1BJ2.3 BV21S3DB2.1BJ2.7	NRDYEL DGSARSARL RDHNAGKIMFG SAWTTNKL RDPSGNTPL AWPRANEKL SLASTGSEA SQGEGFGTDTQ SLAFGQGRSIEQ
De-novo-Induktion II			
HLA-A2-pos	C18	AV1S4AJ54 BV13S1BD1.1BJ1.1	GAGQGAQKL SYFQGGTEA
	C19 + C115	AV22S1AJ28 BV8BD2.1BJ2.5	KNSGAGSYQL SSQTVQETQ
	C94	n.d. BV6S2BD2.1BJ2.7	n.d. SLGAEQ
	C49	AV22S1AJ28 BV23S1BD2.2BJ2.5	TYSGAGSYQL SHRQGQETQ
HLA-A2-neg	Di111	AV1S5AJ20 AV16S1AJ28 BV18S1BD2.1BJ2.7	SSNDYKL RDPGAGSYQL SPSEGYSIEQ
Sortierung III			
HLA-A2-neg	T5, T31, T44, T56, T58, T59	AV7S2AJ28 BV23S1BD1.1BJ1.4	TYSGAGSYQL SQKQGWEKL
	T39, T49	AV15S1AJ6 BV23S1BD1.1BJ1.5	SRSGGSYIP SKSLEANQPQ
	T43	AV16S1AJ28 BV21S2A2BD2.1BJ2.1	RDPGAGSYQL SLEREGTNEQF
	S9	AV6S1AJ6 BV22BD1.1BJ1.3	REASGGSYIP SSADREGNTI

* n.d. steht für nicht durchgeführt.

4.5.7 Analyse unterschiedlicher T-Zell-Zytokine ausgewählter T-Zellklone mittels Multiplex-Verfahren

Da T-Zell-Zytokine wichtige Signalproteine darstellen, die die Funktion anderer Zellen beeinflussen, sollten zusätzlich zur Freisetzung von IFN- γ noch verschiedene andere T-Zell-Zytokine untersucht werden. Außerdem sollte die Frage beantwortet werden, ob die HLA-A2-negativen T-Zellen, die mittels Präsentation von Fremd-MHC-Tyrosinase-Peptid-Komplexen generiert worden waren, andere Zytokine ausschütteten als die HLA-A2-positiven T-Zellen, die mittels Präsentation von Selbst-MHC-Tyrosinase-Peptid-Komplexen induziert worden waren. Die während Koinkubation mit Zielzellen sezernierten Zytokine konnten mit Hilfe der sogenannten „Multiplex“-Methode in den Zellkulturüberständen quantitativ bestimmt werden. Es wurde die Freisetzung folgender Zytokine untersucht: IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ und MIP-1 β . In Abbildung 4.44 sind die Zytokinwerte für die Zytokine IL-2, IL-5, IL-13, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ und MIP-1 β gezeigt, die von den T-Zellklonen sezerniert wurden und bei deren Freisetzung Unterschiede beobachtet werden konnten. Die Diagramme zeigen die Zytokinfreisetzung während Kokultur mit unbeladenen und YMD-beladenen T2-Zellen, die Zytokin-Sekretion während Koinkubation mit HLA-A2⁺ Tyrosinase⁻ Melanomzellen und HLA-A2⁺ Tyrosinase⁺ Mel/IL-2-Zellen wurde zwar ebenfalls gemessen, wird jedoch nicht gezeigt, da nur geringe Unterschiede zu sehen waren. Um ausschließen zu können, dass die gemessenen Zytokine von den Zielzellen freigesetzt worden waren, wurden Überstände der Zielzellen alleine als Kontrollen verwendet. Die ersten Unterschiede zeigten sich bei der IL-2-Sekretion: HLA-A2-positiv T-Zellklone waren kaum in der Lage, während Koinkubation mit HLA-A2-YMD-Liganden in Form von YMD-beladenen T2-Zellen, IL-2 für die eigene Proliferation freizusetzen. Im Gegensatz dazu zeigten alle untersuchten HLA-A2-negativen T-Zellklone IL-2-Werte zwischen 100 und 200 pg/ml. Bei Kokultur mit unbeladenen T2-Zellen wurde kaum IL-2 sezerniert. Das Zytokin IL-5, das zu Aktivierung von B-Zellen führt, wurde hingegen hauptsächlich von HLA-A2-positiven T-Zellen sezerniert. Nur ein HLA-A2-negativer T-Zellklon, B T31, setzte hohe Mengen an IL-5 frei. Bei Kokultur mit spezifischen Ligand (YMD-beladene T2-Zellen) konnte mehr IL-5 detektiert werden als nach Koinkubation mit unspezifischem Liganden. Das inhibitorische Zytokin IL-10 wurde nur von einem einzigen HLA-A2-positiven T-Zellklon (C19) während Koinkubation mit YMD-beladenen T2-Zellen sezerniert (Daten nicht gezeigt). Das Zytokin IL-13 führt zu B-Zellwachstum und wird durchschnittlich in größeren Mengen während Kontakt mit spezifischen Liganden von HLA-A2-positiven T-Zellen freigesetzt. Der Faktor GM-CSF, der eine Rolle bei

Wachstum und Differenzierung der myelomonozytischen Linie spielt, wurde nur in geringen Mengen sezerniert (ca. 50 pg/ml). TNF- α , das von T-Zellen bei lokalen Entzündungen freigesetzt wird und zur Aktivierung des Endothels führt, wurde von beiden Gruppen freigesetzt, tendenziell sezernierten die HLA-A2-negativen T-Zellklone etwas mehr TNF- α als die HLA-A2-positiven T-Zellen. Die IFN- γ -Werte der vorangegangenen ELISA-Versuche konnten mittels Multiplex-Methode bestätigt werden. Im Vergleich zu den HLA-A2-negativen T-Zellklonen sezernierten die HLA-A2-positiven weniger oder gar kein IFN- γ . Das Chemokin MIP-1 β wurde von allen T-Zellen in hohem Ausmaß freigesetzt, oft über die Nachweisgrenze hinaus (> 2600 pg/ml). Die HLA-A2-negativen T-Zellen schienen jedoch mehr MIP-1 β zu sezernieren.

Die erhaltenen Zytokinmuster der T-Zellklone, die aus *De-novo*-Induktionen mit *ivt*RNS-beladenen DZ stammten, sollten mit den Zytokinprofilen der bereits bestehenden T-Zellklone TyrF8 und IVS B verglichen werden. IL-2 und IL-10 wurden von keinem dieser beiden T-Zellklone freigesetzt (blaue Kreise: TyrF8 ZTL; grüne Kreise: IVS B ZTL). Nur YMD-spezifische IVS B ZTL schütteten während Koinkubation mit YMD-beladenen T2-Zellen IL-5 in großen Mengen aus. TyrF8 T-Zellen setzten kein IL-5 frei. Das Zytokin IL-13 wurde von IVS B ZTL nach Kontakt mit YMD-beladenen, von TyrF8 ZTL nach Kontakt mit YMD- und YMN-beladenen T2-Zellen sezerniert. GM-CSF und TNF- α wurde während Koinkubation mit beladenen T2-Zellen kaum freigesetzt. IFN- γ -Ausschüttung zeigten nur TyrF8 ZTL, YMN-Peptid-Liganden führten zu höheren Werten. IVS B ZTL konnten MIP-1 β nur während Koinkubation mit YMD-beladenen T2-Zellen freisetzen, TyrF8 ZTL zeigten Erkennung beider Peptide (YMD und YMN).

Vergleicht man die Zytokinmuster der mittels *ivt*RNS-beladenen DZ generierten T-Zellen mit den mittels YMN-Peptid-beladenen APZ induzierten TyrF8 T-Zellen und den IVS B T-Zellen, die aus einem Melanompatienten isoliert wurden, so deutet sich an, dass Unterschiede in der Induktion der T-Zellen dazu führten, dass die T-Zellen andere Zytokine sezernierten.

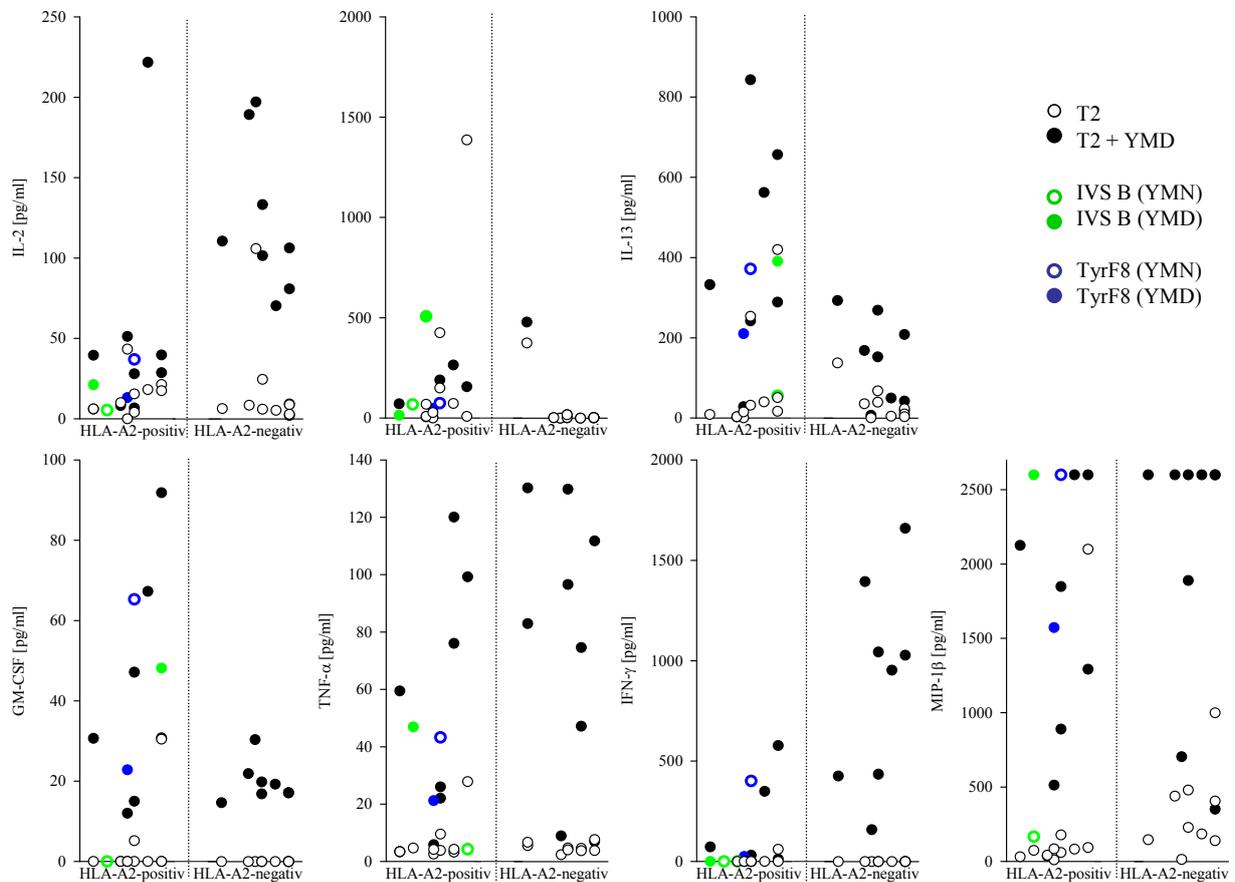


Abbildung 4.44 Zytokinmuster der HLA-A2-positiven und HLA-A2-negativen ZTL, die mittels *De-novo-Induktion I + II* angereichert wurden im Vergleich zu TyrF8 und IVS B ZTL. Mit Hilfe der Multiplex-Methode wurden die Zytokine IL-2, IL-5, IL-13, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ und MIP-1 β in den Überständen von Kokulturen aus T-Zellen aller Spender mit Zielzellen nachgewiesen (\circ = unbeladene T2-Zellen, \bullet = YMD-beladene T2-Zellen). In Blau sind die Zytokin-Werte der TyrF8 T-Zellen, in Grün die Zytokinfreisetzung der IVS B T-Zellen gezeigt. Gefüllte farbige Kreise stehen für Zytokinfreisetzung von TyrF8 und IVS B T-Zellen während Kokultur mit YMD-beladenen T2-Zellen, leere farbige Kreise für Zytokinfreisetzung während Kokultur mit YMN-beladenen T2-Zellen.

5 Diskussion

Das Ziel dieser Doktorarbeit war, HLA-A2-restringierte Peptid-spezifische CD8⁺-T-Zellen für die adoptive Therapie von Patienten mit Tumoren zu generieren. Im Folgenden wird eine neuartige Methode diskutiert, die es ermöglicht, T-Zellen mit hoch affinen TZR und Spezifität für Tumor-assoziierte Peptide zu induzieren, die von in Tumorzellen überexprimierten Selbst-Proteinen stammen. Ein generelles Problem bei der Generierung von Tumor-Peptid-spezifischen T-Zellen ist, dass diejenigen T-Zellen, die TZR mit hoher Affinität für solche Selbst-Peptide tragen, während ihrer Entwicklung im Thymus durch den Prozess der negativen Selektion eliminiert werden, um Autoimmunität zu verhindern. Die TZR-Affinitäten von Selbst-reaktiven T-Zellen, die diesen Prozess überstehen, sind normalerweise niedrig (Theobald *et al.*, 1997; Collela *et al.*, 2000; Molldrem *et al.*, 2003). Deshalb sollten einerseits mit Hilfe von *ivt*RNS-beladenen DZ allorestingierte T-Zellen (Fremd-MHC + Selbst-Peptid) generiert werden, indem ein allogenes T-Zellrepertoire abgegriffen wurde, das keiner negativen Selektion unterzogen worden war, andererseits sollten Tumor-spezifische T-Zellen induziert werden, welche die negative Selektion überstanden haben (Selbst-MHC + Selbst-Peptid). Diese beiden Ansätze wurden in ihrer Fähigkeit verglichen, T-Zellen mit hoch affinen TZR zu induzieren, die in der Lage waren, Tumorzellen effizient zu lysieren. Für Patienten, deren Tumoren das jeweilige TAA exprimieren, könnten die erhaltenen T-Zellen entweder *ex vivo* für einen adoptiven T-Zelltransfer expandiert werden oder die isolierten TZR-Sequenzen dieser T-Zellen zur Herstellung TZR-transgener T-Zellen verwendet werden.

Im Folgenden wird diskutiert, warum autologe DZ als Antigen-präsentierende Zellen (APZ) verwendet wurden und welche Vorteile sich durch die Beladung mit *ivt*RNS ergeben. Die beiden Protokolle zur *De-novo*-Induktion Peptid-spezifischer T-Zellen wurden auf die Fähigkeit hin verglichen, T-Zellen mit hoch affinen TZR zu generieren. Verschiedene Strategien zur Isolierung der gesuchten T-Zellen wurden untersucht. Die so erhaltenen T-Zellklone beider *De-novo*-Induktions-Protokolle wurden aufgrund von Funktionalität, TZR-Affinität und „Fitness“ miteinander und mit den bereits auf andere Arten etablierten T-Zellklonen TyrF8 und IVS B verglichen. Abschließend werden die mit adoptiven T-Zelltransfer verbundenen Gefahren erörtert.

5.1 *ivt*RNS-beladene DZ als APZ

Zuerst wird diskutiert, welche APZ sich zur effizienten Induktion von TAA-spezifischen T-Zellen eignen. Zytotoxische CD8⁺-T-Zellen stellen wichtige Effektorzellen dar, die Immunität gegen Tumoren vermitteln (Greenberg, 1991; Pardoll, 2001). Die beste Fähigkeit zur Stimulation von T-Zellen besitzen professionelle APZ, die mDZ (Banchereau *et al.*, 1998). Mature DZ sind auf die Antigen-Präsentation spezialisiert und zeigen eine hohe Expression von MHC-Klasse-I-, MHC-Klasse-II-Molekülen und wichtigen kostimulatorischen Molekülen, wie CD80, CD86 und CD40. Da mDZ neben Signal 1 über MHC-Peptid-Komplexe den T-Zellen auch Signal 2 über kostimulatorische Moleküle, wie CD80 und CD86, liefern und vor allem T-Zell-Wachstumsfördernde Zytokine sezernieren, eignen sie sich sehr gut für die Aktivierung spezifischer T-Zellen. Fehlt Signal 2, wie bei iDZ, die zwar Antigene in der Peripherie aufnehmen aber kaum kostimulatorische Moleküle exprimieren, so wird den T-Zellen Toleranz vermittelt, wodurch sie entweder in einen anergen Zustand versetzt oder deletiert werden, um Reaktivität gegen Eigengewebe zu verhindern (Steinman *et al.*, 2002). Auch können iDZ regulatorische T-Zellen induzieren, die Tumor-reaktive T-Zellen inhibieren können (Lutz *et al.*, 2002). Mature DZ scheinen deshalb am besten zur Aktivierung von T-Zellen geeignet zu sein, da neben ihrer Eigenschaft, naive T-Zellen zu aktivieren, die Toleranz-Induktion Tumor-Peptid-spezifischer T-Zellen weitgehend ausgeschlossen werden kann.

Wie können nun diese professionellen APZ mit TAA beladen werden? Am häufigsten wurden DZ bisher exogen mit synthetischen Peptiden für TAA beladen (Nestle *et al.*, 1998; Rosenberg, 1999; Thurner *et al.*, 1999). Hierfür muss allerdings die Sequenz des immunogenen TAA-Peptids bekannt sein, das über MHC-Moleküle präsentiert wird. Sollen T-Zellen gegen ein noch nicht in der Literatur beschriebenes TAA generiert werden, so ist viel Vorarbeit nötig, um herauszufinden, wie das Protein prozessiert und präsentiert wird. Erschwerend kommt hinzu, dass MHC-Varianten, bedingt durch Unterschiede ihrer Peptidbindetaschen, verschiedene Peptide präsentieren.

Eine vorteilhafte Alternative als Quelle für Antigene ist Gesamt-RNS, da diese im Zytosol als Ganzes translatiert wird, den DZ also Proteine für die Prozessierung und Peptide für die Präsentation zur Verfügung stehen und somit die Sequenz immunogener Peptide nicht bekannt sein muss. Folglich kann jedes TAA, für das die cDNS-Sequenz bekannt ist, in Form von *ivt*RNS transferiert werden. Auch wurde gezeigt, dass mDZ, die mit Antigen-RNS transfiziert wurden im Vergleich mit Peptid-beladenen DZ, über einen längeren Zeitraum Antigen präsentierten und die Stimulation mit RNS-beladenen DZ zu einer höheren Frequenz an spezifischen T-Zellen mit hoher Avidität gegen Tumor-Antigene führte (Liao *et al.*, 2004). Kürzlich konnte von unserer

Gruppe gezeigt werden, dass die Elektroporation von mDZ mit RNS im Vergleich zur Elektroporation von iDZ zu einer hohen Protein-Expression führte und den Phänotyp der mDZ nicht veränderte (Javorovic *et al.*, 2005). Außerdem hatten diese RNS-beladenen mDZ die Fähigkeit, spezifische T-Zellen zu aktivieren. Allorestrierte T-Zellen mit hoch affinen TZR sollten erhalten werden, indem mDZ einerseits mit einer *ivtRNS*, kodierend für ein ausgewähltes Antigen, und andererseits mit einer *ivtRNS*, kodierend für ein MHC-Allel, kotransfiziert wurden. Zur Überprüfung unserer Annahme, auf diese Weise T-Zellen mit hoch affinen TZR zu erhalten, wurden *ivtRNS* für das Melanom-assoziierte Antigen Tyrosinase und *ivtRNS* für das MHC-Klasse-I-Molekül HLA-A2 verwendet. Prinzipiell könnte jedes MHC-Klasse-I- oder MHC-Klasse-II-Molekül in Form von *ivtRNS* transferiert werden, für das die DNS-Sequenz bekannt ist. Somit könnten nicht nur zytotoxische MHC-Klasse-I-restringierte CD8⁺-T-Zellen, wie in dieser Arbeit gezeigt, sondern auch MHC-Klasse-II-restringierte CD4⁺-T-Helfer-Zellen induziert werden.

Einzelnen konnte sowohl die HLA-A2-*ivtRNS* als auch die Tyrosinase-*ivtRNS* in DZ sehr gut zur Expression gebracht werden (siehe Abbildung 4.7). Wurden die beiden *ivtRNS*-Spezies jedoch im gleichen Mengen-Verhältnis transferiert, so war die HLA-A2-Expression zu allen gemessenen Zeitpunkten, verglichen mit der Einzeltransfektion, erniedrigt. Auch bei der Kotransfektion von Melanom-assoziiertes Melan-A-*ivtRNS* mit HLA-A2-*ivtRNS* konnten weniger HLA-A2-Moleküle auf der Oberfläche detektiert werden (siehe Abbildung 4.9). Zusätzlich wurde weniger Melan-A-Protein nachgewiesen. Da beide *ivtRNS*-Spezies einzeln sehr gut translatiert wurden, schien nicht der Transport der HLA-A2-Moleküle oder der TAA-Peptide in das ER oder die dort erfolgende Peptid-Beladung der MHC-Moleküle und der Transport an die Oberfläche betroffen zu sein. Eher wahrscheinlich war eine gegenseitige Beeinflussung beider *ivtRNS*-Spezies. Einen wichtigen Aspekt in diesem Zusammenhang stellt die Qualität der *ivtRNS* dar. Die meisten eukaryotischen mRNS besitzen zur Stabilisierung Poly(A) -Schwänze im 3'-Bereich, welche die Gen-Expression regulieren (Munroe *et al.*, 1990, Colgan *et al.*, 1997). Da die transfizierte *ivtRNS* nach *in vitro* Transkription mit Hilfe von gekauften Reagenzien polyadenyliert wurde, sind Unterschiede in der Länge der angehängten Poly(A) -Schwänze der verschiedenen *ivtRNS*-Chargen möglich. Die verschiedenen RNS-Spezies waren funktionell in Ordnung, allerdings ist *ivtRNS* umso stabiler, je mehr Adenosintriphosphate angehängt werden. Möglicherweise bedingt die Struktur der *ivtRNS*, dass die *ivtRNS*, kodierend für Tyrosinase besser polyadenyliert und stabilisiert werden kann als *ivtRNS*-Spezies, die für MHC-Moleküle kodieren. Um solche Variablen auszuschließen, wurden auch einheitlich stabilisierte *ivtRNS* getestet. Die Verwendung dieser RNS scheiterte jedoch an

der schlechten Expressionseffizienz und Fähigkeit, Peptid-spezifische T-Zellen zu aktivieren (siehe Abbildung 4.3 und 4.4).

Außer der Qualität der *ivt*RNS könnte auch die Proteinsynthese in den DZ eine Rolle spielen. Bei der Proteinsynthese hängt die Effizienz der Translations-Initiation von der in der Nähe der 5'-Cap-Struktur gelegenen *Kozak*-Sequenz ab, der Startstelle auf der mRNA für die Translation. Punktmutationen in der Nähe des AUG-Startkodons können die Effizienz der Translation beeinflussen (Kozak, 1984). An dieser Sequenz initiieren die Ribosomen die Translation der mRNA in Polypeptidsequenzen. Die Regulation der Translation ist vielfältig. Z.B. kann in eukaryotischen Zellen eine höhere Translationseffizienz durch Polyribosomen erreicht werden. So werden mehrere Ribosomen genannt, die gleichzeitig an ein mRNA-Molekül binden und dieses translatieren (Campbell, 1997). Nichtsdestotrotz sind sowohl die Anzahl an Ribosomen in einer Zelle als auch ihre Kapazität begrenzt, da Ribosomen ca. 30-60 Sekunden für die Translation eines RNS-Moleküls benötigen. Es könnte folglich möglich sein, dass die beiden transferierten polyadenylierten *ivt*RNS um die vorhandenen Ribosomen in der DZ konkurrieren müssen. Anhand der Ergebnisse wäre es vorstellbar, dass die Startstelle der Tyrosinase-*ivt*RNS effizienter in der Bindung und Initiation der Ribosomen ist. Da *ivt*RNS aufgrund intrazellulärer RNasen sehr instabil ist und sehr schnell degradiert wird, könnte dies ein Grund sein, warum bei gleichzeitiger Transfektion von Tyrosinase- und HLA-A2- *ivt*RNS weniger HLA-A2-Protein synthetisiert wurde. Auch wäre vorstellbar, dass Melan-A- und HLA-A2-*ivt*RNS-Spezies ähnlich effiziente Initiations-Sequenzen besitzen könnten. Bei Kotransfektion beider *ivt*RNS-Spezies muss die gleiche Anzahl an Ribosomen mehr RNS-Moleküle in Protein umschreiben. Das kurze Zeitfenster, in dem die *ivt*RNS den Ribosomen für die Translation zur Verfügung steht, sowie die begrenzte Anzahl an Ribosomen, könnte dazu führen, dass von beiden *ivt*RNS weniger Protein synthetisiert wird.

Ein weiterer Vorteil des RNS-Transfers ist, dass die Mengen an Antigen- und HLA-A2-*ivt*RNS beliebig variiert werden können. So konnte durch Transfektion mit einer größeren Menge an HLA-A2-*ivt*RNS der erniedrigten HLA-A2-Expression bei Kotransfektion gleicher RNS-Mengen für TAA und MHC-Moleküle entgegengewirkt werden (siehe Abbildung 4.11). Die beste Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation wurde erreicht, wenn mit 48 µg HLA-A2- und 24 µg Tyrosinase-*ivt*RNS elektroporiert wurden (siehe Abbildung 4.12). Wahrscheinlich auch deshalb, weil HLA-A2-Moleküle innerhalb der DZ nicht nur mit Tyrosinase-Peptiden, sondern auch mit prozessierten Peptiden anderen Ursprungs beladen werden und durch den Überschuss an HLA-A2-Molekülen die höchste Anzahl an HLA-A2-Tyrosinase-Peptid-Komplexen erreicht werden konnte.

Die T-Zellklone, mit denen die erfolgreiche Präsentation von Peptid-MHC-Komplexen auf der Oberfläche der DZ überprüft wurde, sezernierten höhere Mengen an IFN- γ während der Kokultur mit Melanomzellen (Mel/IL-2), die HLA-A2-Tyrosinase-Peptid-Liganden exprimierten. Die bessere Stimulation durch Melanomzellen kann möglicherweise folgendermaßen erklärt werden: Im Gegensatz zu den transient transfizierten DZ sind die Liganden in Melanomzellen endogenen Ursprungs. HLA-A2- und Tyrosinase-Proteine werden folglich durch Transkription endogener Gene ständig translatiert und in Form von Peptid-MHC-Liganden nachgeliefert. Die Halbwertszeit für Peptid-MHC-Komplexe auf der Oberfläche von DZ beträgt durchschnittlich 19,9 h (Zehn *et al.*, 2004). Da DZ nur transient mit RNS transfiziert wurden, kann vermutet werden, dass bereits nach relativ kurzer Zeit keine RNS-Moleküle mehr für die Neusynthese von Protein zur Verfügung stehen.

5.2 Funktionalität der etablierten Tyrosinase-Peptid-spezifischen CD8⁺-T-Zellklone: TyrF8 und IVS B

Als Ausgangspunkt für die Generierung von Tyrosinase-Peptid-spezifischen T-Zellen dienten die in der Literatur beschriebenen T-Zellklone TyrF8 und IVS B. Die TyrF8 ZTL stammen aus PBMC eines gesunden Spenders und wurden mit Hilfe von autologen YMN-Peptid-beladenen APZ induziert und expandiert (Visseren *et al.*, 1995). IVS B ZTL wurden aus den PBMC eines Melanom-Patienten isoliert und durch gemischte Lymphozyten-Tumorzellkulturen angereichert (Wölfel *et al.*, 1993). Das Ziel war, T-Zellklone mit höheren Aviditäten zu induzieren, die eine bessere Funktionalität zeigten als TyrF8 und IVS B T-Zellen. Zu diesem Zweck wurden zuerst die ZTL-Antworten dieser beiden T-Zellklone mit verschiedenen Methoden analysiert. Untersucht wurden Intensität und Dissoziation der A2-YMD- Tetramerbindung als Anhaltspunkt für die Avidität der T-Zellklone, die Fähigkeit zur IFN- γ -Sekretion, Zytotoxizität gegenüber Melanomzellen und die Affinität der TZR.

TyrF8 T-Zellen wurden gegen das HLA-A2-restringierte Tyrosinase₃₆₈₋₃₇₆ Epitop YMNNGTMSQV generiert, das aus der Aminosäuresequenz des Tyrosinase-Proteins vorhergesagt worden war (Wölfel *et al.*, 1994). Später wurde herausgefunden, dass sich dieses sogenannte YMN-Peptid leicht von dem posttranskriptional modifizierten Tyrosinase₃₆₈₋₃₇₆ Epitop YMDGTTMSQV (YMD-Peptid) unterscheidet, das mit Hilfe von Massenspektrometrie der Peptide einer HLA-A*0201 Melanomzelllinie isoliert wurde (Skipper *et al.*, 1996). Tyrosinase-Protein exprimierende Zellen präsentieren nur dieses YMD-Peptid (Mosse *et al.*, 1998). Der Unterschied besteht in einer posttranslationalen Modifikation des Asparagins (N) zu Asparaginsäure (D). Der kleine Unterschied dieser beiden Peptide spielt keine Rolle bei der

Peptid-Bindung an HLA-A2-Moleküle, ist jedoch für die Erkennung durch Tyrosinase-spezifische ZTL von großer Bedeutung: YMN-Peptid-spezifische TyrF8 T-Zellen waren zwar in der Lage, auch A2-YMD-Liganden zu detektieren, aber die Intensität der Bindung war geringer und auch die Dissoziation des Tetramers erfolgte schneller (siehe Abbildung 4.14). Aufgrund dieser beiden Eigenschaften war die TZR-Affinität für den HLA-A2-YMD-Peptid-Komplex von TyrF8 ZTL folglich niedriger als von IVS B ZTL (Yee *et al.*, 1999, Palermo *et al.*, 2005). Dennoch waren TyrF8 T-Zellen in der Lage, während der Kokultur mit YMD-beladenen T2-Zellen IFN- γ zu sezernieren, zwar nicht so große Mengen wie während Koinkubation mit YMN-beladenen T2-Zellen, aber mehr als IVS B T-Zellen (siehe Abbildung 4.15). IVS B ZTL hingegen zeigten nur Reaktivität gegen das YMD-Peptid, nicht aber gegen das YMN-Peptid. Koinkubation mit Melanomzelllinien, die nur das posttranskriptional modifizierte Epitop präsentieren, führten zu einer ähnlichen Aktivierung beider T-Zellklone. Die geringe Frequenz an Tyrosinase-Peptid-spezifischen T-Zellen in gesunden Spendern und Melanom-Patienten zeigte, dass es sich bei dem Tyrosinase-Protein im Vergleich zu anderen Melanom-assoziierten Proteinen wie z.B. Melan-A um ein nicht sehr immunogenes Antigen handelt (Kamakami *et al.*, 1994). Manchmal können in solchen Fällen leicht veränderte Peptide von T-Zellen besser erkannt werden und zu einer stärkeren Immunantwort führen (Dyall *et al.* 1998). Solche Peptide werden „heteroklitisch“ genannt und unterscheiden sich in Aminosäuren, die das Binden an MHC-Moleküle bzw. Interaktionen zwischen APZ und ZTL beeinflussen. Die leicht veränderten Sequenzen können zu höherer Stabilität in der MHC-Bindung und immunogeneren Peptiden führen. Wenn solche Peptide, z.B. das YMN-Peptid, für die Induktion verwendet werden, kann es sein, dass die aktivierten ZTL auch auf das tatsächlich vorkommende Peptid reagieren können, wie das bei TyrF8 T-Zellen der Fall war. Diese gegen YMN-Peptid generierten TyrF8 T-Zellen zeigten nicht nur bessere Funktion bezüglich ihrer IFN- γ -Sekretion gegenüber den IVS B T-Zellen, die aus einem Melanom-Patienten isoliert worden waren, sondern konnten auch besser HLA-A2-Tyrosinase-Peptid-präsentierende Melanomzellen lysieren (siehe Abbildung 4.16). Auch die TZR-Affinitäten beider Klone unterschieden sich. Der IVS B T-Zellklon war nicht in der Lage, mit YMN-Peptiden beladene T2-Zellen zu lysieren und zeigte nur geringe TZR-Affinität für das YMD-Peptid (3×10^{-7} M). Der TZR der TyrF8 T-Zellen hingegen besaß höhere Affinitäten zu beiden HLA-A2-restringierten Epitopen (YMD-Peptid: 1×10^{-7} M, YMN-Peptid: 4×10^{-8} M). Im Vergleich zu ZTL-Klonen, die virale Epitope erkennen und deren TZR-Affinitäten von Visseren und Kollegen bis zu 10^{-12} M beschrieben wurden, sind die Affinitäten von TyrF8-TZR dennoch niedrig (Visseren *et al.*, 1995). In dieser frühen Publikation wurde eine Affinität der TyrF8-TZR für YMN-Peptid von 10^{-9} M in Europium-Freisetzung-Versuchen gemessen. In unseren Chrom-Freisetzung-Versuchen wurde eine 40-fach erniedrigte Affinität

von 4×10^{-8} M festgestellt. Diese geringere Affinität könnte sowohl mit den verschiedenen Methoden als auch mit den unterschiedlichen Passagen der verwendeten TyrF8 T-Zellen zusammenhängen, da fortschreitende Stimulationsrunden Änderungen in der Anzahl der exprimierten TZR auf T-Zellen bedingen können. Erstrebenswert wäre es, Tyrosinase-Peptid-spezifische T-Zellen zu generieren, die TZR mit höheren Affinitäten vergleichbar mit denen Virus-spezifischer TZR tragen.

5.3 *De-novo*-Induktion von Tyrosinase-Peptid-spezifischen CD8⁺-T-Zellen

Im Folgenden wird die Strategie zur Generierung solcher T-Zellklone mit hoch affinen TZR spezifisch für Tyrosinase-Peptide diskutiert. Neben der beschriebenen Allorestriktion spielen auch andere Faktoren für die erfolgreiche *De-novo*-Induktion von T-Zellen eine Rolle. Besonders wichtige Akteure sind hierbei die professionellen APZ, wie z.B. die DZ. Werden die Tumor-spezifischen Peptide nicht optimal präsentiert, besitzen die APZ nicht die Fähigkeit, naive T-Zellen zu induzieren. Wie in Abbildung 4.20 zu sehen, zeigten die DZ eine hohe Expression an HLA-A2-Molekülen, Tyrosinase-Protein konnte hingegen intrazellulär in nicht so großen Mengen nachgewiesen werden. Trotzdem reichen die vermutlich wenigen HLA-A2-Tyrosinase-Peptid-Komplexe auf der Oberfläche aus, um die spezifischen T-Zellklone zur IFN- γ -Sekretion zu stimulieren. Die Antigen-Erkennung ist ein extrem sensitiver Prozess, da 1-50 Peptid-MHC-Komplexe auf der Oberfläche einer Zelle ausreichen, um ZTL zu aktivieren und die Zielzelle zu lysieren (Eisen *et al.*, 1996; Sykuley *et al.*, 1996; Valitutti *et al.*, 1997). Da für die Aktivierung der T-Zelle einige TZR-Peptid-MHC-Kontakte nötig sind, wurde angenommen, dass ein Peptid-MHC-Komplex nacheinander mehrere verschiedene TZR-Moleküle binden kann und auf diese Weise T-Zellen adäquat aktiviert werden (Valitutti *et al.*, 1995; Lanziavecchia *et al.*, 2001). Allerdings bestand der übliche Ansatz für die *De-novo*-Induktion zytotoxischer T-Zellen lange Zeit darin, maximale Antigen-Konzentrationen zu verwenden, mit der Idee, so die stärksten ZTL-Antworten zu erhalten. Bald wurde gezeigt, dass die Antigen-Konzentration eine wichtige Rolle bei der Qualität der erhaltenen T-Zellen in Form der Avidität spielt. So konnten z. B. Virus-spezifische T-Zellen ihr Target viel besser lysieren, wenn sie mit niedrigen Antigen-Dosen generiert worden waren (Alexander-Miller *et al.*, 1996a). Einige Gruppen fanden heraus, dass sich hohe Antigen-Konzentrationen bei der *in vitro* Stimulation schädlich auf T-Zellen auswirkten (Iezzi *et al.*, 1998; Alexander-Miller *et al.*, 1996b; Zeh III *et al.*, 1999). Alexander-Miller und Kollegen zeigten sogar, dass unnatürlich hohe Peptid-Konzentrationen *in vitro* vermutlich bei hoch aviden Antigen-spezifischen CD8⁺-T-Zellen den Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) auslösten. T-Zellen mit niedrig affinen TZR werden nicht so leicht

überstimuliert und dominieren in solchen Zellkulturen. Wird Antigen jedoch nur in geringen Mengen präsentiert, verdrängen die T-Zellen mit hoch affinen TZR die T-Zellen mit niedrig affinen TZR von den vorhandenen Peptid-MHC-Komplexen und verhindern, dass T-Zellen, die niedrig affine TZR für diese Peptid-MHC-Komplexe besitzen, genug Signal für deren Stimulation erhalten (Lanziavecchia, 2002). Diese Konkurrenz sollte durch das von uns für die *De-novo*-Induktion gewählte Stimulationsverhältnis von zehn T-Zellen zu einer DZ (10:1) ermöglicht werden. Mit Hilfe von zwei Stimulationsrunden mit *ivt*RNS-beladenen DZ konnten YMD-spezifische T-Zellen angereichert werden (siehe Abbildung 4.22). Mehr Stimulationsrunden schienen nicht empfehlenswert, da gezeigt worden war, dass sowohl iDZ als auch mDZ nach dreimaliger Stimulation bei einem großen Anteil der spezifischen T-Zellen Apoptose induzierten (Mehrotra *et al.*, 2003). Nachdem unser *De-novo*-Induktions-Protokoll erfolgreich eingesetzt wurde (zweimalige Stimulation mit DZ), wurden Daten veröffentlicht, die zeigten, dass eine höhere Anzahl an WT1-spezifischen T-Zellen generiert werden konnte, wenn nur eine Stimulation mit Peptid-beladenen professionellen DZ und zwei Stimulationen mit nicht professionellen Peptid-beladenen PBMC (1 x DZ, 2 x PBMC) erfolgte. Es wird diskutiert, ob die zweimalige Stimulation und Kostimulation mit hoch professionellen DZ schon zu einem Aktivierungs-induziertem Zelltod Peptid-spezifischer T-Zellen führen kann (Ho *et al.*, 2006). Vergleichende Untersuchungen mit *ivt*RNS-beladenen DZ kombiniert mit *ivt*RNS-beladenen PBMC sind in Planung.

Ein weiterer wichtiger Aspekt war, dass die CD8⁺-T-Zellen nicht durch Antikörper-Bindung voraktiviert wurden. Deshalb wurden CD8⁺-T-Zellen mit Hilfe von negativer Separation auf über 80 % angereichert (siehe Abbildung 4.19). Eine Anreicherung bis nahezu 100 % schien nicht erstrebenswert, da sich unter den < 20 % Nicht-CD8⁺-T-Zellen auch CD4⁺-T-Zellen befanden, die dazu beitragen können, langlebige CD8⁺-T-Zellen zu erhalten und somit Hilfe für die CD8⁺-T-Zell-vermittelte Tumor-Abstoßung leisten und folglich eine Rolle beim Schutz vor Tumorentwicklung spielen. So konnte in klinischen Studien indirekt gezeigt werden, dass in Melanom-Patienten der Transfer von Antigen-spezifischen CD8⁺-T-Zellen alleine weit weniger beeindruckend war als der Effekt nach Transfer gemischter Antigen-spezifischer CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellkulturen (Walter *et al.*, 1995; Rosenberg *et al.*, 2004; Dudley *et al.*, 2001). Auch kann die Gabe von IL-2, einem typischen CD4⁺-T-Zell-Zytokin, die Effizienz transferierter CD8⁺-T-Zellen gegen Melanome stark erhöhen (Yee *et al.*, 2000). IL-2 verhindert sowohl in Tiermodellen als auch in klinischen Studien die Deletion oder Erschöpfung transferierter CD8⁺-T-Zellen (Cheever *et al.*, 1982; Matloubian *et al.*, 1994; Hunziker *et al.*, 2002). Studien zeigten, dass die CD4⁺-T-Zellhilfe die Schwelle der CD8⁺-T-Zellaktivierung herabsetzt und somit weniger Antigen für deren Stimulation ausreicht (Lu *et al.*, 2000). Da die *ivt*RNS-beladenen DZ,

die in dem hier diskutierten System verwendet wurden, auch Tyrosinase-Peptide über MHC-Klasse-II-Moleküle exprimieren, ist es durchaus möglich, dass neben den Peptid-spezifischen CD8⁺-T-Zellen auch Peptid-spezifische CD4⁺-T-Zellen generiert wurden. Im Gegensatz zur T-Zellhilfe können CD4⁺CD25⁺-regulatorische T-Zellen eine erfolgreiche *De-novo*-Induktion Selbst-Peptid-spezifischer CD8⁺-T-Zellen verhindern. Sie können einerseits Immunantworten unterdrücken und periphere Toleranz vermitteln, andererseits aber Autoimmunität verhindern (Sakaguchi *et al.*, 2001; Takhashi und Sakaguchi 2003). Für CD4⁺CD25⁺-regulatorische T-Zellen wurde in Mäusen gezeigt, dass sie CD8⁺-T-Zellantworten negativ regulieren können (Kusar *et al.*, 2002; Murakami *et al.*, 2002). Eine Depletion dieser Zellen in Induktionskulturen erscheint daher sinnvoll, da im Mausmodell eine Depletion von CD4⁺CD25⁺-regulatorischen T-Zellen zu einer Erhöhung der CD8⁺-T-Zellantwort gegen Hepatitis-B-Virus (HBV) nach DNS-Immunisierung führte (Furuichi *et al.*, 2005). Kürzlich wurde gezeigt, dass Depletion humaner CCR4⁺-regulatorischer T-Zellen zu CD4⁺-T-Zellen des Th1-Typs führten und so die CD8⁺-T-Zellantwort gegen Tumor-Antigene erhöht werden konnte (Bataar *et al.*, 2007).

Ein weiterer wichtiger Faktor bei dem Prozess der *De-novo*-Induktion von T-Zellen ist das Zytokinmilieu. Die Zytokine IL-2, IL-7 und IL-15 wurden zu verschiedenen Zeitpunkten zugefügt. Sowohl das Zytokin IL-2, ein genereller T-Zellwachstumsfaktor, als auch IL-7 wurden erst zwei Tage nach *De-novo*-Induktion zugesetzt, da sich so die Proliferation nicht-spezifischer CD8⁺-T-Zellen vermindern ließ (Greenberg *et al.*, 2006). Das Zytokin IL-7 spielt eine wichtige Rolle beim Überleben naiver T-Zellen, bei der T-Zell-Homöostase und der Expansion von Gedächtnis-T-Zellen (Lynch und Miller, 1994; Schluns *et al.*, 2000). IL-15 wurde wöchentlich zugesetzt. Dieses Zytokin ist zwar nicht essentiell für die Generierung von CD8⁺-Gedächtnis-T-Zellen, wird jedoch für die Proliferation dieser Zellen und somit für die Aufrechterhaltung der CD8⁺-Gedächtnis-T-Zellpopulation über eine lange Zeit benötigt (Zhang *et al.*, 1998; Becker *et al.*, 2002).

5.4 Sortierungs-Strategien Peptid-spezifischer T-Zellen

Für weitere Analysen der Tyrosinase-spezifischen T-Zellen, die mit Hilfe der Stimulation mit *ivt*RNS-beladenen DZ in den *De-novo*-Induktionskulturen generiert wurden, war eine Anreicherung dieser T-Zellen notwendig.

Eine Methode, die für diesen Zweck in Frage kam, war die Detektion von Tyrosinase-spezifischen T-Zellen mit spezifischen Peptid-MHC-Tetrameren. Es war gezeigt worden, dass Peptid-MHC-Multimere stabil und spezifisch an Peptid-MHC-spezifische T-Zellen banden (Altman *et al.*, 1996) und dass es diese Technik ermöglichte, Antigen-spezifische T-Zellen zu

detektieren und zu isolieren, die in sehr niedrigen Frequenzen im Blut vorhanden waren (Busch *et al.*, 1998; Keenan *et al.*, 2001). Auch die Versuche im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass Tyrosinase-Peptid-spezifische IVS B T-Zellen mit sehr geringen Frequenzen von nur 0,5-0,1 % sehr gut mittels Tetramer detektiert werden konnten (siehe Abbildung 4.13). Deshalb wurden die ersten T-Zelllinien und T-Zellklone mit Hilfe der Tetramerbindung sortiert.

Allerdings wurde auch nach Alternativen für die Isolierung Antigen-spezifischer T-Zellen gesucht, da die aus den *De-novo*-Induktions-Versuchen erhaltenen T-Zellen oft sehr bald starben. Die lange Dauer der Interaktionen zwischen TZR der T-Zelle und Peptid-MHC-Tetramer und die damit verbundene Quervernetzung der TZR kann zu funktionellen Veränderungen der isolierten T-Zell-Populationen, wie TZR-Internalisation, T-Zell-Aktivierung, Überstimulierung und Zelltod führen (Whelan *et al.*, 1999; Daniels und Jameson *et al.*, 2000; Maile *et al.*, 2001; O'Herrin *et al.*, 2001). Da T-Zellen mit hoch affinen TZR isoliert werden sollten, bestand die Gefahr, dass die gesuchten T-Zellen durch die sehr starke Bindung an das Tetramer negativ beeinflusst werden. Deshalb wurde eine Methode verwendet, die es ermöglichte, reversibel Antigen-spezifische T-Zellen zu detektieren und zu isolieren (Knabel *et al.*, 2002). Die Detektion mit sogenannten Peptid-MHC-Streptameren, die von der T-Zelle gelöst werden können, zeigen gleiche Qualitäten der Bindung wie herkömmliche Peptid-MHC-Tetramere, „schonen“ jedoch die T-Zellaktivität. So wurde gezeigt, dass Tetramer-sortierte T-Zellen verminderte zytotoxische Aktivität im Vergleich zu Streptamer-sortierten T-Zellen besaßen (Neudorfer *et al.*, 2007).

Für vergleichende Untersuchungen wurden *De-novo*-induzierte T-Zellkulturen des HLA-A2-negativen Spenders B aufgetaut und mit Hilfe der Tetramer- bzw. Streptamerbindung YMD-Peptid-spezifische T-Zellen sortiert. Die mittels beider Methoden erhaltenen T-Zelllinien wurden auf ihr Verhalten in Tetramer-Bindeversuchen und ihre Funktionalität hin untersucht. Mit Hilfe der Tetramerbindung konnte eine größere Reinheit an Peptid-spezifischen T-Zellen als mit der Streptamerbindung erhalten werden (siehe Abbildung 4.26: 93 % verglichen mit 75,8 %). Auch deuteten Dissoziationsversuche auf eine höhere Avidität der Tetramer-sortierten T-Zellen hin. Nach 2 h waren 73 % der Tetramer-sortierten T-Zellen noch Tetramer⁺, verglichen mit 52 % Tetramer⁺ T-Zellen, die mittels Streptamersortierung erhalten wurden. Funktionelle Unterschiede konnten nur schwer ausgemacht werden, da in beiden Fällen auch alloreaktive T-Zellen isoliert wurden, die HLA-A2 unabhängig vom gebundenen Peptid erkannten. Der alloreaktive Hintergrund, der sowohl bei der IFN- γ -Freisetzung (siehe Abbildung 4.27) als auch bei der spezifischen Lyse von Melanomzelllinien (siehe Abbildung 4.28) zu sehen war, lag allerdings bei der Streptamerbindung deutlich höher, was Schwierigkeiten bei der Isolierung von Tyrosinase-spezifischen T-Zellen vermuten ließ. Wahrscheinlich wurden durch die kurze Dauer der Streptamerbindung viele T-Zellen sortiert, die das Peptid:MHC-Tetramer nur teilweise oder

nicht gut banden, wie A2-spezifische T-Zellen. Der hohe Anteil der A2-spezifischen Zellen bestätigte sich später bei der Suche nach Peptid-spezifischen T-Zellen. Nach Tetramersortierung waren 38 % der T-Zellen YMD-Peptid-spezifisch, wohingegen nach Streptamersortierung kein YMD-Peptid-spezifischer T-Zellklon gefunden werden konnte, fast alle (29 von 34) sortierten T-Zellklone zeigten Allo-A2-Reaktivität (siehe Tabelle 4.5). Wahrscheinlich eignet sich das Streptamer besser, wenn kein Allo-A2-Hintergrund vorliegt. Alle bisherigen Veröffentlichungen, in denen Streptamere verwendet wurden, fanden im vollständig autologen System statt. Allo-MHC-reaktive T-Zellen werden im autologen System nicht induziert und konkurrieren somit nicht um die Bindung an Streptamere. Ein Nachteil von Tetrameren und Streptameren ist, dass das TAA-Epitop für die Sortierung bekannt sein muss und auch nur diejenigen T-Zellen isoliert werden können, die dieses Peptid erkennen. T-Zellen, die gegen andere Epitope des Tyrosinase-Proteins generiert wurden, bleiben unsichtbar. Ein Verfahren, mit dem T-Zellen unterschiedlicher Spezifitäten aufgrund ihrer Funktionalität isoliert werden können, ist der sogenannte „IFN- γ -Capture-Assay“ (Becker *et al.*, 2001). Mit Hilfe von Antikörpern können T-Zellen detektiert werden, die nach spezifischer Stimulation IFN- γ sezernieren. Allerdings müsste vor Anwendung dieser Methode erst ein Weg gefunden werden, die Allo-A2-reaktiven T-Zellen zu entfernen, da gerade diese Zellen während Kontakt mit Zielzellen enorme Mengen an IFN- γ freisetzen.

5.5 „Semi“-allogenes und autologes System im Vergleich

Wie bereits beschrieben, sollten Tyrosinase-Peptid-spezifische T-Zellen mit hoch affinen TZR isoliert werden, die in der Lage sind, Tumorzellen zu töten. T-Zellen von HLA-A2-positiven Spendern, die in einem vollständig autologen Ansatz gegen Tyrosinase-Peptide induziert worden waren, wurden isoliert und mit T-Zellen verglichen, die in einem „semi“-allogenen Ansatz generiert worden waren. „Semi“-allogen deshalb, weil T-Zellen und Stimulationszellen (DZ) aus demselben HLA-A2-negativen Spender stammten, also autolog waren, jedoch die DZ so manipuliert worden waren, dass sie neben ihren Selbst-MHC-Molekülen auch über fremde, sogenannte allogene HLA-A2-Moleküle Tyrosinase-Peptide präsentierten. So sollte ein nicht negativ selektiertes, allorestrictiertes T-Zellrepertoire auf Selbst-Peptid-spezifische T-Zellen hin abgegriffen werden. Die Allorestriktion, d.h. Peptide werden von T-Zellen über Fremd-MHC-Moleküle erkannt, wurde schon früh als mögliche Quelle für hoch avide Peptid-spezifische ZTL beschrieben (Münz *et al.*, 1999). Allorestrictierte T-Zellen erkennen entweder die Strukturen des Fremd-MHC-Moleküls unabhängig von gebundenem Peptid oder Fremd-MHC-Moleküle in einer Peptid-abhängigen Art und Weise (Röttschke *et al.*, 1991; Sherman und Chattopadhyay,

1993). Die Erkennung von Peptid-Liganden durch alloreaktive T-Zellen konnte nicht nur für die Präsentation über allogene MHC-Klasse-I- (Udaka *et al.*, 1992; Udaka *et al.* 1996; Sykulev *et al.*, 1994) sondern auch für die Präsentation über allogene MHC-Klasse-II-Moleküle (Panina-Bordignon *et al.*, 1991; Demotz *et al.*, 1991) gezeigt werden. Somit besteht mit dem in dieser Arbeit verwendeten System die Möglichkeit, nicht nur allorestrierte Peptid-spezifische CD8⁺-T-Zellen sondern auch allorestrierte Peptid-spezifische CD4⁺-T-Zellen zu generieren. Problematisch im „semi“-allogen Ansatz bleibt, dass neben den wenigen Tyrosinase-Peptid spezifischen T-Zellen auch sehr viele T-Zellen induziert werden, die HLA-A2 als Fremd-Antigen erkennen.

Vor- und Nachteile beider Ansätze werden im Folgenden anhand des Vergleichs der unterschiedlichen T-Zelllinien diskutiert. Erste Unterschiede zeigten sich bei der Frequenz der Tyrosinase-Peptid-spezifischen T-Zellen unmittelbar vor Sortierung (siehe Abbildung 4.22). In beiden *De-novo*-Induktionen zeigten die T-Zellkulturen der HLA-A2-negativen Spender B und D (Fremd-MHC + Selbst-Peptid) höhere Prozentanteile an Tetramer⁺CD8⁺ T-Zellen als die T-Zellkulturen der HLA-A2-positiven Spender A und C (Selbst-MHC + Selbst-Peptid). Auch die Sortierungsdaten (siehe Abbildung 4.23) spiegelten dies wieder. Die Frequenzen der CD8⁺Tetramer⁺ T-Zellen der HLA-A2-negativen Spender lagen tendenziell höher. Auch die Fluoreszenzintensität der mit Tetramer detektierten Zellen war deutlich höher. Dies ließ vermuten, dass höher affine T-Zellen erhalten wurden, die besser an Tetramere binden konnten und deshalb mit höherer Intensität detektiert wurden (Yee *et al.*, 1999). Mehr T-Zellen, die das Tetramer mit höheren Intensitäten banden, deuteten auf eine bessere Stimulation durch HLA-A2-allogene Peptid-Liganden hin („semi“-allogene Stimulation).

Die CD8⁺Tetramer⁺ T-Zellen wurden isoliert und entweder als T-Zelllinien kultiviert oder mittels limitierender Verdünnung versucht, zu klonieren. Auch die T-Zellen der erhaltenen Linien unterschieden sich sehr bezüglich Intensität und Dissoziation der A2-YMD-Tetramerbindung, ihrer Fähigkeit zur IFN- γ -Sekretion und ihrer Zytotoxizität gegenüber Melanomzellen. Zuerst wurden die T-Zellen der Zelllinien mittels Tetramerbindung reanalysiert. Der Prozentanteil der CD8⁺Tetramer⁺ T-Zellen war in den Linien B und D, die durch Stimulation mit allogenen MHC-Peptid-Liganden generiert worden war, wesentlich größer und die Intensität der Färbung höher. Auch blieb das Tetramer länger gebunden (siehe Abbildung 4.24 und 4.25). In der Linie B wurden ca. 13 % der T-Zellen mit dem irrelevanten A2-pp65-Kontrolltetramer detektiert. Da in den PBMC keine erhöhte Frequenz an HLA-A2-restringierten pp65-spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt), handelte es sich bei diesen T-Zellen wahrscheinlich um T-Zellen, die HLA-A2-Moleküle des A2-YMD-Tetramers unabhängig vom gebundenen Peptid als Fremd-Antigen erkannten.

Bei T-Zellen des Spenders D wurde eine andere Sortierungsstrategie gewählt, um mit Tetramer⁺ T-Zellen mittlerer (intermediärer) Intensität von den T-Zellen hoher Fluoreszenzintensität für funktionelle Analysen zu trennen und so T-Zellen mit mittelaaffinen wie auch hoch affinen TZR zu erhalten. Die Zelllinie Di (i = intermediär) zeigte tatsächlich ein Tetramer-Bindevverhalten mittlerer Intensität und eine mittlere Dissoziation. Ca. 80 % der T-Zellen, die aufgrund ihrer hohen Fluoreszenzintensität sortiert und als Linie Dh (h = hoch) kultiviert wurden, banden Tetramer mit sehr hoher Intensität. Diese einheitliche Zellpopulation teilte sich jedoch nach 1 h in zwei Populationen auf: eine, die noch Tetramerbindung sehr hoher Intensität zeigte und eine, die das Tetramer mit mittlerer Intensität band. Vermutlich hätte der Abstand zwischen den beiden Sortierungsfenstern („gates“) während der Sortierung größer sein müssen, um keine T-Zellen mit intermediärem Tetramer-Bindevverhalten in die Dh Zelllinie zu sortieren.

Auch funktionell waren die „semi“-allogen stimulierten T-Zelllinien den autolog stimulierten T-Zelllinien überlegen. Die T-Zelllinien der HLA-A2-positiven Spender (Stimulation: Selbst-Peptid + Selbst-MHC) sezernierten kein IFN- γ (siehe Abbildung 4.27). Von den HLA-A2-negativen T-Zelllinien wurde zwar auch IFN- γ während Kokultur mit unbeladenen und A2⁺ Tyr⁻ Melanomzelllinien gemessen, das vermutlich von Allo-A2-spezifischen T-Zellen stammte, aber nach Subtraktion des Allo-A2-Hintergrunds von den IFN- γ -Mengen, die während Kokultur mit Zellen sezerniert wurden, die HLA-A2-YMD-Peptid-Liganden präsentierten, war eine deutliche IFN- γ -Sekretion zu sehen, die auf die Tyrosinase-Peptid spezifischen T-Zellen zurückzuführen war. Die Differenz beider IFN- γ -Werte zeigte die spezifischen Reaktionen. Auch bezüglich der Fähigkeit zur Lyse von Melanomzelllinien waren Unterschiede zu erkennen. Die T-Zelllinien A und C (Selbst-MHC + Selbst-Peptid) zeigten gar keine bzw. kaum Lyse der Melanomzelllinien (siehe Abbildung 4.28). Die T-Zelllinien B, Di und Dh lysierten die A2⁺Tyr⁺ Melanomzelllinien besser als die A2⁺Tyr⁻ Melanomzelllinien. Die Differenzen zwischen spezifischer Reaktivität und Allo-A2-Reaktivität variierten. Die T-Zelllinie B der *De-novo*-Induktion I zeigte größere Unterschiede in der Zytotoxizität von Mel/IL-2- und Mel A375-Zellen als die T-Zelllinien Di und Dh. Gründe hierfür können z.B. Spender-bedingte Unterschiede, wie ein gerade bekämpfter Infekt oder minimale Unterschiede in der Stimulation sein. Da für die Sortierung III Zellen aus der *De-novo*-Induktion I von Spender B aufgetaut wurden und die erhaltenen T-Zelllinien keine so große Differenz zwischen der Lyse der Melanomzelllinie mit spezifischen Peptid-Liganden (Mel/IL-2) und der HLA-A2-positiven Melanomzelllinie (Mel A375) aufwiesen, waren Unterschiede in der Versuchsdurchführung oder/und in der Qualität der Targetzellen wahrscheinlicher. Ebenso könnte z.B. auch eine stärkere Proliferation der Allo-A2-spezifischen T-Zellen verglichen mit Peptid-spezifischen T-Zellen oder umgekehrt und somit der Zeitpunkt des Experiments eine Rolle spielen.

Eine wichtige Frage, die im Zusammenhang mit der Tetramerbindung aufkam, war folgende: Warum kann der hohe Anteil an allorestingierten T-Zellen, die HLA-A2 als ein Fremd-Antigen erkennen, nicht generell mit einem HLA-A2-Tetramer detektiert werden, das ein irrelevantes Peptid präsentiert, wie z.B. mit dem A2-pp65-Tetramer? Vermutlich ist die Avidität der meisten Allo-A2-T-Zellen, die HLA-A2 unabhängig von Peptid binden, für A2-Tetramere nur sehr gering, da die hohe Dichte an Peptid-MHC-Komplexen zum Großteil niedrig avide T-Zellen stimuliert (Bevan, 1984). Durch kurzzeitige Bindung werden diese T-Zellen zwar mitsortiert, für Reanalysen müsste aber wahrscheinlich die Avidität für das Multimer, z.B. durch mehr Peptid-MHC-Komplexe, erhöht werden (Pentamere oder Hexamere).

Neue interessante Ansätze zielen darauf ab, die Allo-A2-reaktiven T-Zellen aus den Zellkulturen zu depletieren (selektive Allodepletion = SAD). Eine viel versprechende Möglichkeit bietet das Aktivierungs-induzierte Antigen CD137 (Nekrose-Faktor-Rezeptor-Molekül), das eine niedrige Basisexpression zeigt, nach Alloantigen-Stimulation aber schnell hochreguliert wird (Wehler *et al.*, 2007). Mittels magnetischer CD137-Depletions-Reagenzien konnten selektiv die alloreaktiven T-Zellen aus Leukämie- und Tumor-reaktiven T-Zelllinien in Hinblick auf adoptiven T-Zelltransfer und zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen entfernt werden. Um alloreaktive T-Zellen spezifisch für individuelle HLA-Allele sichtbar zu machen, eigneten sich sehr gut K562-MHC-Transfektanten als Stimulationszellen. Die CD137-Depletion würde sich auch für unsere Zwecke gut eignen, indem K562 mit der jeweiligen *ivtRNS* für Allo-MHC-Moleküle transfiziert werden und so Allo-MHC-spezifische T-Zellen stimuliert, markiert und entfernt werden könnten. Theoretisch könnte jedes MHC-Allel, von dem die cDNS-Sequenz bekannt ist, transient in Form von *ivtRNS* transferiert werden. Die Transfektion von K562 mit HLA-A2-*ivtRNS* war im Rahmen von eigenen Vorversuchen bereits sehr erfolgreich verlaufen (Daten nicht gezeigt). Versuche in dieser Richtung sind in Planung.

5.6 T-Zellklone beider Stimulationsansätze im Vergleich

Sowohl die Sortierungsdaten als auch die Ergebnisse der Versuche mit den T-Zelllinien zeigten, dass T-Zellen mit höherer Avidität, definiert durch Fluoreszenzintensität der Tetramerbindung und langsamere Dissoziation des Tetramers, erhalten wurden, wenn ein nicht negativ selektiertes T-Zellrepertoire mit allogenen Peptid-MHC-Liganden abgegriffen wurde. Eine funktionelle Überlegenheit der allorestingierten T-Zelllinien bezüglich ihrer IFN- γ -Sekretion und Zytotoxizität gegenüber den Melanomzelllinien schien also vorhanden zu sein, sollte aber in weiteren Versuchen auf klonaler Ebene bestätigt werden, da die Linien aus T-Zellen mit unterschiedlichen Spezifitäten bestanden.

Der erste Ansatz zur Detektion von HLA-A2-restringierten Tyrosinase-spezifischen T-Zellklonen erfolgte mittels IFN- γ -Freisetzungs-Versuchen. IFN- γ wirkt anti-viral und -tumoral und wird von beinahe allen CD8⁺-T-Zellen sezerniert, wenn sie infolge einer Immunantwort aktiviert werden. Da aber einige der generierten T-Zellklone kein IFN- γ ausschütteten, jedoch spezifisch Melanomzellen lysieren konnten (z.B. T-Zellklone: A11, C18), erschienen zunächst Zytotoxizitäts-Versuche mit Melanomzelllinien geeigneter, zumal es das Ziel war, T-Zellen zu generieren, die in der Lage sind, Melanomzellen zu lysieren. Wenn möglich, sollten beide Methoden kombiniert werden, da gezeigt wurde, dass die Anzahl an HIV-spezifischen CD8⁺-T-Zellen mit Zytotoxizitäts-Versuchen unterschätzt wurde und mit IFN- γ -Freisetzungs-Versuchen mehr spezifische T-Zellen gefunden werden konnten (Appay *et al.*, 2000). In allen hier gezeigten Versuchen jedoch wurden keine spezifischen Anti-Tumor T-Zellen erhalten, die keine Zytotoxizität zeigten, aber IFN- γ freisetzten. Genau das Gegenteil war der Fall.

Aus beiden Stimulationsansätzen der *De-novo*-Induktionen resultierten viele spezifische T-Zellklone. 45 % aller getesteten vermeintlichen T-Zellklone der HLA-A2-positiven Spender, die mit Tyrosinase-Peptiden, präsentiert von Selbst-MHC-Molekülen, aktiviert worden waren, waren Tyrosinase-Peptid spezifisch. Im „semi“-allogenen System (HLA-A2-negativer Spender), in dem mit allogenen HLA-A2-Tyrosinase-Peptid-Komplexen stimuliert wurde, erkannten 53 % der T-Zellen HLA-A2-Moleküle als Fremd-Antigen. 31 % der T-Zellen waren spezifisch für HLA-A2-Tyrosinase-Peptid-Liganden. Jede zweite (A2-positive) bzw. jede dritte (A2-negative) T-Zelle zeigte folglich Spezifität.

Die Tyrosinase-Peptid spezifischen T-Zellen wurden mit Hilfe der Tetramer-Technologie bezüglich ihrer TZR-Avidität untersucht. Im Zusammenhang mit der Tetramerbindung kann nur von TZR-Avidität nicht von TZR-Affinität gesprochen werden, da nicht die Bindungsstärke eines einzelnen TZR betrachtet wird, sondern auch die Anzahl an TZR-Molekülen auf der T-Zelloberfläche für die Tetramerbindung eine Rolle spielt. Viele TZR-Moleküle niedriger Affinität zeigen ähnliche Eigenschaften bei der Tetramerbindung, wie wenige TZR-Moleküle hoher Affinität. Deshalb wurden in einer parallelen Färbung mit Anti-CD3-Antikörpern die TZR-Komplexe markiert, um die verschiedenen TZR-Aviditäten vergleichen zu können. Große Unterschiede bezüglich Fluoreszenzintensität und Dissoziationswerte zwischen den HLA-A2-positiven und -negativen T-Zellklonen konnten nicht beobachtet werden. Tendenziell zeigten HLA-A2-negative T-Zellklone eine höhere Intensität, jedoch auch eine etwas schnellere Dissoziation.

Entscheidend ist jedoch die Funktionalität der T-Zellklone. Hier zeigten sich enorme Unterschiede zwischen T-Zellen, die in den verschiedenen Stimulationsansätzen generiert

wurden. Wurde ein nicht negativ selektiertes T-Zellrepertoire nach spezifischen T-Zellen durchsucht (Fremd-MHC + Selbst-Peptid), so wurden T-Zellen induziert, die in ihrer Fähigkeit, IFN- γ zu sezernieren den T-Zellen eines negativ selektionierten T-Zellrepertoires (Selbst-MHC + Selbst-Peptid) überlegen waren. Sowohl Tyrosinase-Peptid (YMD) -beladene T2-Zellen als auch die Melanomzelllinie Mel/IL-2 ($A2^+ Tyr^+$) führten zu einer größeren IFN- γ -Sekretion der meisten T-Zellklone. Auch in ihrer Fähigkeit Melanomzelllinien zu lysieren, waren diese T-Zellklone deutlich überlegen. Es wurden weniger T-Zellen benötigt, um den gleichen lytischen Effekt zu zeigen (durchschnittlich 5.000 verglichen mit 15.000 T-Zellen). Zusätzlich zeigten sie signifikant höhere TZR-Affinitäten (Mittelwerte: $3,1 \times 10^{-9}$ M verglichen mit $8,2 \times 10^{-8}$ M), die höchsten TZR-Affinitäten lagen bei 8×10^{-10} M. Der Mittelwert der TZR-Affinitäten der HLA-A2-negativen allorestingierten, Tyrosinase-Peptid-spezifischen T-Zellen lag 1,5 Log-Stufen höher als der Mittelwert der Affinitäten der HLA-A2-positiven T-Zellen. Die Unterschiede bezüglich der IFN- γ -Sekretion und Affinitäten der TZR waren hoch signifikant und zeigten, dass mit dem „semi“-allogenen System funktionell überlegene T-Zellen mit sehr hoch affinen TZR, verglichen mit den TZR der T-Zellen des autologen Systems, generiert werden konnten. Die Ergebnisse zeigten, dass es sich lohnt, den Allo-A2-Hintergrund in Kauf zu nehmen, zumal im „semi“-allogenen System jede dritte T-Zelle spezifisch war, verglichen mit jeder zweiten im autologen System.

Einen Sonderfall stellten die beiden identischen T-Zellklone T39 und T49 dar. Zuerst lag die Vermutung nahe, dass es sich um Allo-A2-spezifische T-Zellen handelte, da IFN- γ sowohl während Koinkubation mit der $A2^+ Tyr^-$ Melanomzelllinie als auch mit der $A2^+ Tyr^+$ Melanomzelllinie sezerniert wurde. Beide Melanomzelllinien wurden ebenfalls lysiert. Bei der Affinitätsbestimmung mit YMD-beladenen T2-Zellen zeigte sich jedoch deutlich, dass A2-YMD-Liganden spezifisch erkannt wurden. TZR-Sequenzanalysen ergaben, dass der TZR dieser beiden T-Zellklone sich aus einer α -Kette und einer β -Kette ($V\alpha 15$ und $V\beta 23$) zusammensetzte. Erstaunlicherweise handelte es sich um die gleiche β -Kette wie bei den Antigen-spezifischen T-Zellklonen (B T5, B T31, B T44, B T56, B T58, B T59) mit unterschiedlicher CDR3-Region. Mittlerweile weiß man, dass TZR Kreuzreaktivität gegenüber einem großen Spektrum an ähnlichen Liganden besitzen. Vor allem im Zusammenhang mit molekularer Mimikry wurde gezeigt, dass mikrobielle Pathogene Antigen-spezifische T-Zellen aktivieren, die dann mit endogenen Antigenen kreuzreagieren und Autoimmunität auslösen können. Wie T-Zellen auf kreuzreaktive Liganden reagieren, wird im Zusammenhang mit der Entwicklung von Autoimmunität schon viele Jahre erforscht (Lawson, 2000; Benoist und Mathis, 2001). Vorstellbar wäre eine Kreuzreaktivität des TZR hinsichtlich des YMD-Peptides und eines anderen ubiquitären Peptides, das von beiden Melanomzelllinien präsentiert wird. Eine andere

Möglichkeit wäre, dass der Klon eine Allo-A2-Spezifität sowie eine Peptid-Spezifität vereint. Für die Erkennung des Peptid-MHC-Liganden sind hauptsächlich die CDR1-, 2- und 3-Bereiche der α - und β -Kette verantwortlich. Wobei für die CDR1- und CDR2-Bereiche Wechselwirkungen mit dem MHC-Molekül beschrieben wurden und die CDR3-Bereiche aufgrund ihrer hohen Variabilität eher die hoch polymorphe Peptidbindetasche erkennen (Housset und Malissen, 2003). Ob eine der Ketten Allo-A2-Erkennung vermittelt und eine der Ketten Peptid-spezifische Erkennung oder eher verschiedene CDR-Bereiche MHC-Erkennung bzw. Peptid-spezifische Erkennung vermitteln, könnte in TZR-defizienten T-Zellen überprüft werden. Diese T-Zellen könnten transient mit *ivt*RNS für α - und β -Ketten in verschiedenen Kombinationen transfiziert werden. Denn von Schaft und Kollegen wurde gezeigt, dass nach Transfektion von RNS in T-Lymphozyten, die für TZR α - und TZR β -Ketten kodierten, funktionelle zytotoxische T-Zellen generiert werden konnten (Schaft *et al.*, 2006).

Generell auffallend bei der TZR-Analyse war, dass die HLA-A2-positiven T-Zellklone eines Spenders, die mit Selbst-MHC-Molekülen in Kombination mit Tyrosinase-Peptiden generiert wurden, fast alle unterschiedliche Klone darstellten, definiert durch verschiedene α - und β -Ketten des TZR. Die meisten HLA-A2-negativen allorestingierten T-Zellklone (Fremd-MHC + Selbst-Peptid) eines Spenders hingegen waren aus ein und derselben Ursprungs-T-Zelle entstanden, die hohe aber unterschiedliche TZR-Affinitäten gegenüber dem HLA-A2-YMD-Peptid-Liganden zeigten und sich auch in ihrer Funktionalität leicht unterschieden. Es wird kontrovers diskutiert, ob es nicht nur für B-Zellen sondern auch für T-Zellen eine Affinitätsreifung gibt. Primäre T-Zellantworten sind sehr polyklonal, sekundäre T-Zellantworten zeigen eingeschränkte T-Zellrepertoires mit durchschnittlich höherer Avidität (McHeyzer-Williams und Davis, 1995; Busch und Pamer, 1999). Dieses Ergebnis deutet an, dass T-Zellen mit hoher Avidität einen Vorteil während sekundärer Antworten haben könnten. Am Anfang der *De-novo*-Induktion, wenn nur wenige Peptid-spezifische T-Zellen vorhanden sind, ist eine Konkurrenz um Peptid:MHC-Komplexe auf DZ unwahrscheinlich. Aber nach der zweiten Stimulation, wenn die Peptid-spezifischen T-Zellen stark proliferieren, beginnt ein Wettkampf der T-Zellen um das präsentierte Antigen (Wolpert *et al.*, 1998; Kedl *et al.*, 2000). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass T-Zellen mit hoch affinen TZR in der Lage sind, selektiv Peptid:MHC-Komplexe von der Oberfläche verschwinden zu lassen (Kedl *et al.*, 2002). T-Zellen mit hoch affinen TZR verhindern so, dass T-Zellen mit niedrig affinen TZR genügend Stimulation erhalten. Ein weiterer Selektionsvorteil der T-Zellen mit hoch affinen TZR ist, dass sie schneller aktiviert werden (Lanziavecchia, 2002). Dies wären plausible Mechanismen der Affinitätsreifung von T-Zellantworten, der auch für die *in vitro De-novo*-Induktion von T-Zellen zutreffen könnte. Die Konkurrenz zwischen den T-Zellklonen mit mittel und niedrig affinen TZR

ist nicht so groß, da keine T-Zellen mit hoch affinen TZR die Stimulation dieser T-Zellen verhindern (Selbst-MHC + Selbst-Peptid). So entsteht eine T-Zellpopulation mit hoher Diversität an T-Zellen mit niedriger und mittlerer TZR-Affinität. Wird ein nicht negativ selektiertes T-Zellrepertoire stimuliert (Fremd-MHC + Selbst-Peptid), so werden auch T-Zellen mit hoch affinen TZR generiert, welche die Konkurrenz um ausreichende Stimulation verschärfen. Der starke Konkurrenzdruck könnte zu diesen vielen T-Zellen gleichen Ursprungs geführt haben. Man könnte sich auch vorstellen, dass die Tochterzellen eines Klons gegenseitig um die TZR-Stimulation kämpfen mussten und so T-Zellen eines Ursprungsklons erhalten wurden, die unterschiedlich stimuliert wurden und deshalb unterschiedlich differenzierten (Lanziavecchia und Sallusto, 2001). So würden sich die Unterschiede in Funktion und TZR-Affinität zwischen den T-Zellklonen T5, T31, T44, T56, T58 und T59 erklären lassen, die alle aus derselben Ursprungszelle entstanden waren.

5.7 Vergleich der erhaltenen Klone mit TyrF8 und IVS B T-Zellen

Funktionell waren die HLA-A2-negativen T-Zellen überlegen, die mit DZ induziert wurden, die Tyrosinase-Peptide auch über Fremd-MHC-Moleküle präsentierten. Wie schneiden diese T-Zellen nun bei einem Vergleich mit den beiden etablierten Tyrosinase-spezifischen T-Zellklonen TyrF8 und IVS B ab?

IVS B ZTL, isoliert aus einem Melanom-Patienten, und TyrF8 ZTL, generiert mit YMN-beladenen APZ, setzten während Koinkubation mit YMD-beladenen T2-Zellen ähnlich niedrige Mengen an IFN- γ frei, wie die HLA-A2-positiven T-Zellen, die mit Selbst-MHC-Tyrosinase-Peptid-Liganden generiert wurden. TyrF8 ZTL zeigten höhere IFN- γ -Sekretion, vergleichbar mit der IFN- γ -Sekretion der HLA-A2-negativen T-Zellen, wenn sie mit YMN-beladenen T2-Zellen koinkubiert wurden, gegen das sie generiert worden waren. Beide T-Zellklone TyrF8 und IVS B waren bei der Erkennung von Melanomzellen, auf denen die HLA-A2-Tyrosinase-Peptid-Liganden in physiologisch niedrigeren Mengen als auf Peptid-beladenen T2-Zellen präsentiert wurden, funktionell eingeschränkt. Hier sezernierten beide T-Zellklone deutlich weniger IFN- γ als die T-Zellen, die im Rahmen dieser Arbeit mit *ivt*RNS-beladenen DZ generiert wurden, unabhängig davon, ob sie gegen Selbst-MHC-Tyrosinase-Peptid- oder Fremd-MHC-Tyrosinase-Peptid-Liganden generiert wurden.

Die Zytotoxizität von TyrF8 und IVS B T-Zellen für Melanomzelllinien lag ähnlich niedrig wie die Zytotoxizität der T-Zellen, die eine negative Selektion im Thymus überlebt hatten. T-Zellen eines nicht selektierten T-Zellrepertoires zeigten deutlich höhere Zytotoxizität. Werden die TZR-Affinitäten betrachtet, so ergibt sich folgende Reihenfolge: Die schlechteste Affinität zeigte der

IVS B-T-Zellklon (3×10^{-7} M), gefolgt von TyrF8 ZTL (YMD: 1×10^{-7} M; YMN: 4×10^{-8} M). Höhere TZR-Affinitäten zeigten schon die mit *ivt*RNS-beladenen DZ induzierten HLA-A2-positiven T-Zellklone (Selbst-MHC + Selbst-Peptid) mit einem Mittelwert über alle erhaltenen T-Zellklone dieser Gruppe von $8,2 \times 10^{-8}$ M. Die besten TZR-Affinitäten wurden erreicht, wenn die T-Zellen eines nicht negativ selektierten T-Zellrepertoires abgegriffen wurden (Fremd-MHC + Selbst-Peptid). Der Mittelwert der HLA-A2-negativen T-Zellen lag bei $3,1 \times 10^{-9}$ M. Der Unterschied der TZR-Affinitäten zwischen HLA-A2-positiven und -negativen T-Zellen war hoch signifikant.

Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass einerseits schon die *De-novo*-Induktion von T-Zellen mit TAA-*ivt*RNS beladenen DZ erfolgreicher war, bezüglich erhaltener T-Zellen mit besserer Funktion und höherer Affinität, und andererseits, dass es sich lohnt, ein nicht selektiertes T-Zellrepertoire abzugreifen, da auf diese Weise sogar funktionell noch bessere T-Zellen mit noch höher affinen TZR generiert werden konnten.

5.8 „Fitness“

Des Weiteren sollte die „Fitness“ der T-Zelllinien und T-Zellklone, definiert als die Fähigkeit induzierter T-Zellen in einer Antigen-freien Umwelt zu bestehen, verglichen werden. Entscheidend für das Schicksal einer Antigen-stimulierten T-Zelle ist die Signalstärke der Stimulation, die sich aus Antigen-Dosis (Konzentration des Antigens und Affinität für das Antigen) (Alexander-Miller *et al.*, 1996a), kostimulatorischen Signalen (Tuosto und Acuto, 1998; Viola *et al.*, 1999) und Dauer des Stimulus (Iezzi *et al.*, 1998) zusammensetzt. Verschiedene Schwellen der Signalstärke bestimmen über Anergie, Proliferation, Differenzierung oder Aktivierungs-induzierten Zelltod (Lanziavecchia und Sallusto, 2000; Langenkamp *et al.*, 2002). Bei zu schwachem Signal wird die T-Zelle anerg, ist das Signal zu stark wird Aktivierungs-induzierter Zelltod induziert. Bei optimaler Signalstärke dagegen können T-Zellen Fitness und Effektor-Funktionen erwerben. Da sowohl der Kontakt zwischen T-Zellen und Antigen-präsentierenden DZ als auch die T-Zelldifferenzierung von vielen Komponenten abhängt, erhielten einige T-Zellen weniger Stimulation als andere. Es ergeben sich Unterschiede in der Qualität verschiedener Klone aber auch zwischen T-Zellen, die aus einer Ursprungszelle entstanden waren.

Gett und Kollegen zeigten, dass die „Fitness“ von Zelltod-Resistenz und Empfänglichkeit für homöostatische Zytokine abhängt (Gett *et al.*, 2003). Besondere Bedeutung maßen sie dem Anti-apoptotischen Gen Bcl-_{XL} und dem Zytokinrezeptor für IL-15 (IL-15R) zu. Deshalb wurde die Expression der Anti-apoptotischen Gene Bcl-_{XL} und Bcl-2 verschiedener Klone verglichen.

Überexpression beider Gene verhindert den Zelltod in Lymphozyten (Broome *et al.*, 1995; Vander Heiden und Thompson, 1999). Zusätzlich wurde die Expression der humanen Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT) angeschaut, welche die Telomer-Länge stabilisiert und somit Zelltod verhindert. Die Verkürzung der Telomere bei jeder Teilung kann die Zelle altern lassen und Apoptose induzieren. Die Empfänglichkeit für homöostatische Zytokine wurde anhand der Expression der Rezeptoren für IL-7 und IL-15 untersucht. IL-7 und IL-15 spielen eine wichtige Rolle bei der Homöostase von T-Zellen (siehe Kapitel 5.3). IL-2 ist ein allgemeiner Wachstumsfaktor, vor allem für T-Zellen, das in der Phase der Stimulation naiver T-Zellen durch ein Antigen wichtig ist. Eine Balance zwischen IL-15 und IL-2 erhält die Anzahl an CD8⁺-Gedächtnis-T-Zellen aufrecht (Ku *et al.*, 2000). Die Rolle des IL-7R wird kontrovers diskutiert und scheint nicht so bedeutend wie der IL-15-Rezeptor zu sein (Buentke *et al.*, 2006). Das Zytokin IL-15 kann z.B. tolerante T-Zellen retten, so dass sie wieder Funktionalität zeigen (Teague *et al.*, 2006).

IVS B ZTL und TyrF8 ZTL exprimierten den Rezeptor für IL-15 nicht und waren deshalb nicht für IL-15 empfänglich. Unterschiede zeigten sich in der Expression des IL-2-Rezeptors (CD25): TyrF8 ZTL exprimierten CD25 und zeigten einen proliferativen Vorteil gegenüber IVS B ZTL. Die HLA-A2-positive Linie C und die intermediäre HLA-A2-negative Linie Di exprimierten keine CD25-Moleküle, die Expression des IL-15R dagegen konnte nachgewiesen werden. Beide HLA-A2-negativen Linien, die mittels Tetramer- bzw. Streptamer-Technologie sortiert wurden, waren sowohl IL-2 als auch IL-15 empfänglich und zeigten eine gute Proliferation. Auf klonaler Ebene konnten keine Zusammenhänge von CD25- und IL-15R-Expression gesehen werden. Dies könnte an mehreren unspezifischen Stimulationsrunden liegen, die durchgeführt werden mussten, um genügend Zellen für die Analysen zu erhalten und die sicherlich auch die Expression von diesen „Fitness“-Markern beeinflusst haben.

Weitere Oberflächenmarker, die den Zustand von T-Zellen charakterisieren sind: CCR7, CD28 und CTLA-4 (CD152). Der Chemokinrezeptor CCR7, der T-Zellen in sekundäre Lymphgewebe leitet, unterteilt Gedächtnis-T-Zellen in zwei funktionell verschiedene Populationen: CCR7⁻ Gedächtnis-T-Zellen, die sofortige Effektorfunktion besitzen und CCR7⁺ Gedächtnis-T-Zellen, die DZ stimulieren können und keine sofortige Effektorfunktion haben, aber durch weitere Stimulation CCR7⁻ werden können (Sallusto *et al.*, 1999). IVS B ZTL sind alle CCR7⁻, die TyrF8 Population besteht noch zu einem kleinen Teil aus CCR7⁺ T-Zellen, die das Potential haben, DZ zu stimulieren. CD28- und CTLA-4-Moleküle binden an dieselben B7-Liganden auf APZ und sind an der Regulation der Aktivierung und Proliferation Antigen-stimulierter T-Zellen beteiligt. CD28-Moleküle werden auf naiven T-Zellen exprimiert und induzieren T-Zell-Proliferation. Im Gegensatz zu CD28, werden CTLA-4-Moleküle auf aktivierten T-Zellen

exprimiert und inhibieren eine weitere T-Zellaktivierung, indem sie CD28-/B7-Bindungen reduzieren, da sie höhere Affinitäten für B7-Liganden besitzen. (Walunas *et al.*, 1994; Sperling und Bluestone, 1996). Auf allen T-Zelllinien und T-Zellklonen, die durch *De-novo*-Induktion induziert wurden, konnte deshalb keine CD28-Expression nachgewiesen werden. CTLA-4 wurde nur schwach exprimiert. Interessanterweise lag der einzige Unterschied zwischen der Tetramersortierten Linie und der Streptamer-sortierten Linie in einer erhöhten CTLA-4-Expression, was eine negative Regulation durch die lange und starke Tetramerbindung andeuten könnte.

Sowohl Bcl-x_L als auch Bcl-2 konnten auf RNS-Ebene aller getesteten T-Zellklone in moderaten vergleichbaren Mengen nachgewiesen werden. Vermutlich war die Stimulationsstärke durch die *ivt*RNS-beladenen DZ genau richtig, unabhängig davon, ob Tyrosinase-Peptide über Fremd- oder Selbst-MHC-Moleküle präsentiert wurden, und resultierte in einem moderaten Schutz vor Apoptose durch Expression von Bcl-x_L und Bcl-2. hTERT hingegen konnte in keinem der differenzierten Klone nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Das ist nicht überraschend, da für T-Zellen beschrieben wurde, dass unstimulierte T-Zellen kaum hTERT exprimieren, es durch Aktivierung zu verstärkter Expression kommt, die jedoch in Folge weiterer Differenzierung abnimmt (Akbar und Vukmanovic-Stejic, 2007).

Insgesamt ist es sehr schwierig eine Aussage über die „Fitness“ und den Zustand der T-Zelllinien und Klone zu treffen, da folgende Faktoren in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen und den Phänotyp der T-Zellen beeinflussen: Zum einen wurden T-Zellen vermutlich aufgrund ihrer TZR-Affinitäten unterschiedlich stark und lange stimuliert (Lanziavecchia, 2002). Zum anderen kann die Tetramersortierung, wie in Kapitel 5.4 beschrieben, durch die lange Bindung und Quervernetzung der TZR T-Zellen negativ beeinflussen. Auch die unspezifische Stimulation mit Anti-CD3-Antikörper und bestrahlten Zellen, die kostimulatorische Signale zur Verfügung stellen, können den Status jeder T-Zelle beeinflussen. Generell ist somit nur eine Momentaufnahme der T-Zelllinien oder T-Zellklone möglich, die sich nach jeder Stimulationsrunde ändern kann.

5.9 Zytokinmuster

Auch CD8⁺-T-Zellen sind in der Lage, Immunantworten durch freigesetzte Zytokine zu regulieren. Kürzlich wurde gezeigt, dass CD8⁺-Effektor-T-Zellen neben ihrer zytotoxischen Aktivität auch bei Kontakt mit Antigen unterschiedliche Zytokine ausschütten können, die typisch für CD4⁺-T-Zellen sind (Croft *et al.*, 1994). Analog zu den Th1- und Th2-Zellen werden sie Tz1- und Tz2-Zellen genannt. Die Polarisation von Tz1- und Tz2-Zellen ist heterogener und noch nicht so gut charakterisiert, wie die Polarisation von Th1- und Th2-Zellen (Woodland und

Dutton, 2003). Bekannt ist, dass eine Stimulation mit IL-4 eher zu Tz2-Zellen, eine Stimulation mit IL-12 eher zu Tz1-Zellen führt. Die Zytokine, die von HLA-A2-positiven T-Zellen, die autolog über Selbst-MHC-Tyrosinase-Peptid-Moleküle und die Zytokine, die von „semi“-allogen induzierten HLA-A2-negativen T-Zellen (Fremd-MHC + Tyrosinase-Peptid) während Kontakt mit Targetzellen freigesetzt wurden, unterschieden sich deutlich. Erstaunlicherweise zeigte sich bei der Analyse der Zytokine, die von den *De-novo*-induzierten T-Zellen sezerniert wurden, folgende grobe Einteilung: HLA-A2-positive T-Zellen sezernierten eher Tz2-typische Zytokine, wie IL-5, IL-13 und ein Klon auch IL-10. HLA-A2-negative T-Zellen setzten eher Tz1-typische Zytokine, wie IFN- γ , TNF- α und sogar geringe Mengen des Th1-Zytokins IL-2 frei. Jeder Klon zeigte jedoch sein individuelles Zytokinprofil, wahrscheinlich aufgrund verschieden starker Stimulation. Nicht nur interklonal, sondern auch intraklonal konnten Unterschiede beobachtet werden.

Die Rolle der Tz1- und Tz2-Zellen bei Immunantworten bedarf noch weiterer Klärung. Bekannt ist, dass Tz2-Zellen *in vivo* in Patienten mit Allergien (Meissner *et al.*, 1997) und Autoimmunerkrankungen (Inaoki *et al.*, 2003) gefunden wurden. Es wurde gezeigt, dass Tumorspezifische Tz1-, nicht aber Tz2-Zellen, Anti-Tumorimmunität vermitteln (Kemp und Ronchese, 2001; Helmich und Dutton, 2001). Dies lässt vermuten, dass mit dem „semi“-allogenen System CD8⁺-T-Zellen generiert wurden, die überwiegend Zytokine sezernierten, die die Zell-vermittelte Immunität und somit die Tumor-Bekämpfung unterstützen. Mit dem autologen System wurden T-Zellen induziert, die eher Zytokine sezernierten, die B-Zellhilfe vermitteln. TyrF8 und IVS B ZTL sind in ihrer Fähigkeit, Zytokine zu sezernieren, deutlich unterlegen. Sie können kein so weites Spektrum an Zytokinen freisetzen und schütten eher Tz2-Zytokine aus. Für unsere Zwecke, die Bekämpfung von Tumoren, wären vermutlich CD8⁺-T-Zellen, die neben ihrer zytotoxischen Aktivität Tz1-Zytokine sezernieren, von Vorteil. Eine Modulation der CD8⁺-T-Zellen in die eine oder andere Richtung während der *De-novo*-Induktion wäre durchaus denkbar. An DZ, die IL-12 sezernieren, wird bereits in unserem Labor geforscht (Zobywalski *et al.*, 2007). Ihr Einsatz in der *De-novo*-Induktion von T-Zellen könnte die Zytokinprofile der CD8⁺-T-Zellen bzw. CD4⁺-T-Zellen weiter in die gewünschte Richtung Tz1- und Th1-Antwort verschieben.

5.10 Gefahren des adoptiven Transfers hoch aviden CD8⁺-T-Zellen

Neuere Studien haben gezeigt, dass der adoptive T-Zelltransfer von autologen selektierten T-Zellen mit bestimmten Spezifitäten die Tumorlast reduzieren konnte, besonders wenn die Patienten vorher nicht-myeloablativ behandelt wurden (Dudley *et al.*, 2002; Dudley und Rosenberg, 2003). Das Dilemma ist, dass die meisten Tumoren aus entarteten Körperzellen entstehen und somit keine fremden Antigene präsentieren. Ein Angriffspunkt allerdings könnte vom Tumor überexprimiertes Selbst-Protein sein. Wenn nun mit unserem „semi“-allogenen System CD8⁺-T-Zellen mit stärkeren Effektorfunktionen gegen Tumor-assoziierte Selbst-Antigene induziert werden und entweder *ex vivo* für den adoptiven Transfer expandiert oder TZR-transgene T-Zellen generiert werden, muss besonders über mögliche Gefahren nachgedacht werden.

Eine unerwünschte Nebenwirkung wäre Autoimmunität gegen Selbstgewebe. Adoptive T-Zelltherapie von Melanom-Patienten mit Lymphozyten, die Melanom-Differenzierungs-Antigene erkannten, die auch von Melanozyten der Haut exprimiert werden, führte zu einem Angriff der normalen Melanozyten. Die Melanom-Patienten entwickelten Vitiligo, eine Autoimmunerkrankung, charakterisiert durch den Verlust der Melanozyten (Dudley *et al.*, 2002). Deshalb muss das TAA sehr vorsichtig ausgewählt werden und bei der Wahl des TAAs, gegen das die hoch aviden CD8⁺-T-Zellen generiert werden sollen, besonders darauf geachtet werden, dass dieses TAA nicht in lebenswichtigen Organen oder Geweben exprimiert wird. Gut geeignet sind Antigene, die außer vom Tumor nur in immunprivilegierten Geweben exprimiert werden, wie z.B. MAGE (Melanom-Antigen-Gen) oder Antigene, die in der fötalen und embryonalen Entwicklung eine Rolle spielen, wie z.B. CEA („Carcinoembryonic antigen“) (DePlaen *et al.*, 1994; Nair *et al.*, 1999). Auch können Immunantworten, die gegen einen einzelnen Tumor-Liganden gerichtet sind, zu Tumorzellen führen, die die Expression des jeweiligen Liganden verloren haben und so der Immunüberwachung entkommen können. Mischungen mit T-Zellen verschiedener TAA-Spezifitäten können dem entgegenwirken, erhöhen jedoch die Gefahr der Autoimmunität, wenn T-Zellen enthalten sind, die normales Gewebe erkennen.

Weitere Verbesserungen der adoptiven T-Zell-Therapie, als erfolgreiche Strategie, Tumoren zu bekämpfen, hängen von einem besseren Verständnis immunologischer Prozesse ab, wie der Rolle von CD4⁺-T-Helfer-Zellen aber auch der Rolle von supprimierenden regulatorischen T-Zellen, der Fähigkeit der CD8⁺-T-Zellen *in vivo* zu bestehen und zu den Tumoren zu wandern und ein geeignetes Umfeld für die Tumor-spezifischen T-Zellen zu schaffen.

5.11 Ausblick

Bisher war ein großes Problem für den Therapieansatz des adoptiven T-Zelltransfers, dass es sehr schwierig ist, hoch averse CD8⁺-T-Zellen zu generieren, die in der Lage sind, Tumorzellen zu töten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe von DZ, die allogene MHC-Moleküle und Tyrosinase-Protein koexprimierten, Peptid-spezifische CD8⁺-T-Zellen eines nicht negativ selektierten T-Zellrepertoires induziert und isoliert. Diese T-Zellen besaßen hoch affine TZR gegen TAA-Selbst-Peptide, zeigten hervorragende Effektorfunktionen sowohl im Töten von Melanomzellen als auch in der Zytokinfreisetzung und brachten somit die besten Eigenschaften für den adoptiven T-Zelltransfer mit sich. Die *De-novo*-Induktion mit *ivt*RNS-beladenen DZ zur Generierung allorestingierter T-Zellen stellte sich im Vergleich mit bisher bekannten Strategien als deutlich überlegen heraus.

Wird ein Aspekt gelöst, so eröffnen sich viele neue Wege, die erforscht werden sollten. Experimente, die in diesem Zusammenhang denkbar wären, sind die Untersuchung der Rolle von CD4⁺-T-Zellen bei der *De-novo*-Induktion, sowohl von CD4⁺-T-Helfer-Zellen als auch von regulatorischen T-Zellen, die Toleranz bei Selbst-Peptid-spezifischen CD8⁺-T-Zellen induzieren können. Auch wäre es interessant, allorestingierte CD8⁺-T-Zellen und CD4⁺-T-Zellen gegen neue viel versprechende TAA zu generieren. Der Phantasie sind keine Grenzen gesetzt, da jedes beliebige TAA mit verschiedenen MHC-Klasse-I- und Klasse-II-Molekülen in Form von *ivt*RNS kombiniert werden können. Der Einfluss des Zytokinmilieus auf die T-Zellen während der *De-novo*-Induktion könnte untersucht werden. Neuartige Methoden zur Depletion der störenden Allo-MHC-T-Zellen könnten die Klonierung und Isolierung Antigen-spezifischer T-Zellen erleichtern. Mittels *ivt*RNS-Technologie könnten die erhaltenen Sequenzen für die α - und β -Ketten hoch affiner TZR und ihr Beitrag zur TZR-Affinität weiter erforscht werden.

Das Immunsystem ist ein sehr komplexes und empfindliches System. Jedes kleine Ergebnis im Forschungsbereich der Immuntherapie bringt uns ein kleines bisschen in der Bekämpfung von Krebserkrankungen weiter. Als längerfristiges Ziel wäre es für die klinische Anwendung wichtig, transgene T-Zellen mit den in dieser Arbeit erhaltenen hoch affinen TZR-Sequenzen für den adoptiven T-Zelltransfer zu generieren. Auch an der Minimierung der Nebenwirkungen sollte weiter geforscht werden. Bei Autoimmunreaktionen könnten regulatorische T-Zellen eingesetzt werden. Aber auch über induzierbare TZR sollte nachgedacht werden.

6 Literaturverzeichnis

Akbar, A. N. und Vukmanovic-Stejic, M. (2007). Telomerase in T lymphocytes: use it and lose it? *J Immunol* **178**(11): 6689-94.

Alexander-Miller, M. A., Leggatt, G. R., Berzofsky, J. A. (1996a). Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic T lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(9):4102-7.

Alexander-Miller, M. A., Leggatt, G. R., Sarin, A., Berzofsky, J. A. (1996b). Role of antigen, CD8, and cytotoxic T lymphocyte (CTL) avidity in high dose antigen induction of apoptosis of effector CTL. *J Exp Med* **184**(2): 485-492.

Altman, J. D., Moss, P. A., Goulder, P. J., Barouch, D. H., McHeyzer-Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J., Davis, M. M. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* **274**(5284): 94-96.

Andersen, M. H., Keikavoussi, P., Brocker, E. B., Schuler-Thurner, B., Jonassen, M., Sondergaard, I., Straten, P. T., Becker, J. C. und Kampgen, E. (2001). Induction of systemic CTL responses in melanoma patients by dendritic cell vaccination: cessation of CTL responses is associated with disease progression. *Int J Cancer* **94**(6): 820-824.

Appay, V., Nixon, D. F., Donahoe, S. M., Gillespie, G. M., Dong, T., King, A., Ogg, G. S., Spiegel, H. M., Conlon, C., Spina, C. A., Havlir, D. V., Richman, D. D., Waters, A., Easterbrook, P., McMichael, A. J. und Rowland-Jones, S. L. (2000). HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* **192**(1): 63-75.

Arden, B., Clark, S. P., Kabelitz, D. und Mak, T. W. (1995). Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* **42**(6): 455-500.

Atkins, M. B., Kunkel, L., Sznol, M. und Rosenberg, S. A. (2000). High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update. *Cancer J Sci Am* **6 Suppl 1**: S11-14.

Baatar, D., Olkhanud, P., Sumitomo, K., Taub, D., Gress, R. und Biragyn, A. (2007). Human peripheral blood T regulatory cells (Tregs), functionally primed CCR4+ Tregs and unprimed CCR4- Tregs, regulate effector T cells using FasL. *J Immunol* **178**(8): 4891-900.

Banchereau, J. und Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**: 245-252.

Becker, C., Pohla, H., Frankenberger, B., Schuler, T., Assenmacher, M., Schendel, D. J. und Blankenstein, T. (2001). Adoptive tumor therapy with T lymphocytes enriched through an IFN-gamma capture assay. *Nat Med* **7**(10): 1159-62.

Becker, T. C., Wherry, E. J., Boone, D., Murali-Krishna, K., Antia, R., Ma, A. und Ahmed, R. (2002). Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med* **195**(12): 1541-8.

Benoist, C. und Mathis, D. (2001). Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? *Nat Immunol* **2**(9):797-801.

- Bevan, M. J.** (1976). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay.
J Exp Med **143**(5): 1283-8.
- Bevan, M. J.** (1984). High determinants density may explain the phenomenon of alloreactivity.
Immunol Today **5**: 128-130.
- Broome, H. E., Dargan, C. M., Krajewski, S. und Reed, J. C.** (1995). Expression of Bcl-2, Bcl-x, and Bax after T cell activation and IL-2 withdrawal.
J Immunol **155**(5): 2311-7.
- Buentke, E., Mathiot, A., Tolaini, M., Di Santo, J., Zamoyska, R. und Seddon, B.** (2006). Do CD8 effector cells need IL-7R expression to become resting memory cells?
Blood **108** (6): 1949-56.
- Burgdorf, S., Kautz, A., Böhnert, V., Knolle, P. A. und Kurts, C.** (2007). Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation.
Science **316**(5824): 612-616.
- Burnet, M.** (1964). Immunological factors in the process of carcinogenesis.
Br Med Bull **20**: 154-158.
- Busch, D. H. und Pamer, E. G.** (1999). T cell affinity maturation by selective expansion during infection.
J Exp Med **189**(4): 701-710.
- Busch, D. H., Pilip, I. M., Vijh, S. und Pamer, E. G.** (1998). Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection.
Immunity **8**(3): 353-362.
- Campbell, N. A.** (1997). Biologie.
Spektrum Verlag, Heidelberg.
- Carey, T. E., Lloyd, K. O., Takahashi, T., Travassos, L. R. und Old, L. J.** (1979). AU cell-surface antigen of human malignant melanoma: solubilization and partial characterization.
Proc Natl Acad Sci USA **76**(6): 2898-902.
- Cheever, M. A., Greenberg, P. D., Fefer, A. und Gillis, S.** (1982). Augmentation of the anti-tumor therapeutic efficacy of long-term cultured T lymphocytes by in vivo administration of purified interleukin 2.
J Exp Med **155**(4): 968-980.
- Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J. und Lanzavecchia, A.** (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells.
Nature **388**(6644): 782-787.
- Cella, M., Salio, M., Sakakibara, Y., Langen, H., Julkunen, I. und Lanzavecchia, A.** (1999). Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA.
J Exp Med **189**(5): 821-829.
- Clark, W. H. Jr., Elder, D. E., Guerry, D. 4th, Braitman, L. E., Trock, B. J., Schultz, D., Synnestvedt, M. und Halpern, A. C.** (1989). Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression.
J Natl Cancer Inst **81**(24): 1893-904.
- Clemente, C. G., Mihm, M. C. Jr., Bufalino, R., Zurrida, S., Collini, P. und Cascinelli, N.** (1996). Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma.
Cancer **77**(7): 1303-10.

- Colella, T. A., Bullock, T. N., Russell, L. B., Mullins, D. W., Overwijk, W. W., Luckey, C. J., Pierce, R. A., Restifo, N. P. und Engelhard, V. H.** (2000). Self-tolerance to the murine homologue of a tyrosinase-derived melanoma antigen: implications for tumor immunotherapy.
J Exp Med **191**(7): 1221-32.
- Colgan, D.F. und Manley, J.L.** (1997). Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation.
Genes Dev **11**: 2755–2766.
- Croft, M., Carter, L., Swain, S. L. und Dutton, R.W.** (1994). Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL) -4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles.
J Exp Med **180**(5): 1715-28.
- Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M. L., Knutson, K. L., Chen, L. und Zou, W.** (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival.
Nat Med **10**(9): 942-949.
- Daniels, M. A. und Jameson, S. C.** (2000). Critical role for CD8 in T cell receptor binding and activation by peptide/major histocompatibility complex multimers.
J Exp Med **191**(2): 335-46.
- Davis, M. M und Bjorkman P. J.** (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition.
Nature **334**: 395-402
- Demetz, S., Sette, A., Sakaguchi, K., Buchner, R., Appella, E. und Grey, H. M.** (1991). Self peptide requirement for class II major histocompatibility complex allorecognition.
Proc Natl Acad Sci USA **88**(19): 8730-4.
- De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., Gaforio, J. J., Szikora, J. P., De Smet, C., Bresseur, F., van der Bruggen, P., Lethé, B., Lurquin, C., et al.** (1994). Structure, chromosomal localization and expression of 12 genes of the MAGE family.
Immunogenetics **40**(5): 360-369.
- de Witte, M. A., Coccoris, M., Wolkers, M. C., van den Boom, M. D., Mesman, E. M., Song, J. Y., van der Valk, M., Haanen, J. B. und Schumacher, T. N.** (2006). Targeting self-antigens through allogeneic TCR gene transfer.
Blood **108**(3): 870-877.
- Dighe, A. S., Richards, E., Old, L. J. und Schreiber, R. D.** (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors.
Immunity **1**(6): 447-456.
- Dudley, M. E. und Rosenberg, S. A.** (2003). Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer.
Nat Rev Cancer **3**(9): 666-675.
- Dudley, M. E., Wunderlich, J., Nishimura, M. I., Yu, D., Yang, J. C., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Sherry, R., Leitman, S. F. und Rosenberg, S. A.** (2001). Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma.
J Immunother **24**(4): 363-373.

- Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Robbins, P. F., Yang, J. C., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Sherry, R., Restifo, N. P., Hubicki, A. M., Robinson, M. R., Raffeld, M., Duray, P., Seipp, C. A., Rogers-Freezer, L., Morton, K. E., Mavroukakis, S. A., White, D. E. und Rosenberg, S. A.** (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes.
Science **298(5594)**: 850-854.
- Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Yang, J. C., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Sherry, R. M., Marincola, F. M., Leitman, S. F., Seipp, C. A., Rogers-Freezer, L., Morton, K. E., Nahvi, A., Mavroukakis, S. A., White, D. E. und Rosenberg, S. A.** (2002). A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma.
J Immunother (1997) **25(3)**: 243-251.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. und Schreiber, R. D.** (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape.
Nat Immunol **3(11)**: 991-998.
- Dunn, G. P., Old, L. J. und Schreiber, R. D.** (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting.
Immunity **21(2)**: 137-148.
- Ehrlich, P.** (1909). Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung.
Ned Tijdschr Geneesk **5**: 273-290.
- Eisen, H. N., Sykulev, Y., Tsomides, T. J.** (1996). Antigen-specific T-cell receptors and their reactions with complexes formed by peptides with major histocompatibility complex proteins.
Adv Protein Chem **49**:1-56.
- Falk, C. S. und Schendel, D. J.** (2002). Allogeneic MHC class I ligands and their role in positive and negative regulation of human cytotoxic effector cells.
Hum Immunol **63(1)**: 8-19.
- Furuichi, Y., Tokuyama, H., Ueha, S., Kurachi, M., Moriyasu, F. und Kakimi, K.** (2005). Depletion of CD25+CD4+T cells (Tregs) enhances the HBV-specific CD8+ T cell response primed by DNA immunization.
World J Gastroenterol **11(24)**: 3772-7.
- Garcia, K. C., Degano, M., Pease, L. R., Huang, M., Peterson, P. A., Teyton, L., Wilson, I. A.** (1998). Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen. *Science* **279(5354)**: 1166-72.
- Gansbacher, B., Bannerji, R., Daniels, B., Zier, K., Cronin, K. und Gilboa, E.** (1990). Retroviral vector-mediated gamma-interferon gene transfer into tumor cells generates potent and long lasting antitumor immunity.
Cancer Res **50(24)**: 7820-5.
- Gao, L., Yang, T. H., Tourdot, S., Sadovnikova, E., Hasserjian, R. und Stauss, H. J.** (1999). Allo-major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocytes engraft in bone marrow transplant recipients without causing graft-versus-host disease.
Blood **94(9)**: 2999-3006.
- Gao, L., Bellantuono, I., Elsässer, A., Marley, S. B., Gordon, M. Y., Goldman, J. M., Stauss, H. J.** (2000). Selective elimination of leukemic CD34(+) progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT1.
Blood **95(7)**: 2198-203.
- Gao, Y., Yang, W., Pan, M., Scully, E., Girardi, M., Augenlicht, L. H., Craft, J. und Yin, Z.** (2003). Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity.
J Exp Med **198(3)**: 433-442

- Geiger, C., Regn, S., Weinzierl, A., Noessner, E. und Schendel, D. J.** (2005). A generic RNA-pulsed dendritic cell vaccine strategy for renal cell carcinoma.
J Transl Med 3:29.
- Geiger, J. D., Hutchinson, R. J., Hohenkirk, L. F., McKenna, E. A., Yanik, G. A., Levine, J. E., Chang, A. E., Braun, T. M. und Mule, J. J.** (2001). Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression.
Cancer Res 61(23): 8513-9.
- Gett, A. V., Sallusto, F., Lanzavecchia, A. und Geginat, J.** (2003). T cell fitness determined by signal strength.
Nat Immunol 4(4): 355-360.
- Gilboa, E. und Vieweg, J.** (2004). Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells.
Immunol Rev 199: 251-263.
- Greenberg, P.D.** (1991). Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells.
Adv Immunol 49: 281.
- Heath, W. R., Belz, G. T., Behrens, G. M., Smith, C. M., Forehan, S. P., Parish, I. A., Davey, G. M., Wilson, N. S., Carbone, F. R. und Villadangos, J. A.** (2004). Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens.
Immunol Rev 199: 9-26.
- Helmich, B. K. und Dutton, R. W.** (2001). The role of adoptively transferred CD8 T cells and host cells in the control of the growth of the EG7 thymoma: Factors that determine the relative effectiveness and homing properties of Tc1 and Tc2 effectors.
J Immunol 166: 6500–6508.
- Ho, W. Y., Nguyen, H. N., Wolf, M., Kuball, J., Greenberg, P. D.** (2006). In vitro methods for generating CD8+ T-cell clones for immunotherapy from the naive repertoire.
J Immunol Methods 310(1-2): 40-52.
- Hock, H., Dorsch, M., Kunzendorf, U., Qin, Z., Diamantstein, T. und Blankenstein T.** (1993). Mechanisms of rejection induced by tumor cell-targeted gene transfer of interleukin 2, interleukin 4, interleukin 7, tumor necrosis factor, or interferon gamma.
Proc Natl Acad Sci USA 90(7): 2774-8.
- Horowitz, M. M., Gale, R. P., Sondel, P. M., Goldman, J. M., Kersey, J., Kolb, H. J., Rimm, A. A., Ringdén, O., Rozman, C., Speck, B., et al.** (1990). Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation.
Blood 75(3): 555-562.
- Housset, D. und Malissen, B.** (2003). What do TCR-pMHC crystal structures teach us about MHC restriction and alloreactivity?
Trends Immunol 24(8): 429-437.
- Huang, J., Khong, H. T., Dudley, M. E., El-Gamil, M., Li, Y. F., Rosenberg, S. A. und Robbins, P. F.** (2005). Survival, persistence, and progressive differentiation of adoptively transferred tumor-reactive T cells associated with tumor regression.
J Immunother (1997) 28(3): 258-267.
- Hunziker, L., Klenerman, P., Zinkernagel, R. M. und Ehl, S.** (2002). Exhaustion of cytotoxic T cells during adoptive immunotherapy of virus carrier mice can be prevented by B cells or CD4+ T cells.
Eur J Immunol 32(2): 374-382.
- Ibe, S., Qin, Z., Schüler, T., Preiss, S. und Blankenstein, T.** (2001). Tumor rejection by disturbing tumor stroma cell interactions.
J Exp Med 194(11): 1549-59.

- Iezzi, G., Karjalainen, K. und Lanzavecchia, A.** (1998). The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells.
Immunity **8(1)**:89-95.
- Inaoki, M., Sato, S., Shirasaki, F., Mukaida, N. und Takehara, K.** (2003). The frequency of type 2 CD8+ T cells is increased in peripheral blood from patients with psoriasis vulgaris.
J Clin Immunol **23**: 269–278.
- Janeway, C. A. Jr., Travers, P., Walport, M. und Shlomchik, M. J.** (2005). IMMUNOBIOLOGY the immune system in health and disease.
Garland Science Publishing, New York, USA.
- Javorovic, M.** (2004). T-Cell Stimulation by Melanoma RNA-Pulsed Dendritic Cells
Dissertation der Fakultät für Biologie der LMU München
- Javorovic, M., Pohla, H., Frankenberger, B., Wolfel, T., Schendel, D. J.** (2005). RNA transfer by electroporation into mature dendritic cells leading to reactivation of effector-memory cytotoxic T lymphocytes: a quantitative analysis.
Mol Ther **12(4)**: 734-43.
- Johnson, L. A., Heemskerk, B., Powell, D. J. Jr., Cohen, C. J., Morgan, R. A., Dudley, M. E., Robbins, P. F. und Rosenberg, S. A.** (2006). Gene transfer of tumor-reactive TCR confers both high avidity and tumor reactivity to nonreactive peripheral blood mononuclear cells and tumor-infiltrating lymphocytes.
J Immunol **177(9)**: 6548-59.
- Kausche, S., Wehler, T., Schnürer, E., Lennerz, V., Brenner, W., Melchior, S., Gröne, M., Nonn, M., Strand, S., Meyer, R., Ranieri, E., Huber, C., Falk, C. S. und Herr W.** (2006). Superior antitumor in vitro responses of allogeneic matched sibling compared with autologous patient CD8+ T cells.
Cancer Res **66(23)**: 11447-54.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Sakaguchi, K., Robbins, P. F., Rivoltini, L., Yannelli, J. R., Appella, E. und Rosenberg, S. A.** (1994). Identification of the Immunodominant Peptides of the MART-1 Human Melanoma Antigen Recognized by the Majority of HLA-A2-restricted Tumor Infiltrating Lymphocytes.
J Exp Med **180**: 347-352.
- Kedl, R. M., Rees, W. A., Hildeman, D. A., Schaefer, B., Mitchell, T., Kappler, J. und Marrack, P.** (2000). T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells.
J Exp Med **192(8)**: 1105-13.
- Kedl, R. M., Schaefer, B. C., Kappler, J. W. und Marrack, P.** (2001). T cells down-modulate peptide-MHC complexes on APCs in vivo.
Nat Immunol **3(1)**: 27-32.
- Keenan, R. D., Ainsworth, J., Khan, N., Bruton, R., Cobbold, M., Assenmacher, M., Milligan, D. W. und Moss, P. A.** (2001). Purification of cytomegalovirus-specific CD8 T cells from peripheral blood using HLA-peptide tetramers.
Br J Haematol **115(2)**: 428-434.
- Kemp, R. A. und Ronchese, F.** (2001). Tumor-specific Tc1, but not Tc2, cells deliver protective antitumor immunity.
J Immunol **167**: 6497–6502.
- Klein, J.** (1986). Natural History of the Major Histocompatibility complex.
New York, Wiley.
- Khong, H. T. und Restifo, N. P.** (2002). Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes.
Nat Immunol **3(11)**: 999-1005.

- Knabel, M., Franz, T. J., Schiemann, M., Wulf, A., Villmorow, B., Schmidt, B., Bernhard, H., Wagner, H. und Busch, D. H.** (2002). Reversible MHC multimer staining for functional isolation of T-cell populations and effective adoptive transfer.
Nat Med **8(6)**: 631-637.
- Kolb, H. J., Schmid, C., Barrett, A. J. und Schendel, D. J.** (2004). Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras.
Blood **103(3)**: 767-776.
- Kozak, M.** (1984). Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin in vivo.
Nature **308(5956)**: 241-246.
- Kozak, M.** (2004). How strong is the case for regulation of the initiation step of translation by elements at the 3' end of eukaryotic mRNAs?
Gene **343**: 41-54.
- Ku, C. C., Murakami, M., Sakamoto, A., Kappler, J. und Marrack, P.** (2000). Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines.
Science **288(5466)**: 675-678.
- Kursar, M., Bonhagen, K., Fensterle, J., Kohler, A., Hurwitz, R., Kamradt, T., Kaufmann, S. H. und Mittrucker, H. W.** (2002). Regulatory CD4+CD25+ T cells restrict memory CD8+ T cell responses.
J Exp Med **196(12)**: 1585-92.
- Langenkamp, A., Casorati, G., Garavaglia, C., Dellabona, P., Lanzavecchia, A. und Sallusto, F.** (2002). T cell priming by dendritic cells: thresholds for proliferation, differentiation and death and intracлонаl functional diversification.
Eur J Immunol **32(7)**: 2046-54.
- Lanzavecchia, A. und Sallusto, F.** (2000). Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells.
Science **290(5489)**: 92-97.
- Lanzavecchia, A. und Sallusto, F.** (2001). Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination.
Nat Immunol **2(6)**: 487-492.
- Lanziavecchia, A.** (2002). Lack of fair play in the T cell response.
Nat Immunol **3**: 9-10.
- Lawson, C. M.** (2000). Evidence for mimicry by viral antigens in animal models of autoimmune disease including myocarditis.
Cell Mol Life Sci **57(4)**: 552-560.
- Lee, W. C., Wang, H. C., Hung, C. F., Huang, P. F., Lia, C. R. und Chen, M. F.** (2005). Vaccination of advanced hepatocellular carcinoma patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells: a clinical trial.
J Immunother (1997) **28(5)**: 496-504.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B.** (1998). Genetic instabilities in human cancers.
Nature **396(6712)**: 643-649.
- Liao, X., Li, Y., Bonini, C., Nair, S., Gilboa, E., Greenberg, P., D., und Yee, C.** (2004). Transfection of RNA encoding tumor antigens following maturation of dendritic cells leads to prolonged presentation of antigen and the generation of high-affinity tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes.
Mol Ther **9**: 757-764.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. und Darnell, J. E.** (2001). Molekulare Zellbiologie.
Spektrum Verlag, Heidelberg.

- Lu, Z., Yuan, L., Zhou, X., Sotomayor, E., Levitsky, H. I. und Pardoll, D. M.** (2000). CD40-independent pathways of T cell help for priming of CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **191(3)**: 541-550.
- Lynch, D. H. und Miller, R. E.** (1994). Interleukin 7 promotes long-term in vitro growth of antitumor cytotoxic T lymphocytes with immunotherapeutic efficacy in vivo. *J Exp Med* **179(1)**: 31-42.
- Maile, R., Wang, B., Schooler, W., Meyer, A., Collins, E. J. und Frelinger, J. A.** (2001). Antigen-specific modulation of an immune response by in vivo administration of soluble MHC class I tetramers. *J Immunol* **167(7)**: 3708-14.
- Maker, A. V., Phan, G. Q., Attia, P., Yang, J. C., Sherry, R. M., Topalian, S. L., Kammula, U. S., Royal, R. E., Haworth, L. R., Levy, C., Kleiner, D., Mavroukakis, S. A., Yellin, M. und Rosenberg, S. A.** (2005). Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase I/II study. *Ann Surg Oncol* **12(12)**: 1005-16.
- Matloubian, M., Concepcion, R. J. und Ahmed, R.** (1994). CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol* **68(12)**: 8056-63.
- McHeyzer-Williams, M. G. und Davis, M. M.** (1995). Antigen-specific development of primary and memory T cells in vivo. *Science* **268(5207)**: 106-11.
- Mehrotra, S., Stevens, R., Zengou, R., Chakraborty, N. G., Butterfield, L. H., Economou, J. S., Dorsky, D. I. und Mukherji, B.** (2003). Regulation of Melanoma Epitope-specific Cytolytic T Lymphocyte Response by Immature and Activated Dendritic Cells, in Vitro. *Cancer Research* **63**: 5607-5614.
- Meissner, N., Kussebi, F., Jung, T., Ratti, H., Baumgarten, C., Werfel, T., Heusser, C. und Renz, H.** (1997). A subset of CD8+ T cells from allergic patients produce IL-4 and stimulate IgE production in vitro. *Clin Exp Allergy* **27**: 1402-1411.
- Mempel, T. R., Henrickson, S. E. und Von Andrian, U. H.** (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* **427(6970)**: 154-159.
- Milani, V., Frankenberger, B., Heinz, O., Brandl, A., Ruhland, S., Issels, R. D. und Noessner, E.** (2005). Melanoma-associated antigen tyrosinase but not Melan-A/MART-1 expression and presentation dissociate during the heat shock response. *International Immunology* **17 (3)**: 257-268.
- Moldrem, J. J., Lee, P. P., Wang, C., Champlin, R. E. und Davis, M. M.** (1999). A PR1-human leukocyte antigen-A2 tetramer can be used to isolate low-frequency cytotoxic T Lymphocytes from healthy donors that selectively lyse chronic myelogenous leukaemia. *Cancer Res* **59(11)**: 2675-81.
- Moldrem, J. J., Lee, P. P., Kant, S., Wieder, E., Jiang, W., Lu, S., Wang, C. und Davis, M. M.** (2003). Chronic myelogenous leukemia shapes host immunity by selective deletion of high-avidity leukemia-specific T cells. *J Clin Invest* **111(5)**: 639-647.
- Moris, A., Teichgräber, V., Gauthier, L., Bühring, H. J. und Rammensee, H. G.** (2001). Cutting edge: characterization of allorestricted and peptide-selective alloreactive T cells using HLA-tetramer selection. *J Immunol* **166(8)**: 4818-21.

- Morris, E. C., Tsallios, A., Bendle, G. M., Xue, S. A. und Stauss, H. J.** (2005). A critical role of T cell antigen receptor-transduced MHC class I-restricted helper T cells in tumor protection. *Proc Natl Acad Sci USA* **102(22)**: 7934-9.
- Mosse, C. A., Meadows, L., Luckey, C. J., Kittlesen, D. J., Huczko, E. L., Slingluff, C. L., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. und Engelhard, V. H.** (1998). The class I antigen-processing pathway for the membrane protein tyrosinase involves translation in the endoplasmic reticulum and processing in the cytosol. *J Exp Med* **187(1)**: 37-48.
- Münz, C., Obst, R., Osen, W., Stevanović, S. und Rammensee, H. G.** (1999). Alloreactivity as a source of high avidity peptide-specific human CTL. *J Immunol* **162**: 25-34.
- Munroe, D. and Jacobson, A.** (1990). Tales of poly(A): a review. *Gene* **91(2)**:151-158.
- Murakami, M., Sakamoto, A., Bender, J., Kappler, J. und Marrack, P.** (2002). CD25+CD4+ T cells contribute to the control of memory CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **99(13)**: 8832-7.
- Nair, S. K., Hull, S., Coleman, D., Gilboa, E., Lyerly, H. K. und Morse M. A.** (1999). Induction of carcinoembryonic antigen (CEA) -specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vitro using autologous dendritic cells loaded with CEA peptide or CEA RNA in patients with metastatic malignancies expressing CEA. *Int J Cancer* **82(1)**: 121-124.
- Naito, Y., Saito, K., Shiiba, K., Ohuchi, A., Saigenji, K., Nagura, H. und Ohtani, H.** (1998). CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* **58(16)**: 3491-4.
- Nestle, F. O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G. und Schadendorf, D.** (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor-lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* **4**: 328-332.
- Neudorfer, J., Schmidt, B., Huster, K. M., Anderl, F., Schiemann, M., Holzappel, G., Schmidt, T., Germeroth, L., Wagner, H., Peschel, C., Busch, D. H. und Bernhard, H.** (2007). Reversible HLA multimers (Streptamers) for the isolation of human cytotoxic T lymphocytes functionally active against tumor- and virus-derived antigens. *J Immunol Methods* **320(1-2)**: 119-31.
- O'Herrin, S. M., Slansky, J. E., Tang, Q., Markiewicz, M. A., Gajewski, T. F., Pardoll, D. M., Schneck, J. P. und Bluestone, J. A.** (2001). Antigen-specific blockade of T cells in vivo using dimeric MHC peptide. *J Immunol* **167(5)**: 2555-60.
- Palermo, B., Garbelli, S., Mantovani, S., Scoccia, E., Da Prada, G.A., Bernabei, P., Avanzini, M.A., Brazzelli, V., Borroni, G. und Giachino, C.** (2005). Qualitative difference between the cytotoxic T lymphocyte responses to melanocyte antigens in melanoma and vitiligo. *Eur J Immunol* **35(11)**: 3153-62.
- Panina-Bordignon, P., Corradin, G., Roosnek, E., Sette, A. und Lanzavecchia, A.** (1991). Recognition by class II alloreactive T cells of processed determinants from human serum proteins. *Science* **252(5012)**: 1548-50.
- Pardoll, D.** (2001). T cells and tumours. *Nature* **411**: 1010-1012.

- Penn, I.** (1999). Posttransplant malignancies.
Transplant Proc **31(1-2)**: 1260-2.
- Perez-Diez, A. und Marincola, F. M.** (2002). Immunotherapy against antigenic tumors: a game with a lot of players.
Cell Mol Life Sci **59(2)**: 230-240.
- Rees, W., Bender, J., Teague, T. K., Kedl, R. M., Crawford, F., Marrack, P. und Kappler, J.** (1999). An inverse relationship between T cell receptor affinity and antigen dose during CD4(+) T cell responses in vivo and in vitro.
Proc Natl Acad Sci USA **96(17)**: 9781-6.
- Ribas, A., Butterfield, L. H., Glaspy, J. A. und Economou, J. S.** (2003). Current developments in cancer vaccines and cellular immunotherapy.
J Clin Oncol **21(12)**: 2415-32.
- Rivoltini, L., Barracchini, K. C., Viggiano, V., Kawakami, Y., Smith, A., Mixon, A., Restifo, N. P., Topalian, S. L., Simonis, T. B., Rosenberg, S. A. und Marincola, F. M.** (1995). Quantitative Correlation between HLA Class I Allele Expression and Recognition of Melanoma Cells by Antigen-specific Cytotoxic T Lymphocytes.
Cancer Research **55**: 3149-3157.
- Rötzschke, O., Falk, K., Faath, S., und Rammensee, H. G.** (1991). On the nature of peptides involved in T cell alloreactivity.
J Exp Med **174(5)**: 1059-71.
- Rosenberg, S. A.** (1999). A new era of cancer immunotherapy: converting theory to performance.
CA Cancer J Clin **49(2)**: 70-3, 65.
- Rosenberg, S. A.** (2000). Interleukin-2 and the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer.
Cancer J Sci Am **6 Suppl 1**: S2-7.
- Rosenberg, S. A. und Dudley, M. E.** (2004). Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes.
Proc Natl Acad Sci USA **101 Suppl 2**: 14639-45.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M. und Takahashi, T.** (2001). Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance.
Immunol Rev **182**: 18-32.
- Salter, R. D., Howell, D. N. und Cresswell, P.** (1985). Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids.
Immunogenetics **21(3)**: 235-46.
- Savage, P., Gao, L., Vento, K., Cowburn, P., Man, S., Steven, N., Ogg, G., McMichael, A., Epenetos, A., Goulmy, E., Stauss, H. J.** (2004). Use of B cell-bound HLA-A2 class I monomers to generate high-avidity, allo-restricted CTLs against the leukemia-associated protein Wilms tumor antigen.
Blood **103(12)**: 4613-5.
- Schaft, N., Dörrie, J., Thumann, P., Beck, V. E., Müller, I., Schultz, E. S., Kämpgen, E., Dieckmann, D. und Schuler, G.** (2005). Generation of an optimized polyvalent monocyte-derived dendritic cell vaccine by transfecting defined RNAs after rather than before maturation.
J Immunol **174(5)**: 3087-97.

- Schaft, N., Dorrie, J., Muller, I., Beck, V., Baumann, S., Schunder, T., Kampgen, E. und Schuler, G.** (2006). A new way to generate cytolytic tumor-specific T cells: electroporation of RNA coding for a T cell receptor into T lymphocytes.
Cancer Immunol Immunother **55(9)**: 1132-41.
- Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C. und Lefrancois, L.** (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo.
Nat Immunol **1(5)**: 426-432.
- Schuler, G., Schuler-Thurner, B. und Steinman, R. M.** (2003). The use of dendritic cells in cancer immunotherapy.
Curr Opin Immunol **15(2)**: 138-147.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J. und Schreiber R. D.** (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity.
Nature **410(6832)**: 1107-11.
- Sharma, P., Shen, Y., Wen, S., Yamada, S., Jungbluth, A. A., Gnjatic, S., Bajorin, D. F., Reuter, V. E., Herr, H., Old, L. J. und Sato, E.** (2007). CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma.
Proc Natl Acad Sci USA **104(10)**: 3967-72.
- Sheil AG.** (1986). Cancer after transplantation.
World J Surg **10(3)**: 389-396.
- Sherman, L. A. und Chattopadhyay, S.** (1993). The molecular basis of allorecognition.
Annu Rev Immunol **11**: 385-402.
- Skipper, J. C., Hendrickson, R. C., Gulden, P. H., Brichard, V., Van Pel, A., Chen, Y., Shabanowitz, J., Wolfel, T., Slingluff, C.L. Jr, Boon, T., Hunt, D. F. und Engelhard, V. H.** (1996). An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins.
J Exp Med **183(2)**: 527-534.
- Sperling, A.I. und Bluestone, J.A.** (1996). The complexities of T-cell co-stimulation: CD28 and beyond.
Immunological Reviews **153**: 155-182.
- Stanislawski, T., Voss, R. H., Lotz, C., Sadovnikova, E., Willemsen, R. A., Kuball, J., Ruppert, T., Bolhuis, R. L., Melief, C. J., Huber, C., Stauss, H. J. und Theobald, M.** (2001). Circumventing tolerance to a human MDM2-derived tumor antigen by TCR gene transfer.
Nat Immunol **2(10)**: 962-970.
- Staveley-O'Carroll, K., Sotomayor, E., Montgomery, J., Borrello, I., Hwang, L., Fein, S., Pardoll, D. und Levitsky, H.** (1998). Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression.
Proc Natl Acad Sci USA **95(3)**: 1178-83.
- Steinman, R. M. und Nussenzweig, M. C.** (2002). Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance.
Proc Acad Sci USA **99**: 351-358.
- Street, S. E., Cretney, E. und Smyth, M. J.** (2001). Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis.
Blood **97(1)**: 192-197.
- Sykulev, Y., Brunmark, A., Tsomides, T. J., Kageyama, S., Jackson, M., Peterson, P. A. und Eisen, H.N.** (1994). High-affinity reactions between antigen-specific T-cell receptors and peptides associated with allogeneic and syngeneic major histocompatibility complex class I proteins.
Proc Natl Acad Sci USA **91(24)**: 11487-11491.

- Sykulev, Y., Joo, M., Vturina, I., Tsomides, T. J. und Eisen, H. N.** (1996). Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity* **4(6)**: 565-571.
- Takahashi, T. und Sakaguchi, S.** (2003). The role of regulatory T cells in controlling immunologic self-tolerance. *Int Rev Cytol* **225**: 1-32.
- Teague, R. M., Sather, B. D., Sacks, J. A., Huang, M. Z., Dossett, M. L., Morimoto, J., Tan, X., Sutton, S. E., Cooke, M. P., Ohlen, C. und Greenberg, P. D.** (2006). Interleukin-15 rescues tolerant CD8⁺ T cells for use in adoptive immunotherapy of established tumors. *Nat Med* **12(3)**: 335-341.
- Theobald, M., Biggs, J., Hernandez, J., Lustgarten, J., Labadie, C. und Sherman, L. A.** (1997). Tolerance to p53 by A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **185(5)**: 833-841.
- Thomas, L.** (1959). Reactions to homologous tissue antigens in relation to hypersensitivity [discussion]. In *Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states*. H. S. Lawrence, editor. Hoeber-Harper. New York, New York, USA. 529-532.
- Thurner, B., Haendle, I., Roder, C., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Jonuleit, H., Bender, A., Maczek, C., Schreiner, D., von den Driesch, P., Brocker, E. B., Steinman, R. M., Enk, A., Kampgen, E. und Schuler, G.** (1999). Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in stage IV melanoma. *J Exp Med* **190**: 1669.
- Toes, R. E., Schoenberger, S. P., van der Voort, E. I., Offringa, R. und Melief, C. J.** (1998). CD40-CD40 Ligand interactions and their role in cytotoxic T lymphocyte priming and anti-tumor immunity. *Semin Immunol* **10(6)**: 443-448.
- Tuosto, L. und Acuto, O.** (1998). CD28 affects the earliest signaling events generated by TCR engagement. *Eur J Immunol* **28(7)**: 2131-42.
- Udaka, K., Tsomides, T. J. und Eisen, H. N.** (1992). A naturally occurring peptide recognized by alloreactive CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in association with a class I MHC protein. *Cell* **69(6)**: 989-98.
- Udaka, K., Wiesmuller, K. H., Kienle, S., Jung, G. und Walden, P.** (1996). Self-MHC-restricted peptides recognized by an alloreactive T lymphocyte clone. *J Immunol* **157(2)**: 670-678.
- Urban, J. L., Holland, J. M., Kripke, M. L. und Schreiber, H.** (1982). Immunoselection of tumor cell variants by mice suppressed with ultraviolet radiation. *J Exp Med* **156(4)**: 1025-41.
- Uyttenhove, C., Van Snick, J. und Boon, T.** (1980). Immunogenic variants obtained by mutagenesis of mouse mastocytoma P815. I. Rejection by syngeneic mice. *J Exp Med* **152(5)**: 1175-83.
- Valitutti, S. und Lanzavecchia, A.** (1997). Serial triggering of TCRs: a basis for the sensitivity and specificity of antigen recognition. *Immunol Today* **18(6)**: 299-304.
- Valitutti, S., Muller, S., Cella, M., Padovan, E. und Lanzavecchia, A.** (1995). Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* **375(6527)**: 148-151.

- Van der Heiden, M. G. und Thompson, C. B.** (1999). Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis?
Nat Cell Biol **1(8)**: E209-16.
- van Duivenvoorde, L. M., van Mierlo, G. J., Boonman, Z. F. und Toes, R. E.** (2006). Dendritic cells: vehicles for tolerance induction and prevention of autoimmune diseases.
Immunobiology **211(6-8)**: 627-632.
- Viola, A., Schroeder, S., Sakakibara, Y. und Lanzavecchia, A.** (1999). T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains.
Science **283(5402)**: 680-682.
- Visseren, M. J. W., van Elsas, A., van der Voort, H. E., Rensing, M. E., Kast, W. M., Schrier, P. I., Melief, C. J. M.** (1995). CTL Specific for the Tyrosinase Autoantigen Can Be Induced from Healthy Donor Blood to lyse Melanoma Cells?
J Immunol **154**: 3991-3998.
- Walter, E. A., Greenberg, P. D., Gilbert, M. J., Finch, R. J., Watanabe, K. S., Thomas, E. D., Riddell, S. R.** (1995). Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor.
N Engl J Med **333(16)**: 1038-44.
- Walunas, T.L., Lenschow, D.J., Bakker, J.Y., Linsley, P.S., Freeman, G.J., Gren, J.M., Thompson, C. B. und Bluestone, J. A.** (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation.
Immunity **1**: 405-413.
- Wehler, T. C., Nonn, M., Brandt, B., Britten, C. M., Grone, M., Todorova, M., Link, I., Khan, S. A., Meyer, R. G., Huber, C., Hartwig, U. F. und Herr W.** (2007). Targeting the activation-induced antigen CD137 can selectively deplete alloreactive T cells from antileukemic and antitumor donor T-cell lines.
Blood **109(1)**: 365-373.
- Wei, M. L. und Cresswell, P.** (1992). HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides.
Nature **356(6368)**: 443-446.
- Wells, S. E., Hillner, P. E., Vale, R. D. und Sachs, A. B.** (1998). Circularization of mRNA by Eukaryotic Translation Initiation Factors.
Molecular Cell **2**: 135-140.
- Whelan, J. A., Dunbar, P. R., Price, D. A., Purbhoo, M. A., Lechner, F., Ogg, G. S., Griffiths, G., Phillips, R. E., Cerundolo, V. und Sewell, A. K.** (1999). Specificity of CTL interactions with peptide-MHC class I tetrameric complexes is temperature dependent.
J Immunol **163(8)**: 4342-8.
- Wölfel, T., Hauer, M., Klehmann, E., Brichard, V., Ackermann, B., Knuth, A., Boon, T., Meyer zum Buschenfelde, K. H.** (1993). Analysis of antigens recognized on human melanoma cells by A2-restricted cytolytic T lymphocytes (CTL).
Int J Cancer **55(2)**: 237-244.
- Wölfel, T., Van Pel, A., Brichard, V., Schneider, J., Seliger, B., Meyer zum Buschenfelde, K. H. und Boon, T.** (1994). Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes.
Eur J Immunol **24(3)**: 759-764.
- Wölfel, M., Schalk, S., Hellmich, M., Huster, K. M., Busch, D. H. und Berthold, F.** (2004). Quantitation of MHC tetramer-positive cells from whole blood: evaluation of a single-platform, six-parameter flow cytometric method.
Cytometry A **57(2)**:120-30.

- Wolpert, E. Z., Grufman, P., Sandberg, J. K., Tegnesjo, A. und Karre, K.** (1998). Immunodominance in the CTL response against minor histocompatibility antigens: interference between responding T cells, rather than with presentation of epitopes.
J Immunol **161**(9): 4499-505.
- Woodland, D. L. und Dutton, R. W.** (2003). Heterogeneity of CD4(+) and CD8(+) T cells.
Curr Opin Immunol **15**(3): 336-342.
- Yee, C., Savage, P. A., Lee, P. P., Davis, M. M. und Greenberg, P. D.** (1999). Isolation of High Avidity Melanoma-Reactive CTL from Heterogeneous Populations Using Peptide-MHC Tetramers.
J Immunol **162**: 2227-2234.
- Yee, C., Thompson, J. A., Roche, P., Byrd, D. R., Lee, P. P., Piepkorn, M., Kenyon, K., Davis, M. M., Riddell, S. R. und Greenberg, P. D.** (2000). Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo.
J Exp Med **192**(11): 1637-44.
- Yewdell, J. W., Norbury, C. C. und Bennink, J. R.** (1999). Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: implications for generating CD8+ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines.
Adv Immunol **73**: 1-77.
- Yu, J. S., Liu, G., Ying, H., Yong, W. H., Black, K. L. und Wheeler, C. J.** (2004). Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma.
Cancer Res **64**(14): 4973-9.
- Zeh III., H. J., Perry-Lalley, D., Dudley, M. E., Rosenberg, S. A. und Yang, J. C.** (1999). High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy.
J Immunol **162**(2): 989-994.
- Zehn, D., Cohen, C. J., Reiter, Y. und Walden, P.** (2004). Extended presentation of specific MHC-peptide complexes by mature dendritic cells compared to other types of antigen-presenting cells.
Eur J Immunol **34**(6): 1551-60.
- Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D. F. und Sprent, J.** (1998). Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15.
Immunity **8**(5): 591-599.
- Zhou, D., Srivastava, R., Grummel, V., Cepok, S., Hartung, H. P. und Hemmer, B.** (2006). High throughput analysis of TCR-beta rearrangement and gene expression in single T cells.
Lab Invest **86**(3): 314-321.
- Zinkernagel, R. M.** (2000). Localization dose and time of antigens determine immune reactivity.
Semin Immunol **12**(3): 163-171.
- Zobywalski, A., Javorovic, M., Frankenberger, B., Pohla, H., Kremmer, E., Bigalke, I. und Schendel, D. J.** (2007). Generation of clinical grade dendritic cells with capacity to produce biologically active IL-12p70.
J Transl Med **5**: 18.

7 Abkürzungen

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AICD	„activation induced cell death“
AMV	Vogel („Avian“) -Myeloblastose-Virus
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
B-LZL	lymphoblastoide B-Zelllinien
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
BZR	B-Zell-Rezeptor
CCR	Chemokin (CC-Motiv) -Rezeptor
CD	Differenzierungscluster („cluster of differentiation“)
cDNS	komplementäre DNS
CDR	Komplementaritäts-bestimmende Region („complementarity determining region“)
CEA	Carcino-Embryonales Antigen
CP	Kreuzungspunkt („crossing point“)
CpG	nichtmethylierte DNS-Motive bakterieller DNS (Cytosin-phospho-Guanin)
CTLA-4	„Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4“
Cy5	Cyanin 5
DC-Sign	„DC-specific ICAM-grabbing nonintegrin“
DZ	dendritische Zelle
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotid-5-Triphosphat
dsDNS	Doppelstrang-DNS („double strand DNA“)
dsRNS	Doppelstrang-RNS („double strand RNA“)
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionsassay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fab	Antigenbindendes Fagment
FACS	fluoreszenzaktivierter Zell-Sortierer („fluorescence activated cell sorting“)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum (FCS)
FSC	Vorwärtsstreuung („forward scatter“)
FL	Fluoreszenz
g	Erdbeschleunigung („gravity“)
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
Gy	Gray
h	Stunde
HBV	Hepatitis-B-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HPLC	“High Performance Liquid Chromography“
HS	Humanserum
H ₂ Odest.	destilliertes Wasser
hTERT	humane Telomerase Reverse Transkriptase
hu	human
iDZ	immature Dendritische Zelle
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMI	Institut für Molekulare Immunologie
IU	internationale Einheit (IU)
<i>ivt</i> RNS	<i>in vitro</i> transkribierte RNS
kb	Kilobasen
lat.	Lateinisch
LB	Luria Bertani
LE	lytische Einheit (LE)
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MACS	magnetischer Zellsortierer („magnetic activated cell sorting“)
MAGE	Melanom-Antigen-Gen

MART-1	„ <u>m</u> elanoma <u>a</u> ntigen <u>r</u> ecognized by <u>T</u> cells 1“
mDZ	mature Dendritische Zelle
MEM	modifiziertes Eagle-Medium
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („ <u>m</u> ajor <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> omplex“)
M-II-K	MHC-Klasse-II-reiches Kompartiment
Min.	Minute
mRNS	Boten-RNS („ <u>m</u> essenger RNA“)
NK-Zelle	natürliche Killer-Zelle
OD	optische Dichte
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes („ <u>p</u> eripheral <u>b</u> lood <u>m</u> ononuclear <u>c</u> ells“)
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung („ <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline“)
PCR	Polymerasekettenreaktion („ <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction“)
pDNS	Plasmid-DNS
PE	Phycoerythrin
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PI	Propidiumjodid
R	Rezeptor
RAG-1, -2	„ <u>r</u> ecombination- <u>a</u> ctivator <u>g</u> ene-1,-2“
RCC	„ <u>r</u> enal <u>c</u> ell <u>c</u> arcinoma“
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rRNS	ribosomale RNS
rpm	Umdrehungen pro Minute („ <u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute“)
RPMI 1640	Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
SAD	selektive Allodepletion
Sek.	Sekunde
Std.	Stunde
Strep	Streptomycin
SSC	Seitwärtsstreuung („ <u>s</u> ide <u>s</u> catter“)
ssDNS	Einzelstrang-DNS („ <u>s</u> ingle <u>s</u> trand DNA“)

SSO	Sequenz-spezifisches Oligonukleotid
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Taq	thermus aquaticus (Bakterium)
TAP	Transporterprotein („transporter associated with antigen processing“)
TdT	terminale Desoxynukleotidyltransferase
TE	Tris-EDTA-Puffer
Th	T-Helfer-Zelle
TIL	Tumor-infiltrierende T-Lymphozyten
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tz	zytotoxische T-Zelle
tRNS	Transfer-RNS
TZR	T-Zell-Rezeptor
ÜN	über Nacht
U	Einheit (Unit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
VLE	„very low endotoxin“
WT-1	Wilm`s Tumor 1
ZTL	zytotoxische T-Zelle

8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist im Verlauf der zurückliegenden drei Jahre kontinuierlich gewachsen und gereift. Und wie das nun mal zur Forschung gehört, stellten sich mir, kaum dass eine Frage beantwortet schien, sogleich mindestens drei neue. Viele Personen haben mir dabei geholfen, nicht zu verzagen, die richtigen Fragen zu stellen und Antworten zu finden. Ihnen allen gilt mein inniger Dank.

Herzlich danke ich Frau Prof. Chris Falk für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit an der Fakultät für Biologie der LMU München. Ungeachtet der gegebenen räumlichen Entfernung war sie jederzeit für mich erreichbar und stand mir mit ihrer fachlichen Kompetenz hilfreich zur Seite.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dolores Schendel. Sie hat die vorliegende Arbeit thematisch angeregt, mit ihrem stetigen Interesse begleitet und maßgeblich gefördert. Die vielen wissenschaftlichen Diskussionen mit ihr waren für mich sehr wertvoll und haben mich in der täglichen Arbeit motiviert und weiter gebracht. Ich freue mich schon jetzt auf die weiteren wissenschaftlichen Herausforderungen in ihrer Gruppe.

Bei Dr. Bernhard Frankenberger möchte ich mich für seine bereitwillige Unterstützung bei allen aufkommenden Fragen und Problemen sehr herzlich bedanken. Seine großes fachliches Wissen half mir stets weiter.

Dr. Christiane Geiger danke ich für die vielen hilfreichen Tipps und Vorschläge. Ihre experimentelle Erfahrung war mir sehr nützlich.

Ein Dankeschön geht an PD Dr. Elfriede Nössner und Prof. Ralph Mocikat, die immer die Zeit fanden, mir bei theoretischen oder praktischen Fragestellungen zu helfen.

Dr. Josef Mysliwietz danke ich herzlich für die Einführung in die Durchflusszytometrie und deren Auswertung. Bei sämtlichen Antikörper-Fragen konnte er mir mit seiner großen experimentellen Erfahrung stets weiterhelfen.

Dr. Angela Krackhardt, Ingrid Schuster und Anna Brandl möchte ich sehr für ihre wissenschaftliche Unterstützung allgemein und bei T-Zellklonierungen im Besonderen danken. Ebenso gilt Dr. Slavoljub Milosevic mein Dank für die Hilfestellungen bei Klonierungsfragen aller Art.

Am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der TU München danke ich Prof. Dirk Busch, Dr. Matthias Schiemann und Florian Anderl sehr für die Bereitstellung der Tetramer-Technologie und die Vermittlung ihres „Know-how“.

Für die bereitwillige Unterstützung bei einer Vielzahl von Experimenten und Zellkulturarbeiten gebührt Sabine Eichenlaub mein großer Dank. Adam Slusarski danke ich sehr für die Unterstützung bei TZR-Analysen und beim Einscannen unendlich vieler Seite. Silke Raffegerst, vielen Dank für die hilfreichen Korrekturen!

Monika Braun und Barbara Simm haben mir sowohl bei der HLA-Typisierung als auch beim Multiplex-Verfahren mit ihrer Erfahrung hilfreich zur Seite gestanden. Dafür gilt ihnen mein großer Dank.

Mein herzlicher Dank geht an Sylvia Donhauser, der „guten Fee“ des Instituts, die sich immer um alle administrativen Angelegenheiten kümmerte und auch sonst stets ein Auge auf das Wohl aller IMI-Mitstreiter hat.

Bei Henriette Bendz, PD Dr. Helga Bernhard, Christoph Brenner, Maja Bürdek, Dr. Kathleen Ebelt, Dr. Joachim Ellwart, Nadine Hömberg, Dr. Susan King, Dr. Susanne Krauss-Etschmann, Dr. Elisabeth Kremmer, Dr. Konrad Kronenberger, Dr. Berit Jungnickel, Dr. Carolin Lücking, Barbara Mosetter, Karin Nispel, Dr. Marcus Odendahl, Petra Skrablin, Stefani Spranger, Dominik ter Meer, Kristina Umbach, Anke Zobywalski und all denjenigen, die ich vielleicht vergessen habe zu nennen, möchte ich mich sehr für die Hilfe in allen Laborlebenslagen bedanken. Auch den Mitarbeitern vom LTI, Dr. Heike Pohla, Heidi Herbig, Birgit Stadlbauer und Dr. Alex Buchner, vielen Dank.

Ganz besonders möchte ich mich für die tolle Zeit und Atmosphäre in Raum 302 bei Sabine Eichenlaub, Miran Javorovic und Markus Schmid bedanken. Ihr habt für mich die drei Jahre unvergesslich gemacht, danke für eure Unterstützung!

Im Besonderen möchte ich mich auch bei allen Kollegen des IMIs bedanken, die ich noch nicht namentlich genannt habe und die dieses Institut zu etwas ganz Besonderem machen. Vielen Dank für eure Hilfe!!!

Ein lieber Dank geht an meine Eltern und Uli. Ihnen möchte ich für ihr reges Interesse, unzählige Aufmunterungen, wenn es mal nicht so lief, wie ich mir das vorgestellt habe, sowie für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen herzlich danken.

Ein letztes Dankeschön geht an eine ungenannte Vielzahl von Menschen, denen ich persönlich nie begegnet bin, die jedoch unsere Wissenschaft zu dem gemacht haben, was sie heute ist. Ohne ihr Wirken und ihre wissenschaftlichen Erfolge in den zurückliegenden Jahren und Jahrzehnten gäbe es kein Fundament, auf dem ich hätte aufbauen können.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Susanne Wilde
Geburtstag/-ort: 28. April 1979, Fürth
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildungsdaten

09/1985 – 07/1989 Grundsschulbesuch (Volksschule Westheim)
09/1989 – 07/1998 Naturwissenschaftliches Gymnasium
(Justus von Liebig Gymnasium Neusäß)

11/1998 – 10/2003 Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Fachrichtung Biologie
Hauptfach: Genetik,
Nebenfächer: Biochemie, Immunologie, Humangenetik)

2002 Tätigkeit als Studentische Hilfskraft
(Projekt: Adoptive Zelltherapie)

10/2003 Diplom (Diplom-Biologin)

11/2003 – 04/2004 Tätigkeit als Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für
molekulare Strahlenbiologie der GSF

06/2004 – 07/2007 Erstellung der vorliegenden Arbeit zur Promotion zum
Dr. rer. nat. an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Durchführung der Arbeit am Institut für Molekulare
Immunologie der GSF in München, Großhadern

Veröffentlichungen

Drexler, G. A., Wilde, S., Beisker, W., Ellwart, J., Eckardt-Schupp, F. und Fritz, E. (2004). The rate of extrachromosomal homologous recombination within a novel reporter plasmid is elevated in cells lacking functional ATM protein.

DNA Repair (Amst). **3(10)**: 1345-53.

Frankenberger, B., Regn, S., Geiger, C., Noessner, E., Falk, C. S., Pohla, H., Javorovic, M., Silberzahn, T., Wilde, S., Buchner, A., Siebels, M., Oberneder, R., Willimsky, G., Pezzutto, A., Blankenstein, T. und Schendel, D. J. (2005). Cell-based vaccines for renal cell carcinoma: genetically-engineered tumor cells and monocyte-derived dendritic cells.

World J Urol. **23(3)**: 166-174.

Javorovic, M., Wilde, S., Zobywalski, A., Noessner, E., Lennerz, V., Wölfel, T. und Schendel, D. S. Inhibitory Effect of RNA Pool Complexity on Stimulatory Capacity of RNA-Pulsed Dendritic Cells.

submitted/eingereicht

Patent

PCTEP2006007752 „Cells co-expressing allogeneic MHC molecules and antigens to induce peptide-specific T cells from non-selected allogeneic T cell repertoires”

pending/ anhängig am EPA

Erklärung

hiermit versichere ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Die Arbeit wird hiermit erstmalig einer Prüfungskommission vorgelegt. Diese Dissertation wurde von Frau Prof. Dr. Dolores J. Schendel am Institut für Molekulare Immunologie der GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit – betreut und wird von Frau PD. Dr. Christine S. Falk vor der Fakultät vertreten.

München, den 26.06.2007

(Susanne Wilde)

