

**Generierung WT1-spezifischer T-Zellen
und Selektion spezifischer T-Zellrezeptoren
mittels transgener Expression
in Jurkat-T-Zellen**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

**der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Angefertigt am
Institut für Molekulare Immunologie des Helmholtz Zentrum München
unter der Betreuung von Fr. Prof. Dr. Dolores Schendel

vorgelegt von
Maja Bürdek
München, Dezember 2009

ERSTGUTACHTER:

Fr. Prof. Dr. Elisabeth Weiß

ZWEITGUTACHTER:

Fr. PD Dr. Bettina Kempkes

Dissertation eingereicht am 08.12.2009

Mündliche Prüfung am 23.08.2010

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	3
1.1 Das Immunsystem	3
1.2 Tumorüberwachung und Tumorflucht	4
1.3 Avidität von T-Zellen für körpereigene Antigene	5
1.4 WT1 als tumorassoziiertes Antigen	6
1.5 Dendritische Zellen als APC	9
1.6 TCR-Signalweg	10
1.6.1 Die „Zwei-Signal-Theorie“ der T-Zellaktivierung	13
1.6.2 Kostimulation durch CD8	14
1.6.3 Expression von IL-2 und IL-2R α nach Aktivierung der T-Zelle	16
1.7 Zielsetzung der Arbeit	17
2 Material	19
2.1 Zellen	19
2.2 Antikörper	20
2.2.1 Primäre Antikörper	20
2.2.2 Sekundäre Antikörper	21
2.3 Peptide	21
2.4 Multimere	21
2.5 T-Zellrezeptoren	22
2.6 Oligonukleotide („Primer“)	22
2.6.1 Primer für Klonierungen	22
2.6.2 Primer für Sequenzierungen	22
2.6.3 TCR-V α -Primer	22
2.6.4 TCR-V β -Primer	23
2.7 Plasmide	24
2.8 <i>E.coli</i> -Stämme	25
2.9 Größenstandards	25
2.10 Enzyme und Chemikalien	26
2.11 Kommerzielle Analysesysteme	27
2.12 Verbrauchsmaterial	28
2.13 Geräte	28
2.14 Medien	30
2.14.1 Zellkulturmedien	30
2.14.2 <i>E.coli</i> -Medien	31
2.15 Allgemeine Puffer und Lösungen	31
2.16 Personen	31
3 Methoden	33
3.1 Kultivierung von Zelllinien	33
3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen	33

3.1.2	Bestimmung der Zellzahl	33
3.1.3	Einfrieren von Zellen	34
3.1.4	Auftauen von Zellen	34
3.1.5	Kultivierung adhärenter Zelllinien	34
3.1.6	Kultivierung von Suspensionszellen	35
3.1.7	Kultivierung von EBV-transformierten B-Zelllinien	35
3.1.8	Restimulation und Kultivierung des etablierten T-Zellklons A42	35
3.1.9	Generierung und Kultivierung Dendritischer Zellen	36
3.1.9.1	Isolierung von PBMC aus Frischblut	36
3.1.9.2	Ansetzen von DC aus einem Leukaphereseprodukt	36
3.1.9.3	Generierung von DC	37
3.1.9.3.1	Generierung von iDC und mDC nach dem 7-Tages-Protokoll (7d DC)	37
3.1.9.3.2	Generierung von iDC und mDC nach dem 3-Tages-Protokoll (3d DC)	37
3.1.10	„Semi-allogene“ De-novo-Induktion naiver T-Zellen mit <i>ivt</i> RNS-transfizierten DC	37
3.1.11	Kultivierung von peptidspezifischen T-Zellen	38
3.1.12	Kultivierung von J76-Klonen	38
3.2	Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	39
3.2.1	Kulivierung von <i>E. coli</i>	39
3.2.2	Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNS mittels Elektroporation	39
3.2.3	Chemische Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNS mittels Hitze-Schock	39
3.2.4	Selektion und Expansion transformierter Bakterien	40
3.2.5	Einfrieren transformierter Bakterien	40
3.3	Molekularbiologische Arbeiten	40
3.3.1	Plasmid-DNS-Extraktion aus transformierten Bakterien	40
3.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
3.3.3	Analyse des TCR-V α β -Repertoires	41
3.3.4	Restriktionsverdau von DNS	42
3.3.5	DNS-Präzipitation	42
3.3.6	Dephosphorylierung linearer DNS-Fragmente	42
3.3.7	Ligation von DNS-Fragmenten	43
3.3.8	Agarose-Gelelektrophorese von DNS	43
3.3.9	Gel-Extraktion	43
3.3.10	Sequenzierung	43
3.3.11	Herstellung von Expressionskonstrukten für die Generierung von <i>ivt</i> RNS	43
3.3.11.1	Herstellung der pGEM4Z-100A-TCR-Expressionskonstrukte	44
3.3.11.2	Herstellung des Expressionskonstrukts pCDNA3.1/Hygro-CD8 α	44
3.3.11.3	Klonierung der TCR α - und TCR β -Ketten von TyrF8 CTL	45
3.3.12	Isolierung von zellulärer Gesamt-RNS	45
3.3.13	cDNS-Synthese mittels Reverser Transkription	46
3.3.14	Produktion von Einzel-Spezies- <i>ivt</i> RNS	46
3.3.15	Aufreinigung der <i>ivt</i> RNS	47
3.3.16	Konzentrationsbestimmung von RNS/DNS	47
3.3.17	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNS	47
3.3.18	RNS-Transfektion von Zellen mittels Elektroporation	48
3.4	Durchflusszytometrie	49
3.4.1	Färbung von Oberflächenmolekülen	49
3.4.2	Multimerfärbung und -sortierung	50
3.4.3	Färbung von intrazellulären Proteinen	50
3.4.4	Färbung von intrazellulärem IL-2	51
3.4.5	Magnetische Separation verschiedener Zellpopulationen	51
3.4.5.1	CD8 ⁺ T-Zell-Isolierung mittels negativer Depletion	52
3.4.5.2	Anreicherung IL-2 ⁺ Jurkat-Zellen mittels positiver Separation	52

3.5	Funktionsanalysen	53
3.5.1	Peptidbeladung von T2-Zellen	53
3.5.2	Inkubation von DC mit langem Melan-A-Peptid (p70)	53
3.5.3	Stimulation von Jurkat-Zellen mit PMA/Ionomycin	54
3.5.4	DC-Migrations-Analyse	54
3.5.5	Spezifische Stimulation von T-Zellen	54
3.5.6	IFN γ -ELISA	55
3.5.7	IL-2-ELISA	56
3.5.8	⁵¹ Chrom-Freisetzungs-Versuch	56
3.6	Computeranalysen	56
3.6.1	CellQuestPro TM und FloJo TM	56
3.6.2	Clone Manager 5 TM	56
4	Ergebnisse	57
4.1	De-novo-Induktion von HLA-A2-restringierten, WT1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen	57
4.1.1	Prinzip der „semi-allogenen“ De-novo-Induktion von HLA-A2-restringierten, WT1-spezifischen T-Zellen	58
4.1.2	Proteinexpression nach Elektroporation von <i>ivtRNS</i> in DC und PBMC	60
4.1.3	Anreicherung der HLA-A2-restringierten, WT1-spezifischen T-Zellen während der De-novo-Induktion	62
4.1.4	Sortierung und Klonierung der WT1-spezifischen T-Zellen	63
4.1.5	Spezifität der sortierten T-Zelllinie	64
4.1.6	TCR-Repertoire-Analyse der sortierten T-Zelllinie	65
4.2	Vergleich von 3d DC und 7d DC	68
4.2.1	Generierung von 3d DC und 7d DC	68
4.2.2	Vergleich der 3d DC und 7d DC hinsichtlich Antigenaufnahme, -prozessierung und -präsentation sowie Stimulation von peptidspezifischen Gedächtnis-T-Zellen im „Melan-A-System“	69
4.2.3	Phänotyp von DC	72
4.2.3.1	Morphologie und Größe von 3d DC und 7d DC	72
4.2.3.2	Oberflächenmarker von 3d DC und 7d DC	73
4.2.3.2.1	Unreife DC (iDC)	73
4.2.3.2.2	Reife DC (mDC)	75
4.2.3.2.3	Phänotyp von 3d DC vor und nach Elektroporation	76
4.2.3.3	Erkennung von Melan-A-Peptid/MHC-Molekülen auf DC durch A42 CTL	77
4.2.4	Peptidaufnahme und -präsentation in DC	79
4.2.4.1	Makropinozytose von FITC-Dextran	79
4.2.4.2	Elektroporation von DC mit langem Melan-A-Peptid (p70)	80
4.2.4.3	Makropinozytose von langem Melan-A-Petid (p70)	81
4.2.5	Elektroporation von DC mit Melan-A- <i>ivtRNS</i>	83
4.2.5.1	Kinetik der Melan-A-Expression nach Elektroporation von <i>ivtRNS</i>	83
4.2.5.2	Proteinexpression nach Elektroporation von <i>ivtRNS</i> und stimulatorische Kapazität von 3d DC und 7d DC auf A42 CTL	85
4.2.5.2.1	Elektroporation gleicher Mengen <i>ivtRNS</i> in DC	85
4.2.5.2.2	Elektroporation unterschiedlicher Mengen <i>ivtRNS</i> in DC	87
4.2.5.3	Optimierung der Elektroporationsbedingungen für 3d DC	88
4.2.5.3.1	eGFP-Expression in DC nach Elektroporation von <i>ivtRNS</i> mit unterschiedlichen Elektroporationsbedingungen	88
4.2.5.3.2	Proteinexpression nach <i>ivtRNS</i> -Transfer unter optimierten Elektroporationsbedingungen	89
4.2.6	Migration von DC	91
4.3	Etablierung eines Testsystems für TCR-Spezifität in Jurkat-76-Zellen	93
4.3.1	Prinzip des TCR-Test-Systems mit Jurkat-76-Zellen	94
4.3.2	Charakterisierung verschiedener Jurkat-T-Zelllinien	95

4.3.2.1	Phänotyp verschiedener Jurkat-T-Zelllinien	95
4.3.2.2	CD25-Expression auf Jurkat-Zellen nach Stimulation des TCR	97
4.3.2.3	IL-2-Sekretion verschiedener Jurkat-Zellen nach Stimulation	99
4.3.2.3.1	Unspezifische Stimulation von Jurkat-Zellen	99
4.3.2.3.2	Spezifische TCR-Stimulation von Jurkat-Zellen	101
4.3.2.3.3	Gibt es einen synergistischen Effekt von PMA auf die IL-2-Sekretion nach Stimulation über den TCR?	102
4.3.3	Klonierung von IL-2 ⁺ Jurkat-Zellen	104
4.3.3.1	Anreicherung von IL-2 ⁺ Jurkat-Zellen	104
4.3.3.2	Stimulation und Charakterisierung von IL-2 ⁺ Jurkat-76-Klonen	105
4.3.4	Expression und Spezifitätsbestimmung definierter TCR-Ketten in J76-IVB10	107
4.3.4.1	CD8-unabhängige und CD8-abhängige TCR	107
4.3.4.2	Stimulation von stabilen T58-TCR-transgenen J76-CD8-Zellen und transient T58-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen	112
4.3.4.3	Verbesserte CD25-Expression und IL-2-Sekretion von J76-IVB10-Zellen durch Kostimulation über B7-Moleküle	116
4.3.4.4	Generierung von CD8-positiven J76-IVB10	117
4.3.4.4.1	Transiente Koexpression von CD3 und CD8 in J76-IVB10	117
4.3.4.4.2	Quantitativer Nachweis der TCR-Affinität	119
4.3.4.5	Analyse der V α 19/V β 5.2-(„WT1“-TCR)-Spezifität	127
5	Diskussion	132
5.1	De-novo-Induktion HLA-A2-restringierter, WT1-spezifischer CD8⁺ T-Zellen	132
5.2	Fähigkeit von 3d DC zur Peptidprozessierung bzw. -präsentation und Stimulation von T-Zellen	137
5.3	Entwicklung eines Testsystems für TCR-Spezifität in Jurkat-Zellen	141
5.3.1	Heterogenität verschiedener J76-Transduktanten	142
5.3.2	Nachweis von TCR-Spezifität in J76-IVB10-Zellen	144
5.3.3	Kostimulation durch CD8	147
5.3.4	Analyse der Spezifität des V α 19/V β 5.2-TCR	149
5.3.5	Mögliches Problem des Jurkat-Systems und Ausblick	151
6	Literaturverzeichnis	153
7	Abkürzungen	164
	Erklärung	167
	Curriculum Vitae	168
	Danksagung	170

ZUSAMMENFASSUNG

Der T-Zellrezeptor-Gentransfer ist eine vielversprechende Methode zur Gewinnung antigenspezifischer T-Zellen für eine adoptive T-Zelltherapie bei Tumorpatienten. Die Identifikation geeigneter, tumorspezifischer T-Zellrezeptoren stellt daher ein wichtiges Forschungsfeld dar. Ein Ziel dieser Dissertation war die Generierung allorestingierter, Wilm's Tumor Antigen 1 (WT1)-spezifischer, zytotoxischer T-Lymphozyten in einem HLA-A2-restringierten System. HLA-A2-negative, CD8-positive T-Zellen wurden mit in drei Tagen generierten, autologen dendritischen Zellen (3d DC) und autologen mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC), die mit WT1- und HLA-A2-*in-vitro*-transkribierter-(*ivt*)RNS transient transfiziert worden waren, stimuliert. Nach drei Stimulationsrunden wurden HLA-A2-restringierte, WT1-spezifische T-Zellen mit spezifischen Multimeren sortiert.

Es zeigte sich, dass 3d DC bei der De-novo-Induktion von naiven T-Zellen im Vergleich zu in sieben Tagen ausgereiften dendritischen Zellen (7d DC), die in früheren Versuchen in unserem Labor verwendet wurden, weniger effizient waren. Um die unterschiedliche Stimulationsfähigkeit der beiden DC-Populationen genauer analysieren zu können, wurden 3d DC und 7d DC im Hinblick auf Antigenaufnahme, Antigenpräsentation und Stimulation antigenspezifischer T-Zellen charakterisiert. 3d DC zeigten vergleichbare Fähigkeiten bei der Aufnahme und Präsentation von Peptid, ebenso wie bei der anschließenden Stimulation von Gedächtnis-T-Zellen. Eine optimale Proteinexpression in 3d DC nach Elektroporation mit *ivt*RNS konnte jedoch erst nach Modifikation der für die 7d DC etablierten Standardbedingungen erreicht werden. Erst nach Transfektion der 3d DC mit *ivt*RNS unter optimierten Bedingungen zeigten diese eine mit 7d DC vergleichbare Proteinexpression und eine vergleichbare stimulatorische Fähigkeit auf T-Zellen.

Trotz der geringen Ausbeute an HLA-A2-restringierten, WT1-spezifischen T-Zellen nach der De-novo-Induktion mit 3d DC, konnte eine T-Zelllinie generiert werden, die in der Lage war, WT1⁺/HLA-A2⁺ Tumorzellen zu erkennen und zu lysieren. Diese Fähigkeit der T-Zelllinie ging aber nach mehreren unspezifischen Restimulationen verloren, da unspezifische T-Zellen die WT1-spezifischen T-Zellen vermutlich überwuchsen. Es konnten mehrere T-Zellrezeptor-(TCR)-Repertoire-Analysen sowohl zum Zeitpunkt, als die T-Zelllinie noch spezifische zytotoxische Aktivität zeigte, als auch zu einem späteren Zeitpunkt, als diese zytotoxische Aktivität nicht mehr detektierbar war, durchgeführt werden. Durch Vergleich dieser verschiedenen T-Zellrezeptor-Analysen konnten die TCR-V α 19-Kette und die TCR-V β 5.2- und -V β 13.2-Ketten als potenzielle WT1-spezifische TCR-Ketten identifiziert werden. Diese

TCR-V α - und TCR-V β -Ketten wurden in T7-Vektoren kloniert, und nachfolgend die, den Ketten entsprechende, *ivt*RNS hergestellt.

Zur Analyse der Spezifität dieser TCR-V α - und TCR-V β -Ketten wurde in dieser Dissertation ein neues TCR-Testsystem in TCR-defizienten Jurkat-T-Zellen (J76) etabliert. Dazu wurde aus einer J76-Gesamtpopulation der Jurkat-76-Klon IVB10 isoliert, der nach unspezifischer Stimulation mit PMA und Ionomycin in der Lage war, größere Mengen an IL-2 zu sezernieren und CD25 (IL-2R α) verstärkt zu exprimieren. Zur Validierung dieses Testsystems wurden verschiedene TCR mit definierter Spezifität mittels Elektroporation von *ivt*RNS transient in J76-IVB10 zur Expression gebracht. Zur Analyse ihrer Spezifität und Funktionalität wurden die TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen mit antigenpräsentierenden Tumorzellen oder peptid-beladenen T2-Zellen koinkubiert. Eine antigenspezifische Stimulation CD8-unabhängiger TCR führte zur Sekretion von IL-2 und zu einer erhöhten Expression von CD25 in J76-IVB10-Zellen. Der vermutlich CD8-abhängige TyrF8-TCR konnte jedoch nach spezifischer Stimulation in J76-IVB10-Zellen weder eine IL-2-Sekretion noch eine Hochregulation von CD25 induzieren. Um die Spezifität von CD8-abhängigen TCR in diesem TCR-Testsystem besser untersuchen zu können, wurden durch Transfektion eines CD8 α -Konstruktes J76-IVB10-Zellen generiert, die das CD8 α / α -Homodimer transient auf ihrer Oberfläche exprimierten. Für CD8-positive, T58-TCR-transgene J76-IVB10-Zellen konnte beobachtet werden, dass sie eine höhere IL-2-Sekretion nach Stimulation mit Peptid zeigten als T58-TCR-transgene J76-IVB10 ohne CD8-Expression.

Im weiteren Verlauf wurde ein potenziell WT1-spezifischer TCR in dem hier etablierten TCR-Testsystem näher analysiert. Die TCR-Ketten V α 19 und V β 5.2 aus der De-novo-Induktion zeigten eine stabile Paarung und konnten zusammen mit endogenem CD3 auf J76-IVB10 exprimiert werden. Der V α 19/V β 5.2-TCR konnte jedoch nach Stimulation mit WT1-Peptid auch in CD8-transgenen J76-IVB10 keine IL-2-Sekretion induzieren. Ähnliches wurde für den Tyrosinase-spezifischen TCR TyrF8 beobachtet, was darauf hinwies, dass für einige TCR eine Stimulation in TCR-transgenen, CD8 α / α -exprimierenden J76-IVB10-Zellen zu keiner detektierbaren Signalweiterleitung führte. Für eine weitere Optimierung des J76-IVB10-Systems und eine Analyse der Spezifität des möglicherweise WT1-spezifischen TCR könnten die Zellen mit einem heterodimeren CD8 α / β -Molekül transfiziert werden. Wie in der Literatur beschrieben wird, besitzt ein CD8 α / β -Heterodimer möglicherweise eine größere stimulatorische Kapazität auf gewisse TCR als ein CD8 α / α -Homodimer.

1 EINLEITUNG

1.1 DAS IMMUNSYSTEM

Das Immunsystem ist das System des Körpers, das Pathogene, wie Bakterien, Viren oder Pilze, erkennen und abwehren kann, sobald diese Pathogene durch die Oberflächenepithelien des Körpers gedrungen sind.

Zunächst treffen Pathogene auf Zellen der **angeborenen Immunität**, wie phagozytierende Makrophagen, die eine sehr schnelle Immunreaktion vermitteln und dadurch eine erste Verteidigungslinie des Immunsystems darstellen. Die Makrophagen erkennen Bakterien mithilfe von Oberflächenmolekülen, die Bestandteile auf der bakteriellen Oberfläche binden können und die Makrophagen dadurch dazu veranlassen, das Bakterium aufzunehmen. Makrophagen sezernieren als Reaktion auf bakterielle Bestandteile Zytokine und Chemokine, wodurch verschiedene Zellen, wie neutrophile Zellen und Monozyten, aus dem Blut an den Entzündungsherd gelockt werden. Ein anderer Mechanismus der angeborenen Immunität ist die Aktivierung des so genannten Komplementsystems, mit dessen Hilfe Oberflächen von Mikroorganismen mit Fragmenten bedeckt werden, wodurch diese von Makrophagen erkannt und phagozytiert werden. Außerdem setzt die Komplementkaskade auch kleine Peptide frei, die zur Entzündung beitragen. Circa vier bis sechs Tage nach einer Infektion setzt die **adaptive Immunität** ein, die ausgelöst wird, sobald eine unreife dendritische Zelle (iDC) ein Pathogen aufgenommen hat. iDC wandern unablässig durch die peripheren Gewebe und nehmen extrazelluläre Partikel, wie Bakterien oder Viruspartikel durch den rezeptorunabhängigen Prozess der Makropinozytose auf. Nach Aufnahme eines Pathogens werden die iDC aktiviert und entwickeln sich zu reifen dendritischen Zellen (mDC), die zu den peripheren lymphatischen Geweben, wie Lymphknoten und Milz, wandern und dort als so genannte „professionelle“ antigenpräsentierende Zellen (engl.: antigen presenting cell, APC) spezifische Lymphozyten für das jeweilige Pathogen aktivieren können. Antigene werden nach Aufnahme in den DC prozessiert und in Form von Peptiden auf MHC-Molekülen (engl.: major histocompatibility complex) präsentiert. Die adaptive Immunität besitzt zwei Arten von Lymphozyten, die unterschiedliche Pathogene erkennen können: B-Zellen produzieren lösliche Immunglobuline (Ig), die direkt an Pathogene binden können, wodurch die so genannte **humorale Immunität** gewährleistet wird, und T-Zellen, die Antigene (z.B. virale Peptide) durch ihren T-Zellrezeptor auf MHC-Molekülen der Körperzellen erkennen, was als **zellvermittelte Immunität** bezeichnet wird. Naïve B- und T-Zellen, also Zellen, die noch nicht auf ihr spezifisches Antigen getroffen sind, zirkulieren durch die lymphatischen Gefäße und werden aktiviert, sobald sie ihr jeweiliges Antigen in

Milz oder Lymphknoten entdecken. Nachdem naive T- oder B-Lymphozyten auf ihr spezifisches Antigen getroffen sind, proliferieren sie und entwickeln sich zu Effektorzellen, die aus den lymphatischen Organen zurück ins Blut wandern und dort Pathogene bzw. Zielzellen, die entsprechende Antigene präsentieren, erkennen und eliminieren können.

Nach Verschwinden des Antigens durchlaufen die meisten antigenspezifischen Zellen den programmierten Zelltod (Apoptose). Einige Zellen, so genannte **Gedächtniszellen** überleben jedoch und bilden die Grundlage für das **immunologische Gedächtnis**. Das immunologische Gedächtnis ermöglicht eine sehr schnelle und effiziente Immunreaktion nach einer erneuten Infektion mit demselben Pathogen und führt dadurch zu einer dauerhaften Immunität.

1.2 TUMORÜBERWACHUNG UND TUMORFLUCHT

Burnet und Thomas stellten die Hypothese der **Tumorüberwachung** (engl.: Immunosurveillance) auf, die besagt, dass Immunzellen Tumorzellen erkennen und eliminieren können (Burnet, 1970). Verschiedene Studien, in denen beobachtet wurde, dass immunsupprimierte Personen, wie etwa Patienten nach einer Transplantation oder Personen mit Immundefizienzen, anfälliger für die Entwicklung von Tumoren waren, unterstützten diese Hypothese (Penn, 1999). Es wurde beschrieben, dass bei Personen, die ein Nierentransplantat erhalten hatten, das Risiko, einen Tumor zu entwickeln, deutlich höher war als bei gesunden Personen (Birkeland et al., 1995). Tumore können aufgrund der Expression spezieller, tumorassoziierter Antigene (TAA) von T-Zellen erkannt werden (van der Bruggen et al., 1991). TAA sind z.B. tumorspezifische Antigene, wie Onkogene oder Tumorsuppressorgene, oder gewebespezifische Antigene, die während der Entwicklung exprimiert werden.

Trotz dieser möglichen Erkennung eines Tumors durch T-Lymphozyten, können viele Tumore dem Immunsystem entkommen und über Gewebegrenzen hinaus unkontrolliert wachsen. Verantwortlich für diese so genannte **Tumorflucht** (engl.: tumor escape) sind verschiedene Charakteristika, die Tumore aufweisen, um eine Erkennung durch das Immunsystem zu unterbinden.

Tumore zeichnen sich durch eine hohe genetische Instabilität aus. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass ein durchschnittlicher Tumor mehr als 1×10^4 Mutationen enthält (Stoler et al., 1999). Einige dieser mutierten Zellen können überleben, da sie genetische Eigenschaften besitzen, die ihnen einen Selektionsvorteil in ihrer jeweiligen Umgebung verschaffen und eine Erkennung durch Lymphozyten verhindern können.

Mögliche Mechanismen dem Immunsystem zu entkommen, sind unter anderem die Herunterregulierung von MHC-Klasse-I-Molekülen, der Verlust von TAA oder

kostimulatorischen Molekülen, die Sekretion immunsupprimierender Zytokine und die Präsentation veränderter Peptidliganden (Khong und Restifo, 2002).

Bei der Tumorummunüberwachung können drei verschiedene Phasen unterschieden werden (Dunn et al., 2002). Zunächst werden Tumorzellen von Immunzellen erkannt und eliminiert („Eliminierungsphase“). Die zweite Phase beginnt, sobald einige Tumorzellen vom Immunsystem nicht eliminiert werden können. Es stellt sich zunächst ein Gleichgewicht („Äquilibrium“) zwischen dem Immunsystem und den Tumorzellen ein. Das Äquilibrium ist vermutlich die längste der drei Phasen und kann über Jahre hinweg andauern. In der dritten Phase können die Tumorzellen dem Immunsystem entkommen und der Tumor beginnt unkontrolliert zu wachsen („Tumorflucht“). In diesem Stadium wird der Tumor klinisch sichtbar.

1.3 AVIDITÄT VON T-ZELLEN FÜR KÖRPEREIGENE ANTIGENE

Hoch-avide T-Zellen, also T-Zellen, die schon geringe Konzentrationen an MHC/Peptid-Molekülen auf Zielzellen erkennen können, stellen ein attraktives Mittel zur Bekämpfung von Tumoren dar. Unter **Affinität** eines TCR versteht man dessen Bindungsstärke für seinen jeweiligen MHC/Peptid-Liganden. Da die Dichte der TCR auf einer T-Zelle die Bindungsstärke ebenfalls beeinflusst, spricht man von der **Avidität** einer T-Zelle, also der Summe der einzelnen TCR-Affinitäten.

Bei der Gewinnung hoch-avider, tumorantigenspezifischer T-Zellen steht man jedoch vor dem Problem, dass die TAA häufig überexprimierte, körpereigene Antigene darstellen. Hoch-avide T-Zellen für körpereigene („Selbst“-)Antigene werden während der T-Zellentwicklung durch den Prozess der negativen Selektion im Thymus eliminiert, um autoimmune Effekte dieser T-Zellen zu verhindern (Colella et al., 2000; Theobald et al., 1997). Nur niedrig-avide T-Zellen für „Selbst“-Antigene entwickeln sich weiter und können aus dem Blut isoliert werden. Niedrig-avide T-Zellen sind jedoch meist nicht in der Lage, eine geringe Anzahl an MHC/Peptid-Molekülen auf Tumorzellen zu erkennen und somit vermutlich nicht von Nutzen für eine Tumorthherapie.

Eine elegante Methode, um hoch-avide, TAA-spezifische T-Zellen *in vitro* zu generieren, ist die „semi-allogene“ De-novo-Induktion (Wilde et al., 2009). Diese stützt sich auf die Tatsache, dass einige alloreaktive T-Zellen, also Zellen, die „Fremd-MHC“-Moleküle erkennen können, den Prozess der positiven Selektion im Thymus durch Kreuzreaktivität zu „Selbst-MHC“-Molekülen überstehen können. Alloreaktive T-Zellen spielen bei der Transplantatabstoßung und der „Spender-gegen-Empfänger“-Krankheit (engl.: „graft-versus-host-disease“, GVHD) eine Rolle (Klein, 1986). Ein Teil der alloreaktiven T-Zellen erkennt Fremd-MHC-Moleküle unabhängig vom präsentierten Peptid, ein anderer Teil in einer

peptidabhängigen Art und Weise (Sherman und Chattopadhyay, 1993). Da die negative Selektion von T-Zellen Selbst-MHC-restringiert ist, stellen die alloreaktiven T-Zellen eine geeignete Quelle dar, um an hoch-avide, tumorantigenspezifische T-Zellen zu gelangen. Stauss und Kollegen konnten auf diese Weise mittels peptidbeladener T2-Zellen WT1-spezifische T-Zellen mit hoch-affinen TCR selektieren (Gao et al., 1999). In unserem Labor konnten bereits sehr erfolgreich spezifische, hoch-avide T-Zellen für das Antigen Tyrosinase mithilfe eines „semi-allogenen“ Stimulationsansatzes generiert werden (Wilde et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit sollten HLA-A2-restringierte, WT1-spezifische T-Zellen generiert werden. Dazu wurden CD8⁺ T-Zellen eines HLA-A2-negativen Spenders mit 3d DC (in drei Tagen generierte DC) bzw. PBMC eines HLA-A2-negativen Spenders stimuliert. Die DC bzw. PBMC wurden vor den Stimulationen mit HLA-A2-*ivt*RNS und WT1-*ivt*RNS (TAA-*ivt*RNS) elektroporiert, worauf sie in der Lage waren, verschiedene WT1-Epitope über HLA-A2-Moleküle zu präsentieren. Bisher wurden zwei immunogene Epitope von WT1, die auf HLA-A2-Molekülen präsentiert werden, näher beschrieben (Bellantuono et al., 2002). Mithilfe dieser Methode wurden T-Zellen induziert, die entweder alloreaktiv waren, also nur das Fremd-MHC-Molekül HLA-A2 in einer peptidunabhängigen Art und Weise erkannten, oder aber T-Zellen, die allorestringiert und WT1-spezifisch waren (Elliott und Eisen, 1990; Rotzschke et al., 1991). Mithilfe von HLA-A2/WT1₁₂₆₋₁₃₄-Multimeren wurden WT1₁₂₆₋₁₃₄-Peptid-spezifische, aber auch alloreaktive T-Zellen aus der Kokultur isoliert.

Die Generierung hoch-avider, TAA-spezifischer T-Zellen *ex vivo* könnte zwei verschiedene klinische Anwendungen ermöglichen. Einerseits könnten die TAA-spezifischen T-Zellen expandiert und für einen adoptiven Transfer in Patienten verwendet werden. Dieser Ansatz ist jedoch nur in Patienten möglich, die schon eine Knochenmarkstransplantation erhalten haben und somit eine geeignete Umgebung für die allorestringierten Zellen bieten können. Eine andere Möglichkeit wäre der Transfer der TCR-Sequenzen in autologe PBMC, wodurch TCR-transgene T-Zellen entstehen, die antigenexprimierende Tumorzellen eines Patienten eliminieren können. Dieser Ansatz ist breiter anwendbar, da er auch bei Patienten, die keine Knochenmarkstransplantation erhalten haben, von Nutzen ist.

1.4 WT1 ALS TUMORASSOZIIERTES ANTIGEN

WT1 wurde zunächst als Tumorsuppressorgen beschrieben, das bei der Entwicklung des Wilm's Tumor, oder Nephroblastom, bei Kindern eine Rolle spielt. In circa 15 % aller Wilm's Tumore können Mutationen im *WT1*-Gen gefunden werden (Hastie, 1994). Neben der Rolle als Tumorsuppressorgen kann *WT1* auch als Onkogen fungieren. Eine Überexpression von WT1 kann sowohl in vielen soliden Tumoren als auch in den meisten Leukämieformen

detektiert werden, wobei der Grad der Überexpression mit einer schlechteren Prognose korreliert (Bergmann et al., 1997).

WT1 ist ein Transkriptionsfaktor, der eine essenzielle Rolle während der embryonalen Entwicklung spielt. In adulten Geweben wird WT1 jedoch nur noch von wenigen Zelltypen, wie z.B. myoepithelialen Vorläuferzellen und hämatopoetischen Stammzellen, in geringem Maße exprimiert (Huang et al., 1990; Maurer et al., 1997). WT1 kann die Transkription verschiedener Gene, wie z.B. *TGFβ* (transforming growth factor β) und *Egr-1* (early growth response protein 1), regulieren und spielt eine Rolle bei der post-transkriptionalen Prozessierung von RNS (Scharnhorst et al., 2001).

Die schematische Darstellung des WT1-Proteins und seiner Domänen ist in Abb. 1.1 zu sehen.

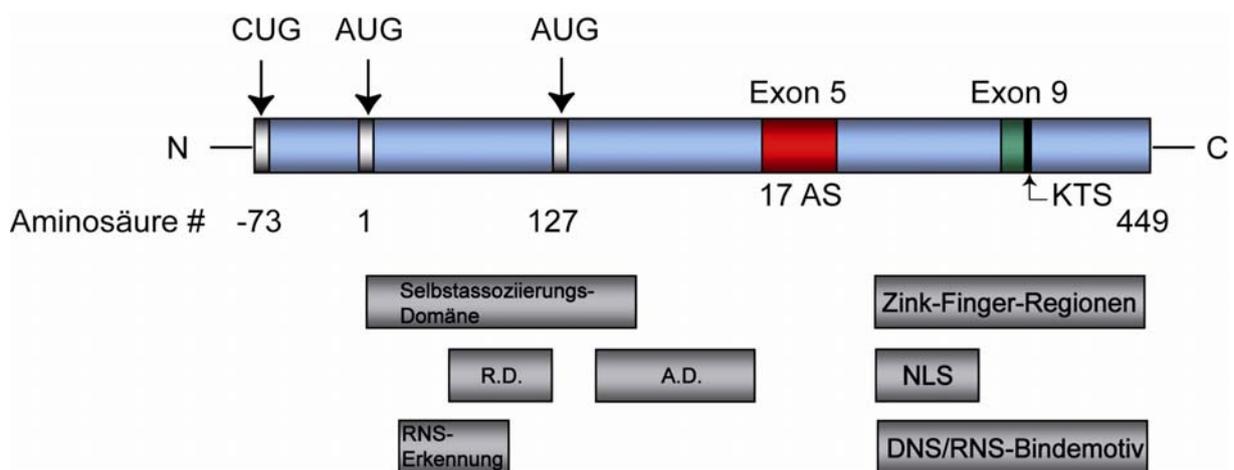


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des WT1-Proteins (nach Scharnhorst et al., 2001). Das WT1-Protein besteht aus zehn Exons, von denen Exon 5 (17 AS) und drei Aminosäuren innerhalb von Exon 9 (KTS-Sequenz) alternativ gespleißt werden können. Durch Translation vom CUG-Start werden größere Formen des Proteins gebildet, durch Translation von einem internen AUG-Start kleinere Formen. AS = Aminosäure. R.D. = Repressionsdomäne. A.D. = Aktivierungsdomäne. NLS = Zellkern-lokalisierungssignal. N = N-Terminus. C = C-Terminus.

WT1 wird aus 10 Exons zusammengesetzt und kommt in einer Vielzahl verschiedener Isoformen vor, die durch alternatives Spleißen, alternative Translations-Initiationsstellen und den Prozess des so genannten „RNS-Editing“ entstehen (Wagner et al., 2003). Am meisten ist bisher über die alternativen Spleiß-Isoformen bekannt. In der WT1-Sequenz existieren zwei Exons, die alternativ gespleißt werden können: Exon 5 und Exon 9. Exon 5 kodiert für 17 Aminosäuren (17 AS), die alternativ gespleißt werden können. Innerhalb von Exon 9 befinden sich zwei Spleißstellen, wodurch drei Aminosäuren, die so genannte KTS-Sequenz, am Ende des Exons herausgespleißt werden können. Zusätzlich zu diesen Spleiß-Varianten gibt es längere WT1-Isoformen mit einer molekularen Masse von 60-62 kDa, die durch einen alternativen Translations-Initiations-Start (CUG), der stromaufwärts des Initiator-AUG-Starts lokalisiert ist, entstehen (Bruening und Pelletier, 1996). Eine interne Translations-Initiation an

einem AUG-Kodon an Aminosäureposition 127 führt zu kleineren WT1-Isoformen mit einer molekularen Masse von 36-38 kDa (Scharnhorst et al., 1999). Weitere Formen von WT1 können durch „RNS-Editing“ an Nukleotid 839 der WT1-mRNS gebildet werden. Bei diesem Prozess wird ein Leuzin an Position 280 im WT1-Protein durch ein Prolin ersetzt (Sharma et al., 1994). Insgesamt können so über 24 verschiedene Isoformen von WT1 gebildet werden, was zu einem enormen Potenzial des WT1-Proteins führt. Alle vier Hauptformen von WT1, die durch alternatives Spleißen entstehen, werden in soliden Tumoren und Leukämien exprimiert und spielen unterschiedliche Rollen während der Tumorgenese (Ito et al., 2006; Ueda et al., 2003). Für die Herstellung von WT1-*ivt*RNS für die De-novo-Induktion in dieser Arbeit wurde cDNS der WT1-Isoform A (kein 17AS, kein KTS) verwendet, die den alternativen CUG-Translationsstart aufweist. Diese Isoform beinhaltet sämtliche Epitope, die in allen vier Haupt-Isoformen von WT1 vorkommen. Durch Verwendung dieser Spleißvariante sollte verhindert werden, dass bei der De-novo-Induktion T-Zellen induziert werden, die ein Epitop erkennen, das in nur einer speziellen WT1-Isoform vorkommt.

Das WT1-Protein enthält eine Prolin- und Glutamin-reiche Region, die die transkriptionelle Regulation steuert, und mehrere Zink-Finger-Regionen an seinem C-Terminus, durch die das Protein an verschiedenen DNS-Sequenzen binden kann (Bickmore et al., 1992; Gessler et al., 1990). Innerhalb der Zink-Finger-Motive befinden sich zwei Kernlokalisierungssignale (engl.: nuclear localisation signal, NLS), mit deren Hilfe das WT1-Protein in den Nukleus transportiert wird (Bruening et al., 1996). Außerdem konnten durch strukturelle Analysen mögliche RNS-Erkennungsstellen am N-Terminus von WT1 identifiziert werden (Kennedy et al., 1996).

Da WT1 in vielen Tumoren überexprimiert und in adulten Geweben nur von einigen wenigen Zelltypen in geringem Maße exprimiert wird, stellt dieses TAA ein interessantes Zielantigen für Tumorimmuntherapien dar. Es konnte bereits *in vitro* gezeigt werden, dass WT1-spezifische T-Zellen in der Lage sind, leukämische CD34⁺ Stammzellen zu lysieren. Normale CD34⁺ Zellen blieben aber wegen der viel geringeren WT1-Expression verschont (Gao et al., 2000). Außer dem häufig verwendeten HLA-A2-restringierten WT1₁₂₆₋₁₃₄-Peptid (RMFPNAPYL) konnte bereits ein weiteres immunogenes WT1-Peptid beschrieben werden, das auf HLA-A2-Molekülen präsentiert wird (WT1₂₃₅₋₂₄₃-Peptid: CMTWNQMNL). CTL, spezifisch für diese beiden Epitope, waren in der Lage, CD34⁺ Stammzellen von Leukämiepatienten *in vitro* zu erkennen und zu lysieren (Bellantuono et al., 2002).

1.5 DENDRITISCHE ZELLEN ALS APC

In der in dieser Arbeit durchgeführten „semi-allogenen“ De-novo-Induktion naiver T-Zellen wurden dendritische Zellen für die Primärstimulation verwendet. Dendritische Zellen stellen die potentesten APC für die Stimulation naiver T-Zellen dar (Banchereau und Steinman, 1998). Im unreifen Zustand zirkulieren sie durch periphere Gewebe und nehmen Antigene aller Art über spezifische Rezeptoren oder durch Mechanismen wie Makropinozytose, Phagozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose auf. iDC spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der Toleranzinduktion in T-Zellen (Mahnke et al., 2002).

Nach Aufnahme eines Antigens kann dieses auf zwei verschiedenen Wegen in den DC prozessiert und auf MHC-Moleküle geladen werden.

Exogene Proteine werden in Endosomen durch Proteasen in kürzere Peptide geschnitten (12-25 Aminosäuren). Diese Endosomen fusionieren dann mit Vesikeln, die MHC-Klasse-II-Moleküle aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) enthalten, wodurch so genannte „MHC-Klasse-II-reiche Kompartimente“ (engl.: MHC-class-II rich compartments, MIIC) entstehen. In diesen MIIC werden Peptide auf die MHC-II-Moleküle geladen. Diese MHC-II/Peptid-Moleküle werden anschließend an die Zelloberfläche transportiert und können dort CD4⁺ T-Zellen stimulieren. Die MHC-II/Peptid-Moleküle werden sehr schnell nach Reifung der DC und für eine Zeitspanne von mehreren Tagen auf der Oberfläche exprimiert (Cella et al., 1997).

Im Gegensatz dazu werden endogene Antigene, wie etwa virale Proteine oder „Selbst“-Proteine, im Zytoplasma von Proteasomen in Peptide mit einer Länge von 4-20 Aminosäuren gespalten (Kisselev et al., 1999). Diese Peptide werden in einer ATP-abhängigen Weise durch TAP-Proteine (engl.: transporter associated with antigen processing) in das endoplasmatische Retikulum transportiert. Es können jedoch nur Peptide mit einer Länge von 8-11 Aminosäuren mit den TAP-Proteinen interagieren und auf MHC-I-Molekülen gebunden werden (Momburg et al., 1994). TAP ist mit einem Multiproteinkomplex, dem so genannten „MHC-Klasse-I-Lade-Komplex“ innerhalb des ER assoziiert. Dieser Komplex besteht aus einem MHC-Klasse-I/ β_2 -Mikroglobulin-Dimer und den Chaperon-ähnlichen Proteinen Calreticulin, ERp57 und Tapasin und ermöglicht die Beladung von MHC-I-Molekülen mit Peptiden. Anschließend werden die MHC-I/Peptid-Moleküle an die Zelloberfläche transportiert, wo sie dann CD8⁺ T-Zellen stimulieren können. Im Gegensatz zu MHC-II/Peptid-Molekülen werden die MHC-I/Peptid-Moleküle nur einige Stunden auf der Zelloberfläche exprimiert, was jedoch durch die ständige Neusynthese von MHC-I/Peptid-Molekülen ausgeglichen wird (Cella et al., 1999). MHC-I-Moleküle werden auf sämtlichen nukleären Zellen exprimiert, wohingegen MHC-II-Moleküle nur auf der Oberfläche professioneller APC, wie Makrophagen, DC und B-Zellen, vorkommen.

DC haben außerdem die einzigartige Fähigkeit, exogene Antigene (z.B. von Tumorzellen oder sterbenden Zellen) durch Phagozytose aufzunehmen und sie auf MHC-I-Molekülen zu präsentieren. Durch diesen Prozess, der so genannten „Kreuzpräsentation“, können CD8⁺ T-Zellen, die spezifisch für diese exogenen Antigene sind, aktiviert werden. So konnte man beispielsweise beobachten, dass iDC sterbende, Virus-infizierte Zellen aufnehmen und anschließend virale Antigene dieser infizierten Zellen CD8⁺ T-Zellen kreuzpräsentieren können (Albert et al., 1998). Diese Fähigkeit machte die DC zu geeigneten Kandidaten für Tumor-Immuntherapien. In verschiedenen, in Mäusen erfolgreich getesteten, DC-basierten Tumorstoffen wurden DC mit Tumorantigenen aus verschiedenen Quellen, wie Tumorextrakten, kurzen Peptiden oder Tumor-RNS beladen (Gilboa, 2007; Mocellin et al., 2004). Auch beim Menschen wurden bereits verschiedene klinische Studien mit DC-basierten Tumorstoffen durchgeführt, bei denen eine erhöhte T-Zell-Antwort gegenüber Tumorantigenen beobachtet werden konnte (Palucka et al., 2009).

Nach der Aufnahme von Antigen entwickeln sich iDC zu mDC und wandern in die Lymphknoten. Die Reifung der DC wird durch so genannte „Danger Signale“ ausgelöst, die durch das Vorhandensein von Pathogenen entstehen oder wenn Gewebe von Pathogenen zerstört wird, und die von Rezeptoren auf den DC detektiert werden. Solche Signale sind bakterielle Komponenten, wie z.B. DNS und Lipopolisaccharid (LPS), Pilzbestandteile, Virusbestandteile wie doppelsträngige RNS (dsRNS), Zytokine und Moleküle, die von körpereigenen Zellen stammen (z.B. Hitze-Schock-Proteine) (Cella et al., 1999). In Folge der Reifung nehmen die DC kein Antigen mehr auf und regulieren die Expression diverser Zelloberflächenmoleküle, wie z.B. CD86, CD80 und CD40, hoch, die für eine spätere Stimulation von T-Zellen wichtig sind. Außerdem werden Chemokinrezeptoren, wie CCR7 (Chemokin-(CC-Motiv)-Rezeptor 7), verstärkt exprimiert, wodurch die reifen DC aus den peripheren Geweben in die Lymphknoten gelangen. CCR7 erkennt das Chemokin SLC (engl.: secondary lymphoid tissue chemokine), das von lymphatischen Endothelzellen produziert wird und das Chemokin ELC (engl.: Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine), das wiederum in den T-Zellarealen der Lymphknoten von reifen DC sezerniert wird (Gunn et al., 1998; Sallusto et al., 1998). In den Lymphknoten treffen die DC auf naive T-Zellen, die durch MHC/Peptid und kostimulatorische Moleküle der DC stimuliert und aktiviert werden.

1.6 TCR-SIGNALWEG

Sobald ein TCR an sein spezifisches Antigen, das auf einem MHC-I- bzw. MHC-II-Molekül präsentiert wird, bindet, wird eine Signalkaskade innerhalb der T-Zelle ausgelöst, die letztendlich zu einer Proliferation und Aktivierung der T-Zelle führt. Die Mehrzahl der

peripheren T-Zellen exprimiert einen dimeren TCR, der aus einer α - und einer β -Kette zusammengesetzt ist. Beide TCR-Ketten bestehen jeweils aus einem variablen (V) Gensegment in Kombination mit einer so genannten „joining“ (J) Region und einer zugehörigen konstanten (C) Region, wobei die TCR β -Kette außerdem ein „diversity“ (D) Segment zwischen der V- und J-Region enthält. Wichtig für die Erkennung von Peptid/MHC-Molekülen sind die komplementaritätsbestimmenden Regionen (engl. complementarity determining regions, CDR), die in den hypervariablen Regionen des TCR lokalisiert sind. Die CDR3-Region zeichnet sich durch eine hohe Sequenzvariabilität aus und dient der Epitoperkennung, wohingegen die CDR1- und CDR2-Regionen die weniger variablen MHC-Moleküle erkennen (Abb. 1.2).

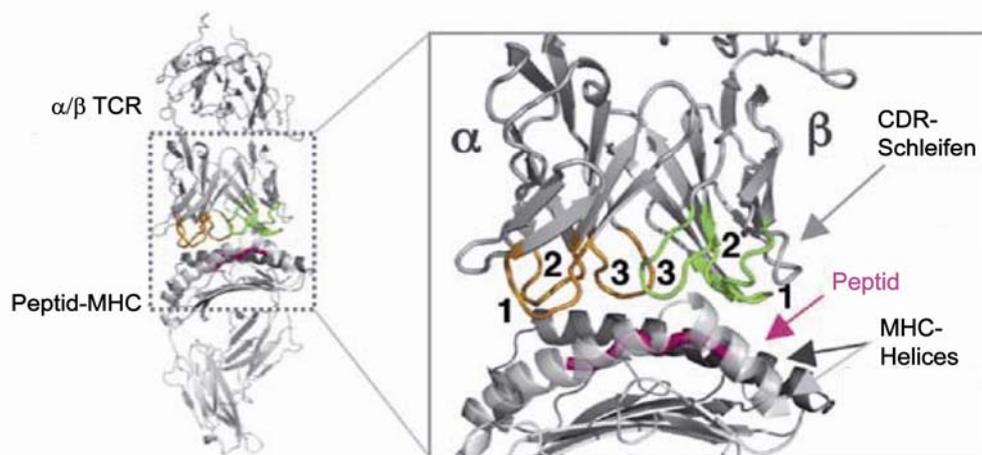


Abb. 1.2: Dreidimensionale Struktur der Interaktion eines α/β TCR mit einem Peptid-MHC-Molekül (Garcia und Adams, 2005). Die hypervariablen CDR-Schleifen der variablen Ketten eines TCR stehen in direktem Kontakt mit einem Peptid-MHC-Molekül. Die CDR1- und CDR2-Schleifen interagieren mit den MHC-Helices, während CDR3 an das in den MHC-Helices gebundene Peptid bindet. Die CDR-Schleifen der TCR α -Kette sind in orange, die CDR-Schleifen der TCR β -Kette in grün abgebildet. Das in den MHC-Helices gebundene Peptid ist magentafarben markiert.

Das erste Ereignis, das nach der Bindung des TCR an sein spezifisches MHC/Peptid-Molekül auftritt, ist die Aktivierung einer Proteintyrosinkinase (PTK) der Src-Familie (Wange und Samelson, 1996) (Abb. 1.3). In einigen Systemen ist Lck die hauptsächlich aktivierte Kinase, in anderen Systemen ist es die Fyn-Kinase. Eine essenzielle Rolle bei der Aktivierung der PTK scheint die Tyrosinphosphatase CD45 zu spielen, da man beobachtet hat, dass eine Bindung des TCR an sein Antigen in CD45-negativen Zellen nicht zu einer Aktivierung von PTK der Src-Familie führt. Eine mögliche Aufgabe von CD45 könnte es sein, den Phosphorylierungsstatus eines Tyrosinrestes in PTKs der Src-Familie zu kontrollieren (O'Shea et al., 2001).

Die Aktivierung von Lck oder Fyn führt zu einer Phosphorylierung von Tyrosinresten in den ITAMs (engl.: immunoreceptor tyrosine-based activation motifs), die in den invarianten Ketten des TCR (CD3 γ , δ , ϵ und ζ) lokalisiert sind. Die phosphorylierten Reste dienen als

Bindestellen für Zap-70 (engl.: zeta-chain-associated protein kinase 70), eine PTK der Syk-Familie (Chan et al., 1992). Die Assoziation von Zap-70 an den TCR-Komplex führt zur Phosphorylierung mehrerer wichtiger Proteine, wie der Phospholipase-C (PLC), die ihrerseits nach Phosphorylierung Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) in die zwei intrazellulären Botenstoffe („second messenger“) Diazylglyzerol (DG) und Inositol-Trisphosphat (IP₃) hydrolysiert (Weiss et al., 1991).

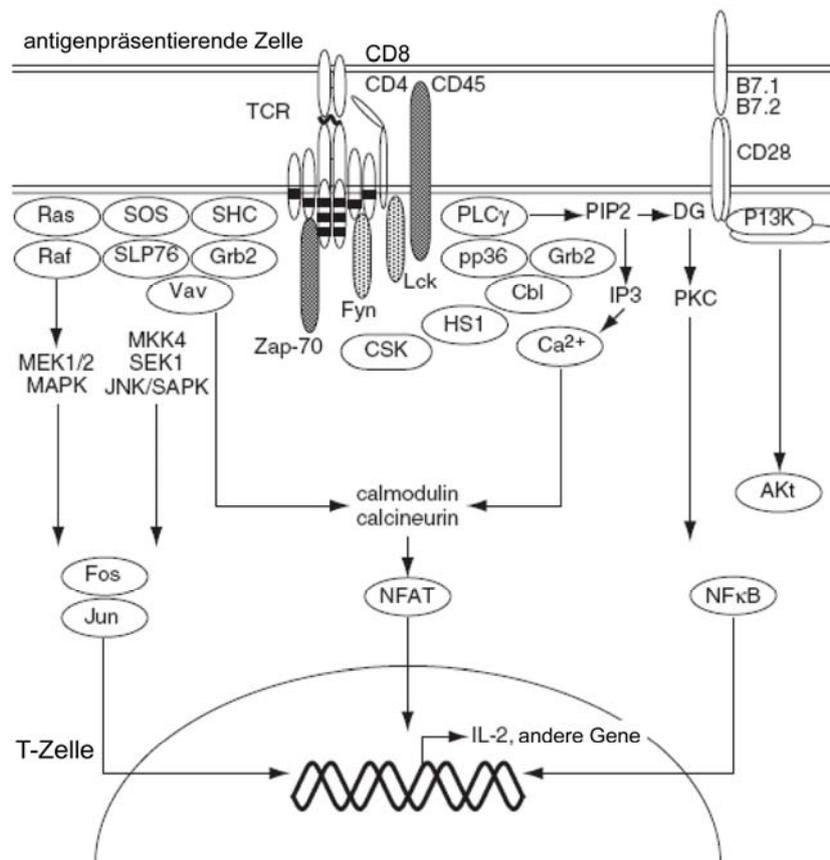


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Moleküle, die an der TCR-vermittelten Signalkaskade beteiligt sind (O'Shea et al., 2001). Nach der Bindung eines TCR an sein spezifisches Peptid/MHC-Molekül werden Fyn und Lck aktiviert, die ITAMs in den CD3-Ketten phosphorylieren, wodurch ZAP-70 binden kann. Wichtige Kostimulatoren sind CD4 bzw. CD8 und CD28. Durch die folgende Signalkaskade über PLC γ und Ras werden Transkriptionsfaktoren wie Fos, Jun, NFAT und NF κ B aktiviert.

DG aktiviert seinerseits verschiedene Mitglieder der Serin/Threonin-Proteinkinase-C-Familie (PKC), wohingegen IP₃ einen Kalziumefflux aus dem endoplasmatischen Retikulum auslöst, wodurch sich die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöht. Diese erhöhten Kalziumkonzentrationen führen zu einer Aktivierung von Calmodulin und Calcineurin, was wiederum eine Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT (engl.: nuclear factor of activated T cells) auslöst, der eine wichtige Rolle bei der Regulation des *IL-2*-Gens spielt (Jain et al., 1993). PKC aktiviert andererseits andere Transkriptionsfaktoren, wie Fos, Jun und NF κ B, die die Expression von Zytokinen und deren Rezeptoren beeinflussen. Die

Stimulation des TCR führt außerdem zur Aktivierung von Ras, was wiederum zur Stimulation mehrerer Serin/Threonin- bzw. Tyrosinkinase führt, die ihrerseits Transkriptionsfaktoren wie Fos und Jun aktivieren können.

1.6.1 DIE „ZWEI-SIGNAL-THEORIE“ DER T-ZELLAKTIVIERUNG

Eine optimale Stimulation von T-Zellen benötigt mindestens zwei Signale: die Bindung des TCR an sein spezifisches Peptid/MHC-Molekül (Signal 1) und die Interaktion von CD28, das auf der T-Zelle exprimiert wird, mit B7.1 (CD80) und/oder B7.2 (CD86) auf der APC (Signal 2) (Abb. 1.3). Verschiedene Hypothesen führten zur Entwicklung der „Zwei-Signal-Theorie“, die besagte, dass eine T-Zelle, die nur das stimulierende Signal durch ein Peptid/MHC-Molekül ohne ein weiteres kostimulierendes Signal erhält, nicht aktiviert wird, sondern in einen anergen Zustand übergeht.

Ursprünglich wurde die „Zwei-Signal-Theorie“ entwickelt, um zu erklären, warum Lymphozyten in der Lage sind, zwischen „Selbst“ und „Fremd“ zu unterscheiden (Bretscher und Cohn, 1970). Diese erste Theorie besagte, dass, wenn nur eine einzige T-Zelle auf ihr spezifisches Antigen trifft, diese Zelle deletiert wird, da man mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgehen kann, dass diese Zelle ein „Selbst“-Antigen erkennt. Andere selbstreaktive Klone wurden vermutlich schon deletiert. Falls jedoch zwei unabhängige Klone ein Antigen erkennen, ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass dies ein „Fremd“-Antigen ist, wodurch die Aktivierung der T-Zelle ausgelöst wird. Lafferty entdeckte in den 70er Jahren, dass die alleinige Präsentation von Alloantigenen nicht ausreichte, um T-Zellen in einer gemischten Lymphozytenreaktion (engl.: mixed lymphocyte reaction, MLR) zu aktivieren (Lafferty et al., 1974). Er stellte daraufhin die Hypothese auf, dass ein Kostimulator von antigenpräsentierenden Zellen produziert wird, der essenziell für die Aktivierung von T-Zellen ist. 1975 übertrugen Lafferty und Cunningham diese Regeln von der Alloreaktivität auf T-Lymphozyten generell (Lafferty und Cunningham, 1975). Nachdem die MHC-Restriktion eines TCR von Zinkernagel und Doherty entdeckt wurde, postulierten sie außerdem, dass das zweite Signal durch das MHC-Molekül vermittelt wird. Dadurch versuchten sie die Tatsache zu erklären, dass Alloantigene T-Zellen im Gegensatz zu konventionellen Antigenen besser stimulieren konnten (Cunningham und Lafferty, 1977; Zinkernagel und Doherty, 1974). In den 80er Jahren wurde entdeckt, dass ein nicht-reaktiver („anerg“) Zustand in T-Zellen induziert werden konnte, wenn ein Antigen von toten oder fixierten APC präsentiert wurde. Dies zeigte, dass lebende APC notwendig waren, um ein zweites Signal für eine Aktivierung der T-Zellen zu vermitteln (Jenkins und Schwartz, 1987). Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Ideen dazu entwickelt, wie ein solches „zweites Signal“ beschaffen sein könnte. Nach einem Modell von Janeway wurde das zweite Signal

durch häufig vorkommende mikrobielle Produkte ausgelöst, die an Rezeptoren auf den APC binden und diese dadurch aktivieren können („*Stranger Theorie*“) (Janeway, 1992). Matzinger dagegen vermutete, dass eine Aktivierung von APC und ein dadurch vermitteltes zweites Aktivierungssignal für T-Zellen durch so genannte „Danger Signale“ ermöglicht wurde, die entstehen, wenn Zellen beschädigt werden („*Danger Theorie*“) (Matzinger, 1994). Mittlerweile wurden verschiedene Kostimulatoren identifiziert, die ein weiteres Signal bei der T-Zellaktivierung vermitteln können. Dazu gehören Zytokine wie z.B. IL-4, sowie Oberflächenmoleküle, die auf APC exprimiert werden, wie B7.1 (CD80), B7.2 (CD86) und CD40 (June et al., 1994; Liu und Linsley, 1992). Die Interaktion zwischen CD28 auf der T-Zelle und den zwei Liganden B7.1 und B7.2 auf der APC wird als das hauptsächlichste kostimulatorische Signal angesehen.

B7.1, ursprünglich als B-Zell-Aktivierungsmolekül entdeckt, war der erste Ligand, der für CD28 identifiziert wurde (Yokochi et al., 1982). B7.1 wurde außer auf B-Zellen auch auf verschiedenen APC, Monozyten und verschiedenen Tumorzelllinien detektiert. Die funktionale Bedeutung von B7.1 zeigte sich, als beobachtet wurde, dass eine durch PMA induzierte T-Zellproliferation durch die Zugabe von B7.1-Transfektanten erhöht werden konnte. Die T-Zellproliferation konnte außerdem durch Anti-CD28-Antikörper blockiert werden (Gimmi et al., 1991; Linsley et al., 1991). B7.2 besitzt eine sehr ähnliche Struktur wie B7.1 und kann ebenfalls einen kostimulatorischen Effekt auf T-Zellen haben (Azuma et al., 1993; Freeman et al., 1993). Die Expression von B7.1 und B7.2 kann durch Zell-Zell-Interaktionen oder Zytokine reguliert werden. So spielt beispielsweise der CD40/CD40L-Signalweg eine wichtige Rolle, da B7.1 und B7.2 durch die Signalübertragung über CD40 induziert werden (Ranheim und Kipps, 1993). Zytokine, die die Expression der beiden B7-Moleküle induzieren können sind z.B. IL-4 oder IFN γ (Hathcock et al., 1994; Stack et al., 1994). Die Ligation von CD28 an seine Liganden führt durch die Rekrutierung des PI-3-Kinase-Adapters p85 an ein hoch konserviertes Motiv im zytoplasmatischen Teil von CD28 zu einem Anstieg von 3'phosphorylierten Inositol-Phospholipiden (Stein et al., 1994). Diverse Prozesse wie Zytokinsekretion, Zellzyklus oder Überleben werden in der Zelle durch CD28 beeinflusst (Kane und Weiss, 2003).

1.6.2 KOSTIMULATION DURCH CD8

Neben der Kostimulation der T-Zelle durch die Bindung von CD28 an B7-Moleküle auf der APC, spielt die Kostimulation über CD8- bzw. CD4-Moleküle bei der Aktivierung von T-Zellen eine wichtige Rolle. An MHC-I-Moleküle bindende, zytotoxische T-Zellen exprimieren das CD8-Molekül, T-Zellen, die Peptide auf MHC-II-Molekülen erkennen, tragen das CD4-Molekül auf ihrer Oberfläche.

CD8 kann die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen (CTL) auf verschiedene Arten verbessern. Zum einen wird die Bindung zwischen dem TCR und dem MHC-I/Peptid-Molekül durch die zusätzliche Bindung von CD8 an das MHC-Molekül verstärkt, wodurch die Sensitivität der T-Zelle erhöht werden kann (Garcia et al., 1996). Zum anderen wird durch CD8 die Lck-Kinase aktiviert, die ihrerseits Zap-70 phosphoryliert und so zur Aktivierung der T-Zelle beiträgt (Abb. 1.3 und 1.4) (Veillette et al., 1988). So hat man beobachtet, dass die Erkennung eines Antigens durch T-Zellen und die darauffolgende Aktivierung der T-Zellen durch eine Transfektion der T-Zellen mit der CD8-cDNS verbessert werden konnte. (Dembic et al., 1987).

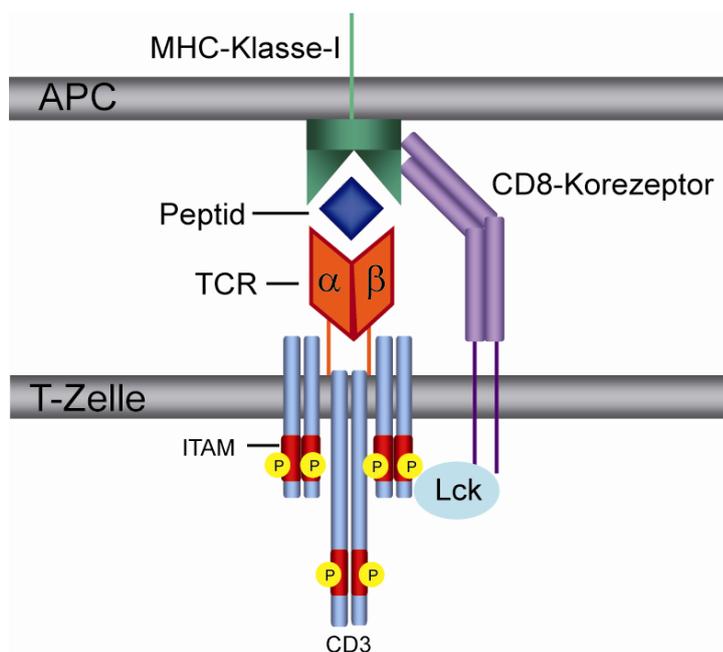


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des TCR/Korezeptor-Komplexes. Nach Bindung des TCR:CD3-Komplexes an ein MHC-I/Peptid-Molekül führt die Aktivierung von Kinasen wie Lck zur Phosphorylierung von ITAMs. Durch die Bindung des Korezeptors CD8 an das MHC-I-Molekül auf der APC wird die Kinase Lck noch zusätzlich aktiviert. Die Aggregation des TCR mit dem Korezeptor unterstützt so die Aktivierung der T-Zelle. Außerdem kann die Bindung zwischen dem TCR und dem MHC/Peptid-Molekül durch die zusätzliche Bindung von CD8 an das MHC-Molekül stabilisiert werden (APC: engl. antigen presenting cell; ITAM: engl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif).

Das CD8-Molekül wird als CD8 α / α -Homodimer oder als CD8 α / β -Heterodimer auf CTL exprimiert und kann in beiden Formen als Kostimulator agieren. Während die zytoplasmatische Domäne von CD8 α mit der p56^{lck}-Kinase assoziiert ist, besitzt die zytoplasmatische Domäne von CD8 β dagegen kein identifizierbares Proteinbindemotiv. Die beiden Dimere weisen in verschiedenen Aspekten deutliche Unterschiede auf. So kommt CD8 α / β hauptsächlich auf TCR $\alpha\beta$ ⁺ Thymozyten und peripheren T-Zellen vor, CD8 α / α zeigt dagegen eine viel breitere Expression in verschiedenen Geweben, wie z.B. neben T-Zellen auch auf DC und NK1.1⁺ T-Zellen (Norment und Littman, 1988; Torres-Nagel et al., 1992). Obwohl beide Dimere mit einer ähnlichen Affinität an MHC-I-Moleküle binden können, besitzen sie unterschiedliche Fähigkeiten, die T-Zell-Antwort auf ein Antigen zu verstärken. So konnte in verschiedenen Studien beobachtet werden, dass CD8 α / β -Dimere ein größeres Potenzial als Korezeptoren besaßen als CD8 α / α -Homodimere. Es konnte gezeigt werden, dass ein chimäres CD8-Molekül, bestehend aus der extrazellulären Domäne von CD8 β und

den transmembranen und zytoplasmatische Anteilen von CD8 α eine verstärkte Korezeptorfunktion im Gegensatz zu CD8 α/α aufwies (Wheeler et al., 1992).

Strukturanalysen der CD8 α/β -MHC-Interaktion erhärteten die Vermutung, dass der extrazelluläre, kürzere Bereich von CD8 β eine wichtige Rolle bei der Orientierung der zytoplasmatischen Domänen des CD8 α/β -Dimers und der dadurch ausgelösten Signaltransduktion spielt (Rettig et al., 2009; Wang et al., 2009). Für bestimmte, hoch-avide, CD8-abhängige TCR konnte gezeigt werden, dass sie nach Transfer in CD8 β -defiziente Zellen keine antigenspezifische Zytotoxizität auf Zielzellen mehr auslösen konnten (McNicol et al., 2007). Dies war erstaunlich, da vorangegangene Studien gezeigt hatten, dass hoch-avide T-Zellen im Gegensatz zu niedrig-aviden T-Zellen in ihrer Funktionalität nicht von der CD8-Expression abhängig waren (Kerry et al., 2003; von Herrath et al., 1994).

1.6.3 EXPRESSION VON IL-2 UND IL-2R α NACH AKTIVIERUNG DER T-ZELLE

1976 wurde IL-2 als ein T-Zellwachstumsfaktor identifiziert. In den 1980ern stellte sich heraus, dass IL-2 für die T-Zellproliferation und für die Induktion von Effektorfunktionen notwendig ist (Letourneau et al., 2009). IL-2 ist ein Zytokin, das von aktivierten CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen sezerniert und sehr schnell, aber nur transient, nach Stimulation des TCR und kostimulatorischer Moleküle, wie CD28, produziert wird. Die transiente IL-2-Sekretion ist darauf zurückzuführen, dass auf die *IL-2*-Transkription durch Signale des TCR und die Stabilisierung der *IL-2*-mRNS durch kostimulatorische Signale eine transkriptionelle Stilllegung des *IL-2*-Gens und eine schnelle Degradierung der *IL-2*-mRNS folgt (Jain et al., 1995). Etwa 500 bp vor dem Transkriptionsstart des *IL-2*-Gens erstreckt sich eine minimale, proximale Promotor/Enhancer-Region, die in humanen und murinen *IL-2*-Genen einen hohen Grad an Konservierung aufweist. Der Signalweg über den TCR induziert AP-1 (engl.: activator protein 1), erhöht die Konzentration an aktivem NF κ B und löst eine Calcineurin-vermittelte Dephosphorylierung von NFAT aus, wodurch der Transkriptionsfaktor in den Nukleus transportiert wird. Diese Transkriptionsfaktoren binden an spezifische Stellen innerhalb des minimalen Promotors und tragen so zur Transkription von *IL-2* bei.

Der Mechanismus, der die Stilllegung von *IL-2* reguliert, ist weniger gut geklärt. Bisher ist nur bekannt, dass die Transkriptionsfaktoren Zfx1a (ZEB, TCF8) und CREM (Icer) an den minimalen *IL-2*-Promotor binden und eine Reportergentranskription inhibieren können, der genaue Mechanismus bleibt jedoch noch zu klären (Barton et al., 1996; Yasui et al., 1998).

IL-2 reguliert bzw. inhibiert seine eigene Produktion in einer autoregulatorischen Rückkopplungsschleife. Diese Rückkopplung hängt mit der Aktivierung von Stat5 (engl.: signal-transducer and transactivator 5) und der IL-2-abhängigen Induktion des transkriptionellen Repressors Blimp-1 (engl.: B lymphocyte maturation protein-1) zusammen.

Nach der Aktivierung einer T-Zelle wird IL-2 sezerniert und der hoch-affine IL-2-Rezeptor (IL-2R) exprimiert, worauf produziertes IL-2 autokrin an den IL-2R binden kann. Dies führt zu einer Aktivierung von Stat5 und zu einer Induktion von Blimp-1, wodurch die Transkription des *IL-2*-Gens unterdrückt wird. Es bleibt noch zu klären, ob die Aktivierung von Stat5 direkt zu einer Induktion von Blimp-1 führt und ob Blimp-1 IL-2 direkt unterdrückt.

Der IL-2R besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten: der IL-2R α -Kette (CD25), der IL-2R β -Kette (CD122) und der IL-2R γ -Kette (CD132) (Malek, 2008). Die IL-2R β - und γ -Ketten bilden einen Rezeptor, der nur niedrig-affin für IL-2 ist ($K_d \sim 10^{-9}$ M) und auf ruhenden T-Zellen exprimiert wird. Nach Aktivierung der T-Zellen wird zusätzlich die IL-2R α -Kette exprimiert, wodurch sich ein heterotrimerer Rezeptor bildet, der eine hohe Affinität für IL-2 besitzt ($K_d \sim 10^{-11}$ M). Eine Strukturanalyse des IL-2/IL-2R-Komplexes hat ergeben, dass alle Untereinheiten des IL-2R an IL-2 binden, die meisten Kontakte bilden sich aber zwischen IL-2 und IL-2R α . Signifikante Interaktionen gibt es zwischen der β - und der γ -Kette, wodurch sich ein stabiler Komplex der vier Moleküle bildet (Stauber et al., 2006). Dieser Komplex induziert die oben beschriebene Signalweiterleitung durch IL-2, die von den zytoplasmatischen Teilen der IL-2R β - und γ -Kette abhängt.

Einzelne IL-2R-Untereinheiten werden weit verbreitet auf verschiedenen lymphoiden Zelltypen exprimiert, aber nur zwei Zelltypen koexprimieren die IL-2R α -, β -, und γ -Kette, die den hoch affinen IL-2-Rezeptor bilden: CD4⁺ FoxP3⁺ T-regulatorische-Zellen und aktivierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, wobei T-regulatorische-Zellen den hoch-affinen IL-2R im Gegensatz zu konventionellen T-Zellen dauerhaft exprimieren.

1.7 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Ein Ziel dieser Arbeit war die Generierung von HLA-A2-restringierten, WT1-spezifischen T-Zellen mithilfe einer „semi-allogenen“ De-novo-Induktion naiver CD8⁺ T-Zellen. CD8-positive T-Zellen eines HLA-A2-negativen Spenders wurden in mehreren Runden mit 3d DC oder PBMC desselben Spenders stimuliert, die zuvor mit WT1-*ivt*RNS und HLA-A2-*ivt*RNS transfiziert wurden. Potenziell WT1-spezifische T-Zellen sollten mithilfe eines Multimers isoliert, anschließend expandiert und auf ihre Spezifität und Funktionalität hin analysiert werden.

Da nach der De-novo-Induktion nur eine sehr geringe Anzahl an T-Zellen mithilfe des HLA-A2/WT1-Multimers isoliert werden konnte, sollten die Fähigkeiten der für die Primärstimulation verwendeten 3d DC im Hinblick auf Antigenaufnahme, Antigenpräsentation und Stimulation von T-Zellen untersucht und mit 7d DC verglichen werden. Ferner sollte die

Proteinexpression in 3d DC nach Elektroporation von *ivtRNS* und deren stimulatorisches Potenzial auf Gedächtnis-T-Zellen quantitativ analysiert werden.

Außerdem sollte ein TCR-Testsystem mit TCR-defizienten Jurkat-76-Zellen (J76) etabliert werden, mit dessen Hilfe es möglich war, die Spezifität neu identifizierter TCR zu untersuchen. Zunächst sollten geeignete Marker identifiziert werden, mit deren Hilfe die Aktivierung von TCR-transgenen J76-Zellen gemessen werden konnte. Desweiteren sollte der Einfluß von CD8 auf die Signaltransduktion in J76 nach Stimulation transgener TCR untersucht werden.

2 MATERIAL

2.1 ZELLEN

Zellen	Beschreibung	Quelle	Referenz
A42 CTL	monoklonale CTL-Linie; HLA-A*0201-restringiert; spezifisch für das Melan-A ₂₆₋₃₅ -Epitop	Panelli, MC.	Kawakami et al., 1994
TyrF8 CTL	monoklonale CTL-Linie; HLA-A*0201-restringiert; spezifisch für das Tyrosinase ₃₆₉₋₃₇₇ -Epitop	Schrier, P.	Visseren et al., 1995
AK-EBV-B	Epstein-Barr-Virus-transformierte lymphoblastoide Zelllinie aus einem gesunden Spender	Wölfel, T.	Wölfel et al., 1994
LAZ-388	Epstein-Barr-Virus-transformierte lymphoblastoide Zelllinie	Schrier, P.	
DC	aus Monozyten eines gesunden Blutspenders generiert	Im Labor generiert	
PBMC	Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut eines gesunden Blutspenders	Elutriation	
Mel 624.38	Melanomzelllinie; HLA-A2-positiv; Melan-A-positiv		Rivoltini et al., 1995
Mel A375	Melanomzelllinie; HLA-A2-positiv; Melan-A-negativ	ATCC (CRL-1619)	
Mel IL-2	Melanomzelllinie; HLA-A2-positiv; stabile IL-2-Transfektante; Melan-A-positiv	Schrier, P.	
SK Mel 29	Melanomzelllinie; HLA-A2-positiv	Wölfel, T.	Wölfel et al., 1994a
NN26	Nierenzelllinie (Normalniere), isoliert aus „Patient 26“	Schendel, DJ.	Schendel et al., 1993
TIL26	Tumor-infiltrierende-Lymphozyten, isoliert aus „Patient 26“	Schendel, DJ.	Schendel et al., 1993
RCC26	Nierenzellkarzinom-Zelllinie; HLA-A2-positiv; isoliert aus „Patient 26“	Schendel, DJ.	Schendel et al., 1993
RCC26/B7	Nierenzellkarzinom-Zelllinie; HLA-A2-positiv; stabile B7.1-Transfektante	Blankenstein, T.	
K562	Erythroblastoide Leukämie-Zelllinie	ATCC	Lozzio et al., 1975
K562-A2	Erythroblastoide Leukämie-Zelllinie; stabile HLA-A2-Transfektante	Pohla, H.	Britten et al., 2002
T2	Hybrid einer T- und einer B-lymphoblastoiden Zelllinie; TAP-defizient	Panelli, MC.	Salter et al., 1985
Jurkat-76	TCR α - und β -Ketten-defiziente T-Zell-Lymphom-Zelllinie	Blankenstein, T.	Heemskerk et al., 2003
Jurkat-76-TCR26	TCR α - und β -Ketten-defiziente T-Zelllinie; stabile Transduktante für den TCR26 (LSG)	Uckert, W.	Sommermeier et al., 2006
Jurkat-76-CD8	TCR α - und β -Ketten defiziente T-Zelllinie; stabile Transduktante für CD8 α	Uckert, W.	

Zellen	Beschreibung	Quelle	Referenz
Jurkat-76-CD8-T58	TCR α - und β -Ketten-defiziente T-Zelllinie; stabile Transduktante für den TCR T58 und CD8 α	Wilde, S.	
Jurkat-76-CD8-D115	TCR α und β -Ketten-defiziente T Zelllinie; stabile Transfektante für den TCR D115 und CD8 α	Wilde, S.	

Tab. 2.1: Verwendete Zelllinien.

2.2 ANTIKÖRPER

2.2.1 PRIMÄRE ANTIKÖRPER

Spezifität	Klon	Isotyp	Konjugation	Hersteller
CCR7	2H4	IgM	-	Becton Dickinson, Heidelberg
CD1a	NA1/34	IgG _{2a}	FITC	Dako Cytomation, Glostrup (Dänemark)
CD3	UCHT1	IgG ₁	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD3	OKT-3	IgG _{2a}	-	Kremmer, IMI, München
CD4	RPA-T4	IgG ₁	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CD8	RPA-T8	IgG ₁	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CD8	SK1	IgG ₁	APC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD14	M5E2	IgG _{2a}	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CD25 (IL-2R α)	1HT44H3	IgG _{2a}	PE	Beckman Coulter, Fullerton (USA)
CD28	CD28.2	IgG ₁	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD40	5C3	IgG ₁	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CD40L	TRAP1	IgG ₁	PE	Immunotech, Marseille (Frankreich)
CD80	L307.4	IgG ₁	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CD83	HB15e	IgG ₁	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD86	2331	IgG ₁	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CD137	4B4-1	IgG ₁	APC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD152 (CTLA-4)	BNI3	IgG _{2a}	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CD206 (DC-SIGN)	DCN46	IgG _{2b}	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD274 (B7-H1)	M1H1	IgG ₁	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
HB82 (HLA-A2)	BB7.2	IgG _{2b}	-	ATCC, Rockyville (USA)
HLA-DR	G46-6	IgG _{2a}	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
IgG ₁ , Isotypkontrolle	X40	IgG ₁	FITC und PE	Becton Dickinson, Heidelberg
IgG ₁ , Isotypkontrolle	MOPC21	IgG ₁	APC	Becton Dickinson, Heidelberg
IgG _{2a} , Isotypkontrolle	G155-178	IgG _{2a}	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
IL-2	5344.111	IgG ₁	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
Melan-A	A103	IgG ₁	-	Dako Cytomation, Glostrup (Dänemark)
Tyrosinase	T311	IgG _{2a}	-	Novocastra, Newcastle (UK)
WT1	C-19	IgG	-	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Tab. 2.2: Verwendete primäre Antikörper.

2.2.2 SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER

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

Tab. 2.3: Verwendete sekundäre Antikörper.

2.3 PEPTIDE

Epitop	Peptidsequenz	Quelle
WT1 ₁₂₆₋₁₃₄	RMFPNAPYL	Metabion
Melan-A (p70)	GSGHWDFAWPWGSLAGIGILTV	Biosyntan
Melan-A ₂₆₋₃₅	ELAGIGILTV	Metabion
TIL26 (Surrogat)*	YQYPVWLAV	Metabion
Influenza-(Flu)-Matrix-Protein ₅₈₋₆₆	GILGFVTL	Metabion
Tyrosinase ₃₆₉₋₃₇₇	YMN <u>U</u> GTMSQV	Metabion
Tyrosinase ₃₆₉₋₃₇₇	YMD <u>G</u> GTMSQV (modifiziert)	Metabion

Tab. 2.4: Peptide.

* Epitop, das von TIL26-TCR erkannt wird, jedoch nicht natürlich auf RCC26 präsentiert wird („Surrogat“-Peptid). Die Peptidsequenz wurde durch PS-SCL-Technologie identifiziert (engl.: Positional Scanning Soluble Synthetic Peptid Combinatorial Library) (Rubio-Godoy et al., 2002).

2.4 MULTIMERE

Multimer	Peptidsequenz	Quelle
HLA-A*0201/WT1 ₁₂₆₋₁₃₄ /Hβ ₂ m [§]	RMFPNAPYL	Busch, D.; TU München
HLA-A*0201/pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ [#] /Hβ ₂ m [§]	NLVPMVATV	Busch, D.; TU München

Tab. 2.5: Multimere.

[§] humanes β₂-Mikroglobulin

[#] Peptid des internen Matrix-Proteins pp65 (Phosphoprotein, 65 kDa) des humanen Zytomegalovirus (präsentiert auf HLA-A2).

2.5 T-ZELLREZEPTOREN

T-Zellrezeptoren	Spezifität	Referenz/Quelle
D115-TCR	Tyrosinase ₃₆₉₋₃₇₇ (YMDGTMSQV)	Wilde et al., 2009
T58-TCR	Tyrosinase ₃₆₉₋₃₇₇ (YMDGTMSQV)	Wilde et al., 2009
TIL26-(LSG)-TCR	TIL26-„Surrogat“-Peptid	Schendel et al., 1993
TyrF8-TCR	Tyrosinase ₃₆₉₋₃₇₇ (YMNGTMSQV)	Visseren et al., 1995
V α 19/V β 5.2-TCR	unbekannt	diese Arbeit

Tab. 2.6: Verwendete T-Zellrezeptoren.

2.6 OLIGONUKLEOTIDE („PRIMER“)

2.6.1 PRIMER FÜR KLONIERUNGEN

Spezifität	Primer	Sequenz	Produktlänge	Enzym
TyrF8-TCR-V α -Kette	5'	ATAGGTACCATGAAATCCTTGAGAGTTTTACTA	846 bp	<i>KpnI</i> <i>XbaI</i>
	3'	ATATCTAGATCAGCTGGACCACAGCCGC		
TyrF8-TCR-V β -Kette	5'	ATAGGATCCATGGGCCCGGGCTCCTC	948 bp	<i>BamHI</i> <i>XbaI</i>
	3'	ATATCTAGATCAGAAATCCTTTCTCTTGACCA		
CD8 α	5'	GTACGGTACCATGGCCTTACCAGTGACC	705 bp	<i>KpnI</i> <i>XbaI</i>
	3'	CTAGTCTAGATTAGACGTATCTCGCCGAAAG		

Tab. 2.7: Verwendete Primer für Klonierungen (mit entsprechenden Schnittstellen).

2.6.2 PRIMER FÜR SEQUENZIERUNGEN

Name	Primer	Sequenz
T7	5'	TAATACGACTCACTATAGGG

Tab. 2.8: Zur Sequenzierung verwendeter Primer.

2.6.3 TCR-V α -PRIMER

TCR-V α -Spezifität	Primer	Sequenz
P-5' α ST	5'	CTGTGCTAGACATGAGGTCT
P-3' α ST	3'	CTTGCCTCTGCCGTGAATGT
3'T-C α	3'	GGTGAATAGGCAGACAGACTTGTCACTGGA
PANV α 1	5'	AGAGCCCAGTCTGTGASCCAG
PANV α 1.1	5'	AGAGCCCAGTCRGTGACCCAG
V α 2	5'	GTTTGGAGCCAACRGAAGGAG
V α 3	5'	GGTGAACAGTCAACAGGGAGA
V α 4	5'	TGATGCTAAGACCACMCAGC
V α 5	5'	GGCCCTGAACATTCAGGA
V α 6	5'	GGTCACAGCTTCACTGTGGCTA

TCR-V α -Spezifität	Primer	Sequenz
V α 7	5'	ATGTTTCCATGAAGATGGGAG
V α 8	5'	TGTGGCTGCAGGTGGACT
V α 9	5'	ATCTCAGTGCTTGTGATAATA
V α 10	5'	ACCCAGCTGCTGGAGCAGAGCCCT
V α 11	5'	AGAAAGCAAGGACCAAGTGTT
V α 12	5'	CAGAAGGTA ACTCAAGCGCAGACT
V α 13	5'	GAGCCAATTCCACGCTGCG
V α 14	5'	CAGTCTCAACCAGAGATGTC
V α 14.1	5'	CAGTCCCAGCCAGAGATGTC
V α 15	5'	GATGTGGAGCAGAGTCTTTTC
V α 16	5'	TCAGCGGAAGATCAGGTCAAC
V α 17	5'	GCTTATGAGA AACTGCGT
V α 18	5'	GCAGCTTCCCTTCCAGCAAT
V α 19	5'	AGAACCTGACTGCCAGGAA
V α 20	5'	CATCTCCATGGACTCATATGA
V α 21	5'	GTGACTATACTAACAGCATGT
V α 22	5'	TACACAGCCACAGGATACCCTTCC
V α 23	5'	TGACACAGATTCTGCAGCTC
V α 24	5'	GAAGTGCCTCTTCAATGC
V α 25	5'	ATCAGAGTCCTCAATCTATGTTTA
V α 26	5'	AGAGGGAAAGAATCTCACCATAA
V α 27	5'	ACCCTCTGTTCTGAGCATG
V α 28	5'	CAAAGCCCTCTATCTCTGGTT
V α 29	5'	AGGGGAAGATGCTGTCACCA
V α 30	5'	GAGGGAGAGAGTAGCAGT
V α 31	5'	TCGGAGGGAGCATCTGTGACTA
V α 32	5'	CAAATTCCTCAGTACCAGCA

Tab. 2.9: TCR-V α -Primer.

Primer-Arbeitslösungen: 2,5 pmol/ μ l (Ausnahme: 3'T-C α : 5 pmol/ μ l)

S=C/G

R=A/G

Anmerkung: Die Primer für die Amplifikation der konstanten TCR-Kette, die als interne PCR-Kontrolle dienen, sind fett markiert.

2.6.4 TCR-V β -PRIMER

TCR-V β -Spezifität	Primer	Sequenz
P-5'BST	5'	AAGCAGAGATCTCCCACAC
P-3'BST	3'	GAGGTAAGCCACAGTTGCT
P-3'CBII	3'	GATGGCTCAAACACAGCGACCTC
V β 1	5'	GCACAACAGTTCCTGACTTGGCAC
V β 2	5'	TCATCAACCATGCAAGCCTGACCT
V β 3	5'	GTCTCTAGAGAGAAGAAGGAGCGC
V β 4	5'	ACATATGAGAGTGGATTTGTCATT
V β 5.1	5'	ATACTTCAGTGAGACACAGAGAAAC

TCR-V β -Spezifität	Primer	Sequenz
V β 5.2	5'	TTCCCTAACTATAGCTCTGAGCTG
V β 6.1	5'	GCCCAGAGTTTCTGACTTACTTC
V β 6.3	5'	ACTCTGAAGATCCAGCGCACACA
V β 7	5'	CCTGAATGCCCAACAGCTCTC
V β 8	5'	ATTTACTTTAACAACAACGTTCCG
V β 8S3	5'	GCTTACTTCCGCAACCGGGCTCCT
V β 9	5'	CCTAAATCTCCAGACAAAGCT
V β 10	5'	CTCCAAAAACTCATCCTGTACCTT
V β 11	5'	TCAACAGTCTCCAGAATAAGGACG
V β 12	5'	AAAGGAGAAGTCTCAGAT
V β 12S3	5'	GCAGCTGCTGATATTACAGAT
V β 13	5'	TCGACAAGACCCAGGCATGG
V β 13.1	5'	CAAGGAGAAGTCCCAAT
V β 13.2	5'	GGTGAGGGTACAACCTGCC
V β 13S5	5'	ATACTGCAGGTACCACTGGCA
V β 14	5'	GTCTCTCGAAAAGAGAAGAGGAAT
V β 15	5'	AGTGTCTCTCGACAGGCACAGGCT
V β 16	5'	AAAGAGTCTAACAGGATGAGTCC
V β 17	5'	CAGATAGTAAATGACTTTTCAG
V β 18	5'	GATGAGTCAGGAATGCCAAAGGAA
V β 19	5'	CAATGCCCAAGAACGCACCCTGC
V β 20	5'	AGCTCTGAGGTGCCCCAGAATCTC
V β 21	5'	AAAGGAGTAGACTCCACTCTC
V β 22.1	5'	CATCTCTAATCACTTATACT
V β 22.2	5'	AAGTGATCTTGCGCTGTGTCCCA
V β 22.3	5'	CTCAGAGAAGTCTGAAATATTCG
V β 23	5'	GCAGGGTCCAGGTCAGGACCCCA
V β 24	5'	ATCCAGGAGGCCGAACACTTCT

Tab. 2.10: TCR-V β -Primer.

Primer-Arbeitslösungen: 2,5 pmol/ μ l (Ausnahme: P-3'C β II: 5 pmol/ μ l)

Anmerkung: Die Primer für die Amplifikation der konstanten TCR-Kette, die als interne PCR-Kontrolle dienen, sind fett markiert.

2.7 PLASMIDE

Plasmid	cDNS	Resistenz	Quelle
pCDNAI/Amp/Aa1.2	Melan-A	Ampizillin	Wölfel, T.
pZeoSV2+/huTyr	Tyrosinase	Zeozin	Sutter, G.
pCDM8-HLA-A2	HLA-A2	Ampizillin, Tetrazyklin	Weiß, E.
pGEM4Z4Z/GFP/A64	eGFP	Ampizillin	Su, Z.
pReceiver-B02-WT1	WT1 (Isoform A) [§]	Ampizillin	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD)
pMA-V α 19	V-Alpha-19	Ampizillin	Geneart (Regensburg)

Plasmid	cDNS	Resistenz	Quelle
pMA-Vβ5.2	V-Beta-5.2	Ampizillin	Geneart (Regensburg)
pMA-Vβ13.2	V-Beta-13.2	Ampizillin	Geneart (Regensburg)
pGEM4Z-100A-Vα19	V-Alpha-19	Ampizillin	diese Arbeit
pGEM4Z-100A-Vβ5.2	V-Beta-5.2	Ampizillin	diese Arbeit
pGEM4Z-100A-Vβ13.2	V-Beta-13.2	Ampizillin	diese Arbeit
pCDNA3.1/Hygro-TyrF8-TCRα	TyrF8-TCR-Alpha	Ampizillin/Hygromycin	diese Arbeit
pCDNA3.1/Hygro-TyrF8-TCRβ	TyrF8-TCR-Beta	Ampizillin/Hygromycin	diese Arbeit
pCDNA3.1/Hygro-T58-TCRα	T58-TCR-Alpha	Ampizillin/Hygromycin	Schmid, M.
pCDNA3.1/Hygro-T58-TCRβ	T58-TCR-Beta	Ampizillin/Hygromycin	Schmid, M.
pCDNA3.1/Hygro-TIL26-TCRα	TIL26-LSG-TCR-Alpha	Ampizillin/Hygromycin	Turqueti-Neves, A.
pCDNA3.1/Hygro-TIL26-TCRβ	TIL26-LSG-TCR-Beta	Ampizillin/Hygromycin	Turqueti-Neves, A.
pBullet-hCD8α	CD8-Alpha	Ampizillin	Uckert, W.
pCDNA3.1/Hygro-hCD8α	CD8-Alpha	Ampizillin/Hygromycin	diese Arbeit

Tab. 2.11: Plasmide.

§: WT1-Isoform A setzt sich wie folgt zusammen: CUG-Translationsstart, kein KTS (in Exon 9), kein 17 AS (Exon 5) (siehe Abb. 1.1; Sequenz siehe NM_000378.3 und NP_000369.3). Alle Plasmide außer pBullet tragen einen T7-Promotor, wodurch eine *in-vitro*-Transkription der cDNS möglich ist.

2.8 E.COLI-STÄMME

Bakterien	Genotyp	Quelle
One Shot INV110	<i>F'</i> { <i>tra</i> Δ36 <i>proAB lacIq lacZ</i> ΔM15} <i>rpsL</i> (StrR) <i>thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) Δ(<i>mcrC-mrr</i>)102::Tn10 (TetR)	Invitrogen, Karlsruhe
One Shot TOP10F'	<i>F'</i> { <i>lacIq Tn10</i> (TetR)} <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [<i>F'</i> <i>proAB lacIqZ</i> ΔM15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene, Amsterdam (NL)

Tab. 2.12: Verwendete E.coli-Stämme.

2.9 GRÖßENSTANDARDS

Größenstandard	Hersteller
1 kb plus DNA ladder™	Invitrogen, Karlsruhe
GeneRuler™ 1 kb Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 100 bp Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
RNA ladder high range™	Fermentas, St. Leon-Rot

Tab. 2.13: Größenstandards.

2.10 ENZYME UND CHEMIKALIEN

Produkt	Hersteller
10x <i>Taq</i> -Polymerase Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
1-Brom-3-Chloropropan	Merck, Darmstadt
7-AAD (7-Aminoaktinomycin D)	Sigma, Deisenhofen
Agar, SELECT Agar [®]	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose, Ultra Pure	Invitrogen, Karlsruhe
Ampizillin	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe
(humanes) β_2 -Mikroglobulin (H β_2 m)	Calbiochem, San Diego (USA)
<i>Bam</i> HI (Restriktionsenzym)	New England BioLabs, Frankfurt/Main
Brefeldin-A (BFA)	MP Biomedicals, Irvine (USA)
⁵¹ Cr	ICN Biochemicals, Irvine (USA)
CIP, Alkalische Phosphatase	Fermentas, St. Leon-Rot
CCL19 (Chemokin)	R&D Systems, Wiesbaden
DEPC (Diethyl-Pyrocbonat)	Sigma, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
DNS Auftragspuffer (6x)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Eco</i> RI (Restriktionsenzym)	New England BioLabs, Frankfurt/Main
EDTA (0,5 M)	Applied Biosystems, Darmstadt; Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol (absolut)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid, 10 mg/ml	Merck, Darmstadt
FACS [™] Flow und Rinse	BD, Heidelberg
FKS (Fötales Kälberserum)	Invitrogen, Karlsruhe
Ficoll [®]	Biochrom, Berlin
Fungizone [®] Antimycotic (Amphotericin B)	Invitrogen, Karlsruhe
Genetizin	Invitrogen, Karlsruhe
GM-CSF (<i>Leukine</i>)	Berlex, Seattle (USA)
Glyzerin, 87 %	Merck, Darmstadt
HCl (Salzsäure)	Merck, Darmstadt
Heparin-Natrium	Braun, Melsungen
HEPES	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Hind</i> III (Restriktionsenzym)	New England BioLabs, Frankfurt/Main
HS (Humanserum)	IMI, München; Lonza, Walkersville (USA)
Hygromyzin B	Invitrogen, Karlsruhe
Interleukin 1 β (IL-1 β)	R&D Systems, Wiesbaden
Interleukin 2 (IL-2)	Chiron Behring, Marburg
Interleukin 4 (IL-4)	R&D Systems, Wiesbaden
Interleukin 6 (IL-6)	R&D Systems, Wiesbaden
Interleukin 7 (IL-7)	PromoKine, Heidelberg
Interleukin 15 (IL-15)	Peprtech, Rocky Hill (USA)
Ionomyzin	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
<i>Kpn</i> I (Restriktionsenzym)	New England BioLabs, Frankfurt/Main
LB Broth Base	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Frema, München
MRA (Mycoplasma removal agent)	MP Biomedicals, Illkirch (Frankreich)

Produkt	Hersteller
Natriumazetat (3 M)(C ₂ H ₃ NaO ₂)	Applied Biosystems, Darmstadt
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
Nichtessenzielle Aminosäuren (NEAA)	Invitrogen, Karlsruhe
OptiMEM I Medium	Invitrogen, Karlsruhe
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
PCR-Master-Mix (2x)	Promega, Mannheim
PFA (Paraformaldehyd)	Sigma, Deisenhofen
PGE ₂ (Prostaglandin E ₂)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat)	Sigma, Deisenhofen
PI (Propidiumjodid)	ICN Biochemicals, Irvine (USA)
RNS Auftragspuffer (2x)	Fermentas, St. Leon-Rot
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Saponin	Sigma, Deisenhofen
S.O.C.-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
SpeI (Restriktionsenzym)	New England BioLabs, Frankfurt/Main
Streptavidin-PE	Dianova, Hamburg
Substrat Reagenzien A and B	Becton Dickinson, Heidelberg
Taq-Polymerase	Promega, Mannheim
T4-Ligase	New England BioLabs, Frankfurt/Main
T4-DNS-Ligase-Puffer	New England BioLabs, Frankfurt/Main
TAE (Tris Azetat EDTA) Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Tetrazyklin	Merck, Darmstadt
TNF α	R&D Systems, Wiesbaden
TRI-Reagent [®]	Molecular Research Center, Cincinnati (USA)
Tris (hydroxymethyl) aminomethan	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	Promega, Mannheim
Tween 20	ICN, Eschwege
VLE-RPMI 1640 mit L-Glutamin	Biochrom, Berlin
XbaI (Restriktionsenzym)	New England BioLabs, Frankfurt/Main
Zeozin	Invitrogen, Karlsruhe

Tab. 2.14: Chemikalien.

2.11 KOMMERZIELLE ANALYSESYSTEME

Produkt	Hersteller
First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche Diagnostics, Mannheim
JETstar Plasmid Purification Maxi Kit	Genomed, Löhne
MACS – CD8+ T Cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
OptEIA [™] Human IFN γ Set	BD Biosciences, Heidelberg
OptEIA [™] Human IL-2 Set	BD Biosciences, Heidelberg

Produkt	Hersteller
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel, Düren
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Chatsworth (USA)
mMESSAGE mMACHINE™ T7 Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Poly(A) Tailing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
MACS – IL-2 Secretion Assay	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Tab. 2.15: Kommerzielle Analysesysteme.

2.12 VERBRAUCHSMATERIAL

Produkt	Hersteller
0,5 ml –Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
1,5 ml –Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Einmalpipetten (5/10/25 ml)	Greiner, München
Einmalspritzen (5 ml, 10 ml, 50 ml)	BD, Heidelberg
Elektroporationsküvetten (0,1 cm; 0,4 cm)	Bio Rad, München
FACS™ Röhrchen	Peske OHG, Aindling
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	BD, Heidelberg
Kryo-Röhrchen (1 ml, 1,8 ml)	Nunc, Wiesbaden
Kulturplatten (6/24/48/96 Loch)	TPP, Trasadingen (Schweiz)
MACS MS, LS, LD Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Millex-GP-Filtereinheit	Millipore, Schwalbach
Nitrilhandschuhe	Semperit, Wien (Österreich)
Pasteurpipetten	Peske OHG, München
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen	Greiner, München
Pipettenspitzen Eppendorf/Greiner	Materiallager, Neuherberg
Pipettenspitzen, gestopft	Starlab, Ahrensberg
Selbstklebende PE-Folie	Macherey-Nagel, Düren
Transwell® Platten	Corning, NY (USA)
Vakuum-Filtrationssystem 250 ml	TPP, Trasadingen (Schweiz)
Zellkulturflaschen (25 cm ² und 175 cm ²)	BD, Heidelberg
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Greiner, München
Zellkulturflaschen (Nunclon™ 80 cm ²)	Nunc, Wiesbaden
Zellschaber	Nunc, Wiesbaden

Tab. 2.16: Verbrauchsmaterial.

2.13 GERÄTE

Produkt	Hersteller
Absaugpumpe	HLC, Bovenden
Bestrahlungsanlage ¹³⁷ Cs, HWM-D-2000	Gammacell, Ottawa (Kanada)
Brutschrank, CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus, München
Cryo 1 °C Einfrier-Container	Nalgene, Hereford (UK)
Durchflusszytometer, FACS™ Calibur	BD, Heidelberg

Produkt	Hersteller
Durchflusszytometer, LSR-II™	BD, Heidelberg
Eismaschine	Scottsman, Mailand (Italien)
Elektroporator Gene Pulser Xcell™	Bio-Rad, München
Elisa-Reader Sunrise	Tecan, Crailsheim
FACSAria™ CellSorter	BD, Heidelberg
Gefrierschrank	Liebherr, Ochsenhausen
Gelapparatur DNA Sub Cell	Bio-Rad, München
Gelapparatur Geltray	Renner, Dannstadt
Gelprint 2000i	Biophotonics, Ann Arbor (USA)
Heizblock Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge 2K15	Sigma, Osterode am Harz
Kühlzentrifuge Eppendorf Centrifuge 54172	Eppendorf, Hamburg
Laborwaagen B6, P120, PC 440	Mettler, Giessen
Lichtmikroskop	Zeiss, Göttingen
MACS Zelltrennsystem	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnetrührer IKA RCT	Bachofen, Reutlingen
Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikrowellengerät FM 3510	Moulinex, Frankreich
Milli-Q®, Reinstwasserherstellungssystem	Millipore, Schwalbach
NanoDrop ND-1000	PEQLAB, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	neo-Lab, München
PCR-Thermocycler T-1	Biometra, Göttingen
pH-Meter pH391	WTW, Weilheim
Pipetten Eppendorf/Gilson	Eppendorf, Hamburg; Gilson, Middleton (USA)
Pipettierhilfe, Pipetus Akku	Hirschmann, Ebersberg
Plattenzentrifuge Labofuge 6000	Heraeus, München
Schüttler MTS4	IKA, Staufen
Schüttler TR 125	Infors, Bottmingen (Schweiz)
Schüttler Vortex Genie 2	Bachofen, Reutlingen
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Stickstofftank Chronos Biosafe	Messer Griesheim, Krefeld
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus, München
Tischzentrifuge Hettich Mikroliter	Bachofen, Reutlingen
Ultrazentrifuge Sorvall® RC-5B	Thermo Scientific, Schwerte
UV-Transilluminator, 302 nm / 365 nm	Synoptics Cambridge (UK)
UV-Transilluminator, 366 nm	Bachofen, Reutlingen
Wasserbad	Memmert, Schwabbach
Zentrifuge Eppendorf Minispin	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge IEC 6000B	ICE, Bedfordshire (UK)
Zentrifuge Megafuge2.0	Heraeus, München

Tab. 2.17: Geräte.

2.14 MEDIEN

2.14.1 ZELLKULTURMEDIEN

Medium	Bestandteile	Endkonzentration
DC-Medium	VLE RPMI 1640 mit L-Glutamin Humanserum	= 1,5 %
DC-Migrations-Medium	RPMI 1640 Humanserum GM-CSF IL-4 +/- CCL19	= 1 % = 500 U/ml = 250 U/ml = 100 ng/ml
Tumorzell-Medium	RPMI 1640 FKS L-Glutamin (200 mM) Nicht essenzielle Aminosäuren (100x) Natriumpyruvat (100 mM) Penizillin/Streptomycin (10^4 IU/ml)	= 10 % = 2 mM = 1x = 1 mM = 100 IU/ml
T-Zellklon-Medium	RPMI 1640 Humanserum HEPES (1 M) L-Glutamin (200 mM) β -Mercaptoethanol (50 mM) Penizillin/Streptomycin (10^4 IU/ml)	= 10 % = 12,5 mM = 4 mM = 50 μ M = 100 IU/ml
RPMI III	RPMI 1640 L-Glutamin (200 mM) Natriumpyruvat (100 mM) Penizillin/Streptomycin (10^4 IU/ml)	= 2 mM = 1 mM = 100 IU/ml
B-Zell-Medium	RPMI III FKS	= 10 %
A42 CTL Medium	RPMI III Humanserum MRA (50 μ g/ml) IL-2	= 10 % = 0,5 μ g/ml = 125 IU/ml
Einfriermedium	DMSO in FKS	= 10 %

Tab. 2.18: Zellkulturmedien.

2.14.2 *E. COLI*-MEDIEN

Medium	Bestandteile
LB-Medium	10 g Pepton 5 g Hefeextrakt 10 g Natrium-Chlorid Ad 1 l H ₂ O (dest.)
LB-Agar-Medium	10 g LB Broth Base 7,5 g Agar Ad 500 ml H ₂ O (dest.)

Tab. 2.19: *E.coli*-Medien.

Antibiotikahaltige Medien wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 60°C mit Ampizillin (Endkonzentration: 100 µg/ml) versetzt.

2.15 ALLGEMEINE PUFFER UND LÖSUNGEN

Puffer	Bestandteile
DNS-Elektrophoresepuffer	H ₂ O dest. + 1:50 TAE-Puffer (50x)
RNS-Elektrophoresepuffer	DEPC H ₂ O + 1:50 TAE-Puffer (50x)
ELISA-Antikörperpuffer	1 % Milchpulver in PBS
ELISA-Beschichtungspuffer	0,1 M Na ₂ CO ₃ 7,13 g NaHCO ₃ 1,59 g Na ₂ CO ₃ Ad 1 l H ₂ O dest. (→ pH 9,5)
ELISA-Waschpuffer	0,5 ‰ Tween in PBS
FACS-Puffer	1 % FKS in PBS
MACS-Puffer	10 % HS in PBS 2 mM Na-EDTA
DEPC-Wasser	0,1 % DEPC in H ₂ O dest.
Zellfixierlösung	1 % PFA in PBS

Tab. 2.20: Allgemeine Puffer und Lösungen.

2.16 PERSONEN

Folgenden Personen wird für das Bereitstellen verschiedener Materialien, wie Multimeren, Antikörpern oder Plasmiden herzlich gedankt:

Blankenstein, T. Max Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin

Busch, D. Institut der Medizinischen Mikrobiologie, Immunologie and Hygiene, Technische Universität, München

Kremmer, E. IMI, Helmholtz Zentrum München
Milošević, S. IMI, Helmholtz Zentrum München
Nößner, E. IMI, Helmholtz Zentrum München
Schmid, M. IMI, Helmholtz Zentrum München
Schrier, P. Leiden University Medical Center, Leiden (Niederlande)
Sutter, G. Technische Universität, München
Turqueti-Neves, A. IMI, Helmholtz Zentrum München
Uckert, W. Max Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin
Wilde, S. IMI, Helmholtz Zentrum München
Wölfel, T. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
Weiß, E. Ludwig-Maximilians-Universität, München

3 METHODEN

3.1 KULTIVIERUNG VON ZELLINIEN

3.1.1 KULTIVIERUNG EUKARYOTISCHER ZELLEN

Alle Arbeiten zur Kultivierung der Zellen wurden mit sterilem Material, Lösungen und Medien bei sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank 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 mithilfe der Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer (Laboroptik) bestimmt. Der Farbstoff Trypanblau dringt nur in tote, nicht aber in lebendige Zellen ein. Es wurden dementsprechend 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. 10 µl der Farbstoff-Zell-Mischung wurde in den Zwischenraum einer Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Unter dem Lichtmikroskop wurde nachfolgend die Anzahl der ungefärbten Zellen in mindestens zwei Großquadraten, bestehend aus 16 Kleinquadraten, bestimmt. Die durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat wurde mit dem Kammerfaktor 1×10^4 und dem Verdünnungsfaktor 10 multipliziert und ergab die Anzahl an Zellen, die in einem ml Zellkulturmedium enthalten waren. Die Gesamtzellzahl ergibt sich aus dem Wert pro ml multipliziert mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension. War die Zellkonzentration niedrig, so wurde eine geringere Verdünnung gewählt.

Die allgemeine Berechnungsformel lautet:

$$\frac{\text{Ausgezählte Zellen}}{\text{Ausgezählte Fläche (mm}^2\text{)} \cdot \text{Kammertiefe (mm)} \cdot \text{Verdünnung ml}} = \text{Zellen / ml}$$

3.1.3 EINFRIEREN VON ZELLEN

Abhängig von der Zellart wurden unterschiedliche Zellkonzentrationen gewählt. $2\text{-}5 \times 10^6$ Tumorzellen oder DC, $0,5\text{-}3 \times 10^6$ T-Zellen bzw. $2\text{-}5 \times 10^7$ PBMC wurden abzentrifugiert, in 500 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. Man sollte darauf achten, dass das Einfrieren von Säugerzellen langsam geschieht, damit es nicht zur Kristallbildung im Zytoplasma kommt. Aus diesem Grund wurden die Kryo-Röhrchen nach sorgfältigem Mischen entweder im *Nalgene® Cryo 1°C Einfrier-Container* oder in Zellstoff umwickelt für mindestens 24 h 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 zu sehen war, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen, das 5 ml FKS enthielt, überführt und fünf Minuten bei 450 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment in dem jeweiligen, auf 37°C vorgewärmten Kulturmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt.

3.1.5 KULTIVIERUNG ADHÄRENTER ZELLINIEN

Die adhärennten humanen Tumorzelllinien Mel A375, Mel IL-2, Mel 624.38, SK Mel 29, RCC26 und RCC26/B7, sowie die Zelllinie NN26 wurden in Tumorzellmedium kultiviert. Das Medium der Zelllinie RCC26/B7 wurde zudem mit 0,4 mg/ml Hygromyzin B versetzt. Das Medienvolumen in einer 75 cm^2 -Zellkulturflasche betrug 10 ml. Durchschnittlich alle drei bis vier Tage wurde das Medium abgenommen und die adhärennt wachsenden Zellen einmal mit PBS gewaschen. Zu Zellen in 75 cm^2 -Flaschen wurden 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung gegeben, kurz geschwenkt und die Flasche solange im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen abgelöst hatten. Ein Teil der Zellsuspension wurde in eine neue, bereits mit Medium befüllte Flasche transferiert. Je nach Bedarf wurden die Zelllinien mit Medium im Verhältnis 1:2 bis 1:10 verdünnt. Eine Zellcharge wurde maximal acht Wochen in Kultur gehalten. Dadurch sollte eine Anreicherung von Mutanten verhindert werden.

3.1.6 KULTIVIERUNG VON SUSPENSIONSZELLEN

Die humanen Suspensionszelllinien T2, K562, K562-A2, und Jurkat-76 (sowie alle Jurkat-76-Transduktanten) wurden ebenfalls in Tumorzellmedium kultiviert. Das Medium der Zelllinie K562-A2 wurde zudem mit 1 mg/ml Genetizin versetzt. Die Suspensionszellen wurden in stehenden 75 cm²-Zellkulturflaschen mit 10-30 ml Medium in Kultur gehalten. Ungefähr alle drei bis vier Tage wurden $\frac{3}{4}$ der Zellsuspension entfernt und dasselbe Volumen an frischem Medium zugesetzt.

3.1.7 KULTIVIERUNG VON EBV-TRANSFORMIERTEN B-ZELLINIEN

Bei lymphoblastoiden B-Zelllinien (B-LZL) handelt es sich um humane B-Zellen, die mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) transfiziert und dadurch immortalisiert wurden. B-LZL, wie LAZ-388 und AK-EBV-B (Wolfel et al., 1994), wurden in B-Zell-Medium kultiviert und expandiert.

3.1.8 RESTIMULATION UND KULTIVIERUNG DES ETABLIERTEN T-ZELLKLONS A42

Pro Vertiefung einer 24-Lochplatte wurden 5×10^5 frisch aufgetaute CTL ausgesät. SK Mel 29 Zellen (bestrahlt mit 100 Gy, 1×10^5 Zellen pro Vertiefung) wurden als Stimulationszellen und AK-EBV-B-Zellen (bestrahlt mit 100 Gy, 2×10^5 Zellen pro Vertiefung) als „Feederzellen“ zugesetzt. Die T-Zellkultur erfolgte in A42 CTL Medium (Endvolumen: 1,5 ml pro Vertiefung). Am Tag der Restimulation betrug die Endkonzentration von IL-2 500 IU/ml. Durchschnittlich alle zwei Tage wurde die Hälfte des Mediums abgenommen und durch frisches Medium mit 0,5 µg/ml MRA (mycoplasma removal agent) und 250 IU/ml IL-2 ersetzt, so dass die Endkonzentration von IL-2 125 IU/ml betrug. Während ihrer Expansion wurden die CTL alle zwei Wochen restimuliert. Ab Tag sieben nach Restimulation konnten die T-Zellen in funktionalen Analysen (z.B. in eine Kokultur mit DC für einen nachfolgenden IFN γ -ELISA) verwendet werden.

3.1.9 GENERIERUNG UND KULTIVIERUNG DENDRITISCHER ZELLEN

3.1.9.1 Isolierung von PBMC aus Frischblut

200 ml heparinisieretes Blut eines gesunden Spenders wurden mit 400 ml PBS gemischt. Je 35 ml dieses Blut-PBS-Gemisches wurden in 50 ml Röhrchen vorsichtig auf 15 ml Ficoll geschichtet. Die Anreicherung der PBMC erfolgte über eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation. Um eine Auftrennung verschiedener Zelltypen zu erreichen, wurde 18 Minuten bei 840 g ohne Bremse zentrifugiert. Für sämtliche Zentrifugationsschritte wurde die Megafuge2.0 verwendet. Um Thrombozyten zu entfernen, wurden 15 ml der obersten Phase abgenommen. Anschließend wurde erneut, wie oben beschrieben, ohne Bremse zentrifugiert, die leukozytenreiche Interphase vorsichtig abgenommen und je zwei Interphaseringe in einem 50 ml Röhrchen vereinigt. Die Zellen wurden anschließend mit 20 ml PBS gewaschen und für zehn Minuten bei 472 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, je zwei Zellsedimente fusioniert und erneut einmal mit PBS und zweimal mit Waschlösung (PBS + 0,5 % Humanserum) gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden zwei Zellsedimente vereinigt. Schließlich wurde das Zellsediment in DC-Medium resuspendiert, die Zellzahl ermittelt und je $4-7 \times 10^7$ Zellen in eine NUNC „Nuncleon Surface“ Kulturflasche (80 cm^2) überführt. Diese Kulturflaschen besitzen eine spezielle Beschichtung, die eine Anhaftung der Monozyten ermöglicht. Nach 60-minütiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO_2 wurden die nicht adhärenen PBMC durch mehrmaliges Waschen mit RPMI 1640 entfernt. Die adhärenen Monozyten wurden in 15 ml DC-Medium kultiviert.

3.1.9.2 Ansetzen von DC aus einem Leukaphereseprodukt

Um eine Standardisierung der Versuche zu erreichen und Unterschiede in der Qualität und Ausbeute der DC aufgrund verschiedener Spender zu verhindern, wurden von einzelnen Spendern Blutpräparate mittels Leukapherese gewonnen. Um einzelne Zelltypen, wie Monozyten oder T-Zellen, anzureichern, wurden die Leukaphereseprodukte anschließend einer Elutriation unterzogen. Während einer Elutriation werden die verschiedenen Zelltypen des Blutes durch mehrere Zentrifugationsschritte nach dem Gegenstromprinzip aufgrund ihrer Größe und Dichte separiert.

Je $4-7 \times 10^7$ aufgetaute PBMC wurden in NUNC-Flaschen (80 cm^2) ausgesät und für 2 h bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Nicht adhärenente PBMC wurden vorsichtig gewegewaschen und adhärenierende Monozyten in DC-Medium kultiviert.

Monozyten wurden nach dem Auftauen sofort zu 15×10^6 Zellen pro 15 ml DC-Medium in eine NUNC-Zellkulturflasche (80 cm²) gegeben und ohne weitere Waschschriffe direkt zu DC ausgereift.

3.1.9.3 Generierung von DC

3.1.9.3.1 Generierung von iDC und mDC nach dem 7-Tages-Protokoll (7d DC)

Um unreife dendritische Zellen zu erhalten, wurden angereicherte Monozyten in DC-Medium kultiviert und an Tag 1, sowie an Tag 3 mit 100 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4 versetzt. An Tag 6 folgte die Maturierung der unreifen DC (6d iDC) durch Zugabe des „Jonuleit-Cocktails“, bestehend aus 100 ng/ml GM-CSF, 20 ng/ml IL-4, 10 ng/ml IL-1 β , 15 ng/ml IL-6, 10 ng/ml TNF- α und 1000 ng/ml PGE₂ (Jonuleit et al., 1996). An Tag 7 konnten die reifen DC (7d mDC) geerntet werden.

3.1.9.3.2 Generierung von iDC und mDC nach dem 3-Tages-Protokoll (3d DC)

Um 2d iDC zu erhalten, wurden angereicherte Monozyten in DC-Medium kultiviert und sofort an Tag 0 mit 100 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4 versetzt. An Tag 2 erfolgte die Maturierung der iDC durch Zugabe des „Jonuleit-Cocktails“ (siehe 7d DC). An Tag 3 konnten die reifen DC (3d mDC) geerntet werden.

3.1.10 „SEMI-ALLOGENE“ DE-NOVO-INDUKTION NAIVER T-ZELLEN MIT *IVT*RNS-TRANSFIZIERTEN DC

Die mDC eines HLA-A2-negativen Spenders wurden mittels Elektroporation mit WT1- und HLA-A2-*ivt*RNS kotransfiziert und mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro Vertiefung in einer 24-Lochplatte ausgesät.

Die autologen CD8⁺ T-Zellen des jeweiligen Spenders wurden, wie unter Abschnitt 3.4.5.1 beschrieben, durch negative Depletion angereichert und mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen pro Vertiefung zu den DC gegeben. Die Kokultur wurde 9 h nach der Elektroporation angesetzt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in T-Zellklon-Medium. Um die Generierung von Effektorzellen zu unterstützen, wurden drei Tage nach Ansetzen der Kokultur IL-2 (12,5 IU/ml) und IL-7 (5 ng/ml) zugegeben. An Tag 10 erfolgte eine spezifische Restimulation der CD8⁺-T-Zellen mit *ivt*RNS-transfizierten PBMC. Dieses Protokoll wurde von Greenberg und Kollegen entwickelt, da man beobachtet hatte, dass wiederholte Stimulationen mit DC zu einem Verlust der hoch-aviden T-Zellen führen können (Ho et al., 2006). Die T-Zellen wurden

geerntet, gezählt und erneut mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro Vertiefung ausgesät und aufgrund der geringeren Größe von PBMC im Vergleich zu DC mit 1×10^7 PBMC versetzt. Zwei Tage später wurden erneut IL-2 (12,5 IU/ml) und IL-7 (5 ng/ml) zugegeben. Insgesamt zehn Tage nach der zweiten spezifischen Restimulation wurden die T-Zellen analog der zweiten Restimulation mit *iv*tRNS-transfizierten PBMC restimuliert.

Nach weiteren zehn Tagen wurden die CD8⁺ T-Zellen mit einem HLA-A*0201/WT1₁₂₆₋₁₃₄-Multimer (freundlicherweise von Prof. D. Busch bereitgestellt) sortiert.

3.1.11 KULTIVIERUNG VON PEPTIDSPEZIFISCHEN T-ZELLEN

T-Zellen, die mit dem HLA-A*0201/WT1₁₂₆₋₁₃₄-Multimer positiv selektiert wurden, wurden entweder als T-Zelllinie expandiert oder kloniert.

Für die Generierung einer T-Zelllinie wurden circa 50 CD8⁺/Multimer⁺-T-Zellen in eine Vertiefung einer 96-Loch-Rundbodenplatte gegeben. Für die Klonierung wurden die Zellen in limitierenden Verdünnungen in 96-Loch-Rundbodenplatten ausgesät. Rechnerisch fünf Zellen, eine Zelle und 0,3 Zellen pro Vertiefung wurden in 200 µl T-Zellklon-Medium kultiviert. Nach 14 Tagen wurden stark proliferierende T-Zellen in 24-Lochplatten umgesetzt und unspezifisch mit OKT-3-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 (LAZ-388, bestrahlt mit 150 Gy, 1×10^4 Zellen pro 96-Loch bzw. 1×10^5 Zellen pro 24-Loch) restimuliert. Alle drei Tage wurde IL-2 (50 IU/ml) zugesetzt, alle sieben Tage IL-7 (5 ng/ml) und IL-15 (10 ng/ml). Alle 14 Tage wurden die T-Zelllinie und T-Zellklone, wie beschrieben restimuliert und kultiviert.

3.1.12 KULTIVIERUNG VON J76-KLONEN

J76-T-Zellklone wurden rechnerisch als eine Zelle pro Vertiefung einer 96-Loch-Rundbodenplatte in Tumorzellmedium ausgesät. Als „Feederzellen“ wurden PBMC von fünf verschiedenen Spendern (bestrahlt mit 50 Gy, 1×10^5 Zellen pro 96-Loch) zugesetzt. Sobald die Zellen ausreichend proliferierten wurden sie in kleine 25 cm²-Zellkulturflaschen umgesetzt.

3.2 ARBEITEN MIT *ESCHERICHIA COLI*

3.2.1 KULIVIERUNG VON *E. COLI*

E.coli-Stämme (siehe Tab. 2.12) wurden auf Festmedium, d.h. auf LB-Agarplatten (siehe 2.14.2) bei 37°C oder als Übernachtskultur bei 150 rpm und 37°C in LB-Medium (siehe 2.14.2) im Schüttelinkubator inkubiert. Auf LB-Agarplatten waren die *E.coli*-Kolonien bei 4°C mehrere Wochen haltbar. Zur Langzeitlagerung wurden die Bakterien in 87 %igem Glycerin eingefroren (siehe 3.2.5) und bei -80°C gelagert. *E.coli* aus Glycerinkulturen wurden direkt zum Animpfen einer Übernachtskultur verwendet.

3.2.2 TRANSFORMATION KOMPETENTER BAKTERIEN MIT PLASMID-DNS MITTELS ELEKTROPORATION

Um größere Mengen an Plasmid-DNS zu erhalten, mussten elektrokompetente Bakterien (XL1-Blue) mit der benötigten Plasmid-DNS transformiert und expandiert werden. Hierzu wurde ein Aliquot der elektrokompetenten Zellen aufgetaut, 20 µl Bakteriensuspension mit 1 µg Plasmid-DNS vermischt, in Küvetten (0,1 cm) überführt und im Elektroporator *Gene Pulser Xcell* unter Einwirkung eines Elektropulses (1,8 kV) transformiert. Nach dem Elektropuls wurde umgehend 1 ml S.O.C.-Medium zugegeben, die Bakterienlösung in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 1 h auf 37°C im Heizblock inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Ansatz für zehn Minuten bei 950 g zentrifugiert, anschließend 800 µl des Überstands verworfen und die Bakterien in den verbleibenden 200 µl resuspendiert. Die transformierten Bakterien wurden auf einer LB-Agarplatte mit 100 µg/ml Ampizillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.2.3 CHEMISCHE TRANSFORMATION KOMPETENTER BAKTERIEN MIT PLASMID-DNS MITTELS HITZE-SCHOCK

Die Hitze-Schock-Methode war eine weitere Möglichkeit, um chemisch kompetente Bakterien, wie z.B. die *dam*⁻-Bakterien INV110, mit Plasmid-DNS zu transformieren. Hierzu wurde ein Aliquot der kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut, 50 µl Bakteriensuspension mit 1 µl Plasmid-DNS vermischt und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Darauf wurde die Plasmid-DNS-Bakterien-Suspension für genau 30 Sekunden in ein 42°C warmes Wasserbad gehalten. Nach dem Hitze-Schock wurden umgehend 250 µl warmes S.O.C.-Medium zugegeben und die Bakterienlösung für 1 h bei 37°C im Heizblock unter leichtem Schütteln von 300 rpm inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 100 µl des Ansatzes auf

einer LB-Agarplatte mit 100 µg/ml Ampizillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.2.4 SELEKTION UND EXPANSION TRANSFORMIERTER BAKTERIEN

Nur die Bakterienzellen, welche mit Plasmid-DNS, kodierend für ein ausgewähltes Protein und eine Ampizillin-Antibiotikaresistenz, transformiert worden waren, konnten auf Selektionsplatten (LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampizillin) wachsen und Kolonien bilden. Für eine nachfolgende MAXI-Plasmidpräparation wurden ein bis zwei Kolonien ausgewählt und zur Vorkultivierung in je 5 ml LB-Medium (100 µg Ampizillin/ml) überführt. Es folgte eine Inkubation über Tag im Schüttler bei 37°C und 150 rpm. Am Abend wurden 200 ml LB-Medium (100 µg Ampizillin/ml) mit 20 µl der Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Für eine MINI-Plasmidpräparation wurden zehn Bakterienkolonien am Abend in je 5 ml LB-Medium (100 µg Ampizillin/ml) gegeben und über Nacht wie oben beschrieben inkubiert. Am nächsten Tag wurden 800 µl der Bakteriensuspension eingefroren um einen Bakterienstock anzulegen. Mit dem Rest wurde eine Plasmid-DNS-Extraktion MAXI bzw. MINI durchgeführt.

3.2.5 EINFRIEREN TRANSFORMIERTER BAKTERIEN

Um die Bakterien einzufrieren, wurden 400 µl einer Übernachtbakterienkultur zu 84 µl 87 %igem Glycerin in einem Kryo-Röhrchen (1 ml) hinzugefügt, gemischt und zügig bei -80°C eingefroren.

3.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN

3.3.1 PLASMID-DNS-EXTRAKTION AUS TRANSFORMIERTEN BAKTERIEN

Nach Übernachtkultur wurde die Bakteriensuspension bei 5300 g und 4°C für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Plasmid-DNS je nach erwünschter Ausbeute mithilfe des „JETstar Plasmid Purification MAXI bzw. MINI Kits (Genomed)“ nach Angaben des Herstellers aus dem Zellsediment aufgereinigt. Die isolierte DNS wurde anschließend enzymatisch verdaut und die entstandenen Fragmente auf die richtige Größe mittels Gelelektrophorese getestet.

3.3.2 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, mit der es möglich ist einen bekannten DNS-Abschnitt mittels Oligonukleotiden („Primer“) *in vitro* zu amplifizieren (Saiki et al., 1986). Diese Primer sind komplementär zum zu amplifizierenden DNS-Strang und flankieren die Sequenz. Je nach PCR-Programm wiederholen sich die verschiedene Phasen der PCR (Denaturierung der DNS, Hybridisierung der Oligonukleotide an die DNS und Synthese des komplementären Stranges) in einer bestimmten Anzahl von Zyklen (zwischen 30-45mal), wodurch der zwischen den Oligonukleotiden liegende Sequenzbereich exponentiell vervielfältigt wird.

Für die PCR-Reaktionen, die für anschließende Klonierungen angesetzt wurden, wurde der PCR-Master-Mix (2x) von Promega verwendet. Dieses vorgefertigte Reagenz enthält eine *Taq*-DNS-Polymerase, dNTPs, $MgCl_2$ und einen geeigneten Reaktionspuffer (pH=8,5).

Die Standardbedingungen einer PCR beinhalteten die initiale Denaturierung bei 94°C für 2 Min., die Amplifikation bei 94°C für 30 Sek., 58°C für 30 Sek. und 72°C für 1 Min. (35 Zyklen), die Elongation bei 72°C für 10 Min. und die Kühlung bei 4°C.

3.3.3 ANALYSE DES TCR-V α β -REPERTOIRES

Das TCR-V α β -Repertoire der T-Zellen, die durch De-novo-Induktions-Experimente induziert wurden, wurde mit T-Zellrezeptor-Analysen untersucht. Hierfür wurden folgende Schritte durchgeführt: Isolierung der zellulären Gesamt-RNS, reverse Transkription der mRNA in cDNS, Amplifikation der TCR-V α - und TCR-V β -Gensegmente mit spezifischen Primern und Sequenzierung der PCR-Produkte.

Verschiedene 5'-Primer repräsentieren die Gensegmentfamilien der variablen (V α - bzw. V β -) Regionen der humanen TCR α - bzw. β -Kette. In jedem Ansatz wurde einer der 34 5'-Primer (V α -Region-spezifisch) mit einem im konstanten Bereich liegenden 3'-Primer (3'T-C) eingesetzt. So wurde ein für jede TCR 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 TCR β -PCR-Produkte, die mittels spezifischer 5'-Primer für 35 V β -Regionen und dem konstanten 3'-Primer (P-3'C β II) amplifiziert wurden, waren zwischen 190 und 290 bp groß. Das Kontroll-PCR-Produkt (P-5' β ST und P-3' β ST) hatte für die β -Kette eine Größe von 350 bp.

Die TCR-Repertoire-PCR-Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

1,5 μ l	cDNS
17,7 μ l	HPLC-H ₂ O

4,0 µl	PCR-Puffer (10x)
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	<u>Taq-DNS-Polymerase</u>
40 µl	Gesamtvolumen

Der Ablauf der TCR-PCR beinhaltete die initiale Denaturierung bei 94°C für 2 Min., die Amplifikation bei 94°C für 30 Sek., 56°C für 30 Sek. und 72°C für 1 Min. (35 Zyklen), die Elongation bei 72°C für 10 Min. und die Kühlung bei 4°C.

3.3.4 RESTRIKTIONSVERDAU VON DNS

Der Restriktionsverdau von Plasmid-DNS und PCR-Fragmenten, bei denen mittels geeigneter Primer in einer PCR-Reaktion geeignete Schnittstellen angefügt wurden, erfolgte in den vom Hersteller empfohlenen Inkubationspuffern in einem Zeitraum von 2-3 h beim Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms. Bei Verdau mit zwei Enzymen wurde der Puffer verwendet, der für beide Enzyme am kompatibelsten war, oder, falls das nicht möglich war, ein sequentieller Verdau durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung der DNS (siehe 3.3.5).

3.3.5 DNS-PRÄZIPITATION

Die Reinigung und Konzentration von Nukleinsäure aus wässrigen Lösungen erfolgte durch Fällung. Hierfür wurden zur Probe 1/20 Volumen 0,5 M EDTA, 1/10 Volumen 3 M Natrium-Azetat und das 2-fache Volumen an absolutem Ethanol (siehe Tab. 2.14) zugegeben, gemischt und für 1 h bei -20°C gefällt. Das Präzipitat wurde für 15 Minuten bei 17500 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abpipettiert und die DNS in Nuklease-freiem H₂O gelöst.

3.3.6 DEPHOSPHORYLIERUNG LINEARER DNS-FRAGMENTE

Um eine Religation linearisierter DNS mit kompatiblen Enden zu verhindern, wurden 5'-terminale Phosphatgruppen mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm abgespalten. 1 µg DNS wurde mit 1 U CIP (engl.: calf intestine phosphatase) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

3.3.7 LIGATION VON DNS-FRAGMENTEN

Die Ligation von passenden DNS-Fragmenten erfolgte mithilfe der T4-DNS-Ligase über Nacht auf 16°C [10 µl Ansatz in H₂O dest.; 1 µl T4-Ligase-Puffer (10x), 1 Unit T4-Ligase]. Vektor und Fragment wurden meistens im Verhältnis 1:3 eingesetzt. Während der gesamten Prozedur wurde auf Eis gearbeitet.

3.3.8 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE VON DNS

Eine Auftrennung von DNS-Fragmenten erfolgte über eine Gelelektrophorese. Die Agarose wurde in 1xTAE-Puffer aufgelöst und mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Je nach Größe der zu analysierenden Fragmente wurden Agarosekonzentrationen von 0,8-1,5 % verwendet. Um die Größe der Produkte zu bestimmen, wurde ein DNS-Größenstandard aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 100-120 V. Die Fragmentbanden wurden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert.

3.3.9 GEL-EXTRAKTION

Um DNS-Fragmente aus Agarosegelen zu extrahieren wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten und mit dem „Nucleo Spin Extract II Kit“ von Machery-Nagel nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.3.10 SEQUENZIERUNG

Zur Sequenzierung von dsDNS wurde die Didesoxynukleotid-Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977) angewandt. Die Durchführung erfolgte durch die Firma Sequiserve in Vaterstetten.

3.3.11 HERSTELLUNG VON EXPRESSIONSKONSTRUKTEN FÜR DIE GENERIERUNG VON IVTRNS

Die isolierte Plasmid-DNS bzw. die amplifizierten PCR-Produkte wurden mithilfe von Restriktionsenzymen geschnitten (siehe 3.3.4). Die geschnittenen Plasmide bzw. PCR-Produkte wurden anschließend über eine Gelelektrophorese aufgereinigt (siehe 3.3.8), der Vektor und die Insertion aus dem Gel eluiert (siehe 3.3.9) und ligiert (siehe 3.3.7). Die Ligation wurde mittels Elektroporation oder Hitze-Schock in *E.coli* transformiert (siehe 3.2.2).

und 3.2.3). In *E.coli* wurde die Plasmid-DNS amplifiziert, extrahiert und mit einer Restriktionsanalyse auf den Erfolg der Klonierung überprüft.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene cDNS-Spezies in Vektoren kloniert, die über einen T7-Promotor verfügten. Solche Vektoren waren der pCDNA3.1/Hygro-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) und der pGEM4Z-100A-Vektor (hergestellt von S. Milošević). Der pGEM4Z-100A-Vektor enthält einen Poy(A)-Bereich, wodurch es möglich war, direkt nach der *in-vitro*-Transkription der cDNS bereits polyadenylierte *ivt*RNS zu erhalten. Der nachträgliche Schritt der Polyadenylierung war für diese Konstrukte nicht mehr nötig. Mittels der T7-Promotoren in diesen Vektoren konnte durch den Prozess der *in-vitro*-Transkription *ivt*RNS der verschiedenen cDNS-Spezies hergestellt werden (siehe 3.3.14). Diese *ivt*RNS-Spezies konnten anschließend für die Transfektion von Zellen verwendet werden (siehe 3.3.17).

3.3.11.1 Herstellung der pGEM4Z-100A-TCR-Expressionskonstrukte

Die cDNS der TCR-Ketten V α 19, V β 5.2 und V β 13.2, die in der semi-allogenen De-novo-Induktion naiver T-Zellen identifiziert wurden (siehe 3.1.10), wurden von der Firma Geneart (Regensburg) synthetisiert. Zusätzlich zur TCR-cDNS-Sequenz wurden durch Geneart an den 5'- und 3'-Enden der Konstrukte entsprechende Restriktionsschnittstellen angefügt, durch die die TCR-cDNS leichter in pGEM4Z-100A-Vektoren kloniert werden konnte. Die TCR-Ketten-cDNS wurden von Geneart in pMA-Vektoren kloniert.

Die V α 19-cDNS wurde aus pMA (Geneart, Regensburg) durch Restriktion mit *Xba*I und *Kpn*I in pGEM4Z-100A subkloniert. Die V β 5.2-cDNS wurde mithilfe von *Xba*I und *Eco*RI aus dem pMA-Vektor geschnitten und in pGEM4Z-100A subkloniert. Für die Subklonierung der V β 13.2 cDNS in pGEM4Z-100A wurden die Restriktionsenzyme *Hind*III und *Kpn*I verwendet.

3.3.11.2 Herstellung des Expressionskonstrukts pCDNA3.1/Hygro-CD8 α

Die humane CD8 α -cDNS wurde mittels spezifischer Primer (siehe Tab. 2.7) aus dem Vektor pBullet-CD8 α (freundlicherweise bereitgestellt von W. Uckert, MDC, Berlin) amplifiziert. Der 5'-Primer enthielt eine Restriktionsschnittstelle für *Kpn*I, der 3'-Primer eine Restriktionsschnittstelle für *Xba*I. Die mithilfe dieser Primer amplifizierte CD8 α -cDNS wurde anschließend nach Restriktion mit *Kpn*I und *Xba*I in pCDNA3.1/Hygro subkloniert.

3.3.11.3 Klonierung der TCR α - und TCR β -Ketten von TyrF8 CTL

Um die cDNS der TCR α - und TCR β -Ketten von TyrF8 CTL zu klonieren, wurde die Gesamt-RNS aus TyrF8 CTL isoliert, mittels reverser Transkriptase in cDNS umgeschrieben, über spezifische Primer amplifiziert und anschließend in den Vektor pCDNA3.1/Hygro kloniert.

Die Amplifikation der TCR α -cDNS und TCR β -cDNS aus der TyrF8-cDNS wurde mit spezifischen Primern durchgeführt, die geeignete Restriktionsschnittstellen für die nachfolgende Klonierung enthielten (siehe Tab. 2.7). Das Amplifikat der TyrF8-TCR α -Kette wurde nach Restriktion mit *KpnI* und *XbaI*, das Amplifikat der TyrF8-TCR β -Kette nach Restriktion mit *BamHI* und *XbaI* in den Vektor pCDNA3.1/Hygro kloniert. Die TCR-Sequenzen wurden unter Verwendung des Primers T7 (siehe Tab. 2.8) über Sequenzierungen durch Sequiserve (Vaterstetten) validiert.

3.3.12 ISOLIERUNG VON ZELLULÄRE RNS

Zelluläre Gesamt-RNS wurde aus T-Zellen mithilfe des RNS/DNS/Protein-Isolierungs-Reagenz TRI Reagent® isoliert, das Phenol und Thiozyanat enthält. Mit bis zu 1×10^6 Zellen pro 200 μ l 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 darauffolgende Inkubation (zehn Minuten bei RT) führte zur Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe. 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 μ g Hefe tRNS („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 Sekunden gevortext wurde. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT wurde die Suspension 15 Minuten lang bei 12000 g 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 Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Präzipitation der RNS erfolgte mit einem Volumen Isopropanol, anschließender 10-minütiger Inkubation bei RT und Zentrifugation bei 12000 g für zehn Minuten bei 4°C . Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurde das RNS-Sediment mit 0,5 ml eiskaltem 75 %igen Ethanol (in DEPC-Wasser) acht Minuten lang bei 12000 g und 4°C gewaschen. Anschließend wurde das RNS-Sediment 3-5 Minuten luftgetrocknet und in 20 μ l Nuklease-freiem Wasser aufgelöst. Isolierte und aufgereinigte RNS-Spezies wurden bei -80°C gelagert.

3.3.13 cDNS-SYNTHESE MITTELS REVERSER TRANSKRIPTION

Die Reverse Transkription von zellulärer Gesamt-mRNS in cDNS wurde mithilfe des "First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)" nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Methode stützt sich auf die Fähigkeit der reversen Transkriptase des Vogel-Myeloblastose-Virus (engl.: avian myeloblastosis virus, AMV), mRNS in Einzel-Strang-DNS zu transkribieren. Als Primer für die RT-PCR diente ein Oligo-d(T)-Primer, der mit den 3'-Poly-A-Enden der eukaryotischen mRNS hybridisiert. Wenn die reverse Transkriptase das 5'-Ende der mRNS erreicht hat, generiert die terminale Transferaseaktivität des Enzyms Dideoxy-Terminationssequenzen. Die so genannte "1st strand"-cDNS kann dann als Vorlage in einer PCR verwendet werden. Für die reverse Transkription wurde eine Mischung hergestellt, die pro Ansatz (20 µl) folgende Reagenzienmengen enthielt:

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 RNase-freies H ₂ O	variabel
5 µl	RNS	variabel (~0,5-1 µg der Gesamt-RNS)
20 µl	Gesamtvolumen	

Der Ansatz wurde zehn Minuten bei 25°C, anschließend 60 Minuten bei 42°C inkubiert und zum Schluss für fünf Minuten auf 99°C erhitzt. Danach wurde der Ansatz auf Eis gestellt oder bei -20°C eingefroren.

3.3.14 PRODUKTION VON EINZEL-SPEZIES-IVT-RNS

Die Herstellung der Einzel-Spezies-*ivt*RNS beinhaltet vier Schritte: Die Linearisierung eines Plasmids, das die entsprechende cDNS („complementary“-Desoxyribonukleinsäure) enthielt, die *in-vitro*-Transkription mit anschließender Polyadenylierung der synthetisierten *ivt*RNS, sowie die Aufreinigung der *ivt*RNS. Um die notwendigen Mengen der Plasmid-DNS als cDNS-Matrize zu erhalten, wurde das Plasmid in kompetenten Bakterien amplifiziert.

Jedes Plasmid wurde mit dem entsprechenden Restriktionsenzym linearisiert, um eine geeignete Vorlage für die *in-vitro*-Transkription herzustellen (siehe 3.3.4). Da alle Plasmide einen T7-Promotor am 5'-Ende der cDNS, die das gewünschte Protein kodierte, enthielten, wurde die Transkription mithilfe der T7-RNS-Polymerase des mMESSAGING mMACHINE T7®

Kits nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Stabilität eines RNS-Moleküls und damit die Möglichkeit, es 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. In pDNS-Konstrukten, wie pCDNA3.1/Hygro, in deren Sequenz der Poly(A)-Schwanz nicht kodiert ist, wurden die *ivt*RNS-Spezies im Nachhinein mithilfe eines „Poly(A) Tailing“ Kits nach Angaben des Herstellers polyadenyliert. In pGEM4Z-100A-Konstrukten, die schon eine Poly(A)-Stelle in ihrer Sequenz enthielten war eine nachträgliche Polyadenylierung nicht mehr nötig (siehe 3.3.11.1). Nach der *in-vitro*-Transkription und *ivt*RNS-Aufreinigung (siehe 3.3.15), wurden circa 60-70 µg polyadenylierte *ivt*RNS pro 100 µl Eluat gemessen.

3.3.15 AUFREINIGUNG DER *IVT*RNS

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

3.3.16 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON RNS/DNS

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit einem Spektralphotometer bestimmt. Dazu wurde die Extinktion (optische Dichte, OD) der Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm in Quarzküvetten bestimmt. Als Maß für die Reinheit der Nukleinsäure dient der Quotient bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Für reine DNS sollte er 1,8 und für reine RNS 1,8 bis 2,0 betragen. Niedrigere Werte deuten auf Verunreinigungen mit Proteinen, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen und Zuckern hin.

3.3.17 DENATURIERENDE AGAROSE-GELELEKTROPHORESE VON RNS

Um eine Auflösung der Sekundärstrukturen zu erreichen, wurden die RNS-Proben zunächst mit RNS-Auftragspuffer versetzt und bei 70°C für zehn Minuten inkubiert. Für die Herstellung des 1xTAE-Puffers wurden DEPC-Wasser und ein 50xTAE-Puffer verwendet. Die Agarose wurde in dem entsprechenden Puffervolumen aufgelöst und mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Schließlich wurde für 45 Minuten eine Spannung von 80 V angelegt.

3.3.18 RNS-TRANSFEKTION VON ZELLEN 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. Unreife DC 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 schon die einfache Koinkubation von DC mit RNS zur Aktivierung von T-Zellen führte (Cella et al., 1999), hat man festgestellt, dass „aggressivere“ Methoden, wie die Elektroporation, die Aufnahme von RNS deutlich steigern konnten. Die Elektroporation induziert durch kurze elektrische Pulse eine reversible Permeabilität der Plasmamembranen, wodurch es zur Bildung hydrophiler Poren kommt, 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 $2-3 \times 10^6$ Zellen in mindestens 200 μl OptiMEM I Medium resuspendiert, in eine Elektroporationsküvette (0,4 cm) überführt und etwa drei Minuten auf Eis inkubiert. Das Kühlen der Suspension vor der Elektroporation führte dazu, dass der zelluläre Stoffwechsel heruntergefahren und ein Überhitzen der Zellsuspension verhindert wurde. 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 50 μl zugegeben, so dass das Gesamtvolumen der Suspension in der Küvette höchstens 250 μl betrug. Die Suspension wurde kurz durch Pipettieren gemischt und zügig elektroporiert. Die Elektroporation wurde mit dem Elektroporator *Gene Pulser Xcell* mit den für den jeweiligen Zelltyp angepassten Parametern durchgeführt (siehe Tab. 3.1). Sofort nach der Elektroporation wurden die gesamten Zellen in 4 ml vorgewärmtes Medium pro Vertiefung einer 6-Lochplatte transferiert. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert und in Versuche eingesetzt.

Zelltyp	Protokoll	Bedingungen
7d DC und 3d DC	exponentiell	250 V, 150 μF ; 0,4 cm Küvette
3d DC	exponentiell	300 V, 300 μF ; 0,4 cm Küvette
K562	exponentiell	300 V, 300 μF ; 0,4 cm Küvette
PBMC	Zeit-konstant	800 V, 5 ms; 0,4 cm Küvette
Jurkat	Zeit-konstant	400 V, 2,5 ms; 0,4 cm Küvette

Tab. 3.1: Elektroporationsbedingungen für verschiedene Zelltypen.

3.4 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, die die Detektion von intrazellulären Proteinen und Oberflächenmolekülen mittels spezifischer, an verschiedene Fluorochrome gekoppelte Antikörper ermöglicht. In einer Lösung befindliche Zellen werden durch eine Kapillare gesaugt und passieren einzeln einen Laserstrahl. Detektoren messen die durch die Zelle verursachte Lichtstreuung, die mit der Größe und der Granularität der Zelle korreliert. Das Vorwärtstreulicht (engl.: Forward Scatter, FSC) ist ein Maß für die Beugung des Lichts und ist abhängig vom Volumen der Zelle. Das Seitwärtstreulicht (engl.: Sideward Scatter, SSC) ist ein Maß für die Brechung des Lichts und ist abhängig von der Granularität der Zelle.

Dies ermöglicht eine Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen. Durch Setzen einer Eingrenzung („gate“) kann eine spezielle Zellpopulation gezielt betrachtet werden.

Zusätzlich können im Durchflusszytometer Fluoreszenzfarben gemessen werden. Eine Färbung der Zellen wurde durch fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen spezifische Oberflächenmarker oder intrazelluläre Proteine erreicht. Durch das Laserlicht werden die Fluoreszenzmoleküle angeregt. Die Fluoreszenzemission wird durch Detektoren gemessen und gibt eine Aussage über die Bindung der fluoreszenzgekoppelten Antikörper und somit über die Expression der markierten Moleküle.

Um die intrazelluläre eGFP-(„enhanced green fluorescent protein“)-Expression von eGFP-*ivf*RNS-transfizierten Zellen zu messen, war keine Färbung notwendig, da dieses Molekül selbst fluoresziert.

Die Durchflusszytometrie wurde an einem FACSTM („fluorescence activated cell sorter“) Calibur oder einem LSR-IITM durchgeführt, die Auswertung erfolgte über die CellQuestTM- und FlowjoTM-Software.

3.4.1 FÄRBUNG VON OBERFLÄCHENMOLEKÜLEN

Die Expression der meisten Oberflächenmoleküle wurde mit direkt fluoreszenzfarbstoffkonjugierten Antikörpern gemessen.

Die Zellen wurden geerntet, gezählt und je $0,5-3 \times 10^5$ Zellen in FACS-Röhrchen aufgeteilt und mit 500 μ l FACS-Puffer versehen. Es folgten fünf Minuten Zentrifugation bei 472 g, wobei sämtliche Zentrifugationsschritte in der Megafuge2.0 erfolgten. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 50 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Zu dieser Zellsuspension wurden unkonjugierte oder fluoreszenzmarkierte, monoklonale Antikörper (meist in einer 1:25 Verdünnung) gegeben. Die Inkubationszeit betrug 30-45 Minuten. Die Färbung wurde bei 4°C im Dunkeln durchgeführt. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen. Falls der primäre Antikörper nicht

fluoreszenzmarkiert war, erfolgte eine zweite Inkubation mit einem sekundären fluoreszenzgekoppelten Antikörper für weitere 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln. Schließlich wurden die Zellen zur Fixierung in 200 µl 1 % PFA in PBS aufgenommen. Falls eine Vitalitätsbestimmung mithilfe von Propidiumjodid (PI) (Endkonzentration: 0,5 µg/ml) durchgeführt werden sollte, wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und sofort im Durchflusszytometer analysiert. Um die PI-negativen, lebendigen Zellen wurde ein Fenster gelegt, so dass tote Zellen nicht in die Messung einbezogen wurden.

3.4.2 MULTIMERFÄRBUNG UND -SORTIERUNG

Um die Avidität der HLA-A2-restringierten, WT1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen bestimmen und eine Sortierung dieser Zellen im FACS AriaTM durchführen zu können, wurden die Zellen mithilfe von PE (Phycoerythrin)-konjugiertem HLA-A*0201/WT1₁₂₆₋₁₃₄-Multimer gefärbt.

Vor der Färbung wurden die Zellen zweimal gewaschen. Jeder Waschschrift beinhaltete die Resuspension der Zellen in 500 µl PBS/0,5 % HS, eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 300 g und das Verwerfen des Überstandes. Das Volumen, welches für die Inkubation gewählt wurde, war von der Zellzahl abhängig. Bis zu 1x10⁶ Zellen wurden in 50 µl für 25 Minuten mit dem Multimer bei 4°C inkubiert (Verdünnung = 1:25). Für eine Sortierung von HLA-A2-restringierten, WT1-Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurden bis zu 5x10⁶ Zellen in 100 µl PBS/0,5 % HS mit Multimer gefärbt (Verdünnung = 1:15-1:20). Danach wurde zusätzlich für 25 Minuten ein APC (Allophycocyanin)-konjugierter Anti-CD8-Antikörper im Verhältnis 1:50 zugesetzt. Nach der Färbung wurden die Zellen zweimal gewaschen, in PBS/0,5 % HS aufgenommen und gegebenenfalls mit PI (Endkonzentration: 0,5 µg/ml) für die Vitalitätsbestimmung versetzt. Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert oder Multimer⁺/CD8⁺ -T-Zellen mit einem FACS AriaTM (am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Technische Universität, München) sortiert.

3.4.3 FÄRBUNG VON INTRAZELLULÄREN PROTEINEN

Für eine intrazelluläre Färbung von Proteinen erfolgte zunächst eine Fixierung der Zellen durch 1 %ige PFA-Lösung für 30 Minuten auf Eis. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und in 500 µl 0,1 %iger Saponinlösung resuspendiert. Saponin bewirkt eine Permeabilisierung der Membran und ermöglicht so den Eintritt des Antikörpers und dessen Bindung an intrazelluläre Proteine. Es folgte eine Zentrifugation in der Megafuge 2.0 bei 607 g für vier Minuten. Das Zellsediment wurde in 50 µl 0,25 %iger Saponinlösung aufgenommen, der primäre Antikörper zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde erneut zentrifugiert, das Zellsediment in 500 µl 0,1

%iger Saponinlösung resuspendiert und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Das Zellsediment wurde in 50 µl 0,25 % Saponinlösung aufgenommen, ein fluoreszenz-konjugierter sekundärer Antikörper zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden nochmals 500 µl 0,1 % Saponinlösung zugegeben, zentrifugiert und das Zellsediment in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert.

3.4.4 FÄRBUNG VON INTRAZELLULÄREM IL-2

Für die intrazelluläre Färbung des Zytokins IL-2 in Jurkat-76-Zellen wurden die zu färbenden Zellen während der Phase, in der sie mit PMA und Ionomycin stimuliert wurden und IL-2 produzierten mit 10 µg/ml Brefeldin-A (BFA) inkubiert. BFA inhibiert den Transport von Proteinen in den Golgi-Apparat und führt dadurch zu einer Akkumulation von Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum. Die verminderte Sekretion von IL-2 hat eine Zunahme der intrazellulären Konzentration von IL-2 zur Folge, wodurch größere Mengen an IL-2 bei der intrazellulären Färbung detektiert werden können. Da durch eine Behandlung der Zellen mit BFA der Transport sämtlicher Proteine in den Golgi-Apparat inhibiert wurde, war keine zusätzliche Färbung von Oberflächenmolekülen (z.B. CD25) im selben Ansatz möglich. Die intrazelluläre Färbung wurde wie unter 3.4.3 beschrieben durchgeführt, nur war hier keine Inkubation mit sekundärem Antikörper nötig, da ein FITC (Fluoreszeinisothiozyanat)-konjugierter IL-2-Antikörper verwendet wurde. Für eine Vitalitätsbestimmung wurden die Zellen vor der Fixierung mit 1 %iger PFA-Lösung mit 7-AAD (7-Aminoaktinomycin D; Endkonzentration: 5 µg/ml) inkubiert.

3.4.5 MAGNETISCHE SEPARATION VERSCHIEDENER ZELLPOPULATIONEN

Mithilfe von Antikörpern, die an Oberflächenmoleküle auf Zellen binden, können spezifische Zelltypen aus einer größeren heterogenen Zellpopulation separiert und analysiert werden. Das Prinzip beruht auf der Inkubation der Zellsuspension mit Antikörpern, welche an superparamagnetische Partikel gekoppelt sind, und der anschließenden Trennung der gebundenen von nicht gebundenen Zellen am Magneten (MACS: „Magnetic cell sorting“, Miltenyi). Man unterscheidet hier zwischen der **positiven Separation**, bei der die Antikörper an einen spezifischen Marker binden und die Zellen von Interesse anhand dieses Markers von den restlichen Zellen separiert werden (siehe 3.4.5.2) und der **negativen Separation** bzw. **Depletion**, bei der die Antikörper an verschiedene Marker derjenigen Zellen binden, die von der gewünschten Zellpopulation abgetrennt werden sollen (siehe 3.4.5.1).

3.4.5.1 CD8⁺ T-Zell-Isolierung mittels negativer Depletion

Die Anreicherung und Separation von CD8⁺ CTL aus PBMC, die für eine De-novo-Induktion eingesetzt wurden, erfolgte mit dem CD8⁺ T cell isolation kit II (Miltenyi). Mithilfe dieses Kits werden alle CD8⁻ Zellen mit spezifischen Antikörpern markiert und anschließend über das MACS-System abgetrennt.

Die Zellen wurden gezählt, bei 607 g zehn Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Sämtliche Zentrifugationsschritte erfolgten in der Megafuge2.0. Das Zellsediment wurde in 40 µl MACS-Puffer (0,5 % Humanserum und 2 mM EDTA in PBS) pro 1×10^7 Zellen resuspendiert. Es wurden 10 µl Biotin-AK-Cocktail pro 1×10^7 Zellen zugegeben, gemischt und zehn Minuten bei 4°C inkubiert. In diesem Cocktail befinden sich Antikörper gegen Oberflächenmarker von CD8⁻-Zellen, wie z.B. CD4⁺-Zellen, NK-Zellen und B-Zellen. Anschließend wurden 30 µl MACS-Puffer und 20 µl magnetische Anti-Biotin-Kügelchen pro 10^7 Zellen zugesetzt und für weitere 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden mit MACS-Puffer gewaschen und bis zu 1×10^8 Zellen in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert.

Die Zellsuspension wurde auf eine LS-Säule geladen, die an einem Magneten fixiert war. Die markierten Zellen verblieben somit in der Säule, während das Säuleneluat nur die unmarkierten CD8⁺-Zellen enthielt. Um eine höhere Ausbeute zu erzielen, wurde die Säule dreimal mit MACS-Puffer gewaschen. $0,5 \times 10^5$ Zellen der angereicherten Fraktion wurden anschließend mit fluoreszenzkonjugierten Anti-CD3- und Anti-CD8-Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer auf ihre Reinheit überprüft. In der Regel enthielt das Eluat circa 80 % CD3⁺/CD8⁺-Zellen.

3.4.5.2 Anreicherung IL-2⁺ Jurkat-Zellen mittels positiver Separation

Um diejenigen Zellen aus einer Gesamtpopulation von Jurkat-76-Zellen zu separieren, die nach Stimulation mit PMA/Ionomycin IL-2 sezernierten, erfolgte eine positive Separation der Zellen mithilfe des MACS-Systems und des humanen „IL-2 secretion assay“ von Miltenyi.

Die IL-2-Sortierung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und beinhaltete die Markierung der Zellen mit IL-2-Fänger-Reagenz, eine IL-2-Sekretionsperiode und die Markierung der Zellen mit einem IL-2-Detektionsantikörper und magnetischen Molekülen, die ein separieren der IL-2-sezernierenden Zellen ermöglichten.

Im ersten Schritt des „IL-2 secretion assay“ bindet ein IL-2-spezifisches Fänger-Reagenz an die Zelloberfläche aller Zellen (Leukozyten). Die Zellen wurden zunächst gezählt. Maximal 10^7 Zellen wurden mit 10 ml kaltem MACS-Puffer gewaschen und für zehn Minuten bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 80 µl kaltem Medium resuspendiert. Anschließend wurden 20 µl IL-2-Fänger-Reagenz dazugegeben und die Zellsuspension nach sorgfältigem Mischen fünf Minuten bei 4°C inkubiert.

Danach erfolgte eine kurze Inkubationszeit bei 37°C, in der die Zytokinsekretion ermöglicht wurde. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit warmem Medium verdünnt. Die Höhe der Verdünnung richtete sich nach der erwarteten Zahl IL-2-sezernierender Zellen. Wichtig war eine ausreichende Verdünnung, um zu verhindern, dass sich die Zellen während der IL-2-Sekretionsperiode berührten. Die Zellen wurden in 50 ml Falcon-Röhrchen für 45 Minuten im Brutschrank inkubiert und alle fünf Minuten durch Drehen der Röhrchen gemischt. Zur Färbung der Zellen mit einem PE-gekoppelten IL-2-Detektionsantikörper wurden die Zellen mit kaltem MACS-Puffer gewaschen und für zehn Minuten bei 300 g bei 4°C zentrifugiert, das Zellsediment in 80 µl kaltem MACS-Puffer aufgenommen und mit 20 µl IL-2-Detektionsantikörper gemischt. Für eine zusätzliche CD3- bzw. CD8-Färbung wurden 10 µl des jeweiligen Antikörpers dazugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation der Zellsuspension bei 4°C wurden die Zellen wie oben beschrieben mit 10 ml kaltem MACS-Puffer gewaschen. Zur magnetischen Markierung der Zellen wurde das Zellsediment in 80 µl kaltem MACS-Puffer gelöst, mit 20 µl superparamagnetischen Anti-PE-Kügelchen versehen und 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen der Zellen mit MACS-Puffer wurde das Zellsediment in 500 µl kaltem MACS-Puffer aufgenommen und die IL-2⁺ Zellen durch MS-Säulen über einen MACS-Magneten separiert. Die IL-2⁺ Zellen verblieben nach mehreren Waschrufen in der Säule und wurden mithilfe eines Stempels aus der Säule herausgedrückt.

3.5 FUNKTIONSANALYSEN

3.5.1 PEPTIDBELADUNG VON T2-ZELLEN

T2-Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^6 /ml mit 10 µg/ml Peptid und 10 µg/ml β₂-Mikroglobulin für 2 h bei 37°C und 5 % CO₂ unter regelmäßigem Mischen in einem 15 ml Falcon-Röhrchen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal gewaschen, wodurch ungebundene Peptide entfernt wurden.

3.5.2 INKUBATION VON DC MIT LANGEM MELAN-A-PEPTID (P70)

$3-4 \times 10^6$ DC wurden mit langem Melan-A-Peptid (p70) in unterschiedlichen Konzentrationen in einer 6-Lochplatte 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, um nicht aufgenommenes Peptid zu entfernen.

3.5.3 STIMULATION VON JURKAT-ZELLEN MIT PMA/IONOMYZIN

Zur TCR-unabhängigen Stimulation von Jurkat-T-Zellen wurden diese je nach Zellzahl und späterer Anwendung in 96-Loch-, 48-Loch- bzw. 24-Lochplatten 24 h lang bei 37°C und 5 % CO₂ mit 5 ng/ml PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat), oder mit 5 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert. Die Zellen wurden vor einer weiteren Verwendung einmal gewaschen.

3.5.4 DC-MIGRATIONS-ANALYSE

Um DC auf ihre Migrationsfähigkeit zu untersuchen, wurden sie in einen Migrationsversuch eingesetzt (Schaft et al, 2005). Dazu wurden iDC bzw. mDC geerntet, gewaschen und auf eine Konzentration von 2×10^5 Zellen/100 µl DC-Migrations-Medium eingestellt. In die untere Kammer einer 24-Loch-„Transwell“-Platte wurden 600 µl DC-Migrations-Medium mit bzw. ohne 100 ng/ml CCL19 als Ligand für den Chemokinrezeptor CCR7 vorgelegt. 2×10^5 Zellen wurden in die obere Kammer gegeben und 2 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. DC können durch eine Membran aus der oberen Kammer in die untere Kammer wandern. DC aus der oberen bzw. unteren Kammer wurden geerntet und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

3.5.5 SPEZIFISCHE STIMULATION VON T-ZELLEN

Für eine spezifische Stimulation von T-Zellen wurden entweder antigenpräsentierende DC, T2- oder Tumorzellen verwendet. In jedem Fall wurde ein Verhältnis von Stimulationszellen zu Effektorzellen von 2:1 gewählt.

Bei Verwendung von DC als Stimulationszellen wurden diese zunächst entweder mit *ivt*RNS transfiziert oder mit Peptid beladen. 24 h nach EP bzw. Peptidbeladung wurden die DC zu 4×10^4 Zellen in 100 µl DC-Medium in eine Vertiefung einer 96-Lochplatte ausgesät. 2×10^4 T-Zellen in 100 µl T-Zell-Medium wurden zugegeben, so dass das Endvolumen pro Vertiefung 200 µl betrug. Bei Verwendung von Tumorzellen bzw. peptidbeladenen T2-Zellen als Stimulationszellen wurde mit den gleichen Zellkonzentrationen gearbeitet. Sollte nach spezifischer Stimulation der T-Zellen die Menge an sezerniertem IL-2 bestimmt werden, so wurden ebenfalls 4×10^4 Stimulationszellen mit 2×10^4 T-Zellen in 200 µl Endvolumen in einer 96-Lochplatte kokultiviert.

Sollte nach spezifischer Stimulation der T-Zellen die CD25-Expression bestimmt werden, so wurden 2×10^5 Stimulationszellen mit 1×10^5 T-Zellen in einer 48-Lochplatte in einem Endvolumen von 1 ml kokultiviert.

In allen Stimulationsansätzen wurden nach 24-stündiger Inkubation der Ansätze bei 37°C und 5 % CO₂ entweder 160 µl des Überstandes der Stimulationsansätze geerntet und bis zur

weiteren Analyse bei -20°C eingefroren oder die gesamten Zellen geerntet und sofort für eine durchflusszytometrische Analyse eingesetzt.

3.5.6 IFN γ -ELISA

Die IFN γ -Freisetzung von Effektorzellen wurde aus 50 μl eines Überstandes eines Stimulationsansatzes mittels ELISA unter Verwendung des „OptEIA™ Human IFN γ Set“ von BD nach Angaben des Herstellers bestimmt.

Die Methode beruht auf dem Prinzip, dass das zu detektierende lösliche Protein mithilfe eines spezifischen Antikörpers, der an den Plattenboden haftet, eingefangen wird. Das so gebundene Protein kann dann von einem zweiten, spezifischen, markierten Antikörper detektiert werden.

Am Vortag wurden 96-Loch-Flachbodenplatten mit einem spezifischen Fängerantikörper (1:250 Verdünnung in ELISA-Beschichtungspuffer), beschichtet und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit 1 %igem Milchpulver in PBS 1 h bei RT blockiert, und dreimal mit Waschpuffer (0,05 % Tween 20 in PBS) gewaschen.

Der im Kit enthaltene IFN γ -Standard wurde mit dem entsprechenden Medium des Stimulationsansatzes seriell verdünnt. Anschließend wurden je 50 μl der Standardverdünnungen oder 50 μl der Überstände in eine Vertiefung der beschichteten 96-Lochplatte pipettiert und 1-2 h bei RT inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit Waschpuffer wurden 50 μl eines biotinylierten Maus-Anti-IFN γ -Detektionsantikörper zusammen mit Avidin-konjugierter Rettich-Peroxidase (1:250), in 1 %igem Milchpulver in PBS zugesetzt, 1 h bei RT inkubiert und siebenmal gewaschen. Durch die Zugabe von 100 μl Lösung A (H_2O_2) in Kombination mit Lösung B (Tetramethylbenzidin) erfolgte eine enzymatische Reaktion, die in der Bildung eines blauen Farbstoffs resultierte und somit den Komplex aus Fängerantikörper, IFN γ , biotinyliertem Detektionsantikörper und Avidin-konjugierter Peroxidase sichtbar machte. Diese Reaktion wurde durch 50 μl 1M Phosphorsäure gestoppt, worauf sich die Lösung gelb färbte. Die Farbintensität war proportional zu der umgesetzten Substratmenge und somit indirekt proportional zur Menge an gebundenem IFN γ . Die Messung der optischen Dichte und die Berechnung der IFN γ -Konzentration der zu analysierenden Proben erfolgte im *ELISA reader sunshine* mithilfe von Standardkurven, die anhand der bekannten Standardkonzentrationen erstellt wurden. Es wurden jeweils Mittelwerte aus Duplikaten oder Triplikaten ermittelt.

3.5.7 IL-2-ELISA

Der IL-2-ELISA wurde analog zum IFN γ -ELISA mithilfe des „OptEIA™ Human IL-2 Set“ von BD nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hier wurden ein IL-2-Standard und IL-2-Fänger- bzw. -Detektionsantikörper verwendet.

3.5.8 ⁵¹CHROM-FREISETZUNGS-VERSUCH

Die zytotoxische Aktivität der erhaltenen WT1-Multimer⁺/CD8⁺ T-Zelllinie wurde in 4 h Standard ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuchen analysiert. Die Tumorzellen K562-A2 (WT1⁺/A2⁺) und RCC26 (WT1⁻/A2⁺) wurden als Zielzellen verwendet. 1x10⁶ Zielzellen wurden mit radioaktivem Natrium-Chromat (Na₂⁵¹CrO₄ = Abk.: ⁵¹Cr) (200 μ Ci) 1-1,5 h 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/Vertiefung einer 96-Loch-Spitzbodenplatte in 100 μ l RPMI III-Medium kokultiviert. Diese serielle Verdünnung der T-Zellen ergab unterschiedliche Effektor-zu-Zielzell-Verhältnisse.

Nach 4 h Koinkubation bei 37 °C wurden 50 μ l des Überstandes abgenommen 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 %.

3.6 COMPUTERANALYSEN

3.6.1 CELLQUESTPRO™ UND FLOJO™

Zur Auswertung der am FACSCalibur™ bzw. LSR-II™ generierten Daten, wurden die Computerprogramme CellQuestPro™ und FloJo™ herangezogen. Diese ermöglichten eine Berechnung der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) und des prozentualen Anteils der Zellpopulation, die den jeweiligen fluoreszenzmarkierten Antikörper gebunden hatte.

3.6.2 CLONE MANAGER 5™

Zur *in-silico*-Klonierung und zur Planung von Restriktionsanalysen wurde das Computerprogramm Clone Manager 5™ verwendet.

4 ERGEBNISSE

4.1 DE-NOVO-INDUKTION VON HLA-A2-RESTRINGIERTEN, WT1-SPEZIFISCHEN CD8⁺ T-ZELLEN

Eines der primären Ziele dieser Doktorarbeit war die Generierung von HLA-A2-restringierten, WT1-spezifischen, zytotoxischen T-Zellen. Diese T-Zellen sollten in der Lage sein, HLA-A2-positive, WT1-exprimierende Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren.

Als Methode, um hoch-avide, WT1-spezifische T-Zellen zu erhalten, wurde die De-novo-Induktion von naïven T-Zellen im „semi-allogenen“ System gewählt. In diesem System werden T-Zellen auf ein für sie fremdes MHC-Molekül (hier: HLA-A2) restringiert. Die so generierten, WT1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen haben den Prozess der negativen Selektion im Thymus nicht durchlaufen. Durch die negative Selektion während der T-Zellentwicklung werden normalerweise hoch-avide T-Zellen für körpereigene Antigene, die auf „Selbst“-MHC-Molekülen präsentiert werden eliminiert, um mögliche Autoimmun-Effekte dieser T-Zellen zu verhindern. T-Zellen, die „Selbst“-Peptide auf „Selbst“-MHC-Molekülen mit niedriger Affinität erkennen, entwickeln sich weiter. T-Zellen, spezifisch für „Fremd“-Peptide (z.B. virale Peptide) auf „Selbst“-MHC-Molekülen oder spezifisch für „Fremd“-MHC entwickeln sich ebenfalls weiter, da diese „fremden Moleküle“ nicht im Thymus präsentiert werden.

Zur Stimulation naïver T-Zellen wurden dendritische Zellen (DC) verwendet, da sie die potentesten antigenpräsentierenden Zellen darstellen. Durch das Einbringen eines fremden MHC-Moleküls (hier HLA-A2) zusammen mit dem WT1-Antigen in die DC kann man an ein Repertoire von hoch-aviden, WT1-spezifischen T-Zellrezeptoren gelangen. In der vorliegenden Arbeit wurden CD8⁺ T-Zellen eines HLA-A2-negativen Spenders mit reifen dendritischen Zellen (mDC) desselben Spenders kokultiviert. Die DC wurden vor der Kokultur mit zwei verschiedenen Spezies *in-vitro*-transkribierter RNS (*ivt*RNS) elektroporiert, wobei die eine Spezies für das allogene MHC-Molekül HLA-A2, die andere für das tumorassoziierte Antigen WT1 kodierte. Die mit *ivt*RNS transfizierten DC präsentierten kurze Zeit nach der Elektroporation WT1-(„Selbst“-)Peptide auf HLA-A2-(„Fremd“-)MHC-Molekülen auf ihrer Oberfläche. Die Elektroporation von *ivt*RNS hat im Vergleich zur Peptidbeladung von DC den entscheidenden Vorteil, dass das gesamte TAA in der Zelle prozessiert wird, wodurch theoretisch eine Vielzahl immunogener Epitope auf den DC präsentiert und T-Zellen, spezifisch für diese verschiedenen Epitope erhalten werden können.

In unserem Labor wurde bereits früher gezeigt, dass es mithilfe des „semi-allogenen“ De-novo-Induktionsansatzes tatsächlich möglich ist, höher avide antigenspezifische T-Zellen als

im „autologen“ System zu erhalten (Wilde et al., 2009). Im autologen System wurden CD8⁺ T-Zellen eines HLA-A2-positiven Spenders mit DC stimuliert, die nur mit TAA-*ivf*RNS elektroporiert worden waren. Da hier HLA-A2-positive T-Zellen das „Selbst“-Antigen in einem HLA-A2-(„Selbst“-MHC)-abhängigen Kontext erkannten, konnten nur T-Zellen erhalten werden, die schon negativ selektiert wurden und somit niedrig-avid für das entsprechende TAA waren.

4.1.1 PRINZIP DER „SEMI-ALLOGENEN“ DE-NOVO-INDUKTION VON HLA-A2-RESTRINGIERTEN, WT1-SPEZIFISCHEN T-ZELLEN

Im Gegensatz zu dem schon im Labor etablierten „semi-allogenen“ Stimulationsansatz mit in sieben Tagen ausgereiften DC (7d DC), sollte für die De-novo-Induktion von WT1-spezifischen T-Zellen ein „semi-allogener“ Ansatz mit DC, die innerhalb von drei Tagen aus Monozyten ausdifferenzieren, verwendet werden (3d DC). Im Vergleich zu 7d DC, können diese 3d DC in einer kürzeren Zeitspanne und unter Einsatz geringerer Zytokinmengen aus Monozyten generiert werden (siehe Abschnitt 4.2 f). Bereits William Y. Ho und Kollegen zeigten, dass in zwei Tagen generierte DC („Fast DC“) in der Lage waren, naive T-Zellen zu stimulieren, jedoch wurden die DC in diesen Versuchen nur extrazellulär mit Peptid beladen (Ho et al., 2006). Hier war also, im Gegensatz zur Elektroporation mit *ivf*RNS, keine Prozessierung des Antigens nötig. In Anlehnung an das Protokoll von William Y. Ho et al. wurde in dieser Arbeit nur die Primärstimulation der T-Zellen mit DC durchgeführt. Für die zweite und dritte Stimulation der T-Zellen, die nach jeweils 10 Tagen erfolgte, wurden mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) verwendet, die zuvor mit *ivf*RNS elektroporiert worden waren (Abb. 4.1). In der Literatur wird beschrieben, dass eine wiederholte Stimulation von naiven T-Zellen mit DC zu einem Verlust der antigenspezifischen T-Zellen führen kann, möglicherweise durch den Prozess des „aktivierungsinduzierten Zelltods“ (engl.: activation induced cell death, AICD), der durch eine Interaktion von hoher Avidität zwischen T-Zellen und DC ausgelöst werden kann. Durch Interaktionen der T-Zellen mit PBMC, die weniger potente antigenpräsentierende Zellen enthalten, können die T-Zellen zwar ein stimulatorisches Signal erhalten, der Verlust von antigenspezifischen T-Zellen kann jedoch möglicherweise verhindert werden (Ho et al., 2006).

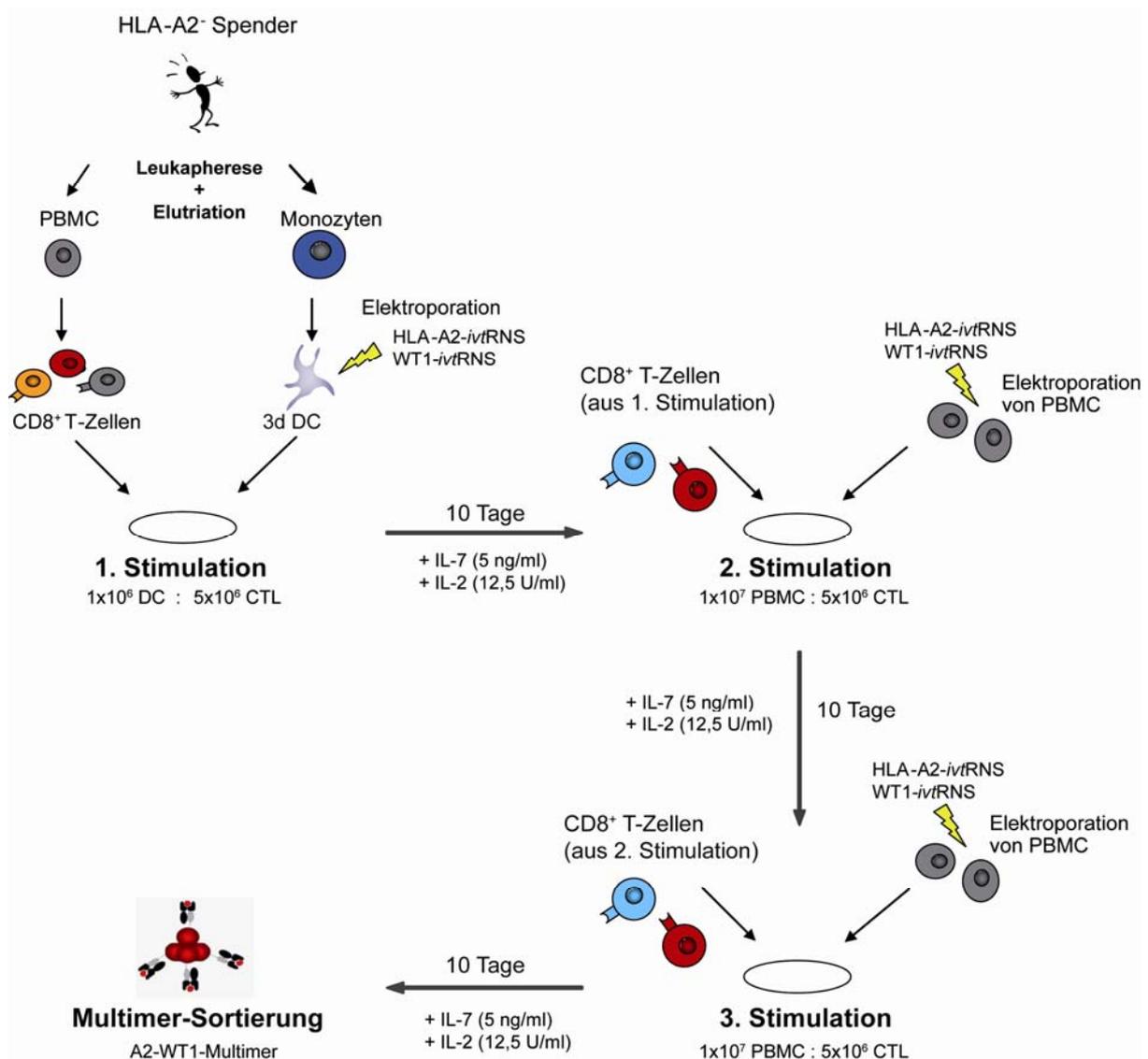


Abb. 4.1: Protokoll für die De-novo-Induktion von HLA-A2-restringierten, WT1-spezifischen, zytotoxischen T-Lymphozyten im „semi-allogenen“ System. Zur Primärstimulation von naiven CD8⁺ T-Zellen wurden Monozyten und PBMC eines HLA-A2-negativen Spenders isoliert. Durch negative Depletion wurden CD8⁺ T-Zellen aus PBMC angereichert, reife dendritische Zellen wurden unter Verwendung des „Jonuleit-Cocktails“ nach drei Tagen aus den Monozyten differenziert (3d mDC). Die 3d mDC wurden mit 24 µg HLA-A2-ivtRNS und 48 µg WT1-ivtRNS elektroporiert und circa 9 h nach der Transfektion mit CD8⁺ T-Zellen kokulturiert. Nach 10 Tagen Kokultur unter Zugabe von IL-2 (12,5 U/ml) und IL-7 (5 ng/ml) erfolgte eine zweite Stimulation mit HLA-A2- und WT1-ivtRNS-transfizierten PBMC. Nach weiteren 10 Tagen Kokultur erfolgte eine dritte Stimulation, die identisch durchgeführt wurde wie die zweite Stimulation. Nach weiteren 10 Tagen Kokultur wurden die T-Zellen mit einem HLA-A*0201/WT1₁₂₆₋₁₃₄-Multimer sortiert. Positiv sortierte T-Zellen wurden als T-Zelllinie etabliert bzw. über ein limitierendes Verdünnungsverfahren kloniert.

Da für den De-novo-Induktionsansatz eine große Anzahl an DC und PBMC nötig war, wurde im Vorfeld eine Leukapherese und Elutriation des Blutes eines gesunden, HLA-A2-negativen Spenders durchgeführt. Bei einer Elutriation wird das Leukaphereseprodukt durch mehrere Zentrifugationsschritte in Monozyten und Lymphozyten aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden direkt nach der Elutriation eingefroren und konnten bei Bedarf aufgetaut werden.

Die CD8⁺ T-Zellen wurden mittels negativer Depletion und magnetischer Separation aus den PBMC herausortiert, wodurch eine Reinheit von circa 80 % erreicht werden konnte. Die reifen 3d DC wurden aus Monozyten unter Verwendung des „Jonuleit-Cocktails“ (100 ng/ml GM-CSF, 20 ng/ml IL-4, 10 ng/ml IL-1 β , 15 ng/ml IL-6, 10 ng/ml TNF- α und 1000 ng/ml PGE₂) generiert. An Tag 3 wurden die reifen DC mit 48 μ g WT1-*ivtRNS* und 24 μ g HLA-A2-*ivtRNS* elektroporiert. 9 h nach der Elektroporation wurden je 1x10⁶ DC mit 5x10⁶ isolierten CD8⁺ T-Zellen in Vertiefungen einer 24-Lochplatte kokultiviert. Die folgenden Stimulationen der CTL verliefen analog zur Primärstimulation, nur wurden hier, wie oben schon beschrieben, *ivtRNS*-transfizierte PBMC als Stimulatorzellen verwendet. Aufgrund ihrer geringeren Größe im Gegensatz zu den DC wurden je 1x10⁷ PBMC zu 5x10⁶ CTL gegeben. Die Zugabe der Zytokine IL-2 und IL-7 erfolgte erst jeweils zwei Tage nach einer Stimulation, da dies zu einer effizienteren Expansion der antigenspezifischen T-Zellen im Gegensatz zu unspezifischen T-Zellen führen sollte.

4.1.2 PROTEINEXPRESSION NACH ELEKTROPORATION VON *ivtRNS* IN DC UND PBMC

Während des unter 4.1.1 beschriebenen Stimulationsprotokolls wurden durchflusszytometrische Analysen der *ivtRNS*-transfizierten DC bzw. PBMC durchgeführt, um die Elektroporationseffizienz und die Proteinexpression von HLA-A2 und WT1 nach jeder Transfektion zu überprüfen (Abb. 4.2). Zu diesem Zweck wurden die Stimulatorzellen jeweils 7 h nach der Elektroporation von *ivtRNS* mit einem spezifischen Antikörper für das Oberflächenmolekül HLA-A2 und jeweils 3 h nach der Elektroporation mit einem spezifischen Antikörper für das intrazelluläre Protein WT1 gefärbt.

Die Zeitpunkte der Färbung wurden je nach der vorher bestimmten optimalen Expression der Proteine nach der Elektroporation von *ivtRNS* gewählt. Wie in Abb. 4.2 A zu erkennen ist, exprimierten 40 % der DC das MHC-Molekül HLA-A2 7 h nach der Elektroporation, PBMC, die für die zweite und dritte Stimulation der T-Zellen verwendet wurden, exprimierten sogar zu 70 % das HLA-A2-Molekül. Dies deutete darauf hin, dass eine ausreichende Anzahl an Stimulatorzellen HLA-A2 auf ihrer Oberfläche trugen und den naiven CD8⁺ T-Zellen präsentieren konnten. Wie in Abb. 4.2 B zu erkennen ist, war die Expression von WT1 im Vergleich zu HLA-A2 deutlich geringer. Nur circa 1 % bis 7 % der DC bzw. PBMC exprimierten das Antigen. Da beide *ivtRNS*-Spezies vor der Elektroporation gemischt wurden und die HLA-A2-*ivtRNS*, wie unter Abb. 4.2 A gezeigt wurde, gut in die Zelle transfiziert werden konnte, sollte dies auch für die WT1-*ivtRNS* der Fall sein. Möglicherweise war die schlechte WT1-Expression darauf zurückzuführen, dass das Protein, ein Transkriptionsfaktor, sehr schnell in den Nukleus gelangt und nur kurze Zeit im Zytosol

vorliegt. Die im Gegensatz zu den PBMC deutlich schlechtere Expression von HLA-A2 in den 3d DC könnte möglicherweise auf diesen, in einer relativ kurzen Zeit generierten DC-Typ zurückzuführen sein. Wie schon unter 4.1.1 erwähnt, wurden die in kürzerer Zeit generierten DC („Fast DC“) in den Stimulationsansätzen, die in der Literatur bisher beschrieben wurden, nur von außen mit Peptid beladen. Möglicherweise unterscheiden sie sich deutlich in ihren Fähigkeiten Antigen aufzunehmen, zu prozessieren und zu präsentieren als auch in ihren Stimulationsfähigkeiten von den in sieben Tagen generierten DC (7d DC).

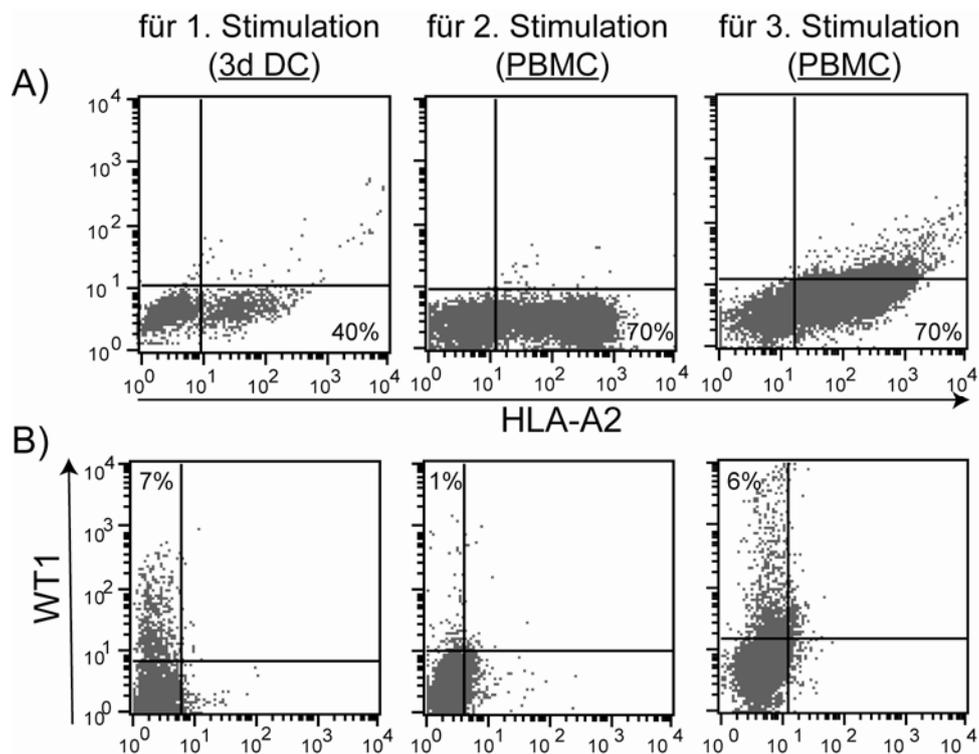


Abb. 4.2: Bestimmung der Proteinexpression in 3d DC und PBMC nach Elektroporation von HLA-A2- bzw. WT1-ivtRNS mittels Durchflusszytometrie. A) 7 h nach Elektroporation von 24 μ g HLA-A2-ivtRNS in 3d DC bzw. PBMC wurde eine Oberflächenfärbung mit dem HLA-A2-spezifischen Hybridom-überstand HB82 durchgeführt. Angegeben ist der prozentuale Anteil der HLA-A2-positiven Zellen in der DC- bzw. PBMC-Population. **B)** 3 h nach der Elektroporation von 48 μ g WT1-ivtRNS wurden die 3d DC bzw. PBMC intrazellulär mit dem WT1-spezifischen C-19-Antikörper gefärbt. Angegeben ist der prozentuale Anteil der WT1-positiven Zellen in der DC- bzw. PBMC-Population. 9 h nach der Elektroporation wurden die 3d DC bzw. PBMC für die De-novo-Induktion naïver T-Zellen eingesetzt (siehe Abb. 4.1).

4.1.3 ANREICHERUNG DER HLA-A2-RESTRINGIERTEN, WT1-SPEZIFISCHEN T-ZELLEN WÄHREND DER DE-NOVO-INDUKTION

Der „semi-allogene“ Stimulationsansatz hatte das Ziel, hoch-avide, WT1-spezifische CTL zu induzieren und anzureichern. Um die Effizienz der Induktion WT1-spezifischer T-Zellen während des De-novo-Induktions-Ansatzes zu überprüfen, wurde jeweils einen Tag vor Stimulation ein Aliquot des Stimulationsansatzes mit einem HLA-A*0201/WT1₁₂₆₋₁₃₄-Multimer und einem Anti-CD8-APC-Antikörper auf die Anwesenheit von WT1-spezifischen, CD8⁺ T-Zellen gefärbt (Abb. 4.3). Wie es bei CTL eines gesunden Spenders zu erwarten war, konnten vor der Primärstimulation der CTL mit *ivt*RNS-transfizierten 3d DC keine WT1-spezifischen CTL detektiert werden. Vor der zweiten und dritten Stimulation der CTL trat eine HLA-A2/WT1-Multimer-positive, CD8-positive Population (0,11 % und 0,13 % positive Zellen) auf. Direkt vor der Sortierung der Zellen waren circa 0,15 % der Zellen des Stimulationsansatzes doppelt-positiv für HLA-A2-WT1 und CD8. Da das HLA-A*0201/WT1₁₂₆₋₁₃₄-Multimer nur an T-Zellen binden konnte, die spezifisch für das immunogene WT1-Epitop RMFPNAPYL, präsentiert über HLA-A2, waren, konnte nicht bestimmt werden, wie viele T-Zellen mit Spezifität gegen andere WT1-Epitope in der Kultur vorhanden waren. Da die T-Zellen mit WT1-*ivt*RNS elektroporierten DC bzw. PBMC stimuliert wurden, konnte man aber vermuten, dass T-Zellen spezifisch für verschiedene WT1-Epitope in der Kokultur vorhanden waren.

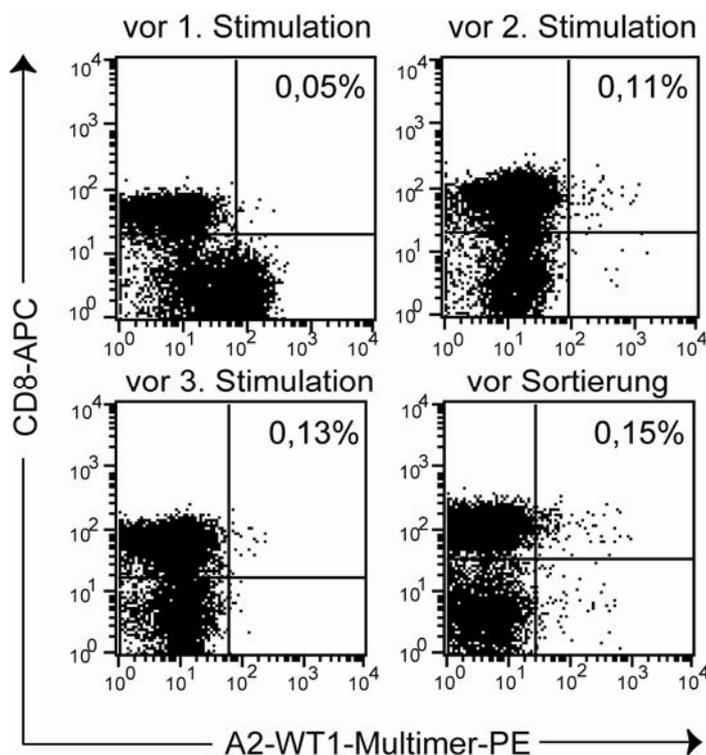


Abb. 4.3: Detektion von WT1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen während der „semi-allogenen“ De-novo-Induktion. Es wurden jeweils vor der ersten, zweiten und dritten Stimulation sowie direkt vor der Sortierung ca. 1×10^5 T-Zellen pro Färbeansatz mit einem Anti-CD8-APC-Antikörper und dem HLA-A*0201/WT1₁₂₆₋₁₃₄-Multimer gefärbt, um eine Anreicherung der WT1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen verfolgen zu können. Angegeben ist der prozentuale Anteil der lebenden, CD8- und WT1-Multimer-positiven Zellen aus der Kokultur.

4.1.4 SORTIERUNG UND KLONIERUNG DER WT1-SPEZIFISCHEN T-ZELLEN

Um die HLA-A2-restringierten, WT1-spezifischen T-Zellen aus dem Stimulationsansatz zu isolieren, wurden die Zellen 30 Tage nach Ansatz der Primärstimulation mit dem HLA-A*0201/WT1₁₂₆₋₁₃₄-Multimer und einem Anti-CD8-Antikörper gefärbt und mit einem FACSAria™ CellSorter sortiert.

Als Negativkontrolle wurde ein Aliquot der Kokultur mit einem HLA-A*0201/pp65₄₉₅₋₅₀₃-Multimer, das ein HLA-A2-restringiertes Peptid des humanen Zytomegalovirus präsentiert, gefärbt (Abb. 4.4).

Nur 0,02 % der 30×10^6 gefärbten Zellen aus der Kokultur waren positiv für CD8 und das HLA-A2/WT1-Multimer. Diese Zahl lag im Bereich der 0,06 % HLA-A2/pp65-Multimer-positiven Zellen der Negativkontrolle. Dies ließ keine eindeutige Aussage über die Spezifität der HLA-A2-WT1-Multimer-positiven Zellen zu. Da bei den vorangegangenen Testfärbungen positive Zellen detektiert werden konnten, wurden die sortierten Zellen weiterkultiviert. Die Zellen wurden nach der Sortierung im limitierenden Verdünnungsverfahren kloniert, wobei 96-Lochplatten mit 0,3 Zellen pro Vertiefung, einer Zelle pro Vertiefung und fünf Zellen pro Vertiefung angesetzt wurden. Bei den Platten, in denen je 0,3 Zellen pro Vertiefung ausgesät wurden, konnte man statistisch davon ausgehen, dass sich in circa jedem dritten Loch eine Zelle befand. T-Zellen, die aus diesen Platten heraus wuchsen, waren mit großer Wahrscheinlichkeit klonal, stammten also von genau einer T-Zelle mit einer T-Zellrezeptorspezifität ab. Die restlichen Zellen wurden zusammen in eine Vertiefung gegeben und als T-Zelllinie weiterkultiviert.

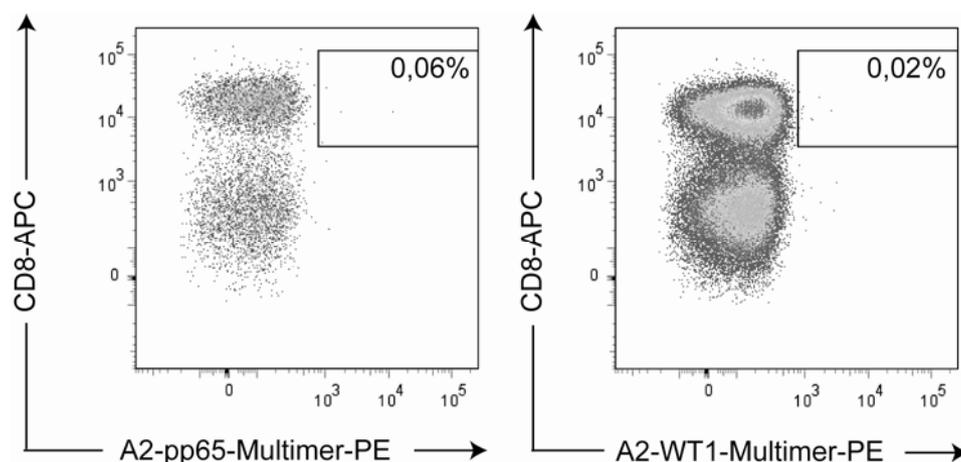


Abb. 4.4: Sortierung von HLA-A2-restringierten, WT1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Ca. 30×10^6 T-Zellen wurden mit dem HLA-A*0201/WT1₁₂₆₋₁₃₄-Multimer und einem Anti-CD8-APC-Antikörper gefärbt. Anschließend wurden die im Fenster markierten Zellen an einem FACSAria™ CellSorter sortiert (rechtes Streudiagramm). Als Negativkontrolle wurden circa 1×10^5 T-Zellen mit dem HLA-A*0201/pp65₄₉₅₋₅₀₃-Multimer und einem Anti-CD8-APC-Antikörper gefärbt (linkes Streudiagramm). Im Fenster ist der prozentuale Anteil der lebenden, CD8⁺/Multimer-positiven Zellen angegeben.

Die T-Zellen wurden alle zwei Wochen unspezifisch mit so genannten „Feederzellen“ (siehe 3.1.11) restimuliert, so dass eine Kultivierung der Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg möglich war.

4.1.5 SPEZIFITÄT DER SORTIERTEN T-ZELLINIE

Vier Wochen nach Sortierung der T-Zelllinie und Klonierung der T-Zellen konnte die potenziell WT1-spezifische T-Zelllinie in einem ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuch auf ihre Spezifität und Funktionalität hin getestet werden. Zu diesem Zweck wurden die T-Zellen („Effektorzellen“) mit den erythroblastoiden Tumorzellen K562-A2 (WT1⁺/A2⁺) (Britten et al., 2002) und den Nierenzellkarzinom-Zellen RCC26 (WT1⁻/A2⁺) („Zielzellen“) in verschiedenen Zellzahlverhältnissen kokultiviert und die spezifische Lyse der Tumorzellen gemessen. Die WT1-Expression wurde in K562-A2-Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Wie in Abb. 4.5 zu erkennen ist, lysierte die T-Zelllinie 13 Tage nach der zweiten unspezifischen Restimulation (linkes Diagramm) die WT1-exprimierende Tumorzelllinie K562-A2 (rote Punkte). Die WT1-negative Tumorzelllinie RCC26 (blaue Punkte) dagegen, wurde nur bei einem Verhältnis der Effektorzellen zu Zielzellen von 10 zu 1 erkannt. Diese Erkennung von WT1⁻/A2⁺ Tumorzellen war vermutlich darauf zurückzuführen, dass es sich bei den hier getesteten T-Zellen um eine T-Zelllinie handelte, die sich aus mehreren verschiedenen T-Zellklonen zusammensetzte. Das bedeutet, in dieser T-Zellpopulation waren neben WT1-spezifischen T-Zellen auch alloreaktive Zellen, also Zellen, die nur das allogene MHC-Molekül HLA-A2 unabhängig vom präsentierten Peptid erkannten, vorhanden. Der beobachtete Effekt, WT1⁻/A2⁺ Tumorzellen zu erkennen und zu lysieren war mit weiterer Verdünnung der Effektorzellen nicht mehr nachweisbar. Die WT1⁺/A2⁺ Tumorzelllinie K562-A2 hingegen wurde auch noch bei einem Verhältnis der Effektorzellen zu Zielzellen von 1,25 zu 1 erkannt und lysiert, was auf die Anwesenheit von WT1-spezifischen T-Zellen in der Population der T-Zelllinie hindeutete. Nach zwei weiteren unspezifischen Restimulationen wurde die T-Zelllinie wiederum auf ihre Spezifität getestet (Abb. 4.5, rechtes Diagramm). Die T-Zellen hatten allerdings 13 Tage nach der vierten unspezifischen Restimulation ihre Fähigkeit verloren, HLA-A2-positive, WT1-exprimierende K562-A2-Tumorzellen zu lysieren. Möglicherweise wurden die WT1-spezifischen T-Zellen in der T-Zelllinie von stark proliferierenden, unspezifischen T-Zellen überwachsen. Die T-Zellen schienen zu diesem späten Zeitpunkt ihre Reaktivität gänzlich verloren zu haben, da auch keine Reaktivität mehr gegenüber HLA-A2 messbar war. Dies hätte man eigentlich von in der T-Zelllinie vorhandenen alloreaktiven Zellen erwartet. Von den ausgesäten T-Zellklonen wuchsen nur zwei ausreichend genug, um in einem ⁵¹Chrom-Freisetzungsversuch auf ihre Spezifität hin getestet werden zu können. Beide Klone zeigten jedoch lediglich eine

Alloreaktivität, da sie sowohl die HLA-A2-positive, WT1-exprimierende Tumorzelllinie K562-A2, als auch die HLA-A2-positive, WT1-negative Tumorzelllinie RCC26 in gleicher Weise erkannten und lysierten (Daten nicht gezeigt).

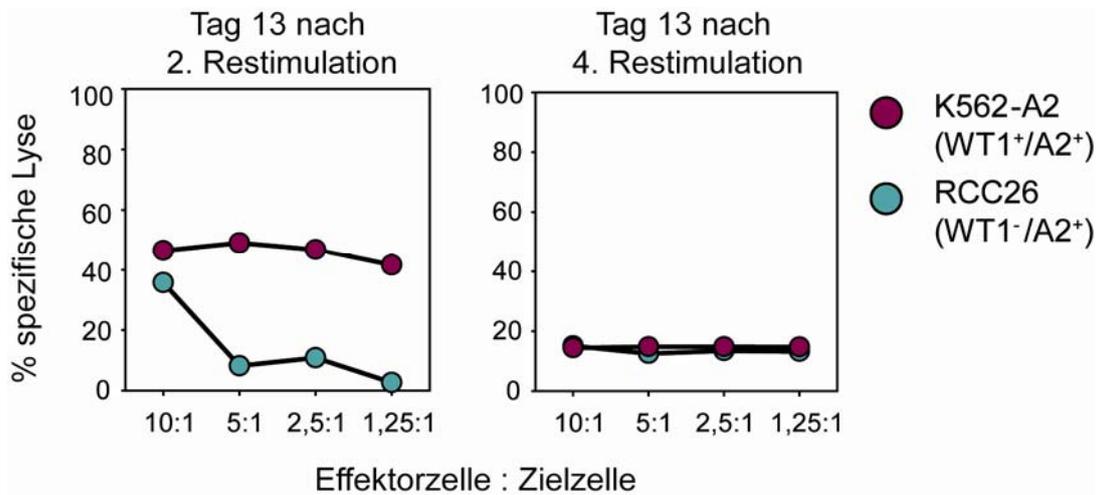


Abb. 4.5: Nachweis der WT1-Spezifität der sortierten CD8⁺ T-Zelllinie mittels spezifischer Lyse der WT1⁺/HLA-A2⁺ Tumorzelllinie K562-A2. Die WT1-spezifische CD8⁺ T-Zelllinie wurde an Tag 13 nach der 2. unspezifischen Restimulation und an Tag 13 nach der 4. unspezifischen Restimulation zum Nachweis ihrer Spezifität und zytotoxischen Aktivität mit WT1⁺/HLA-A2⁺ Tumorzellen (K562-A2) und mit WT1⁻/HLA-A2⁺ Tumorzellen (RCC26) in verschiedenen Verhältnissen von Effektorzellzahl und Zielzellzahl kokultiviert und in einem ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuch getestet.

4.1.6 TCR-REPERTOIRE-ANALYSE DER SORTIERTEN T-ZELLINIE

Zusätzlich zur Spezifität und Funktionalität der T-Zelllinie, sollten die variablen T-Zellrezeptor(TCR)α- und β-Ketten der in der T-Zelllinie vorhandenen Klone identifiziert werden. Parallel zu den unter 4.1.5 beschriebenen ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuchen konnte Gesamt-RNS aus den T-Zellen isoliert werden, um TCR-Repertoire-Analysen durchzuführen. Die Gesamt-RNS wurde mittels reverser Transkription (RT) in cDNS umgeschrieben und diese cDNS in PCR-Reaktionen mit verschiedenen V-Gensegment-Familien-spezifischen Oligonukleotiden („Primern“) für die TCRα- und β-Ketten in Kombination mit spezifischen Konstant-(C)-Region-Primern eingesetzt. In jeder PCR-Reaktion wurden zwei Primerpaare verwendet, wodurch jeweils ein Teil der variablen Kette sowie ein Teil der konstanten Kette des TCR amplifiziert werden konnte. Auf diese Weise konnten die zu den unterschiedenen Zeitpunkten nach der Sortierung in der T-Zelllinie vorhandenen variablen TCRα- und β-Ketten identifiziert werden (Abb. 4.6 und Abb. 4.7).

Es zeigte sich, dass die T-Zelllinie oligoklonal eingeschränkt vorlag und deshalb nur wenige Vα- und Vβ-Ketten detektiert werden konnten. Bei einem Vergleich der TCR-Repertoire-Analysen in Abb. 4.6 A und B bzw. Abb. 4.7 A und B ist zu erkennen, dass einige variable

TCR α - und TCR β -Ketten 13 Tage nach der zweiten Restimulation, also zu dem Zeitpunkt, an dem die T-Zelllinie eine Lyse von WT1⁺/A2⁺ Tumorzellen zeigte, exprimiert wurden, zu einem späteren Zeitpunkt der Analyse (13 Tage nach der vierten Restimulation) konnten diese Ketten jedoch nicht mehr amplifiziert werden (Abb. 4.6 und Abb. 4.7, durch Pfeile gekennzeichnet). In der TCR-V α -Ketten-Analyse (Abb. 4.6) waren dies die Ketten V α 8, V α 16 und V α 19, in der TCR-V β -Ketten Analyse (Abb.4.7) die Ketten V β 5.2, V β 6.3 und V β 13.2.

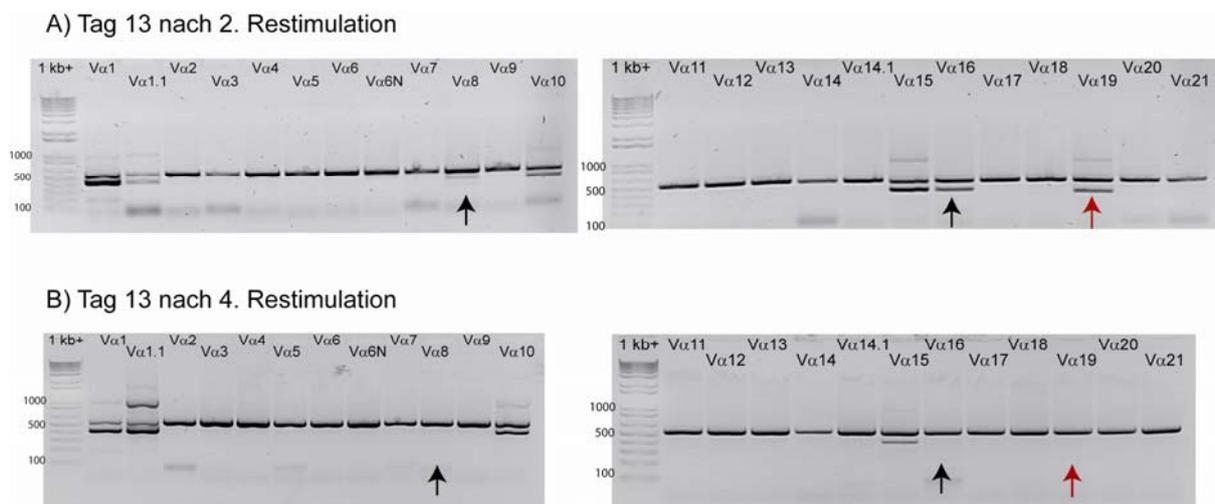


Abb. 4.6: Gelelektrophorese der TCR-V α -Ketten-Analysen der „WT1-spezifischen“ T-Zelllinie. Zur Isolierung von RNS wurden mindestens 3×10^4 Zellen eingesetzt. Die isolierte RNS wurde in cDNS umgeschrieben und vollständig in den PCR-Ansatz zur TCR-V α -Analyse überführt. Die PCR wurde mithilfe TCR-V α -genspezifischer Primer (5') durchgeführt (Tab. 2.7). Die PCR-Amplifikate wurden in einem 1,5%-igen Agarosegel bei 120 V aufgetrennt. Zur Größenbestimmung der erhaltenen Fragmente diente der 1 kb Plus DNA Größenstandard (Invitrogen). Mögliche WT1-spezifische TCRV α -Ketten sind mit roten Pfeilen markiert, die schwarzen Pfeile markieren unproduktive Genumlagerungen oder Kontaminationen. **A)** TCR-V α -Ketten-Analyse an Tag 13 nach der zweiten unspezifischen Restimulation der T-Zellen. **B)** TCR-V α -Ketten-Analyse an Tag 13 nach der vierten unspezifischen Restimulation der T-Zellen. Die Bande auf Höhe von 550 bp stellt das Amplifikat der internen PCR-Kontrolle dar, spezifische TCR-Amplifikate laufen zwischen 370 und 500 bp.

Nach Sequenzierung der TCR-V α - und -V β -Ketten-Amplifikate stellten sich jedoch einige dieser Ketten als unproduktive TCR-Sequenzen heraus (durch schwarze Pfeile markiert). Als produktive, variable TCR-Sequenzen verblieben die Ketten V α 19, V β 5.2 und V β 13.2 (in Abb. 4.6 und 4.7 durch rote Pfeile markiert). Nach der Hypothese, dass in der T-Zelllinie vorhandene WT1-spezifische T-Zellen eventuell mit der Zeit von unspezifischen T-Zellen überwachsen wurden, könnte sich ein WT1-spezifischer TCR aus den TCR-Ketten V α 19, V β 5.2 und V β 13.2 zusammensetzen. Diese Ketten wurden zu dem Zeitpunkt exprimiert, an dem eine spezifische Lyse von WT1-exprimierenden Tumorzellen zu beobachten war und waren zu dem Zeitpunkt, als keine Aktivität im ⁵¹Chrom-Freisetzungsversuch mehr beobachtet werden konnte, nicht mehr zu detektieren.

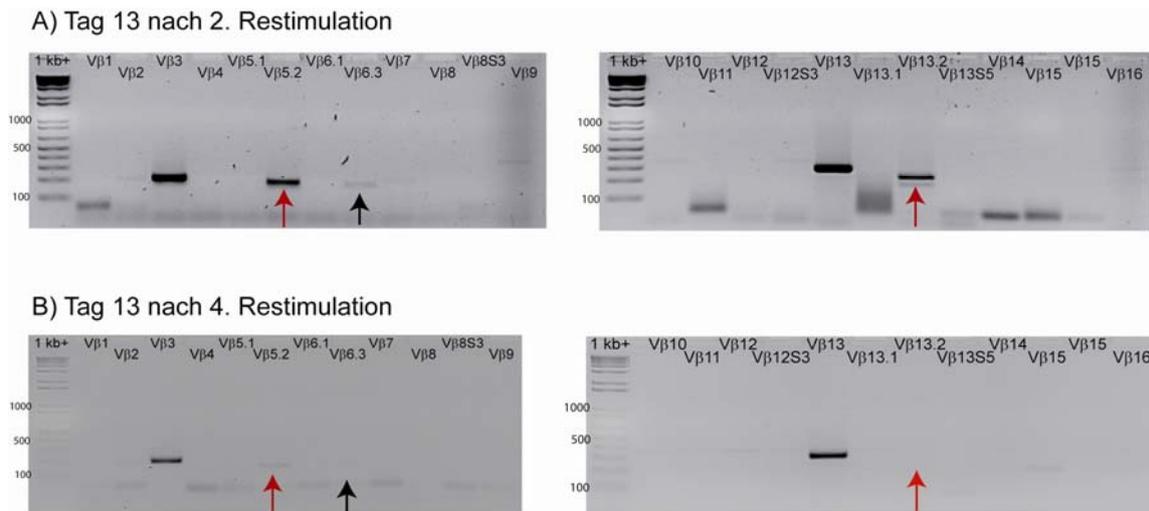


Abb. 4.7: Gelelektrophorese der TCR-Vβ-Ketten-Analysen der „WT1-spezifischen“ T-Zelllinie. Zur Isolierung von RNS wurden mindestens 3×10^4 Zellen eingesetzt. Die isolierte RNS wurde in cDNS umgeschrieben und vollständig in den PCR-Ansatz zur TCR-Vβ-Analyse überführt. Die PCR wurde mithilfe TCR-Vβ-gensegmentspezifischer Primer (5') durchgeführt (Tab. 2.8). Die PCR-Amplifikate wurden in einem 1,5%-igen Agarosegel bei 120 V aufgetrennt. Zur Größenbestimmung der erhaltenen Fragmente diente der 1 kb Plus DNA Größenstandard (Invitrogen). Mögliche WT1-spezifische TCR-Vβ-Ketten sind mit roten Pfeilen markiert, die schwarzen Pfeile markieren unproduktive Genumlagerungen oder Kontaminationen. **A)** TCR-Vβ-Ketten-Analyse an Tag 13 nach der zweiten unspezifischen Restimulation der T-Zellen. **B)** TCR-Vβ-Ketten-Analyse an Tag 13 nach der vierten unspezifischen Restimulation der T-Zellen. Die Bande auf Höhe von 550 bp stellt das Amplifikat der internen PCR-Kontrolle dar (hier schlecht sichtbar), spezifische TCR-Amplifikate laufen zwischen 370 und 500 bp.

Mögliche TCR-Ketten-Kombinationen für einen WT1-spezifischen TCR wären demnach Vα19/Vβ5.2 oder Vα19/Vβ13.2. Die TCR-Vα- und -Vβ-PCR-Produkte wurden aus dem Gel eluiert und von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) sequenziert (Tab. 4.1). Da die isolierte T-Zell-RNS bzw. die amplifizierte cDNS vollständig für die TCR-Analysen eingesetzt wurde, wurden die TCR-Ketten von der Firma Geneart (Regensburg) synthetisiert und die TCR mithilfe eines in der vorliegenden Arbeit etablierten Testsystems auf ihre Spezifität getestet.

Primer	TCR	CDR3
Vα19	AV41*01; AJ49*01	CAVRDPGAGSYQLTF
Vβ5.2	BV5-4; BJ1-1*01; BD1*01	CASSSGATEAFF
Vβ13.2	BV6-2*01/ BV6-3*01; BJ1-2*01; BD1*01	CASSYSGGGYTF

Tab. 4.1: Mögliche WT1-spezifische TCR-Vα- und -Vβ-Ketten. TCR und CDR3 gemäß IMGT-Nomenklatur (<http://imgt.cines.fr>).

4.2 VERGLEICH VON 3d DC UND 7d DC

Nachdem in dem vorher beschriebenen „semi-allogenen“ Stimulationsansatz im Gegensatz zu früher im Labor angesetzten De-novo-Induktionen keine spezifischen T-Zellklone erhalten wurden, sollte die Ursache für die ungenügende Stimulation der T-Zellen geklärt werden. Wie bereits unter 4.1 beschrieben, konnte keine ausreichende Proteinexpression in 3d DC nach Elektroporation von WT1-*ivt*RNS erzielt werden. Möglicherweise war die minimale Ausbeute an HLA-A2/WT1-Multimer-positiven CTL auf die geringe Proteinexpression zurückzuführen.

Möglicherweise haben die 3d DC im Gegensatz zu den in sieben Tagen generierten 7d DC aber auch andere stimulatorische Fähigkeiten auf naive T-Zellen. 3d DC waren in unserem Labor kaum charakterisiert bezüglich Transfektion, Proteinexpression und stimulatorischer Eigenschaften, daher wurde eine genaue Analyse ihrer Funktionen im Vergleich zu den 7d DC durchgeführt.

4.2.1 GENERIERUNG VON 3d DC UND 7d DC

In der Literatur werden verschiedene Protokolle zur *in vitro* Generierung von reifen DC aus Monozyten beschrieben. Diese Protokolle unterscheiden sich sowohl in der Zeitspanne, in der die Monozyten zu unreifen (iDC) und reifen dendritischen Zellen (mDC) ausdifferenziert werden, als auch in der Zusammensetzung des Reifungs-Cocktails, der zur Ausreifung der mDC eingesetzt wird.

Das Standardprotokoll, das in unserem Labor zur Generierung von DC aus Monozyten verwendet wurde, ist in Abb. 4.8 B beschrieben. Monozyten wurden entweder direkt aus einer Fraktion einer Leukapherese/Elutriation gewonnen oder mittels Plattenadhärenz aus PBMC angereichert. Die Monozyten wurden an Tag 0 in Zellkulturflaschen ausgesät und an Tag 1 und 3 durch die Zugabe von IL-4 und GM-CSF zu iDC ausdifferenziert. An Tag 6 wurden die iDC mit dem so genannten „Jonuleit-Cocktail“ (IL-4, GM-CSF, TNF- α , IL-1 β , IL-6 and PGE₂), der als so genannter „goldener Standard“ der DC-Reifungs-Cocktails gilt, innerhalb von 24 h zu mDC ausgereift (Jonuleit et al., 1996). Diese mDC standen an Tag 7 für Versuche zur Verfügung (Abb. 4.8 B).

2003 publizierten Dauer und Kollegen ein neues Protokoll, mit dem es möglich war, reife DC aus Monozyten innerhalb von 48 h zu erhalten (so genannte „Fast DC“). In diesem Protokoll wurden die Monozyten direkt am Tag der Aussaat mit IL-4 und GM-CSF inkubiert und 24 h später mit dem „Jonuleit-Cocktail“ ausgereift (Dauer et al., 2003). Durch diese Optimierung der DC-Generierung war es möglich, reife DC innerhalb von zwei Tagen zu erhalten, was eine enorme Ersparnis von Kosten für Zytokine und Zeit darstellt. In unserem Labor wurde

dieses Protokoll leicht modifiziert. Die Monozyten wurden für zwei Tage mit IL-4 und GM-CSF inkubiert und an Tag 2 innerhalb 24 h mit dem „Jonuleit-Cocktail“ ausgereift. Reife mDC erhielt man so in drei Tagen (3d DC) (Abb. 4.8 A).

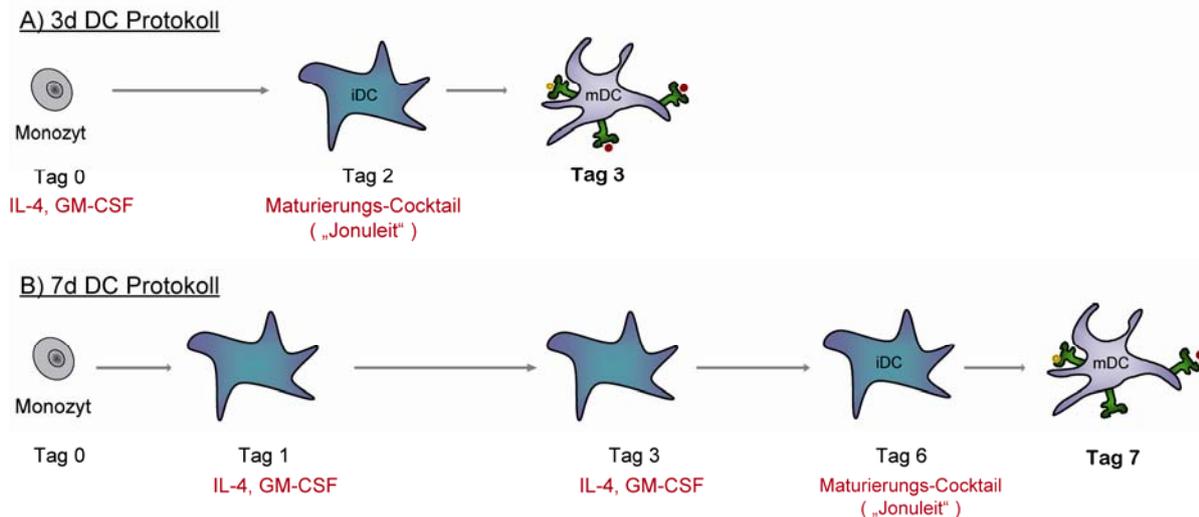


Abb. 4.8: Generierung von unreifen und reifen dendritischen Zellen nach dem 3d DC Protokoll und dem 7d DC Protokoll. A) 3d DC Protokoll: Monozyten werden an Tag 0 mit 100 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4 in DC-Medium inkubiert. An Tag 2 sind die Zellen zu unreifen dendritischen Zellen (iDC) differenziert. Durch Zugabe des „Jonuleit“-Maturierungs-Cocktails (100 ng/ml GM-CSF, 20 ng/ml IL-4, 10 ng/ml IL-1 β , 15 ng/ml IL-6, 10 ng/ml TNF- α und 1000 ng/ml PGE $_2$) für weitere 24 h werden diese iDC zu reifen dendritischen Zellen (mDC) ausgereift. B) 7d DC Protokoll: Monozyten werden an Tag 1 und an Tag 3 mit 100 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4 versehen, wodurch man an Tag 6 iDC erhält. Durch Zugabe des „Jonuleit“-Maturierungs-Cocktails (100 ng/ml GM-CSF, 20 ng/ml IL-4, 10 ng/ml IL-1 β , 15 ng/ml IL-6, 10 ng/ml TNF- α und 1000 ng/ml PGE $_2$) werden diese Zellen innerhalb von 24 h zu mDC ausgereift.

Ein Teilziel dieser Doktorarbeit bestand darin, zu klären, ob die unterschiedlichen Zeitspannen, in denen reife DC generiert werden können einen Einfluss auf die Schlüsseleigenschaften von DC, wie die Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigen haben.

4.2.2 VERGLEICH DER 3d DC UND 7d DC HINSICHTLICH ANTIGENAUFNAHME, -PROZESSIERUNG UND –PRÄSENTATION SOWIE STIMULATION VON PEPTID-SPEZIFISCHEN GEDÄCHTNIS-T-ZELLEN IM „MELAN-A-SYSTEM“

Um 3d DC und 7d DC in ihrer Fähigkeit zur Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigen zu vergleichen, wurde ein „Melan-A-Versuchssystem“ verwendet (Abb. 4.9). Diese Methode erwies sich für die folgende Aufgabenstellung als geeignet, da alle nötigen Komponenten im Labor vorhanden waren:

- Melan-A-*ivt*RNS
- Kurzes, HLA-A*0201-restringiertes Melan-A-Peptid (ELAGIGILTV)
- Langes Melan-A-Peptid (p70) (GSGHWDFAWPWGSLAGIGILTV)
- Melan-A-spezifischer CTL-Klon A42 (erkennt ELAGIGILTV auf HLA-A*0201)
- Melan-A-positive und Melan-A-negative Tumorzelllinien (Mel IL-2 und Mel A375) als Kontrollen

3d DC und 7d DC wurden mithilfe des „Jonuleit-Cocktails“ aus HLA-A2-positiven Monozyten, wie unter 4.2.1 beschrieben, generiert. Diese DC wurden mit Melan-A-*ivt*RNS elektroporiert, 3 h nach Elektroporation intrazellulär auf die Expression von Melan-A mit einem Melan-A-spezifischen Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 4.9 B). 24 h nach Elektroporation mit *ivt*RNS wurden die DC mit den Melan-A-spezifischen A42 CTL für 24 h koinkubiert. Die Stimulation der CTL über den Melan-A-Peptid-MHC-Komplex konnte durch Interferon- γ (IFN γ), das von den A42 CTL sezerniert wurde, nachgewiesen werden.

Um die Fähigkeit der DC zur Antigenprozessierung zu analysieren, wurden die 3d DC und 7d DC mit dem 23 Aminosäuren langen Melan-A-Peptid (p70) inkubiert, das nach der Aufnahme prozessiert und im endoplasmatischen Retikulum auf HLA-A2-Moleküle geladen werden muss, um auf der Oberfläche der DC präsentiert werden zu können. Um die generelle stimulatorische Eigenschaft des kurzen, HLA-A2-restringierten Melan-A-Peptids „ELA“ auf die A42 CTL zu bestimmen, wurden DC von außen direkt mit dem zehn Aminosäuren kurzen Melan-A-Peptid beladen (Abb. 4.9 A). Die Erkennung des Melan-A-Peptids „ELA“ auf der Oberfläche der DC wurde wie oben beschrieben durch die Kokultur mit den Melan-A-spezifischen A42 CTL und der darauffolgenden IFN γ -Sekretion der CTL detektiert. Eine starke IFN γ -Sekretion könnte auf eine große Anzahl an Melan-A-Peptid-MHC-Molekülen auf der Oberfläche der DC hindeuten.

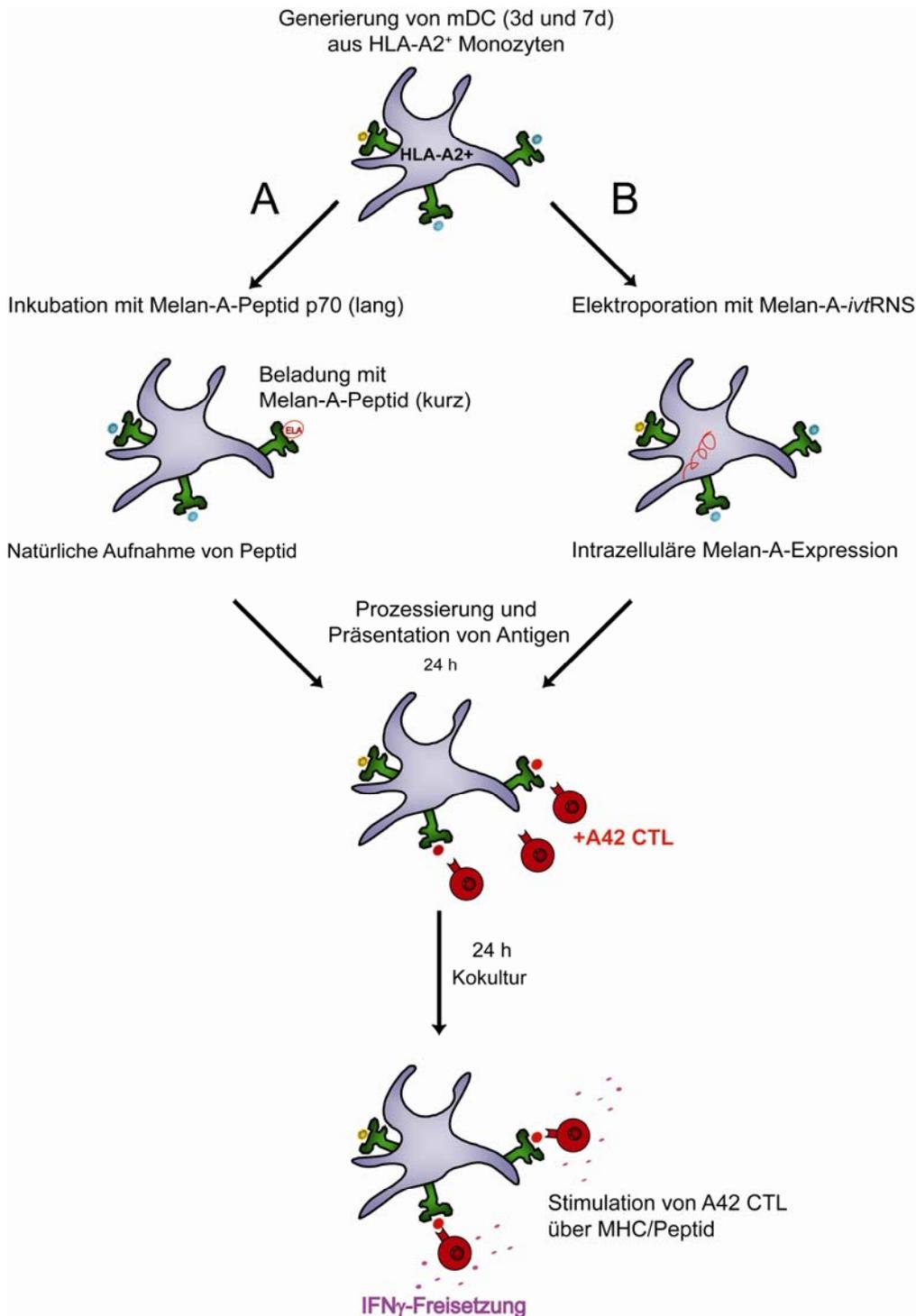


Abb. 4.9: „Melan-A-Versuchssystem“. Um die Fähigkeit von 3d DC und 7d DC zur Antigenaufnahme, Antigenprozessierung und -präsentation, sowie zur Stimulation von peptidspezifischen Gedächtnis-T-Zellen zu vergleichen, wurden die DC entweder mit Melan-A-Peptid beladen (lang oder kurz) (A), oder mit Melan-A-ivtRNS elektroporiert (B). Anschließend wurden je 4×10^4 DC mit 2×10^4 Melan-A-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten A42 für 24 h kokultiviert. Die Stimulation der A42 CTL durch die MHC/Melan-A-Peptid-Moleküle wurde anhand der IFN γ -Sekretion der A42 CTL durch ELISA bestimmt.

4.2.3 PHÄNOTYP VON DC

Zunächst sollte der Phänotyp der 3d DC und 7d DC, also Morphologie, Größe und die Expression charakteristischer Oberflächenmoleküle, analysiert werden. Möglicherweise könnte ein unterschiedlicher Phänotyp der beiden DC-Arten einen Hinweis auf veränderte Eigenschaften in der Antigenaufnahme und in der Stimulation von T-Zellen liefern.

4.2.3.1 Morphologie und Größe von 3d DC und 7d DC

2d iDC, 6d iDC, 3d mDC und 7d mDC wurden aus Monozyten eines HLA-A2-positiven Spenders generiert (siehe 4.2.1) und durchflusszytometrisch auf ihre Größe und Granularität hin untersucht (Abb. 4.10). Das Vorwärtsstreulicht (engl.: Forward Scatter, FSC) hängt von der Größe der Zelle ab, das Seitwärtsstreulicht (engl.: Sideward Scatter, SSC) ist ein Maß für die Brechung des Lichts und ist abhängig von der Granularität der Zelle. Es ist deutlich zu erkennen, dass die 3d mDC kleiner und weniger granulär sind als die 7d mDC.

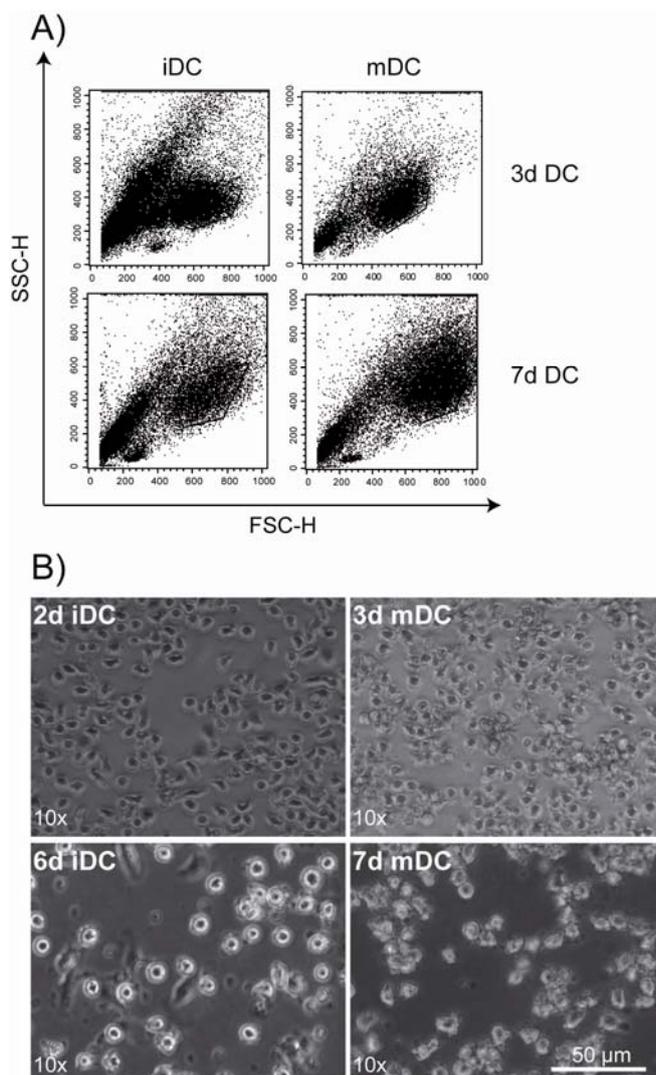


Abb. 4.10: Morphologie von 3d DC und 7d DC. 2d iDC, 6d iDC sowie 3d mDC und 7d mDC wurden generiert und ihre jeweilige Größe und Morphologie analysiert. **A)** Durchflusszytometrische Analyse der Größe und Granularität der DC. **B)** Lichtmikroskopische Aufnahmen der DC in einer 10-fachen Vergrößerung.

Bei den 2d iDC und den 6d iDC war der Unterschied in der Größe fast vernachlässigbar. Ein klarer Größenunterschied zwischen iDC und mDC war eigentlich nur zwischen 6d iDC und 7d mDC zu erkennen, wohingegen die 2d iDC und 3d mDC beinahe gleich groß waren.

Ein ähnliches Bild zeigte die lichtmikroskopische Analyse der DC (Abb. 4.10 B). Vor allem der Größenunterschied zwischen 3d mDC und 7d mDC war auch hier klar zu erkennen.

4.2.3.2 Oberflächenmarker von 3d DC und 7d DC

In vitro generierte DC zeichnen sich durch ein bestimmtes Expressionsprofil an Oberflächenmolekülen aus, mit dessen Hilfe sie eindeutig von Monozyten oder Makrophagen abgegrenzt werden können. CD14, ein Rezeptor für den Komplex von LPS und LPS-bindendem Protein, wird auf Monozyten exprimiert, nicht aber auf DC. CD83, ein Molekül mit noch unbekannter Funktion, wird von mDC, nicht aber von iDC exprimiert und dient als Marker für den Reifegrad der DC. Die kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) und CD40 werden verstärkt auf mDC exprimiert, ebenso wie MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle. DC exprimieren außerdem CD209 (DC-SIGN), das an CD50 (ICAM-3) auf T-Zellen binden kann und so eine wichtige Rolle in der Wechselwirkung von Lymphozyten und antigenpräsentierenden Zellen spielt. Der Chemokinrezeptor CCR7 wird auf unreifen und reifen DC exprimiert, wobei seine Expression auf mDC verstärkt wird. CCR7 bindet die Liganden CCL19 und CCL21 und ermöglicht so eine Wanderung der reifen, mit Antigen beladenen DC zu den Lymphknoten, in denen sie auf naive T-Zellen treffen, die ebenfalls durch die Expression von CCR7 in die Lymphknoten gelangen. Als letztes DC-typisches Oberflächenmolekül dient im folgenden CD274 (PD-L1, B7-H1), das an CD279 (PD-1) auf T-Zellen binden kann und dadurch T-Zellproliferation und Zytokinsekretion inhibiert, was zu immunologischer Toleranz führt. Eine permanente Aktivierung von T-Zellen kann hierdurch auch abgeschaltet werden.

4.2.3.2.1 Unreife DC (iDC)

2d iDC und 6d iDC wurden aus Monozyten generiert und mit FITC- und PE-gekoppelten Antikörpern auf die Expression der unter 4.2.3.2 beschriebenen Oberflächenmoleküle gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 4.11). 2d iDC exprimierten deutlich mehr CD14 (44 %) als 6d iDC (12 %), was vermutlich auf die kürzere Entwicklungszeit der 2d iDC zurückzuführen war. Dementprechend waren noch unausdifferenzierte Monozyten in der Population vorhanden. CD83 wurde auf 2d iDC und 6d iDC noch nicht exprimiert, wohingegen CD40, das MHC-II-Allel HLA-DR und CD86 schon deutlich auf den iDC detektierbar waren.

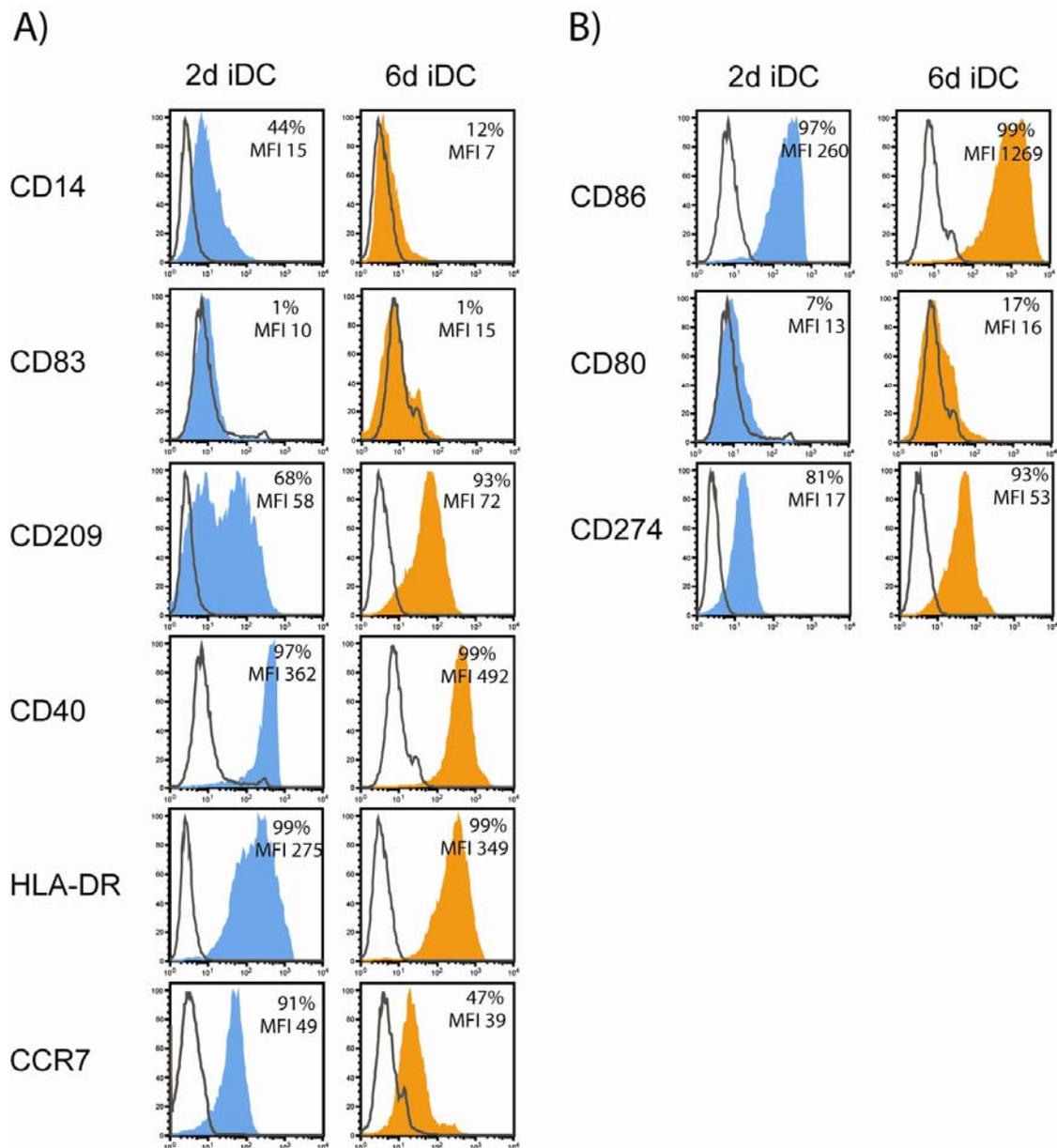


Abb. 4.11: Phänotyp von unreifen 2d iDC und 6d iDC. Es wurden unreife DC nach dem 3-Tages-Protokoll (2d iDC) und nach dem 7-Tages-Protokoll (6d iDC) generiert und durchflusszytometrisch auf die Expression spezifischer Oberflächenmarker untersucht.

Die offenen Histogramme zeigen die Isotypkontrollen, die blau bzw. orange unterlegten Histogramme zeigen die spezifische Bindung von FITC- oder PE-gekoppelten Antikörpern an die jeweiligen Oberflächenmoleküle. Histogrammstatistiken wurden zur Berechnung des prozentualen Anteils der positiven Zellen und der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) genutzt. **A)** Expression von CD14, CD83, CD209, CD40, HLA-DR und CCR7 auf 2d iDC und 6d iDC. **B)** Expression der B7-Familien-Moleküle CD80, CD86 und CD274 auf 2d iDC und 6d iDC.

CD80 wurde auf 2d iDC und 6d iDC schwach exprimiert. CD209 und CCR7 wurden in unterschiedlichen Mengen exprimiert, waren aber auf beiden iDC-Arten detektierbar. Das inhibitorische CD274-Molekül wurde auf den 6d iDC (MFI 53) im Gegensatz zu 2d iDC (MFI 17) etwa dreifach stärker exprimiert.

Insgesamt war die Expression von Oberflächenmolekülen auf den 2d iDC und 6d iDC aber vergleichbar.

4.2.3.2.2 Reife DC (mDC)

Die 2d iDC und 6d iDC wurden durch Zugabe des „Jonuleit-Cocktails“ innerhalb von 24 h zu 3d mDC und 7d mDC ausgereift. Nach dieser Zeitspanne sollten beide mDC-Arten einen für reife DC charakteristischen Phänotyp aufweisen. Wie in Abb. 4.12 zu erkennen ist, war die Expression von Oberflächenmolekülen auf 3d mDC und 7d mDC vergleichbar.

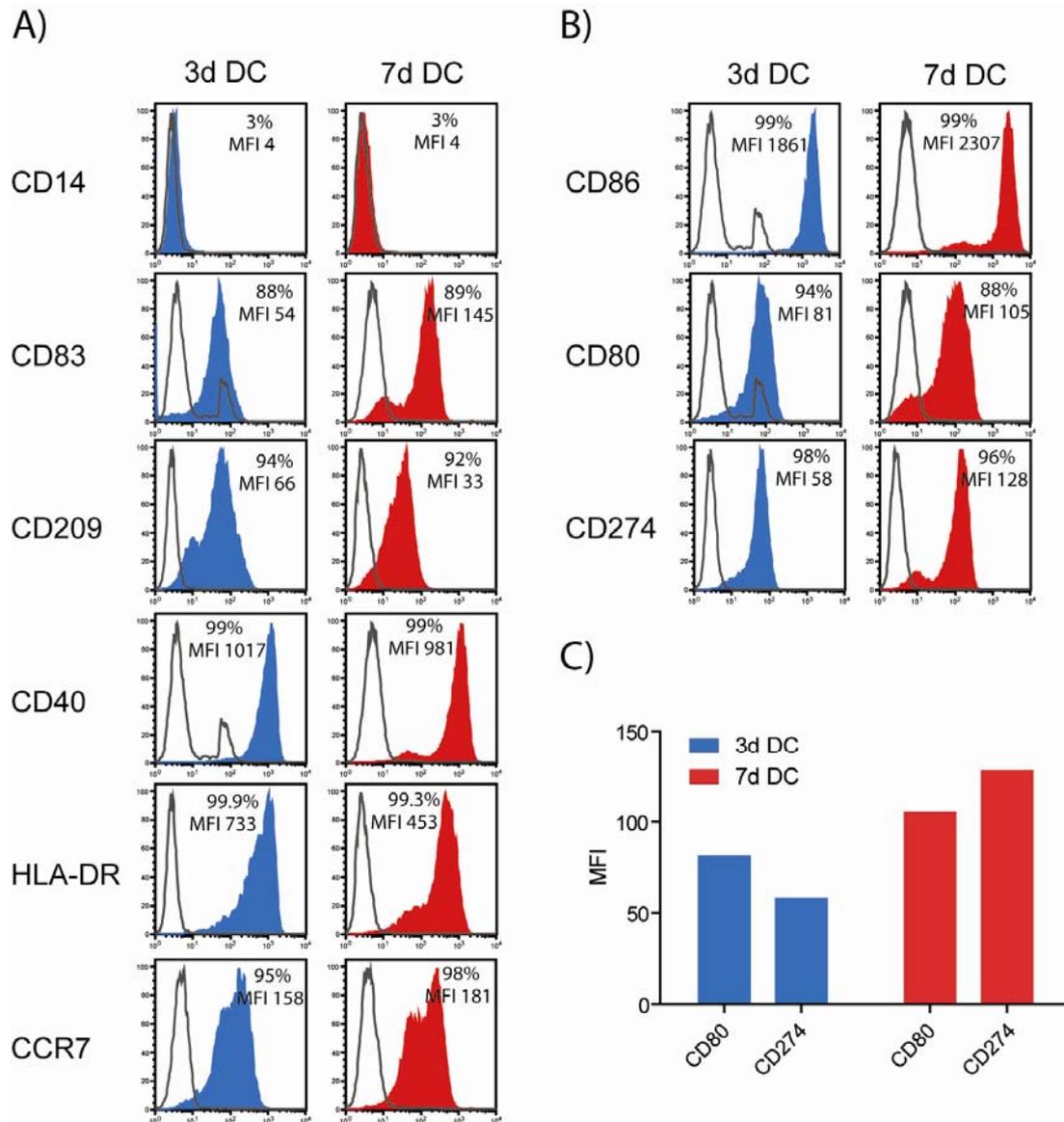


Abb. 4.12: Phänotyp von reifen 3d DC und 7d DC. Es wurden reife DC nach dem 3-Tages-Protokoll (3d mDC) und nach dem 7-Tages-Protokoll (7d mDC) generiert und durchflusszytometrisch auf die Expression spezifischer Oberflächenmarker untersucht. Die offenen Histogramme zeigen die Isotypkontrollen, die blau bzw. rot unterlegten Histogramme zeigen die spezifische Bindung von FITC- oder PE-gekoppelten Antikörpern an die jeweiligen Oberflächenmoleküle. Histogrammstatistiken wurden zur Berechnung des prozentualen Anteils der positiven Zellen und der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) genutzt. **A)** Expression von CD14, CD83, CD209, CD40, HLA-DR und CCR7 auf 3d DC und 7d DC. **B)** Expression der B7-Familien-Moleküle CD80, CD86 und CD274 auf 3d DC und 7d DC. **C)** Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der CD80- und CD274-Expression auf 3d DC und 7d DC im direkten Vergleich.

CD14 war nicht mehr zu detektieren, das bedeutet, die Population der DC enthielt nur noch wenige unausdifferenzierte Monozyten.

Die auf iDC noch nicht exprimierten Moleküle CD80 und CD83 waren auf der Oberfläche von mDC zu detektieren. Moleküle wie HLA-DR und CD86 wurden auf den mDC im Gegensatz zu den iDC verstärkt exprimiert, ebenso wie der CCR7-Chemokinrezeptor, was durch den größeren MFI-Wert („mittlere Fluoreszenzintensität“) sichtbar wird. Das inhibitorische Molekül CD274 war auf den 7d DC im Vergleich zu 3d DC in größerer Anzahl vorhanden. Besonders fiel die verstärkte Expression von CD274 auf 7d mDC im direkten Vergleich zur CD80-Expression auf (Abb. 4.12 C). Dies deutete auf einen eher inhibitorischen Phänotyp der 7d DC hin. Im Gegensatz dazu waren auf der Oberfläche der 3d DC weniger inhibitorische CD274-Moleküle und mehr positiv kostimulatorische CD80-Moleküle detektierbar, was auf einen DC-Typ hinweisen könnte, der T-Zellen besser stimulieren kann.

4.2.3.2.3 Phänotyp von 3d DC vor und nach Elektroporation

Wie gezeigt wurde, zeichneten sich 3d DC und 7d DC in der Expression wichtiger Oberflächenmarker durch einen vergleichbaren Phänotyp aus. Es stellte sich die Frage, ob dieser Phänotyp auch nach Elektroporation der mDC mit *ivt*RNS stabil blieb. Der Phänotyp von 3d mDC, die nicht elektroporiert worden waren und von 3d mDC 5 h und 24 h nach Elektroporation (250 V, 150 μ F) von eGFP-*ivt*RNS wurde durchflusszytometrisch verglichen (Abb. 4.13). Die 3d mDC ohne Elektroporation waren im Vergleich zu den 2d iDC durch einen für reife dendritische Zellen typischen Phänotyp gekennzeichnet (CD14⁻, CD80⁺, CD83⁺, CD86⁺). Dieser Phänotyp blieb sowohl 5 h nach Elektroporation (blaue Balken) als auch 24 h nach Elektroporation (rote Balken) erhalten und unterschied sich weiterhin vom Phänotyp der 2d iDC. Der elektrische Puls, der auf die Zellen ausgeübt wurde, um ein effizientes Eindringen von RNS-Molekülen zu ermöglichen, hatte also keinen Einfluss auf die Expression von Oberflächenmolekülen, was bedeutet, dass mit *ivt*RNS elektroporierte 3d DC weiterhin kostimulatorische Moleküle exprimieren, die wichtig für eine Stimulation von T-Zellen sind.

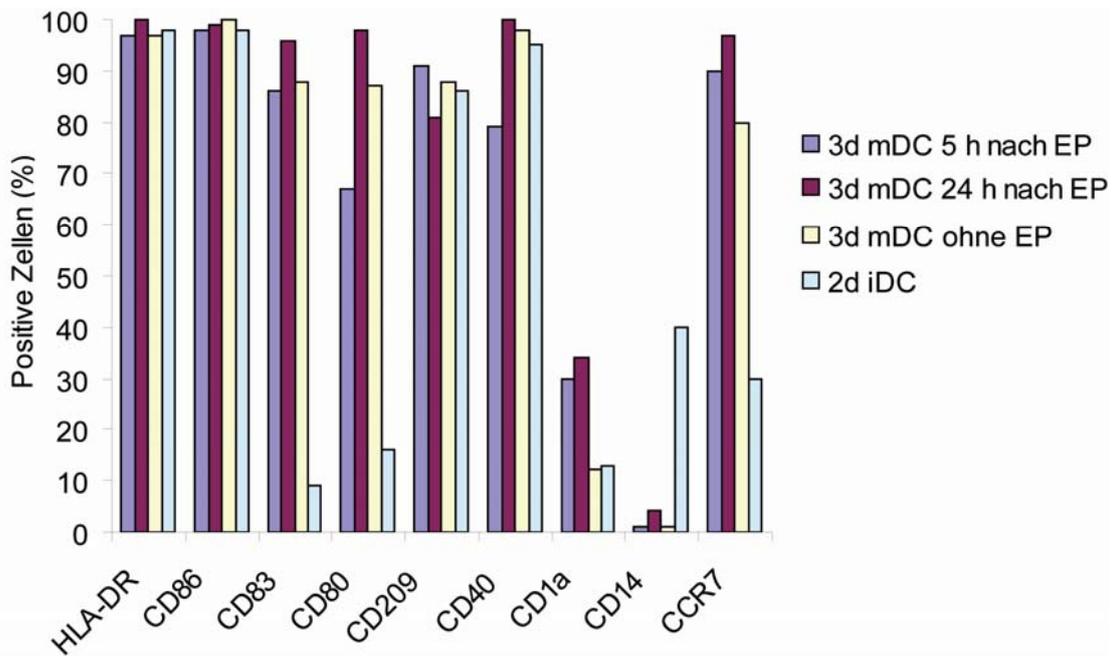


Abb. 4.13: Phänotyp von 2d iDC und 3d mDC ohne Elektroporation sowie 3d mDC 5 h bzw. 24 h nach Elektroporation. 2d iDC und 3d mDC wurden generiert und durchflusszytometrisch auf die Expression von Oberflächenmolekülen untersucht. Die 3d mDC wurden sowohl vor Elektroporation als auch 5 h bzw. 24 h nach Elektroporation auf charakteristische Oberflächenmoleküle gefärbt. Histogramm-Statistiken wurden zur Berechnung des prozentualen Anteils der positiven Zellen herangezogen.

4.2.3.3 Erkennung von Melan-A-Peptid/MHC-Molekülen auf DC durch A42 CTL

Nachdem gezeigt werden konnte, dass 3d DC einen vergleichbaren Phänotyp wie 7d DC aufwiesen und dieser Phänotyp auch nach Elektroporation stabil blieb, stellte sich die Frage, ob 3d DC in gleicher Weise wie 7d DC in der Lage waren, T-Zellen zu stimulieren. Um diese Frage näher zu untersuchen, wurden 3d DC und 7d DC aus HLA-A2-positiven Monozyten generiert und, wie in 4.2.2 A beschrieben, mit dem kurzen, HLA-A2-restringierten Melan-A-Peptid (ELA) beladen. 2 h bzw. 24 h nach Beladung der DC mit Melan-A-Peptid wurde eine Kokultur mit den Melan-A-spezifischen A42 CTL angesetzt und nach 24 h Koinkubation der Zellen eine Stimulation der Melan-A-spezifischen T-Zellen durch deren IFN γ -Sekretion mittels ELISA detektiert (Abb. 4.14). Als Negativkontrolle wurde die Melan-A-negative Tumorzelllinie Mel A375 als Zielzelle eingesetzt, als Positivkontrolle diente die Melan-A-positive Tumorzelllinie Mel IL-2.

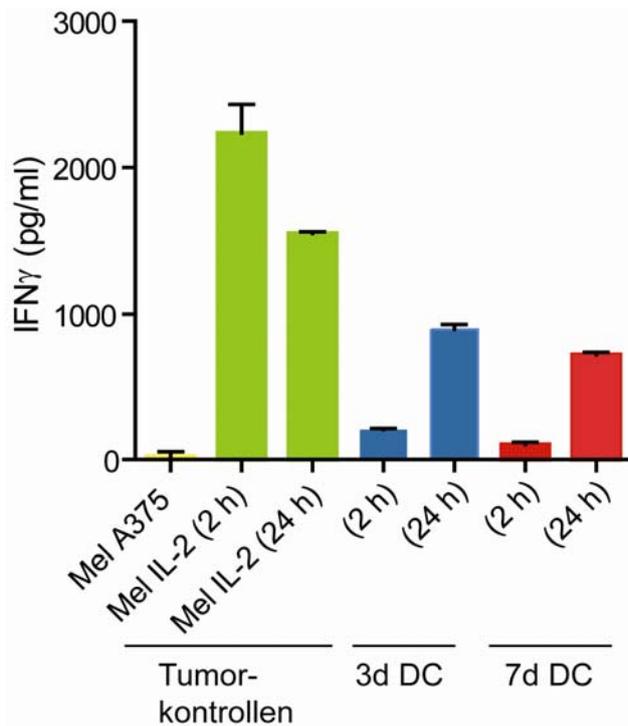


Abb. 4.14: Stimulatorische Kapazität von 3d mDC und 7d mDC nach Beladung mit kurzem Melan-A-Peptid (ELA). 3d bzw. 7d mDC wurden 2 h bzw. 24 h mit 10 $\mu\text{g/ml}$ kurzem Melan-A-Peptid (ELAGIGILTV) beladen und anschließend 24 h mit Melan-A-spezifischen A42 CTL kokultiviert. Zur Kokultur wurden je 4×10^4 Zielzellen und 2×10^4 A42 CTL verwendet. IFN γ wurde aus den Überständen der Kokultur durch ELISA bestimmt. Als Positivkontrolle diente die Melan-A-exprimierende Tumorzelllinie Mel IL-2, als Negativkontrolle die Melan-A-negative Tumorzelllinie Mel A375. Die Balken zeigen jeweils Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichungen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Melan-A-negative Tumorzelllinie Mel A375 von den A42 CTL nicht erkannt wurde, wohingegen eine Kokultur der A42 CTL mit Mel IL-2 zu einer starken IFN γ -Sekretion der A42 CTL führte. Auffällig ist, dass die A42 CTL zu den zwei verschiedenen Zeitpunkten, an denen die Kokulturen angesetzt wurden, nach Koinkubation mit den Tumorzellen Mel IL-2 unterschiedliche Mengen an IFN γ produzieren konnten. Diese Varianzen kamen vermutlich durch generelle Unterschiede in der Fähigkeit zur IFN γ -Sekretion, die die A42 CTL an den jeweiligen Tagen aufwiesen, zu Stande. Die A42 CTL besaßen scheinbar zum früheren Zeitpunkt der Kokultur (2 h) ein größeres Potenzial zur IFN γ -Sekretion als zum späteren Zeitpunkt (24 h).

Die DC, die nur 2 h nach Beladung mit Melan-A-Peptid für eine Kokultur verwendet wurden, konnten die T-Zellen in nur relativ geringem Maße stimulieren. Die DC dagegen, die 24 h lang mit dem Melan-A-Peptid inkubiert wurden, konnten die A42 CTL zu einer deutlich stärkeren IFN γ -Sekretion anregen. Beim Vergleich von 3d DC und 7d DC ist zu erkennen, dass beide DC-Arten gleichermaßen in der Lage waren, T-Zellen zu stimulieren, wobei die 3d DC, die 24 h mit Melan-A-Peptid inkubiert wurden, sogar eine etwas stärkere stimulatorische Fähigkeit als die ebenso behandelten 7d DC zu haben schienen. Insgesamt wies dieses Ergebnis auf eine vergleichbare stimulatorische Kapazität von 3d DC und 7d DC hin.

4.2.4 PEPTIDAUFNAHME UND –PRÄSENTATION IN DC

Nachdem die stimulatorische Fähigkeit der DC nach Beladung mit kurzem Melan-A-Peptid geklärt wurde, stellte sich die Frage, ob 3d DC und 7d DC auch in ihrer Fähigkeit, Moleküle, wie z.B. Antigene, aus ihrer Umgebung aufzunehmen („Makropinozytose“), zu prozessieren, auf ihrer Oberfläche zu präsentieren und dadurch T-Zellen zu stimulieren vergleichbar sind.

4.2.4.1 Makropinozytose von FITC-Dextran

iDC nehmen Antigene aus ihrer Umgebung auf und reifen dann zu mDC heran, die nur noch in geringem Maße Moleküle aus ihrer Umgebung aufnehmen und in die Lymphknoten wandern, wo sie T-Zellen die Antigene präsentieren können.

Um die Makropinozytose-Fähigkeit zu untersuchen, wurden 2d iDC, 6d iDC, 3d mDC und 7d mDC generiert und eine Stunde bei 37°C mit 10 µg/ml bzw. 100 µg/ml FITC-gekoppeltem Dextran inkubiert. Die Aufnahme des Dextrans konnte so direkt über das fluoreszierende FITC-Molekül durchflusszytometrisch gemessen werden (Abb. 4.15, grau unterlegte Histogramme).

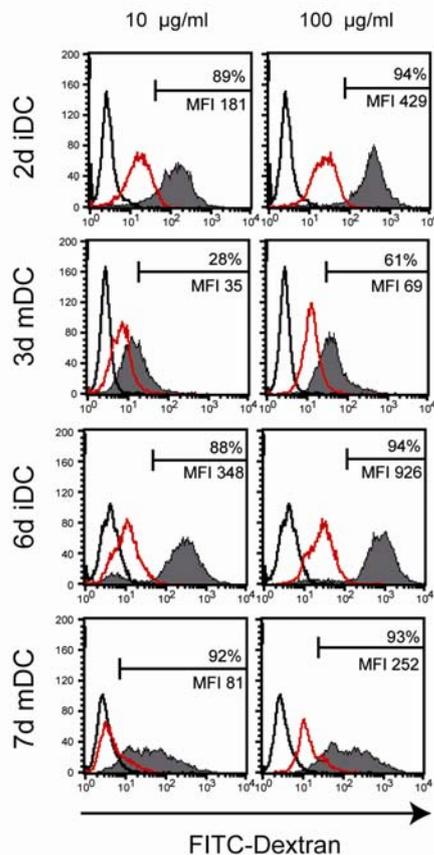


Abb. 4.15: Makropinozytose-Fähigkeit von DC. Unreife und reife DC wurden 1 h lang mit 10 µg/ml bzw. 100 µg/ml FITC-Dextran bei 37°C inkubiert (grau unterlegte Histogramme). Zur Kontrolle von unspezifischem FITC-Dextran wurden die DC für 1 h bei 4°C inkubiert (rote Histogramme). Als Negativkontrolle dienten DC ohne FITC-Dextran-Inkubation (schwarze Histogramme).

Um die spezifische Aufnahme von unspezifisch an der Zelle gebundenem FITC-Dextran abzugrenzen, wurden parallel DC 1 h lang bei 4°C mit FITC-Dextran inkubiert (Abb. 4.15, rote Histogramme), als Negativkontrolle dienten DC, die nur in Medium bei 37°C inkubiert worden waren (Abb. 4.15, schwarze Histogramme).

Wie zu erwarten war, konnten iDC (2d iDC und 6d iDC) im Gegensatz zu mDC (3d mDC und 7d mDC) deutlich mehr FITC-Dextran aufnehmen. In Abb. 4.15 ist außerdem zu sehen, dass 6d iDC mehr FITC-Dextran aufnehmen konnten als 2d iDC. Auch die 7d mDC konnten größere Mengen an FITC-Dextran aufnehmen als 3d mDC. Anhand dieser Analysen wurde deutlich, dass 3d DC und 7d DC eine vergleichbare Fähigkeit zur Makropinozytose aufwiesen. Ob ihre Fähigkeit zur Antigenprozessierung ebenfalls vergleichbar war, sollte im Folgenden geklärt werden.

4.2.4.2 Elektroporation von DC mit langem Melan-A-Peptid (p70)

Eine Schlüsselfähigkeit von DC ist neben der Aufnahme von Antigenen deren Prozessierung und die Präsentation von Peptidfragmenten auf MHC-Molekülen. Um die Frage zu klären, wie gut 3d DC im Vergleich zu 7d DC in der Lage waren, Peptide zu prozessieren und zu präsentieren, wurde ein langes Melan-A-Peptid (p70) verwendet. Dieses Melan-A-Peptid (p70) war aus 23 Aminosäuren (GSGHWDFAWPWGSLAGIGILTV) zusammengesetzt und war somit zu groß, um direkt von außen an HLA-A2-Moleküle binden zu können. Um auf den HLA-A2-Molekülen präsentiert werden zu können, musste das Peptid innerhalb der Zelle geschnitten werden, in das endoplasmatische Retikulum gelangen und dort auf MHC-I-Moleküle geladen werden. Um eine optimale Aufnahme des Peptids in die DC zu garantieren, wurden 3d DC und 7d DC mit 1 µg, 5 µg und 10 µg Melan-A-Peptid (p70) elektroporiert (250 V, 150 µF).

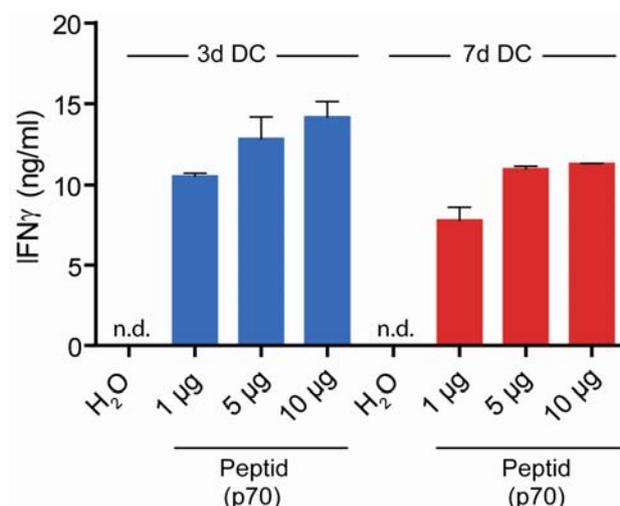


Abb. 4.16: Stimulatorische Kapazität von 3d mDC und 7d mDC nach Elektroporation von langem Melan-A-Peptid (p70). 3d bzw. 7d mDC wurden mit 1 µg, 5 µg und 10 µg langem Melan-A-Peptid (p70) (GSGHWDFAWPWGSLAGIGILTV) elektroporiert und nach 24 h mit Melan-A-spezifischen A42 CTL für weitere 24 h koinkubiert. IFN γ wurde aus den Überständen der Kokultur von 4×10^4 DC und 2×10^4 A42 CTL mittels ELISA bestimmt. Als Negativkontrolle dienten DC, elektroporiert mit H₂O. Die Balken zeigen jeweils Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichungen (n.d. = nicht detektierbar).

24 h nach Elektroporation wurden die DC mit Melan-A-spezifischen A42 CTL koinkubiert und die Aktivierung der CTL 24 h später durch die Bestimmung der IFN γ -Sekretion detektiert. Als Negativkontrolle dienten mit H₂O elektroporierte DC.

Bereits DC, die mit 1 μ g Peptid elektroporiert wurden, waren in der Lage, eine hohe IFN γ -Sekretion in den CTL zu stimulieren (Abb. 4.16). Diese IFN γ -Sekretion konnte nach Elektroporation der 3d DC mit 5 μ g bzw. 10 μ g Melan-A-Peptid (p70) noch gesteigert werden. Bei den mit 7d DC stimulierten CTL war nach der Aufnahme von 5 μ g Peptid schon eine maximale IFN γ -Sekretion zu beobachten, die sich auch nach Elektroporation von 10 μ g Peptid nicht weiter steigern ließ. Es wurde deutlich, dass sowohl 7d DC als auch 3d DC sehr gut in der Lage waren, das lange Melan-A-Peptid (p70) zu prozessieren und den A42 CTL zu präsentieren. Die mit 3d DC stimulierten CTL zeigten sogar eine höhere IFN γ -Sekretion als die mit 7d DC stimulierten CTL.

4.2.4.3 Makropinozytose von langem Melan-A-Peptid (p70)

Nachdem in 4.2.4.2 gezeigt wurde, dass nach Elektroporation von langem Melan-A-Peptid (p70) 3d DC und 7d DC in der Lage waren, A42 CTL zu stimulieren, sollte die stimulatorische Kapazität der DC nach einer natürlichen Aufnahme von langem Melan-A-Peptid (p70) untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden DC mit langem Melan-A-Peptid (p70) für 24 h inkubiert und anschließend für 24 h mit A42 CTL koinkubiert. Die Stimulation von A42 CTL wurde wiederum durch deren IFN γ -Sekretion gemessen (Abb. 4.17). Zusätzlich sollte mit diesem Ansatz die Stimulationsfähigkeit unreifer und reifer DC nach Antigenaufnahme verglichen werden. 2d iDC und 6d iDC wurden generiert und in unreifem Zustand mit langem Melan-A-Peptid (p70) inkubiert. Nach 24-stündiger Inkubationszeit wurden die unreifen DC für weitere 24 h mit A42 CTL koinkubiert. Wie in Abb. 4.17 A zu erkennen ist, waren auch unreife DC in der Lage, CTL zu stimulieren und deren IFN γ -Sekretion zu induzieren. In Abb. 4.17 B wurden unreife DC 24 h mit langem Melan-A-Peptid (p70) inkubiert und vor der Kokultur mit A42 CTL noch 24 h mit dem „Jonuleit-Cocktail“ ausgereift. Die DC waren also zum Zeitpunkt der Antigenaufnahme unreif, zum Zeitpunkt der CTL-Stimulation ausgereift („i/mDC“). Auch diese DC waren in der Lage, das lange Melan-A-Peptid (p70) aufzunehmen und CTL zu stimulieren.

Außerdem wurden 3d mDC und 7d mDC 24 h lang mit langem Melan-A-Peptid (p70) inkubiert und weitere 24 h mit A42 CTL koinkubiert. Wie in Abb. 4.17 C zu erkennen ist, konnten reife DC das Peptid aufnehmen und A42 CTL stimulieren. Auch mit nur 25 ng/ml langem Peptid inkubierte mDC konnten eine IFN γ -Sekretion der A42 CTL hervorrufen. Vergleicht man die 3d DC mit den 7d DC, zeigen die Abb. 4.17 A-C ein relativ ähnliches Bild. Die in kürzerer Zeit generierten DC (unreife oder reife DC) zeigten generell eine größere

stimulatorische Kapazität als die 7d DC. Ein quantitativer Vergleich der IFN γ -Werte der Abb. 4.17 A-C untereinander ist nicht möglich, da die A42 CTL für die jeweiligen Kokulturen an unterschiedlichen Tagen verwendet werden mussten und daher in den verschiedenen Ansätzen jeweils unterschiedliche Fähigkeiten aufwiesen, IFN γ zu sezernieren.

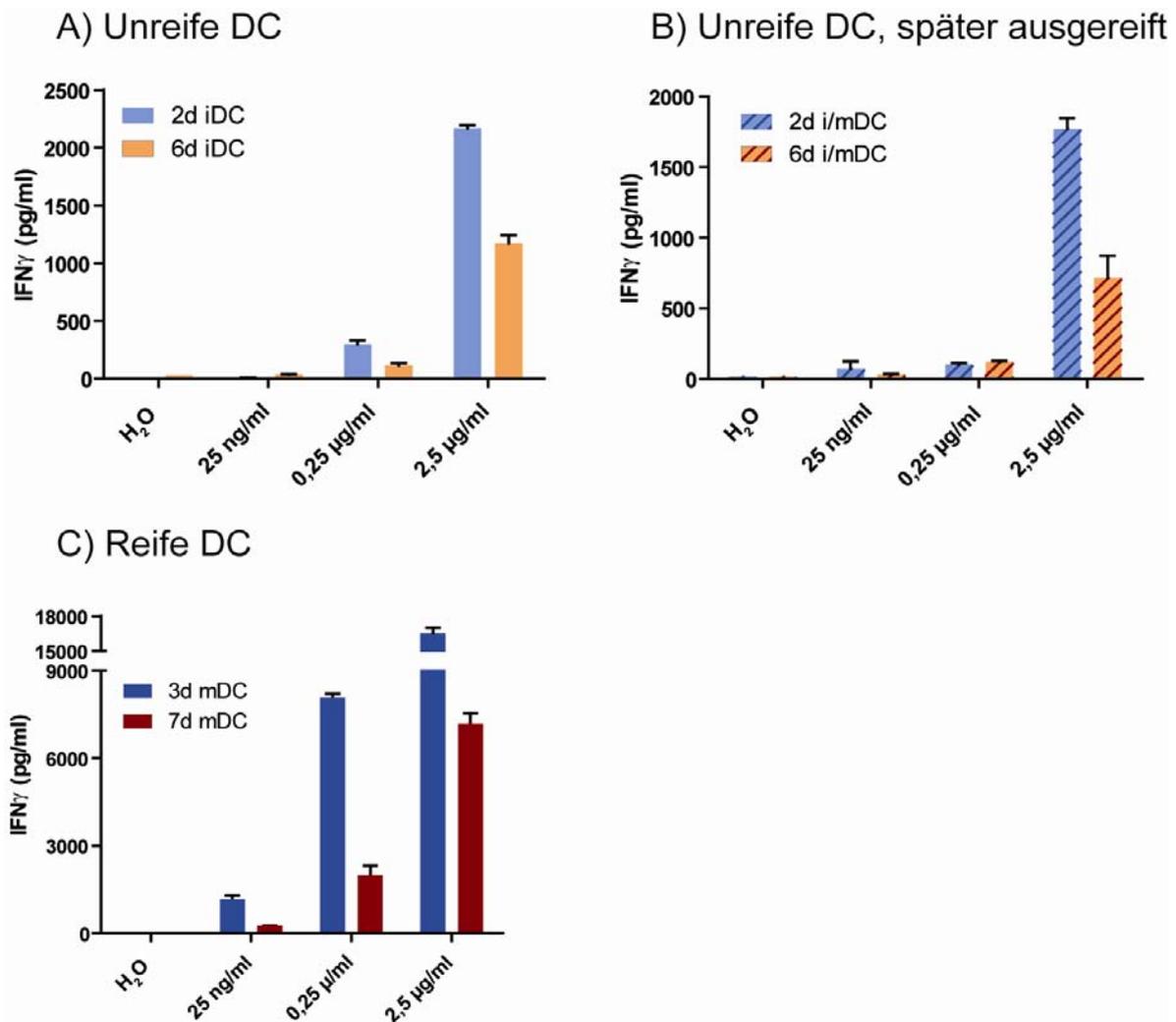


Abb. 4.17: Stimulatorische Kapazität von unreifen und reifen 3d DC bzw. 7d DC nach Makropinozytose von langem Melan-A-Peptid (p70). DC wurden für 24 h mit H₂O, 25 ng/ml, 0.25 μg/ml und 2.5 μg/ml langem Melan-A-Peptid (p70) (GSGHWDFAWPWGSLAGIGILTV) inkubiert. Anschließend wurden je 4x10⁴ DC für 24 h mit 2x10⁴ Melan-A-spezifischen A42 CTL koinkubiert. Die IFN γ -Freisetzung der A42 CTL wurde aus den Überständen durch ELISA bestimmt. Die Balken zeigen Mittelwerte aus Duplikaten mit Standardabweichungen. **A)** Unreife DC wurden mit langem Melan-A-Peptid (p70) inkubiert und für die Kokultur mit A42 CTL verwendet. **B)** Unreife DC wurden mit langem Melan-A-Peptid (p70) inkubiert und vor der Kokultur durch Zugabe des „Jonuleit-Cocktails“ ausgereift. Reife DC wurden mit A42 CTL koinkubiert. **C)** Mithilfe des „Jonuleit-Cocktails“ ausgereifte DC wurden mit langem Melan-A-Peptid (p70) inkubiert und für die Kokultur mit A42 CTL verwendet.

4.2.5 ELEKTROPORATION VON DC MIT MELAN-A-*ivtRNS*

3d DC und 7d DC zeigten ähnliche Fähigkeiten Peptid aufzunehmen, zu präsentieren und CTL zu stimulieren.

Da für die oben beschriebene De-novo-Induktion (4.1) *ivtRNS* als Quelle für das tumorassoziierte Antigen WT1 diente, sollte desweiteren geklärt werden, ob es Unterschiede in der Aufnahme, sowie Translation der *ivtRNS* und in der Prozessierung des Proteins zwischen 3d DC und 7d DC gab. Zu diesem Zweck wurden, wie in 4.2.2 beschrieben, 3d DC und 7d DC mit Melan-A-*ivtRNS* elektroporiert und die intrazelluläre Expression des Melan-A-Proteins durchflusszytometrisch gemessen. Anschließend wurde eine Kokultur von *ivtRNS*-transfizierten DC und den Melan-A-spezifischen CTL (A42) angesetzt.

4.2.5.1 Kinetik der Melan-A-Expression nach Elektroporation von *ivtRNS*

Zunächst sollte der optimale Zeitpunkt für die Detektion von intrazellulärem Melan-A-Protein nach Elektroporation von Melan-A-*ivtRNS* in 3d DC bestimmt werden.

2d iDC, 3d mDC und K562 wurden mit 24 µg Melan-A-*ivtRNS* elektroporiert (250 V, 150 µF), die Melan-A-Expression wurde im Durchflusszytometer 0,5 h, 1,5 h, 3 h, 6 h und 24 h nach der Elektroporation bestimmt. Das Optimum der Melan-A-Expression lag für 2d iDC (30 % Melan-A-positive Zellen, MFI 43) und 3d mDC (47 % Melan-A-positive Zellen, MFI 35) etwa 3 h nach der Elektroporation (Abb. 4.18). 24 h nach Elektroporation exprimierten die 2d iDC kaum noch Melan-A (4 % Melan-A-positive Zellen, MFI 18), bei den 3d DC exprimierten immerhin noch 30 % der Zellen das Melan-A-Protein. Die erythroblastoide Leukämiezelllinie K562 (Lozzio und Lozzio, 1975) dagegen, die hier als Positivkontrolle für die Elektroporation diente, zeigte erst 6 h nach der Elektroporation von *ivtRNS* die höchste Melan-A-Expression (67 % Melan-A-positive Zellen, MFI 158).

Für die folgenden Versuche wurden daher stets reife DC verwendet. Neben der höheren Proteinexpression hatte dies außerdem den Vorteil, dass die reifen DC leichter aus der Zellkulturflasche abgelöst werden konnten als die noch stark adhärierenden unreifen DC. Wie schon vorher in unserem Labor gezeigt wurde, lag das Optimum der Melan-A-Expression in 7d DC ebenfalls 3 h nach der Elektroporation von *ivtRNS*, daher wurden 3d DC und 7d DC immer 3 h nach der Elektroporation von *ivtRNS* intrazellulär auf die Expression von Melan-A-Protein gefärbt.

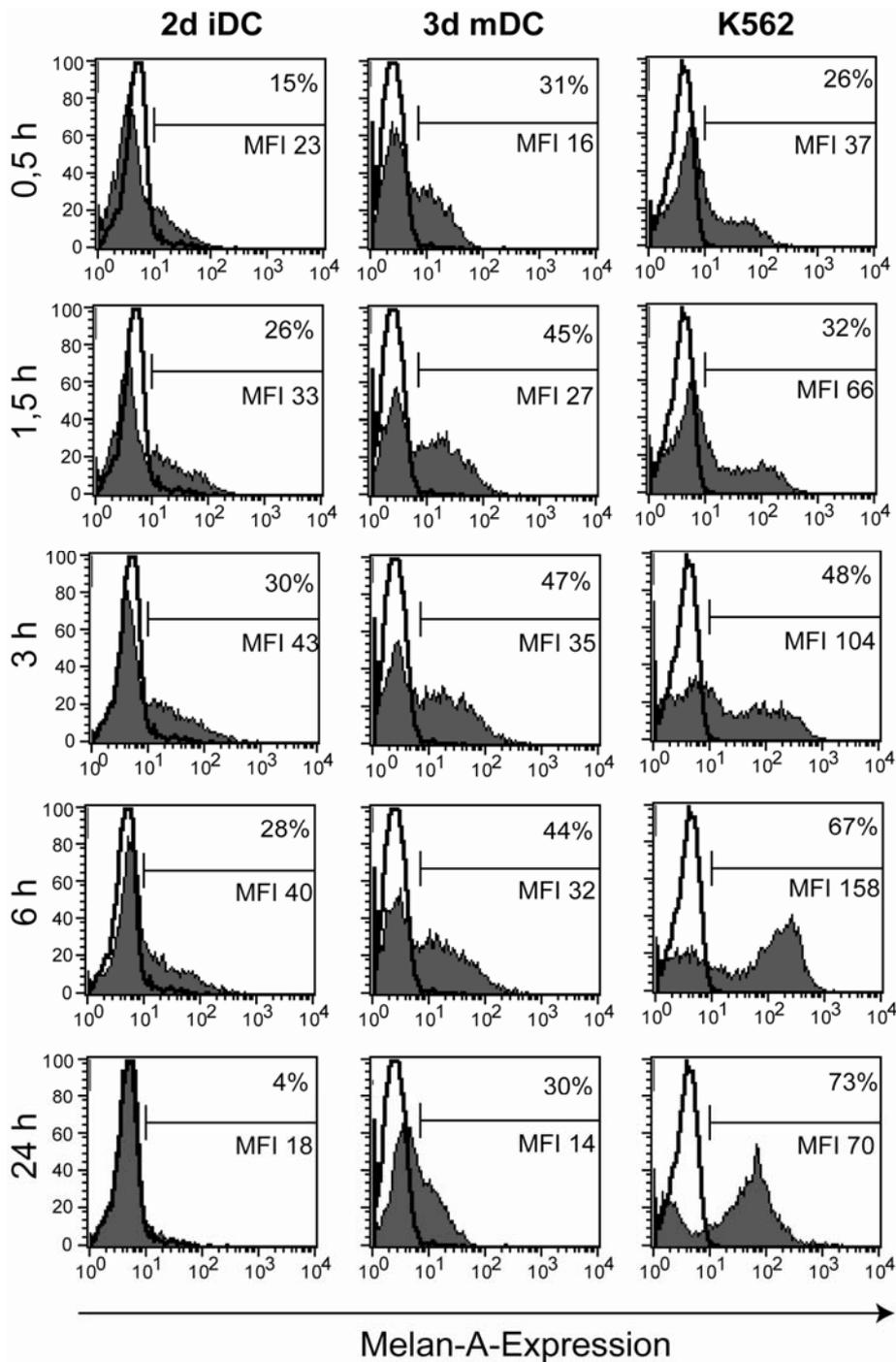


Abb. 4.18: Zeitkinetik der Melan-A-Expression in 2d iDC, 3d mDC und K562 nach Elektroporation von 24 µg Melan-A-ivtRNS. Je 3×10^6 2d iDC, 3d mDC und K562 wurden mit 24 µg Melan-A-ivtRNS elektroporiert und nach 0,5 h, 1,5 h, 3 h, 6 h und 24 h mit einem Maus-anti-human-Melan-A-Antikörper intrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (schwarze Histogramme). Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit H₂O elektroporiert wurden (schwarze, offene Kurven). Histogrammstatistiken wurden zur Berechnung des prozentualen Anteils Melan-A-positiver Zellen und der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) verwendet.

4.2.5.2 Proteinexpression nach Elektroporation von *ivtRNS* und stimulatorische Kapazität von 3d DC und 7d DC auf A42 CTL

Neben der Proteinexpression nach Elektroporation von *ivtRNS* sollte auch die stimulatorische Fähigkeit von *ivtRNS*-transfizierten 3d DC und 7d DC auf Gedächtnis-CTL untersucht werden.

4.2.5.2.1 Elektroporation gleicher Mengen *ivtRNS* in DC

In dieser Analyse wurde neben Melan-A-*ivtRNS* auch Tyrosinase-*ivtRNS* verwendet, um zu überprüfen, ob die schlechte Proteinexpression der 3d DC nach Transfektion von *ivtRNS* auf Eigenschaften der jeweiligen *ivtRNS*-Spezies zurückzuführen sein könnte oder allgemein für verschiedene Spezies zutrifft.

2d iDC, 3d mDC und 7d mDC wurden generiert und je 3×10^6 Zellen mit 24 μg Tyrosinase- bzw. 24 μg Melan-A-*ivtRNS* elektroporiert. 3 h nach der Elektroporation wurden die DC durchflusszytometrisch auf die intrazelluläre Expression von Tyrosinase und Melan-A untersucht (Abb. 4.19 A). Die Tyrosinase-Expression war in 2d iDC und 3d mDC kaum detektierbar, in 7d mDC konnte eine deutlich höhere Tyrosinase-Expression detektiert werden (51 % positive Zellen, MFI 13). Die Melan-A-Expression war generell höher als die Tyrosinase-Expression, die schlechteste Melan-A-Expression wurde in 2d iDC (22 % positive Zellen, MFI 24) beobachtet. In 3d mDC war der Anteil der Melan-A-positiven Zellen höher als in 2d iDC, die beste Melan-A-Expression wurde in den 7d mDC detektiert (64 % positive Zellen, MFI 205). Für beide Antigene war die beste Expression nach Elektroporation von *ivtRNS* in 7d mDC zu beobachten. 24 h nach der Elektroporation von Melan-A-*ivtRNS* wurde eine Kokultur aus *ivtRNS*-transfizierten DC und Melan-A-spezifischen A42 CTL angesetzt und nach 24-stündiger Koinkubation der IFN γ -Gehalt in den Überständen der Kokultur bestimmt (Abb. 4.19 B). Nach Kokultur mit 2d iDC sezernierten die CTL kein IFN γ , nach Kokultur mit 3d mDC konnte eine geringe Stimulation der CTL beobachtet werden. Eine deutlich stärkere IFN γ -Sekretion erfolgte nach Stimulation der CTL mit *ivtRNS*-transfizierten 7d mDC.

7d mDC zeigten hier also ein größeres stimulatorisches Potenzial als 3d mDC bzw. 2d iDC, was vermutlich auf die deutlich höhere Melan-A-Expression in diesen Zellen zurückzuführen war (Abb. 4.19 A). Die geringe Melan-A-Expression könnte dazu geführt haben, dass weniger MHC/Melan-A-Peptid-Moleküle auf der Oberfläche der 2d iDC und 3d mDC exprimiert wurden, was möglicherweise zur geringeren Stimulation von Melan-A-spezifischen A42 Gedächtniszellen geführt hatte.

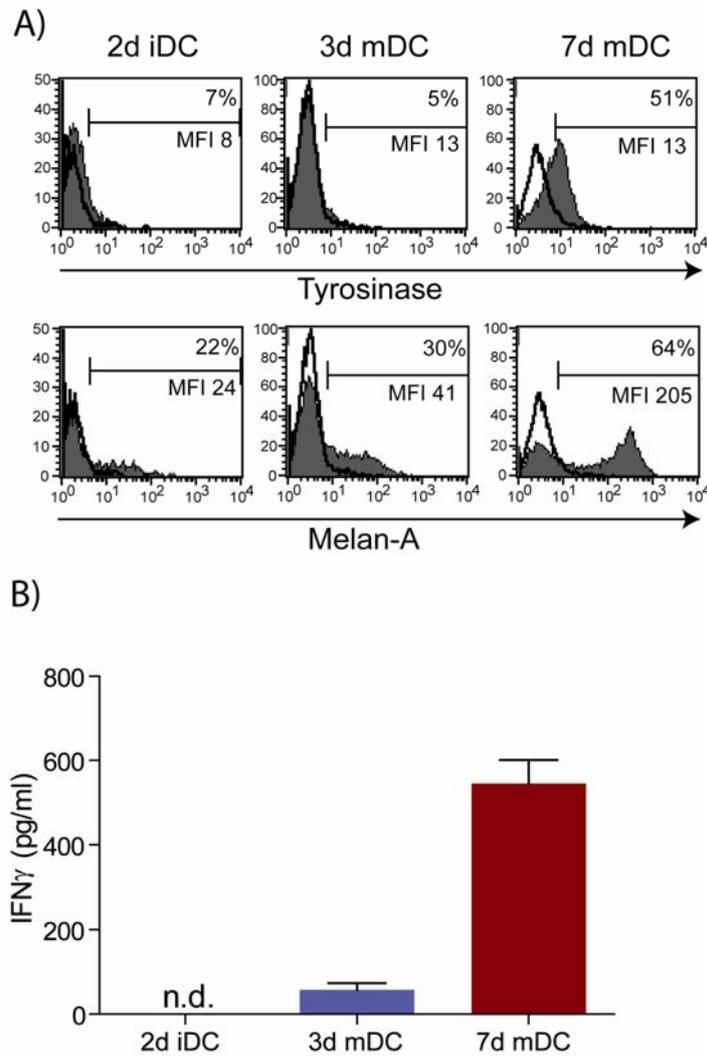


Abb. 4.19: Proteinexpression nach ivtRNS-Transfer und stimulatorische Kapazität der mit Melan-A-ivtRNS elektroporierten DC auf Melan-A-spezifische A42 CTL. A) Je 3×10^6 2d iDC, 3d mDC und 7d mDC wurden mit $24 \mu\text{g}$ Tyrosinase-ivtRNS bzw. Melan-A-ivtRNS elektroporiert und 3 h nach Elektroporation intrazellulär auf die Expression von Tyrosinase bzw. Melan-A mit spezifischen Antikörpern gefärbt (graue Histogramme). Offene, schwarze Histogramme zeigen die Proteinexpression nach Elektroporation von H₂O. **B)** 24 h nach Elektroporation der Melan-A-ivtRNS wurden je 4×10^4 DC mit 2×10^4 Melan-A-spezifischen A42 CTL für weitere 24 h kokultiviert und die IFN γ -Freisetzung aus den Überständen durch ELISA bestimmt. Die Balken zeigen Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichungen (n.d. = nicht detektierbar).

4.2.5.2 Elektroporation unterschiedlicher Mengen *ivt*RNS in DC

Um zu bestimmen, ob die beobachtete geringere stimulatorische Fähigkeit der 3d mDC auf CTL auf die geringere Proteinexpression zurückzuführen war, wurden 3d mDC und 7d mDC mit unterschiedlichen Mengen an Melan-A-*ivt*RNS elektroporiert, um eine vergleichbare Proteinexpression in beiden DC-Typen zu erreichen. 3d DC wurden mit 24 µg bzw. 48 µg Melan-A-*ivt*RNS elektroporiert, 7d DC mit 6 µg, 12 µg und 24 µg (Abb. 4.20 A). Diese DC wurden in eine Kokultur mit Melan-A-spezifischen A42 CTL eingesetzt. Schon die mit nur 6 µg *ivt*RNS transfizierten 7d DC zeigten eine bessere Melan-A-Expression als die mit 48 µg *ivt*RNS transfizierten 3d DC (71 % positive Zellen gegenüber 58 % positive Zellen). Die mit 12 µg *ivt*RNS elektroporierten 7d DC zeigten eine deutlich höhere mittlere Fluoreszenzintensität als die mit 48 µg *ivt*RNS transfizierten 3d DC (MFI 105 und MFI 70).

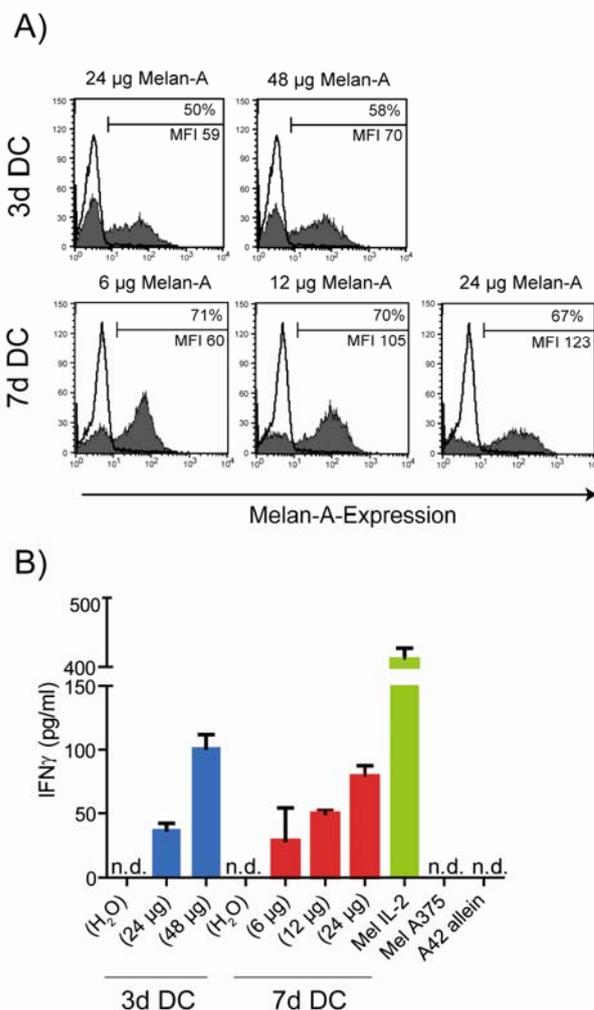


Abb. 4.20: Expression von Melan-A in 3d mDC und 7d mDC 3 h nach Elektroporation unterschiedlicher Mengen *ivt*RNS und stimulatorische Kapazität der elektroporierten DC auf Melan-A-spezifische A42 CTL. A) Je 3×10^6 3d mDC und 7d mDC wurden mit unterschiedlichen Mengen Melan-A-*ivt*RNS elektroporiert und 3 h nach Elektroporation intrazellulär auf die Expression von Melan-A mit einem Maus-anti-human-Melan-A-Antikörper gefärbt. Offene, schwarze Kurven zeigen die Proteinexpression in DC nach Elektroporation von H₂O, die grau unterlegten Kurven zeigen die spezifische Bindung des Antikörpers an Melan-A nach Elektroporation der Melan-A-*ivt*RNS. B) 24 h nach Elektroporation der Melan-A-*ivt*RNS wurden je 4×10^4 DC mit 2×10^4 Melan-A-spezifischen A42 CTL für weitere 24 h kokultiviert und die IFN_γ-Freisetzung in den Überständen durch ELISA bestimmt. Die Balken zeigen Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichungen (n.d. = nicht detektierbar).

Es wurde deutlich, dass 3d DC mit größeren Mengen an *ivt*RNS transfiziert werden mussten, um eine zu den 7d DC vergleichbare Proteinexpression zu erhalten. Nach Kokultur mit A42 CTL zeigten 3d DC und 7d DC mit ähnlicher Proteinexpression auch eine ähnliche stimulatorische Kapazität (Abb. 4.20 B). Hier zeigten sogar die CTL, die mit 48 µg Melan-A-

*ivt*RNS transfizierten 3d DC stimuliert wurden, eine höhere IFN γ -Freisetzung als die CTL, die mit 24 μ g Melan-A-*ivt*RNS-transfizierten 7d DC stimuliert wurden. Dies deutete darauf hin, dass 3d DC, falls die Proteinexpression der Expression in 7d DC entsprach, auch ähnlich gute stimulatorische Eigenschaften aufwiesen. Der kritische Punkt bei der Verwendung von 3d DC als Stimulatorzellen für die De-novo-Induktion schien in der Elektroporation von *ivt*RNS zu liegen. Verwendete man für 7d DC und 3d DC dieselben Elektroporationsbedingungen, musste in den 3d DC eine deutlich höhere Konzentration an *ivt*RNS bei der Elektroporation eingesetzt werden, um eine vergleichbare Proteinexpression wie in den 7d DC zu erhalten.

4.2.5.3 Optimierung der Elektroporationsbedingungen für 3d DC

Da 3d DC und 7d DC in den bisherigen Versuchen mit denselben Elektroporationsbedingungen transfiziert worden waren und hier ein deutlicher Unterschied in der Proteinexpression nach Elektroporation von *ivt*RNS beobachtet wurde, sollten verschiedene Elektroporationsbedingungen für 3d DC getestet werden, um das Eindringen von *ivt*RNS in die Zelle zu verbessern und dadurch eine verbesserte Proteinexpression in 3d DC zu erreichen.

4.2.5.3.1 eGFP-Expression in DC nach Elektroporation von *ivt*RNS mit unterschiedlichen Elektroporationsbedingungen

Um verschiedene Elektroporationsbedingungen für 3d DC zu testen, wurden zunächst je 8 μ g eGFP-(„enhanced green fluorescence protein“)-*ivt*RNS unter verschiedenen Pulsbedingungen in 3d DC elektroporiert. eGFP-*ivt*RNS eignete sich für diesen Versuch, da das eGFP-Protein in der Zelle ohne Verwendung von Antikörpern direkt durchflusszytometrisch nachzuweisen ist. Die DC wurden 3 h und 24 h nach Elektroporation auf die Expression von eGFP untersucht (Abb. 4.21). Als Kontrolle wurden 7d DC und 3d DC mit den in unserem Labor etablierten Standard-Elektroporationsbedingungen für DC mit 8 μ g eGFP-*ivt*RNS elektroporiert (250 V, 150 μ F). Unter diesen Standardbedingungen zeigten die 3d DC, wie schon beschrieben, eine schlechtere eGFP-Expression als 7d DC. Mit veränderten Elektroporationsbedingungen ließ sich die Proteinexpression in 3d DC aber deutlich steigern, die beste eGFP-Expression war in 3d DC zu beobachten, die mit 300 V und 300 μ F elektroporiert worden waren. Hier waren schon 3 h nach Elektroporation von *ivt*RNS 96 % der DC eGFP-positiv, die mittlere Fluoreszenzintensität betrug 251. 24 h nach Elektroporation steigerte sich die MFI sogar auf 531. Diese eGFP-Expression überstieg sogar die Expression in 7d DC.

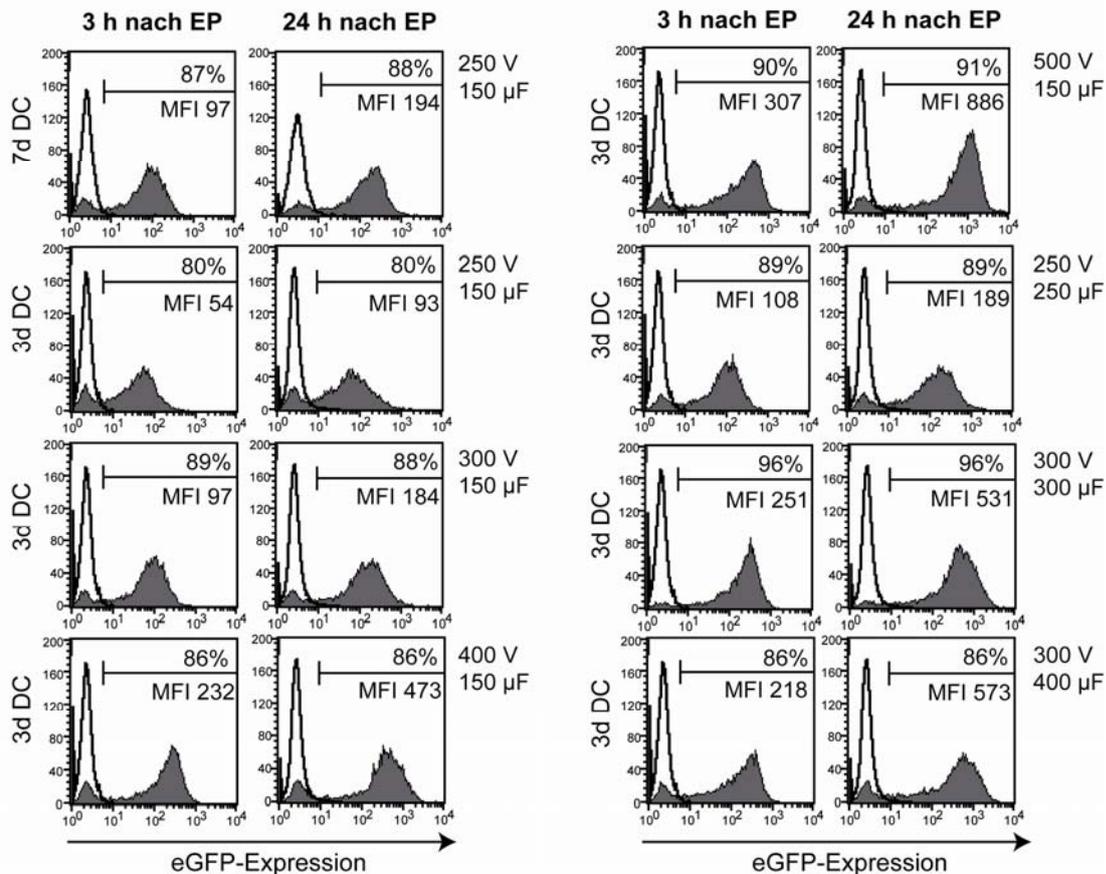


Abb. 4.21: Optimierung der Elektroporationsbedingungen für 3d mDC. Je $2-3 \times 10^6$ 7d mDC und 3d mDC wurden mit $8 \mu\text{g}$ eGFP-ivtRNS unter den jeweils angegebenen Elektroporationsbedingungen im exponentiellen Protokoll transfiziert. 3 h und 24 h nach der Elektroporation wurde die eGFP-Expression im Durchflusszytometer bestimmt. Die offenen Kurven zeigen die eGFP-Expression in mit H_2O transfizierten DC, die grau hinterlegten Kurven zeigen die eGFP-Expression in den mit eGFP-ivtRNS transfizierten Proben. Histogrammstatistiken wurden zur Bestimmung des prozentualen Anteils der eGFP-exprimierenden Zellen in der DC-Population und der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) herangezogen.

4.2.5.3.2 Proteinexpression nach ivtRNS-Transfer unter optimierten Elektroporationsbedingungen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass 3d DC nach Elektroporation von eGFP-ivtRNS mit veränderten Bedingungen (300 V, 300 µF) eine sehr gute Proteinexpression aufwiesen, wurden diese Bedingungen auch für die Elektroporation von Melan-A-ivtRNS in 3d DC verwendet. Anschließend wurde eine Kokultur dieser DC mit Melan-A-spezifischen A42 CTL angesetzt, um das stimulatorische Potenzial der so transfizierten DC zu bestimmen.

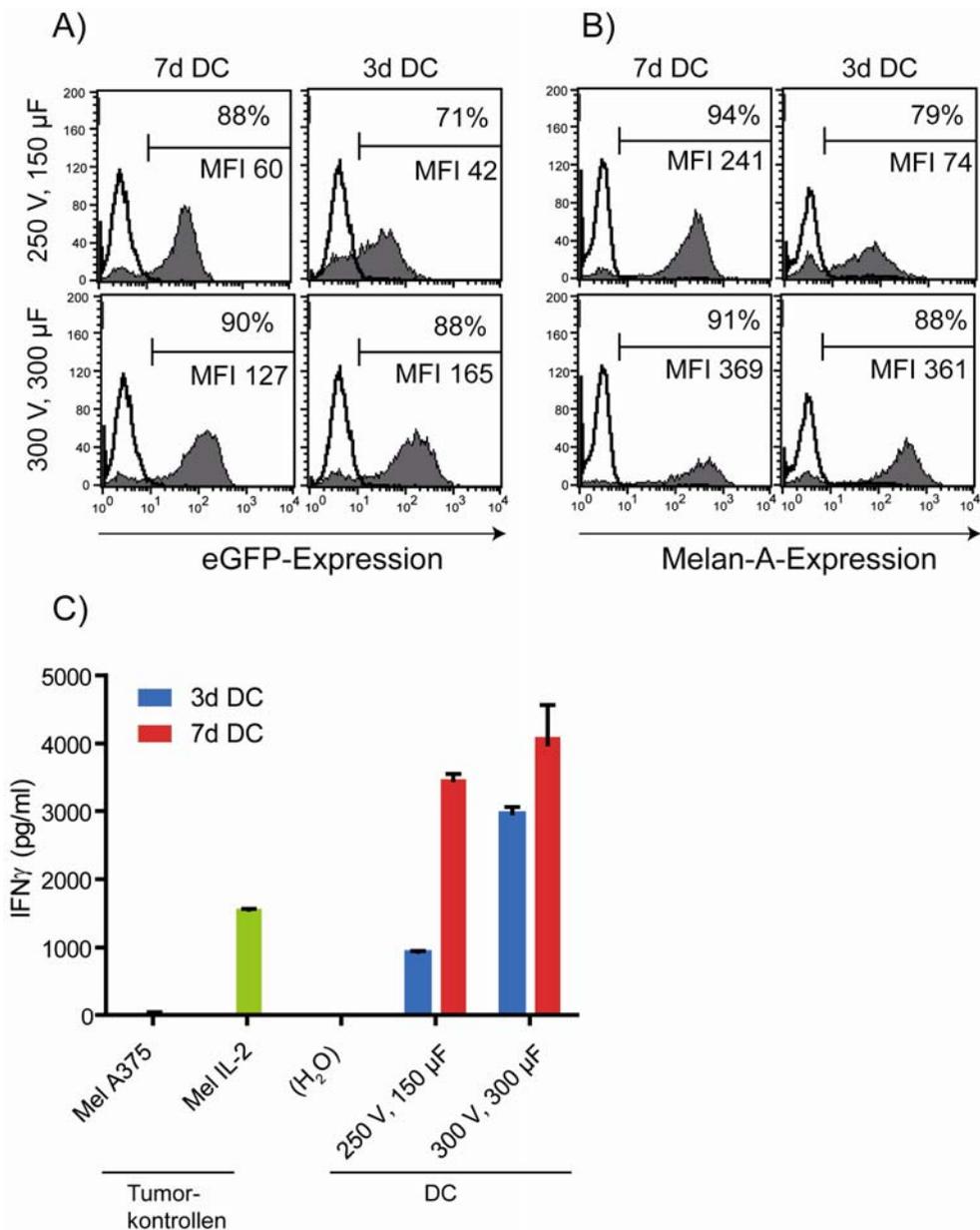


Abb. 4.22: Einfluss verschiedener Elektroporationsbedingungen auf das stimulatorische Potenzial von 3d DC und 7d DC. **A)** 7d DC und 3d DC wurden mit den Standard-Elektroporationsbedingungen (250 V, 150 μ F) und den optimierten Elektroporationsbedingungen (300 V, 300 μ F) mit 8 μ g eGFP-ivtRNS elektroporiert. 3 h nach Elektroporation wurde der Anteil eGFP-positiver DC durchflusszytometrisch bestimmt. **B)** 7d DC und 3d DC wurden mit den Standard-Elektroporationsbedingungen (250 V, 150 μ F) und den optimierten Elektroporationsbedingungen (300 V, 300 μ F) mit 12 μ g Melan-A-ivtRNS elektroporiert. 3 h nach Elektroporation wurde der Anteil Melan-A-positiver DC durchflusszytometrisch bestimmt. **C)** Je 4×10^4 Melan-A-ivtRNS-transfizierte DC wurden 24 h nach der Elektroporation für 24 h mit 2×10^4 A42 CTL kokultiviert. Die IFN γ -Freisetzung wurde in den Überständen durch ELISA bestimmt. Die Balken zeigen Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichungen.

Wie in Abb. 4.22 A und B zu erkennen ist, zeigten 3d DC, die mit eGFP-ivtRNS (Abb. 4.22 A) oder Melan-A-ivtRNS (Abb. 4.22 B) mit optimierten Elektroporationsbedingungen (300 V, 300 μ F) transient transfiziert worden waren, eine höhere Proteinexpression als DC, die mit Standardbedingungen (250 V, 150 μ F) gepulst wurden. Die mittlere Fluoreszenzintensität der

Melan-A-Expression verüffachte sich sogar im Vergleich zu den „alten“ Elektroporationsbedingungen. Es konnte gezeigt werden, dass die Elektroporation verschiedener *ivt*RNS-Spezies mit den optimierten Elektroporationsbedingungen in den 3d DC effizienter war. Auch für die 7d DC schienen die „neuen“ Elektroporationsbedingungen zu einer erhöhten Proteinexpression zu führen, jedoch war hier der Unterschied zur Proteinexpression nach Elektroporation mit den „alten“ Elektroporationsbedingungen nicht so groß wie bei den 3d DC. Nach Kokultur mit Melan-A-spezifischen A42 CTL zeigten die mit den „neuen“ Elektroporationsbedingungen transfizierten DC eine deutlich höhere stimulatorische Fähigkeit als die mit den „alten“ Elektroporationsbedingungen transfizierten DC (Abb. 4.22 C). Die CTL sezernierten nach Kokultur mit den mit 300 V und 300 μ F transfizierten 3d DC circa dreimal so viel IFN γ wie nach Kokultur mit den mit 250 V und 150 μ F elektroporierten 3d DC. Bei den 7d DC war der Unterschied bei weitem nicht so deutlich. Es konnte gezeigt werden, dass die unterschiedliche Elektroporationseffizienz und Proteinexpression in 3d DC und 7d DC durch veränderte Elektroporationsbedingungen für die 3d DC ausgeglichen werden konnte. Mit diesen optimierten Elektroporationsbedingungen sind 3d DC ebenso gut wie 7d DC in der Lage, das Protein nach Transfektion von *ivt*RNS zu exprimieren und CTL über ihre Peptid-MHC-Moleküle zu stimulieren.

4.2.6 MIGRATION VON DC

Neben ihrer Fähigkeit Antigen aufzunehmen, ist die Fähigkeit zu wandern ein entscheidendes Charakteristikum von DC. Nach der Aufnahme von Antigen reifen iDC zu mDC heran und regulieren den Chemokinrezeptor CCR7 hoch, der essenziell für die Wanderung der DC in die Lymphknoten ist. Dort treffen die antigenbeladenen DC auf naive T-Zellen, die ebenfalls durch den CCR7-Rezeptor in die Lymphknoten gelangen. Einer der Liganden für CCR7 ist das Chemokin CCL19, das im Lymphknoten produziert wird und so naive T-Zellen und reife DC zu ihrem Zielort lenkt.

Zur Analyse der Migration der *in vitro* generierten DC wurden 2d iDC, 3d mDC, 6d mDC und 7d mDC generiert und je 2×10^5 der Zellen in einen Migrationsversuch eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden spezielle 24-Lochplatten verwendet, die aus zwei Kammern bestehen und eine Wanderung von Zellen durch eine Membran aus einer Kammer in die Andere erlauben. Die DC wanderten entweder spontan oder entlang eines Chemokingradienten, der durch die Zugabe des Chemokins CCL19 in die untere Kammer, in die die DC wandern sollen, simuliert wurde. Die Zellen, die nach zwei Stunden Inkubationszeit in der oberen Kammer gezählt wurden, sind die Zellen, die nicht gewandert sind (Abb. 4.23 blaue Balken), Zellen, die in der unteren Kammer gezählt wurden, sind gewandert (Abb. 4.23 lila Balken). Die Differenz zwischen den in den oberen und unteren Kammern gezählten Zellen und den

insgesamt eingesetzten Zellen kam dadurch zustande, dass einige Zellen an der Membran zwischen den zwei Kammern haften blieben.

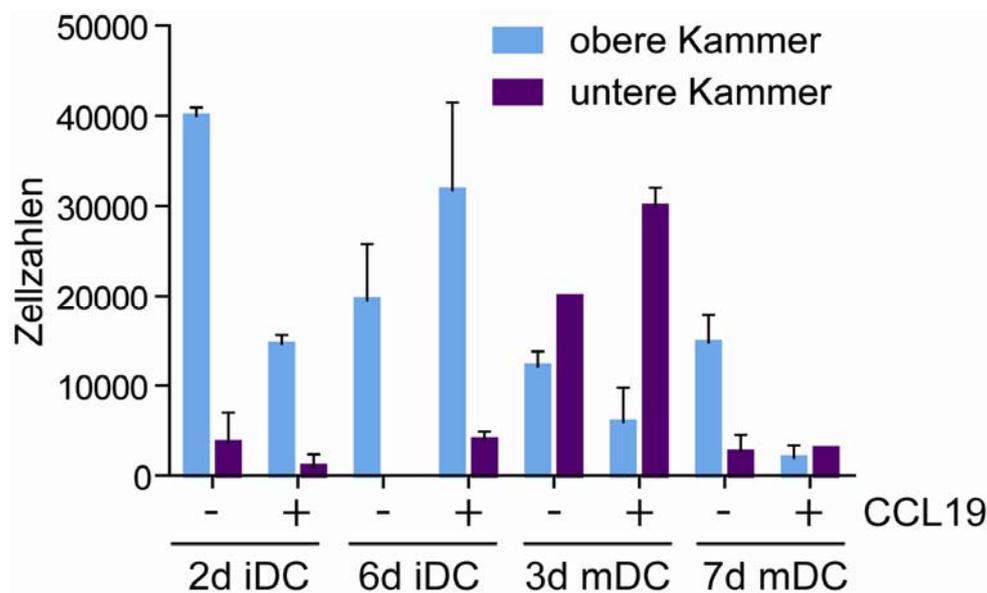


Abb. 4.23: Migrationsfähigkeit von 2d iDC, 6d iDC, 3d mDC und 7d mDC. Je 2×10^5 2d iDC, 6d iDC, 3d mDC oder 7d mDC wurden in die obere Kammer einer „Transwell“-Platte gegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. In die unteren Kammern der „Transwell“-Platte wurde Medium mit (+) oder ohne (-) 100 ng/ml CCL19 vorgelegt. Nach 2 h Inkubation wurden die Zellzahlen in den oberen und unteren Kammern bestimmt. Die Balken zeigen die Mittelwerte der in jeweils zwei Kammern gezählten Zellzahlen mit Standardabweichungen.

Die 2d iDC und 6d iDC zeigten eine sehr geringe spontane und gerichtete Migration (Abb. 4.23). Die 3d DC waren in der Lage, spontan zu wandern, der Anteil der gewanderten Zellen war aber bei der gerichteten Migration höher. 7d DC zeigten eine spontane und gerichtete Migrationsfähigkeit, die deutlich unter der Migrationsfähigkeit der 3d DC blieb. Somit schienen die 3d DC eine bessere Wanderungsfähigkeit im Vergleich zu den 7d DC zu haben, wodurch sie möglicherweise schneller in die Lymphknoten gelangen könnten als 7d DC.

Insgesamt konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass 3d DC und 7d DC ähnliche Eigenschaften in ihrer Fähigkeit Peptide aufzunehmen und Gedächtnis-T-Zellen zu stimulieren aufwiesen. Sie unterschieden sich jedoch in ihrer Proteinexpression nach Elektroporation von *ivt*RNS mit den in unserem Labor etablierten Standardbedingungen. Mit optimierten Bedingungen konnten jedoch in 3d DC eine zu 7d DC vergleichbare Proteinexpression und anschließende stimulatorische Kapazität erzielt werden.

4.3 ETABLIERUNG EINES TESTSYSTEMS FÜR TCR-SPEZIFITÄT IN JURKAT-76-ZELLEN

Mit dem oben beschriebenen De-novo-Induktionsansatz konnte eine T-Zelllinie generiert werden, die in der Lage war, WT1-exprimierende Tumorzellen zu lysieren. Da die Zellen im Laufe der Kultivierung von unspezifischen T-Zellen überwachsen wurden, konnten keine weiteren Tests mit diesen WT1-spezifischen T-Zellen durchgeführt werden. Bei T-Zellklonen hat man generell häufig das Problem, dass sie meist nur eine relativ kurze Lebensdauer *in vitro* besitzen und deshalb häufig nicht alle notwendigen Tests mit den T-Zellen durchgeführt werden können.

Um dieses Problem zu umgehen, werden die TCR-Sequenzen der T-Zellklone durch PCR amplifiziert, identifiziert und die TCR in andere Zellen, wie z.B. PBL (periphere Blut-Lymphozyten) transferiert. In der Literatur werden verschiedene Methoden beschrieben, um die Spezifität eines T-Zellrezeptors außerhalb der ursprünglichen T-Zelle zu testen. Dies geschieht meist nach einem retroviralen Transfer der TCR-cDNS in die Zielzellen. Ferner kann so untersucht werden, ob der TCR auch noch nach Transfer in eine andere Zelle dieselbe Spezifität und Funktionalität besitzt wie in der ursprünglichen T-Zelle. Nur dann wäre der TCR z.B. für einen adoptiven T-Zellrezeptor-Transfer geeignet. Nach Transduktion von PBL mit TCR-cDNS steht man jedoch vor dem Problem, dass nicht nur der transduzierte TCR auf der Oberfläche der T-Zellen exprimiert wird, sondern auch die endogenen TCR der PBL und diverse Misch-TCR, die sich aus einer transduzierten TCR-Alpha-Kette und einer endogenen TCR-Beta-Kette oder umgekehrt zusammensetzen können. Um das Problem zu umgehen, dass transduzierte TCR mit endogenen TCR konkurrieren müssen, werden häufig TCR α/β -defiziente Jurkat-76-Zellen (J76) für die Transduktion von TCR verwendet. Diese T-Zellen haben keinen endogenen TCR und tragen kein CD3 auf der Oberfläche, da CD3 nur in Kombination mit einem TCR exprimiert wird. Einen erfolgreichen Transfer von TCR in J76-Zellen kann man daher direkt an der CD3-Expression der Zellen ablesen. Ein großer Nachteil des retroviralen Systems ist die lange Zeitspanne, die man für den retroviralen Transfer benötigt. Daher war es eines der Hauptziele dieser Doktorarbeit, ein System mit J76-Zellen zu entwickeln, das es erlaubt, die Spezifität und Funktionalität von TCR ohne retroviralen Transfer zu analysieren. Zu diesem Zweck musste ein geeignetes System etabliert werden, mit dem die Aktivierung der TCR-transgenen J76-Zellen detektiert werden konnte. Die üblichen Verfahren, mit denen die Stimulation von T-Zellen über deren TCR bzw. die Aktivierung von T-Zellen gemessen wird, wie z.B. über die IFN γ -Sekretion nach Stimulation der T-Zellen mit spezifischen Zielzellen oder die Lyse von Zielzellen in einem ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Versuch, funktionieren in Jurkat-Zellen nicht.

4.3.1 PRINZIP DES TCR-TEST-SYSTEMS MIT JURKAT-76-ZELLEN

Eine geeignete Methode, um TCR-defiziente J76-T-Zellen ohne retroviralen Transfer mit einem TCR zu transfizieren, ist die Elektroporation von *ivtRNS*. Um *ivtRNS* aus einer TCR-cDNS herstellen zu können, wurden die cDNS der in 4.1 beschriebenen „WT1-TCR“-Ketten $V\alpha 19$, $V\beta 5.2$ und $V\beta 13.2$ in T7-Vektoren kloniert, mit deren Hilfe durch eine T7-Polymerase cDNS in *ivtRNS* umgeschrieben werden konnte. Die Effizienz der Transfektion mit *ivtRNS* kann über die CD3-Expression auf der Oberfläche der Zellen nachgewiesen werden. J76-Zellen besitzen zwar endogenes CD3, dieses kommt jedoch nur zusammen mit einem TCR an die Oberfläche und wird daher nicht auf TCR-defizienten Jurkat-76-Zellen exprimiert (Heemskerk et al., 2003). Nach einer erfolgreichen Elektroporation der J76-Zellen mit TCR-*ivtRNS* erscheint der TCR:CD3-Komplex für circa 24 h auf der Oberfläche. Die TCR-transgenen J76-Zellen können dann mit spezifischen Zielzellen stimuliert werden, wie z.B. T2-Zellen, die TAP-defizient und HLA-A2-positiv sind und mit dem jeweiligen spezifischen Peptid extrazellulär beladen werden können (Salter et al., 1985) oder Tumorzellen, die das entsprechende Epitop präsentieren (Abb. 4.24). 24 h nach Stimulation der J76-Zellen über den transgenen TCR sollte die Spezifität und Funktionalität des TCR nachgewiesen werden.

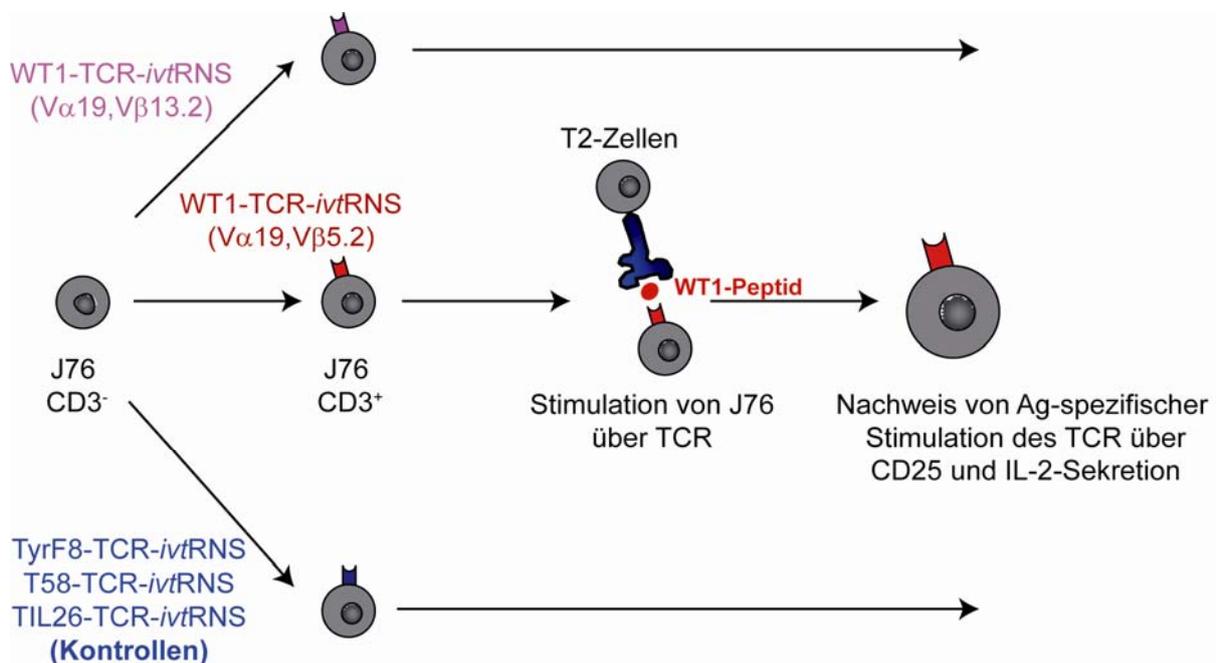


Abb. 4.24: Nachweis von TCR-Spezifität in Jurkat-76. TCR-defiziente Jurkat-76-Zellen (J76) werden mit TCR α - und β -Ketten-*ivtRNS* elektroporiert, worauf sie ausschließlich den transfizierten TCR transient auf ihrer Oberfläche exprimieren. Diese TCR-Expression wird von der CD3-Expression auf der Oberfläche begleitet und kann über eine Oberflächenfärbung von CD3 nachgewiesen werden. Die TCR-transgenen Jurkat-76-Zellen werden dann mit spezifischen Zielzellen, wie z.B. peptidbeladenen T2-Zellen kokultiviert. Nach 24 h wird die spezifische TCR-Stimulation der Jurkat-Zellen durch eine verstärkte Expression von CD25 und die Sekretion von IL-2 detektiert.

Als mögliche Methoden, um eine Aktivierung von J76-Zellen zu messen, konnten in dieser Doktorarbeit zwei Möglichkeiten aufgezeigt werden.

T-Zellen tragen verschiedene Oberflächenmoleküle auf ihrer Oberfläche, die nach Stimulation hochreguliert werden. Eines dieser Moleküle ist die Alpha-Kette des IL-2-Rezeptors, CD25. Der IL-2-Rezeptor setzt sich aus drei verschiedenen Ketten zusammen: der Alpha-, Beta- und Gamma-Kette. Ruhende T-Zellen exprimieren konstitutiv die Beta- und die Gamma-Kette des IL-2-Rezeptors. Durch eine Aktivierung der T-Zellen wird die Synthese einer Alpha-Kette induziert, wodurch ein hochaffiner, heterodimerer Rezeptor gebildet wird. Die Zelle kann in diesem Zustand auf sehr geringe IL-2-Konzentrationen reagieren. Die Bindung von IL-2 an den IL-2-Rezeptor signalisiert der T-Zelle, in den Zellzyklus einzutreten, wodurch sich aktivierte T-Zellen mehrere Tage lang teilen können. CD25 kam daher als ein möglicher Marker für die Aktivierung von T-Zellen in Frage.

T-Zellen produzieren nach Aktivierung durch ein spezifisches Antigen in Gegenwart eines kostimulatorischen Signals das Zytokin Interleukin-2 (IL-2). IL-2 steuert die Proliferation und Differenzierung von aktivierten T-Zellen. Daher ließ sich die IL-2-Sekretion nach Stimulation der Jurkat-Zellen über einen transgenen TCR neben CD25 als Indikator für eine spezifische Aktivierung der J76-Zellen nutzen.

4.3.2 CHARAKTERISIERUNG VERSCHIEDENER JURKAT-T-ZELLINIEN

Die humane leukämische T-Zelllinie Jurkat zeichnet sich durch eine hohe genetische Instabilität aus. Das bedeutet, dass sich Jurkat-Subklone deutlich in ihren Eigenschaften, wie z.B. der Expression diverser Oberflächenmoleküle oder der Sekretion von Zytokinen unterscheiden können. Diese Unterschiede kommen möglicherweise durch Defekte in den „Mismatch“-Reparier-Genen zustande, die zu einer hohen Mutationsrate in Jurkat-T-Zellen führen. Daher sollten zunächst verschiedene, in unserem Labor vorhandene Transduktanten der Ausgangszelllinie Jurkat-76 in der Expression verschiedener T-Zell-typischer Oberflächenmoleküle und der Sekretion von IL-2 miteinander verglichen werden. Ferner sollte bestimmt werden, ob ein spezielles Expressionsmuster an Oberflächenmolekülen einen Einfluss auf die Fähigkeit hat, nach einer Stimulation durch PMA und Ionomyzin bzw. durch den TCR IL-2 zu sezernieren.

4.3.2.1 Phänotyp verschiedener Jurkat-T-Zelllinien

Es sollte bestimmt werden, ob sich die Expression ausgewählter Oberflächenmoleküle nach einer Stimulation der Jurkat-T-Zellen verändert und ob unterschiedliche Jurkat-Zelllinien ein ähnliches Expressionsmuster der Oberflächenmoleküle aufweisen. Zunächst wurde der

Phänotyp der beiden Jurkat-Zelllinien J76 und J76-TCR26 verglichen. J76-TCR26 ist eine Transduktante, die aus der ursprünglichen TCR-defizienten J76-Zelllinie durch einen retroviralen Transfer des TCR26 und einer anschließenden Klonierung generiert wurde (Sommermeyer et al., 2006). Der TCR26 ist ein TCR, der aus Tumor-Infiltrierenden Lymphozyten (TIL) eines Tumorpatienten („Patient 26“) isoliert wurde und der ein von RCC26-Tumorzellen präsentiertes, bisher noch nicht identifiziertes Peptid erkennt (Schendel et al., 1993). Die Jurkat-Zellen wurden entweder im unstimulierten Zustand oder 24 h nach Stimulation mit 5 ng/ml des Phorbolesters PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat) und 500 ng/ml des Kalziumionophors Ionomycin mit spezifischen FITC- oder PE-gekoppelten Antikörpern auf die Oberflächenmoleküle CD28, CD137, CD40L, CD152 und CD25 gefärbt (Abb. 4.25).

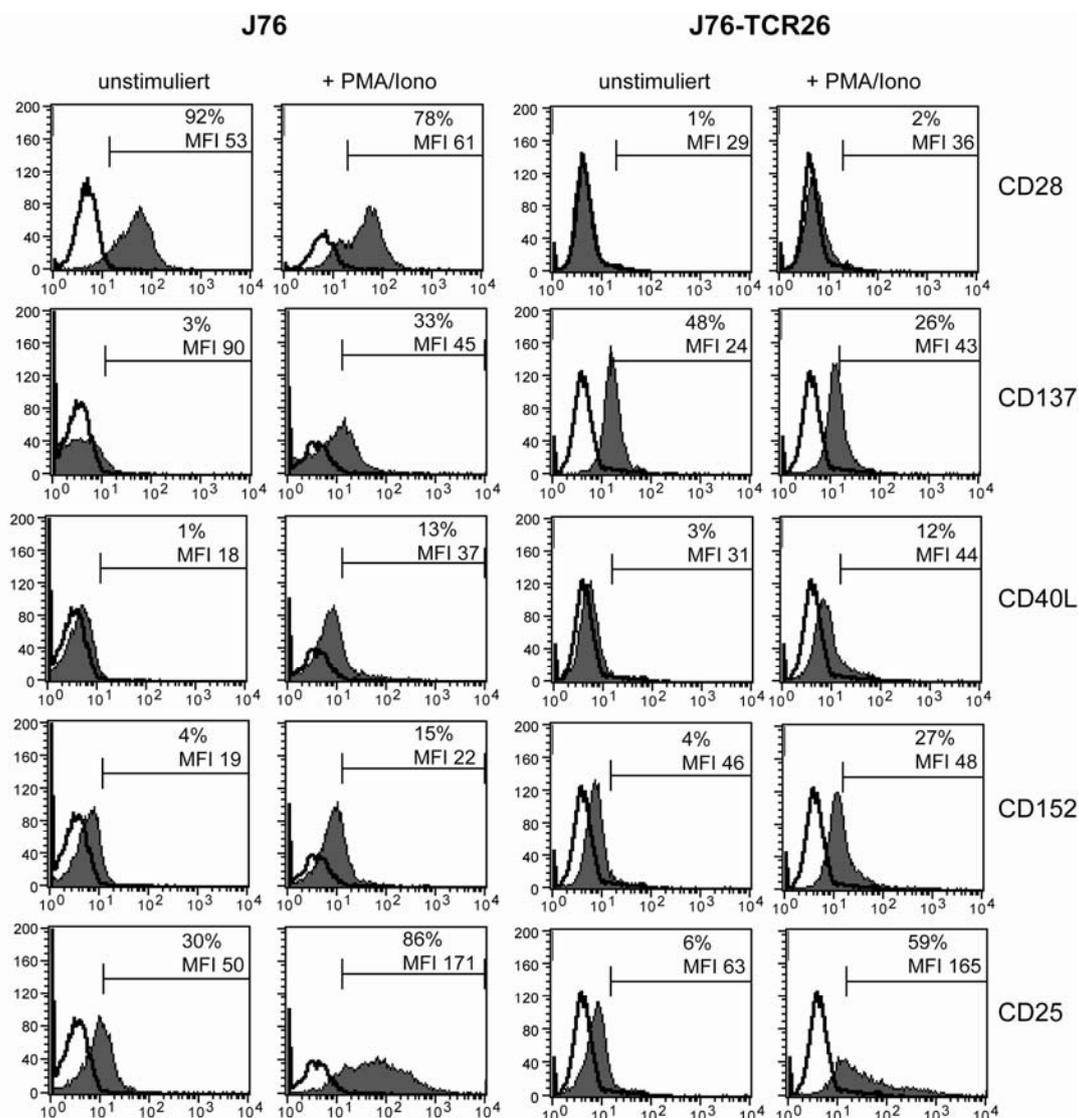


Abb. 4.25: Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf J76 und J76-TCR26 vor und nach Stimulation mit PMA/Ionomycin. Die Zelllinien J76 und J76-TCR26 wurden 24 h mit 5 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert. Unstimulierte und stimulierte Zellen wurden mit FITC- und PE-gekoppelten Antikörpern gegen CD28, CD137, CD40L, CD152 und CD25 gefärbt. Offene Histogramme zeigen Isotypkontrollen, grau hinterlegte Histogramme die Bindung der spezifischen Antikörper.

Die Stimulation der Zellen mit PMA erfolgt über eine Aktivierung der Proteinkinase-C, wohingegen die Zugabe von Ionomycin die intrazelluläre Konzentration an Kalzium erhöht. Die Stimulation erfolgte demnach unabhängig vom TCR, die ausgelösten Ereignisse treten aber auch bei der TCR-Stimulation als Teil der Signalkaskade auf. PMA und Ionomycin haben einen sehr stark stimulierenden Effekt.

Es war zu erkennen, dass die J76-Zellen das kostimulatorische Molekül CD28, das an B7.1 und B7.2 auf antigenpräsentierenden Zellen binden kann und wichtig für eine Signalweiterleitung in der T-Zelle nach Aktivierung des TCR ist, im unstimulierten und im stimulierten Zustand exprimierten. Die J76-TCR26-Zellen hingegen schienen diese Fähigkeit verloren zu haben, was möglicherweise zu einer gestörten Signalweiterleitung nach Aktivierung dieser Zellen führen könnte. CD137, ein Molekül, das nach einer spezifischen Aktivierung über den TCR verstärkt auf T-Zellen exprimiert wird, wurde durch Stimulation mit PMA und Ionomycin nur in J76-Zellen hochreguliert, in den J76-TCR26-Zellen exprimierten weniger Zellen nach Aktivierung dieses Molekül. Die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40L und CD152 war in beiden Zelllinien ähnlich, die unstimulierten Zellen exprimierten nur wenig von diesen Molekülen, nach Aktivierung trugen mehr Zellen innerhalb der Population diese CD-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Am deutlichsten veränderte sich die Expression von CD25 (IL-2R α) nach Aktivierung der Jurkat-Zellen. Beide Jurkat-Zelllinien exprimierten im unstimulierten Zustand relativ wenig CD25, nach der Stimulation mit PMA und Ionomycin wurde die Expression deutlich hochreguliert. Es wurde klar, dass die „Ursprungszelllinie“ J76 und die daraus generierte Transduktante J76-TCR26 deutliche Unterschiede in der Expression von T-Zell-spezifischen Oberflächenmolekülen aufwiesen, CD25 erwies sich aber in beiden Zelllinien als vielversprechender Kandidat für einen Nachweis von T-Zellaktivierung. Die Fähigkeit CD25 zu exprimieren schien in beiden Zelllinien in gleicher Weise vorhanden zu sein und sich noch nicht verändert zu haben.

4.3.2.2 CD25-Expression auf Jurkat-Zellen nach Stimulation des TCR

Wie im vorherigen Kapitel gezeigt werden konnte, waren J76- und J76-TCR26-Zellen in der Lage, auf eine unspezifische Stimulation mit PMA und Ionomycin mit einer verstärkten Expression von CD25 zu reagieren. Als nächstes sollte geklärt werden, ob auch eine spezifische Stimulation der Jurkat-Zellen über den TCR durch ein Antigen zu einer verstärkten Expression von CD25 führen konnte. Da die J76-TCR26-Zellen nach Kokultur mit den spezifischen Zielzellen RCC26 keine Hochregulation von CD25 aufwiesen (Daten nicht gezeigt), sollten weitere J76-Transduktanten auf diese Fähigkeit hin analysiert werden. Dazu wurden die zwei J76-Transduktanten J76-CD8-T58 und J76-CD8-D115 verwendet. Diese Zellen wurden wie J76-TCR26 aus der TCR-defizienten J76-Zelllinie generiert. Hier wurde

neben den Tyrosinase-spezifischen TCR T58 und D115 (Wilde et al., 2009) zusätzlich das kostimulatorische Molekül CD8 α mittels retroviralem Transfer in J76 eingebracht, um die Signalkaskade nach TCR-Stimulation zu verstärken. Somit exprimierten diese Transduktanten CD8 und einen TCR:CD3-Komplex stabil auf ihrer Oberfläche. Da diese Transduktanten nach dem retroviralem Transfer nicht kloniert worden waren, gab es jedoch auch noch CD3-negative bzw. CD8-negative Zellen innerhalb der Population.

Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit 50 ng/ml PMA unspezifisch stimuliert wurden, eine spezifische Stimulation erfolgte durch Kokultur der Jurkat-Zellen mit der Tyrosinase-positiven Melanomzelllinie Mel IL-2 bzw. YMD-(Tyrosinase)-Peptid-beladenen T2-Zellen. Nach 24-stündiger Stimulation wurden die Jurkat-Zellen mit Anti-CD3-FITC- und Anti-CD25-PE-Antikörpern gefärbt. In Abb. 4.26 ist zu erkennen, dass beide Zelllinien im unstimulierten Zustand kaum CD25 auf ihrer Oberfläche exprimierten. Außerdem sieht man, dass neben TCR:CD3-positiven Zellen auch noch CD3-negative Zellen in den beiden Jurkat-Transduktanten vorhanden waren. Nach der unspezifischen Stimulation der T-Zellen mit PMA regulierten sowohl die CD3-negativen als auch die CD3-positiven Zellen CD25 hoch. Dies war zu erwarten, da die Stimulation durch PMA unabhängig vom TCR erfolgt. Nach einer spezifischen Stimulation der Zellen mit Tyrosinase-positiven Mel IL-2 bzw. YMD-Peptid-beladenen T2-Zellen war dagegen eine verstärkte Expression von CD25 nur in der TCR:CD3-positiven Population zu beobachten.

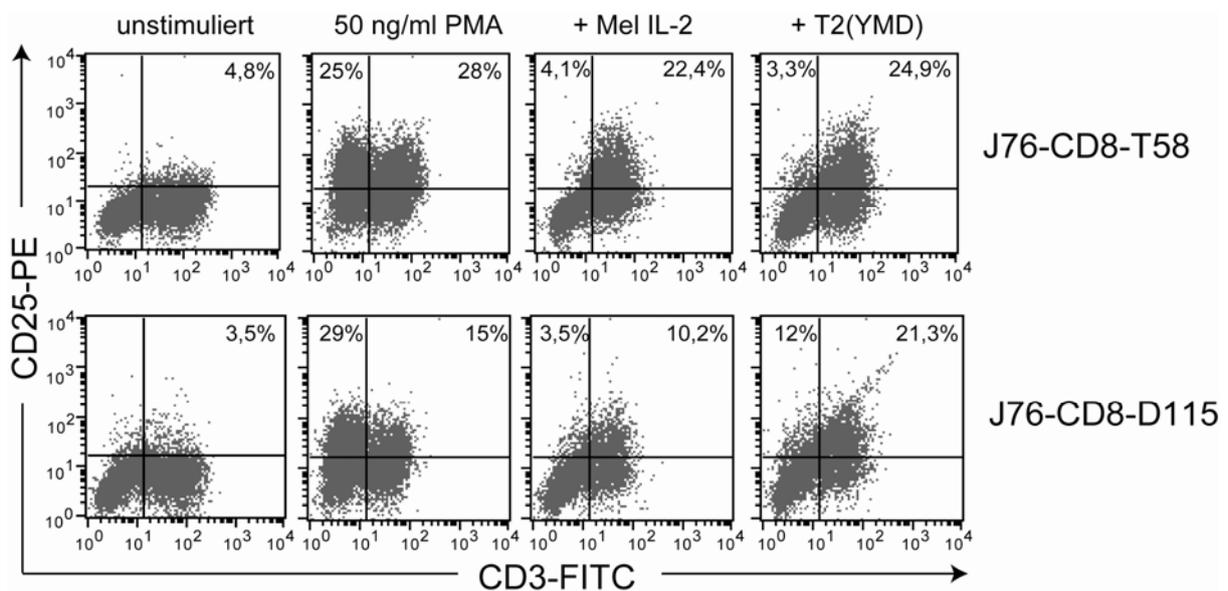


Abb. 4.26: Expression von CD25 und CD3 nach Stimulation von J76-CD8-T58- und J76-CD8-D115-Zellen. Die Zelllinien J76-CD8-T58 und J76-CD8-D115 wurden für 24 h mit 50 ng/ml PMA, der Tyrosinase-positiven Tumorzelllinie Mel IL-2 oder YMD-Peptid-beladenen T2-Zellen stimuliert, als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Gezeigt ist die durchflusszytometrische Analyse der CD3- und CD25-Expression vor und nach Stimulation der Jurkat-Zellen.

Eine Stimulation der J76-CD8-D115-Zellen mit T2-Zellen führte zu einer stärkeren CD25-Expression als eine Stimulation mit Melanomzellen. Dies könnte möglicherweise auf eine größere Anzahl an Peptid/MHC-Molekülen auf der Oberfläche der T2-Zellen zurückzuführen sein.

Die verstärkte Expression von CD25 erwies sich somit in beiden Jurkat-Transduktanten als ein gutes Nachweissystem der spezifischen Antigenerkennung über einen transgenen TCR.

4.3.2.3 IL-2-Sekretion verschiedener Jurkat-Zellen nach Stimulation

Neben der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle, wurden verschiedene Jurkat-Zelllinien auf ihre Fähigkeit, nach Stimulation IL-2 zu produzieren, miteinander verglichen. Es sollte einerseits bestimmt werden, welcher Anteil innerhalb einer Jurkat-Population in der Lage war, IL-2 zu sezernieren und andererseits, wieviel IL-2 verschiedene Jurkat-Zelllinien während einer bestimmten Zeitspanne produzieren konnten.

4.3.2.3.1 Unspezifische Stimulation von Jurkat-Zellen

Um zu bestimmen, wie groß der Anteil IL-2-sezernierender Zellen innerhalb einer bestimmten Jurkat-Population war, wurde mit J76-CD8-Zellen (stabile Transduktanten für CD8 α) und J76-TCR26-Zellen ein IL-2-Sezernierungs-Versuch durchgeführt („IL-2 secretion assay“).

Zu diesem Zweck wurden die Zellen 2 h mit 5 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert und mit IL-2-Antikörpern gefärbt, die gerade sezerniertes IL-2 direkt an der Zelloberfläche binden können und selbst an der Zelle bleiben. An diese Antikörper wurden magnetische Partikel gekoppelt, wodurch es möglich war, die IL-2-produzierende Fraktion der Zellen von der IL-2-negativen Fraktion zu separieren.

Nur 0,11 % der J76-CD8-Zellen konnten als CD8-positiv und IL-2-produzierend detektiert werden (Abb. 4.27 A). Nach einer positiven Separation der IL-2⁺ Fraktion waren nur 1,66 % der Zellen IL-2-positiv. Dagegen produzierten 0,95 % der CD3-positiven J76-TCR26-Zellen IL-2, was deutlich mehr Zellen waren als bei der unstimulierten Probe (0,02 %) (Abb. 4.27 B). Nach der positiven Separation der IL-2-sezernierenden Zellen konnten 51,5 % der J76-TCR26-Zellen als CD3- und IL-2-positiv detektiert werden. In der IL-2-negativen Fraktion verblieben kaum noch IL-2-positive Zellen. Es wurde deutlich, dass die Fähigkeit zur IL-2-Sekretion nach Stimulation in den J76-CD8-Zellen nicht vorhanden war. Die J76-TCR26-Zellen waren in der Lage, IL-2 zu sezernieren und diese IL-2-positive Fraktion konnte durch eine positive Separation auch von der IL-2-negativen Fraktion getrennt werden. Dies zeigte, dass sich zwei Subklone, die aus derselben „Ursprungspopulation“ J76 stammten, in ihrer Fähigkeit, IL-2 zu produzieren, voneinander unterschieden.

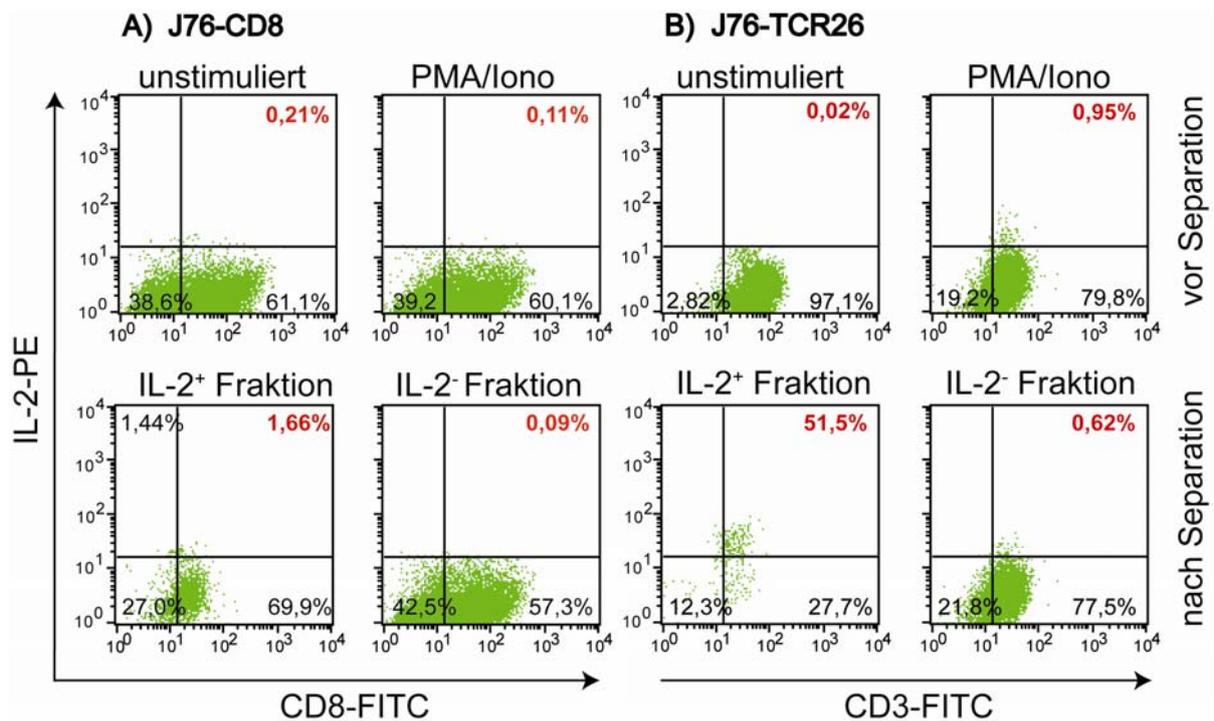


Abb. 4.27: IL-2-Sekretion verschiedener J76-Zelllinien nach Stimulation mit PMA/Ionomycin (IL-2-Sekretions-Versuch). J76-CD8-Zellen und J76-TCR26-Zellen wurden 2 h mit 5 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert, als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. **A)** Stimulierte J76-CD8-Zellen wurden mit Anti-CD8-FITC-Antikörper und Anti-IL-2-PE-Antikörper gefärbt. IL-2-positive Zellen wurden durch magnetische Separation angereichert (IL-2⁺ Fraktion), an IL-2-negative Zellen konnten keine magnetischen Partikel binden (IL-2⁻ Fraktion). **B)** Stimulierte J76-TCR26-Zellen wurden mit Anti-CD3-FITC-Antikörper und Anti-IL-2-PE-Antikörper gefärbt. IL-2-positive Zellen wurden durch magnetische Separation angereichert (IL-2⁺ Fraktion), an IL-2-negative Zellen konnten keine magnetischen Partikel binden (IL-2⁻ Fraktion). Die roten Zahlen markieren den Anteil doppelt-positiver Zellen in der jeweiligen J76-Population (IL-2⁺/CD8⁺ oder IL-2⁺/CD3⁺).

Die Tatsache, dass einige Zellen der J76-TCR26-Population nach Stimulation IL-2 sezernieren konnten, sollte in einem IL-2-ELISA bestätigt werden, um die absolute Menge an sezerniertem IL-2 zu bestimmen. Dazu wurden J76-TCR26-Zellen 0 h, 3 h und 24 h mit 5 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert und die Menge an sezerniertem IL-2 aus den Überständen mittels ELISA bestimmt.

Neben J76-TCR26-Zellen wurden auch J76-CD8-Zellen und J76-Zellen für 24 h mit PMA/Ionomycin stimuliert. Zum Vergleich wurde der IL-2-Gehalt aus den Überständen von unstimulierten Jurkat-Zellen bestimmt. Im unstimulierten Zustand produzierten weder J76-TCR26, noch J76-CD8 oder J76 das Zytokin IL-2 (Abb. 4.28). Dies war eine wichtige Voraussetzung, um später die spezifische Stimulation von Jurkat-Zellen über einen TCR von unstimulierten Zellen abzugrenzen. 3 h nach Stimulation sezernierten die J76-TCR26-Zellen schon circa 400 pg/ml IL-2. Nach 24 h Stimulation wurden sogar über 800 pg/ml IL-2 in den Überständen der J76-TCR26-Zellen detektiert (rote Balken). Die J76-Zellen (lila Balken) produzierten ähnlich viel IL-2 nach 24 h Stimulation. J76-CD8-Zellen waren deutlich von J76- und J76-TCR26-Zellen abzugrenzen, da diese selbst nach 24 h Stimulation nicht in der Lage waren, IL-2 zu sezernieren (blaue Balken). Dies bestätigte die Ergebnisse im

vorherigen Abschnitt, in dem ebenfalls gezeigt wurde, dass kaum Zellen aus der J76-CD8 Population positiv für IL-2 gefärbt werden konnten (Abb. 4.27).

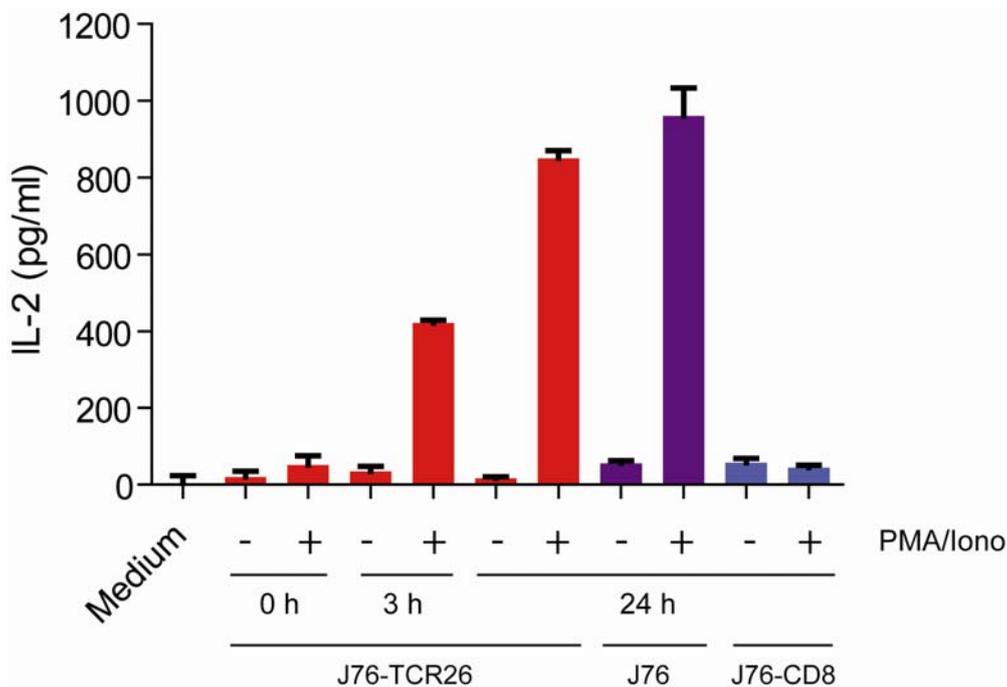


Abb. 4.28: IL-2-Sekretion verschiedener J76-Zelllinien nach unspezifischer Stimulation mit PMA/Ionomycin. J76-TCR26, J76 und J76-CD8 wurden für 0 h, 3 h und 24 h mit 5 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert. Es wurde der IL-2-Gehalt in den Überständen der Stimulationsansätze (4×10^4 Jurkat-Zellen pro Vertiefung einer 96-Lochplatte) durch ELISA bestimmt. Die Balken zeigen Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichungen.

4.3.2.3.2 Spezifische TCR-Stimulation von Jurkat-Zellen

J76-TCR26-Zellen konnten also nach unspezifischer Stimulation mit PMA und Ionomycin detektierbare Mengen an IL-2 produzieren. Nun sollte untersucht werden, ob dies auch nach einer spezifischen Stimulation der Zellen über deren TCR26 der Fall war.

Dazu wurden J76-TCR26-Zellen mit antigenexprimierenden Zielzellen für 24 h koinkubiert. Als Zielzellen dienten die Tumorzellen RCC26 und RCC26/B7, die ein noch unbekanntes Peptid präsentieren, für das der TCR26 spezifisch ist, und T2-Zellen, die mit dem „Surrogat-Peptid“ YQY, das ebenfalls vom TCR26 erkannt wird, beladen wurden [T2(YQY)]. Als Negativkontrollen dienten antigen-negative Zielzellen [Mel A375, NN26, T2(Flu) und T2(unbeladen)]. Als Positivkontrolle wurden TIL26, der T-Zellklon, aus dem der TCR26 ursprünglich isoliert worden war, mit denselben Zielzellen wie J76-TCR26-Zellen kokultiviert. Die Zytokine IL-2 und IFN γ wurden aus den Überständen der Kokulturen durch ELISA bestimmt (Abb. 4.29). TIL26 produzierten nach Kokultur mit TIL26-Peptid (YQY) hohe Mengen IFN γ (mehr als 1000 pg/ml) und circa 200 pg/ml IL-2. Eine IFN γ -Ausschüttung war

auch nach Kokultur von TIL26 mit RCC26 und RCC26/B7 zu beobachten. IL-2 wurde nach Kokultur mit RCC26 nur noch in geringen Mengen sezerniert, nach Kokultur mit RCC26/B7 war kein IL-2 mehr zu detektieren. Scheinbar sind für die Induktion der IL-2-Sekretion in T-Zellen andere kostimulatorische Ereignisse nötig als für eine IFN γ -Sekretion. J76-TCR26 produzierten kein IFN γ , was für Jurkat-Zellen schon in der Literatur beschrieben ist.

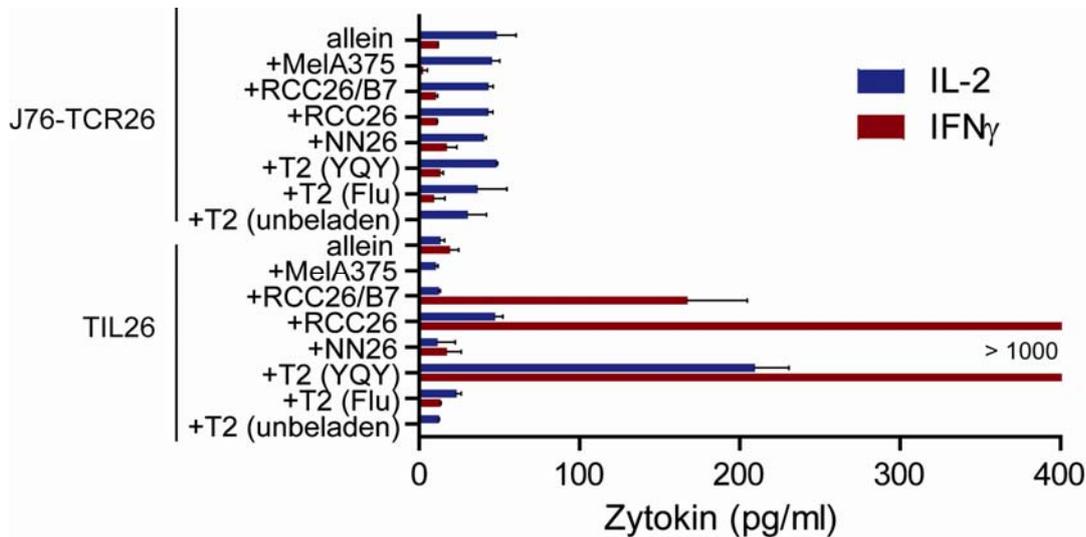


Abb. 4.29: IL-2- bzw. IFN γ -Sekretion von J76-TCR26 und TIL26 nach spezifischer TCR-Stimulation. Es wurden je 4×10^4 J76-TCR26 bzw. TIL26 mit 2×10^4 Zielzellen in einer 96-Lochplatte für 24 h kokultiviert. Die Sekretion der Zytokine IFN γ und IL-2 wurde aus den Überständen durch ELISA bestimmt. Die Balken zeigen Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichungen. Rote Balken markieren die IFN γ -Sekretion, blaue Balken die IL-2-Sekretion.

Die J76-TCR26 zeigten aber auch keine IL-2-Produktion. Möglicherweise war die nicht initiierte IL-2-Sekretion in J76-TCR26 nach antigenspezifischer Stimulation des TCR26 auf die fehlende Oberflächenexpression von CD28 zurückzuführen (siehe Abb. 4.25). Für eine IL-2-Sekretion sind neben der spezifischen Stimulation des TCR noch weitere kostimulatorische Signale, wie z.B. die Bindung von CD28 an B7.1 bzw. B7.2 nötig.

4.3.2.3.3 Gibt es einen synergistischen Effekt von PMA auf die IL-2-Sekretion nach Stimulation über den TCR?

Wie in den vorherigen Kapiteln gezeigt wurde, waren J76-TCR26-Zellen prinzipiell in der Lage, IL-2 nach Stimulation mit PMA und Ionomycin zu sezernieren. Erfolgte die Stimulation jedoch durch ein spezifisches Antigen über den TCR, so reichte dies nicht aus, um eine IL-2-Sekretion zu induzieren. Da J76-TCR26 nicht über CD28 verfügen, war auch eine Kostimulation über B7-Moleküle, wie z.B. durch die B7.1-Transfektante RCC26/B7, nicht erfolgreich (Abb. 4.29). Eine andere Möglichkeit der Kostimulation wäre die zusätzliche

Stimulation der Zellen mit PMA oder Ionomycin. Möglicherweise könnte ein Schwellenwert gefunden werden, bei dem eine Stimulation der J76-TCR26-Zellen mit PMA und dem spezifischen Antigen zu einer Erhöhung der IL-2-Sekretion führte. Um dies zu untersuchen, wurden J76-TCR26 mit unterschiedlichen Konzentrationen PMA stimuliert (Abb. 4.30). Zusätzlich wurden J76-TCR26 in parallelen Stimulationsansätzen gleichzeitig mit PMA und den spezifischen Zielzellen RCC26 stimuliert, gleichzeitig mit PMA und Ionomycin und RCC26 oder nur mit PMA und Ionomycin. In Abb. 4.30 kann man erkennen, dass die Stimulation mit PMA alleine (hellgrüne Kurve) ab einer Konzentration von 1,25 ng/ml PMA zu einer IL-2-Sekretion führte, die hier aber schon ihr Maximum erreicht hat. Ein Zusatz von RCC26-Zellen in die Stimulationskultur führte zu keiner weiteren Erhöhung der IL-2-Ausschüttung (dunkelgrüne Kurve).

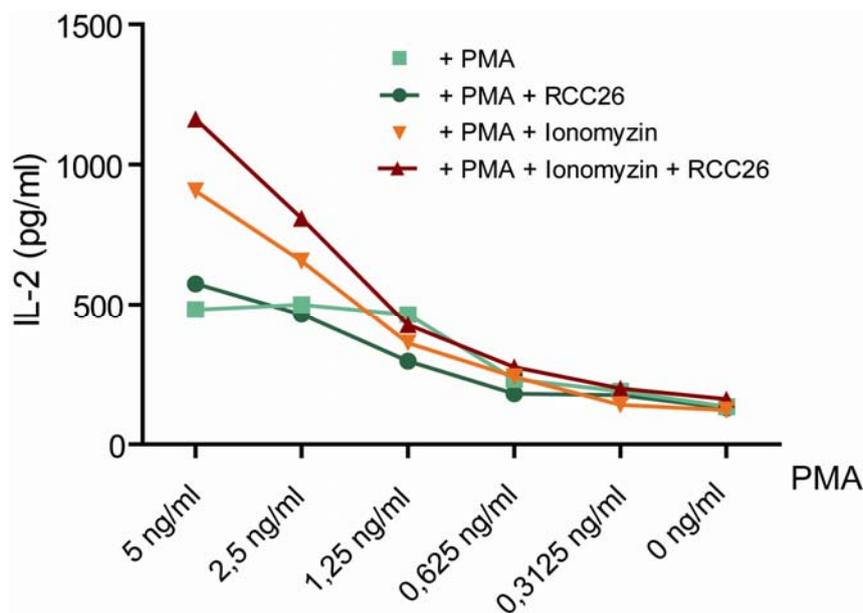


Abb. 4.30: IL-2-Sekretion von J76-TCR26 nach Stimulation mit unterschiedlichen Stimulanzen. Es wurden je 4×10^4 J76-TCR26-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen PMA (5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,625 ng/ml, 0,3125 ng/ml und 0 ng/ml) für 24 h stimuliert. Neben der alleinigen Stimulation mit PMA (hellgrüne Kurve) wurden die Zellen zusätzlich mit 2×10^4 Tumorzellen RCC26 (dunkelgrüne Kurve), mit 500 ng/ml Ionomycin (orange Kurve) oder mit 2×10^4 RCC26 und 500 ng/ml Ionomycin (rote Kurve) inkubiert. IL-2 wurde aus den Überständen durch ELISA bestimmt. Die Werte wurden aus Mittelwerten von Triplikaten errechnet.

Eine Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin (orange Kurve) konnte die IL-2-Sekretion gegenüber der Stimulation mit PMA alleine um das Doppelte steigern. Die IL-2-Sekretion ließ sich durch die Zugabe von RCC26-Zellen zu PMA und Ionomycin nicht deutlich erhöhen (dunkelrote Kurve). Der Defekt in der IL-2-Sekretion nach antigenspezifischer Stimulation der J76-TCR26-Zellen konnte also auch durch zusätzliche Gabe der Stimulanzen PMA und Ionomycin nicht überwunden werden. Die IL-2-Sekretion war nur auf die unspezifischen Stimulanzen PMA bzw. Ionomycin, nicht aber auf Effekte, die zusätzlich durch den TCR

ausgelöst wurden, zurückzuführen. Dies legte die Vermutung nahe, dass der Defekt in der CD28-Expression von J76-TCR26 möglicherweise einer der Gründe für die fehlende IL-2-Ausschüttung nach antigenspezifischer Stimulation des TCR26 sein könnte.

4.3.3 KOLONIERUNG VON IL-2⁺ JURKAT-ZELLEN

Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben wurde, stellen die Jurkat-Zellen eine äußerst heterogene Zellpopulation dar. Um ein verlässliches System für den Nachweis der TCR-Spezifität in Jurkat-Zellen zu etablieren, schien es daher notwendig aus der J76-Gesamtpopulation einige geeignete Klone herauszusortieren, die prinzipiell in der Lage waren IL-2 nach Stimulation zu sezernieren, CD25 nach Aktivierung hochzuregulieren und die außerdem über wichtige kostimulatorische Moleküle, wie z.B. CD28, verfügten.

4.3.3.1 Anreicherung von IL-2⁺ Jurkat-Zellen

Um geeignete Jurkat-Klone für ein TCR-Testsystem zu gewinnen, wurden IL-2-sezernierende J76-Zellen durch einen IL-2-Sezernierungs-Versuch aus der J76-Population isoliert (vgl. Abb. 4.27). Nach einer 2-stündigen Stimulation der Zellen mit 5 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin sezernierten 8,32 % der Jurkat-Zellen IL-2 (Abb. 4.31).

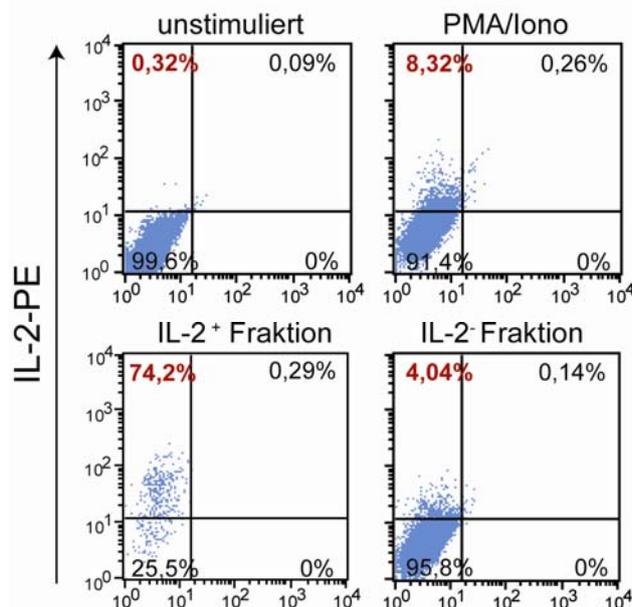


Abb. 4.31: IL-2-Sekretion von Jurkat-76 nach Stimulation mit PMA/Ionomycin und Anreicherung der IL-2-positiven Fraktion. J76-Zellen wurden 2 h lang mit 5 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert. Die unstimulierten und stimulierten Proben wurden mit einem Anti-IL-2-PE-Antikörper gefärbt (obere Streudiagramme). Über eine magnetische Separation wurden die IL-2-positive Fraktion und die IL-2-negative Fraktion der J76-Zellen voneinander getrennt. Jeweils ein Aliquot der Fraktionen wurde mit einem Anti-IL-2-PE-Antikörper gefärbt. Die roten Zahlen markieren den prozentualen Anteil der IL-2-sezernierenden J76-Zellen in der J76-Population.

Diese Population konnte durch magnetische Separation positiv angereichert werden, so dass eine J76-Linie mit 74,2 % IL-2-sezernierenden Zellen generiert werden konnte. Aus dieser Linie wurden durch limitierendes Verdünnungsverfahren Zellklone generiert.

Zu diesem Zweck wurden 96-Lochplatten mit rechnerisch je einer J76-Zelle pro Vertiefung ausgesät. Um die Proliferation und das Überleben der Einzelzelle zu unterstützen, wurden

zusätzlich noch PBMC als „Feeder“-Zellen in die Kulturen dazugegeben (bestrahlt mit 50 Gy, 1×10^5 Zellen pro 96-Loch).

4.3.3.2 Stimulation und Charakterisierung von IL-2⁺ Jurkat-76-Klonen

Durch dieses Verfahren konnten 37 Klone generiert werden, 10 davon wurden auf ihre intrazelluläre IL-2-Expression und ihre CD25-Expression nach 24-stündiger Stimulation mit 5 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin getestet. Um IL-2 in ausreichender Menge innerhalb der Zelle detektieren zu können, wurde die Sekretion von IL-2 mithilfe des Golgi-Inhibitors Brefeldin-A (BFA) verhindert. Die Proben, die auf CD25 gefärbt werden sollten, wurden nicht mit BFA behandelt, da durch den Golgi-Inhibitor auch die Expression von CD25 auf der Zelloberfläche verhindert worden wäre. In Abb. 4.32 A und B sind exemplarisch die IL-2- bzw. CD25-Färbungen der drei J76-Klone VB6, IVB10 und IIIE11 abgebildet. Die Klone exprimierten unstimuliert nur relativ geringe Mengen an IL-2 (Abb. 4.32 A). Nach 24-stündiger Stimulation mit PMA und Ionomycin erhöhte sich bei J76-IVB10 der Anteil der IL-2-exprimierenden Zellen auf 22,4 % (rote Zahl). Die anderen Klone konnten nach Stimulation nicht mehr IL-2 als im unstimulierten Zustand exprimieren. Alle Klone konnten dagegen nach Stimulation mit PMA und Ionomycin die Expression des Oberflächenmoleküls CD25 hochregulieren (Abb. 4.32 B). Vor allem bei J76-IVB10 erhöhte sich der Anteil der CD25-positiven Zellen von circa 2 % vor Stimulation auf über 77 % nach 24 h Stimulation (rote Zahl). Somit schien der J76-IVB10-Klon ein geeigneter Kandidat für ein TCR-Testsystem zu sein und wurde im Folgenden weiter charakterisiert.

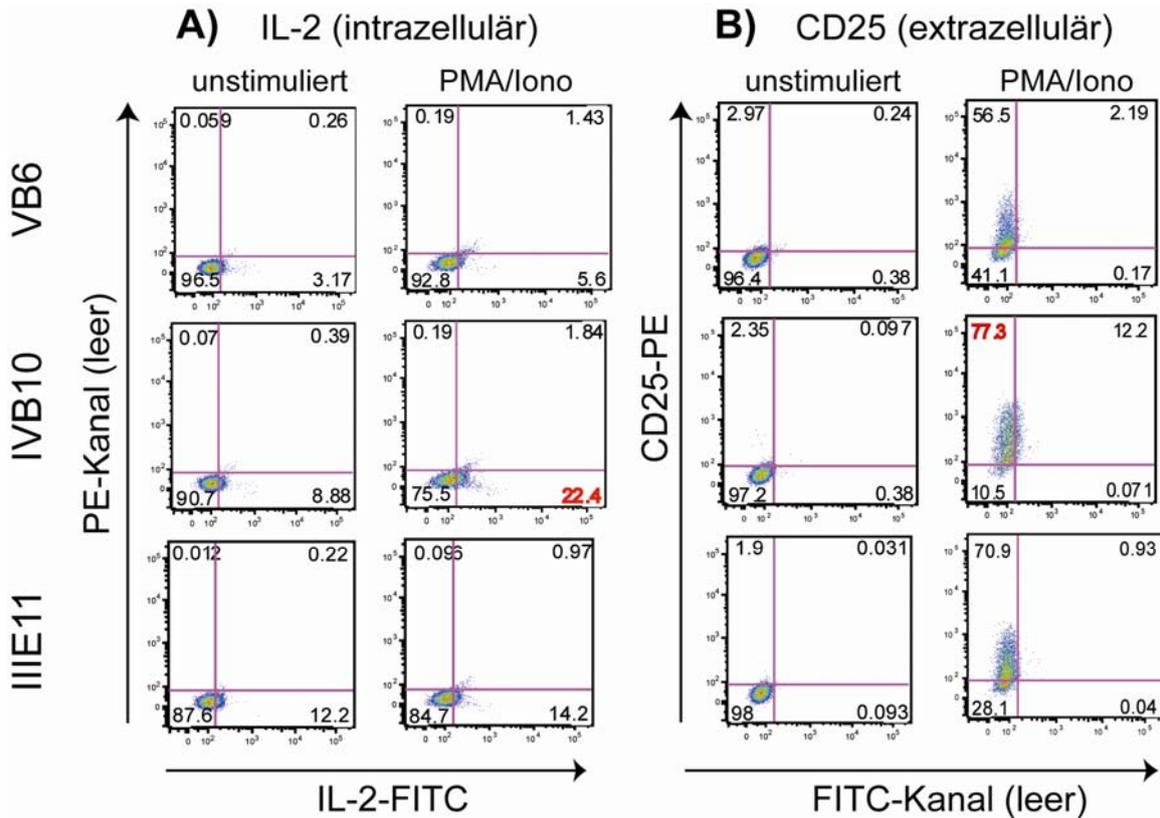


Abb. 4.32: IL-2- und CD25-Expression verschiedener sortierter J76-IL-2⁺-Klone vor und nach Stimulation mit PMA/Ionomyzin. Die Jurkat-76-Klone VB6, IVB10 und IIIIE11 wurden 24 h mit 5 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomyzin stimuliert. **A)** Die Zellen, die intrazellulär auf IL-2 gefärbt werden sollten, wurden zusätzlich mit 10 µg/ml BFA inkubiert. Je ein Aliquot der J76-Klone wurde mit einem anti-IL-2-FITC Antikörper auf die intrazelluläre Expression von IL-2 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. **B)** Je ein Aliquot der J76-Klone wurde mit einem Anti-CD25-PE-Antikörper gefärbt. Die roten Zahlen markieren den höchsten prozentualen Anteil IL-2- bzw. CD25-positiver J76-Zellen der drei hier gezeigten J76-Klone nach Stimulation mit PMA/Ionomyzin.

Der J76-Klon, der für den Nachweis von TCR-Spezifität verwendet werden sollte, sollte nicht nur IL-2 und CD25 nach Stimulation exprimieren, sondern auch über kostimulatorische Moleküle, wie z.B. CD28, verfügen, die für eine IL-2-Sekretion nach spezifischer Stimulation des TCR essenziell sind. J76-IVB10-Zellen wurden mit einem Anti-CD28-FITC-Antikörper gefärbt und zeigten im Durchflusszytometer eine klare CD28-Expression (Abb. 4.33).

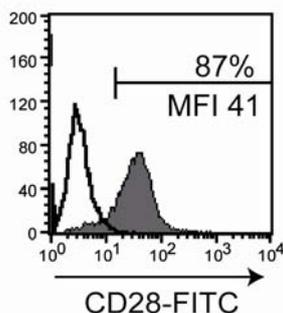


Abb. 4.33: CD28-Expression auf J76-IVB10. Circa 5×10^4 Zellen des Jurkat-76-Klons IVB10 wurden mit einem Anti-CD28-FITC-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Das offene Histogramm zeigt die Isotypkontrolle, das grau hinterlegte Histogramm zeigt die spezifische CD28-FITC-Färbung.

CD28 kann durch die Bindung an B7.1 oder B7.2 die Signalweiterleitung durch ein spezifisches Antigen über den TCR verstärken und dadurch die Sekretion von IL-2 ermöglichen.

4.3.4 EXPRESSION UND SPEZIFITÄTSBESTIMMUNG DEFINIERTER TCR-KETTEN IN J76-IVB10

Nachdem der J76-IVB10-Klon als geeignete Zelle für ein TCR-Testsystem aus der J76-Population isoliert wurde, sollte dieses Testsystem mithilfe einiger, in unserem Labor etablierter TCR bekannter Spezifität überprüft werden.

4.3.4.1 CD8-unabhängige und CD8-abhängige TCR

Zunächst sollten die Spezifitäten zweier bekannter TCR in J76-IVB10 mithilfe des Testsystems analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde *ivtRNS* des TyrF8-TCR (Tyrosinase-spezifisch) und des TIL26-(LSG)-TCR hergestellt. Je 6 µg der TCR-Alpha- und -Beta-Ketten *ivtRNS* wurden in J76-IVB10-Zellen mittels Elektroporation eingebracht. Bereits 3 h nach Elektroporation konnte eine deutliche CD3-Expression bei J76-IVB10 durchflusszytometrisch nachgewiesen werden (Abb. 4.34).

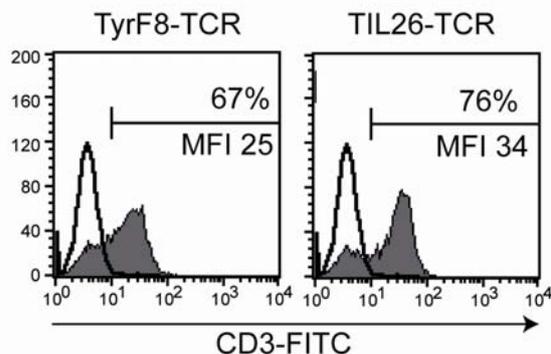


Abb. 4.34: Transiente CD3-Expression in J76-IVB10. Je 3×10^6 J76-IVB10-Zellen wurden mit 6 µg TCR α -Ketten-*ivtRNS* und 6 µg TCR β -Ketten-*ivtRNS* elektroporiert (TyrF8-TCR bzw. TIL26-TCR). 3 h nach der Elektroporation wurden je 1×10^5 Zellen mit einem Anti-CD3-FITC-Antikörper gefärbt und der Anteil an CD3-positiven Zellen, der dem Anteil an TCR-positiven Zellen entspricht, durchflusszytometrisch bestimmt.

Diese CD3-Expression konnte mit der TCR-Expression gleichgesetzt werden, da CD3 nur als Komplex mit einem TCR an der Oberfläche einer T-Zelle erscheint. 67 % der J76-IVB10-Zellen exprimierten 3 h nach der Elektroporation den TyrF8-TCR, sogar 76 % der Zellen exprimierten den TIL26-TCR. Als Negativkontrolle wurden J76-IVB10-Zellen mit H₂O elektroporiert. 3 h nach Elektroporation wurden die TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen für 24 h mit spezifischen Zielzellen kokultiviert. Als antigen-negative Zellen, die von den transgenen TCR nicht erkannt werden sollten, dienten die Melanomzellen Mel A375, als antigen-exprimierende Zielzellen wurden die Tumorzellen Mel 624.38 für den TyrF8-TCR und RCC26

für den TIL26-TCR verwendet. Außerdem wurden noch mit spezifischem Peptid beladene T2-Zellen für eine Kokultur verwendet, da schon in Abb. 4.29 gezeigt werden konnte, dass eine Stimulation der T-Zellen mit peptidbeladenen T2-Zellen eine höhere Zytokinsekretion zur Folge hatte als die Stimulation mit antigenexprimierenden Tumorzellen. Die T2-Zellen, die mit TyrF8-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen kokultiviert wurden, waren vorher mit YMN-Peptid beladen worden, die T2-Zellen, die für eine Kokultur mit TIL26-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen verwendet wurden, wurden mit YQY-Peptid versehen. Als Positivkontrolle wurden die Jurkat-Zellen mit 5 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin für 24 h unspezifisch stimuliert.

Die J76-IVB10-Zellen wurden nach der Stimulation mit Anti-CD3-FITC- und Anti-CD25-PE-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 4.35).

Nach 24-stündiger Stimulation mit PMA und Ionomycin exprimierte der größte Teil der J76-IVB10-Zellen CD25 (Abb. 4.35 B). Es fiel auf, dass die mit PMA/Ionomycin stimulierten Proben deutlich weniger CD3 exprimierten als die unstimulierten Proben (Abb. 4.35 A und B). Vermutlich wurde der transgene TCR nach der starken Stimulation durch PMA/Ionomycin internalisiert. Nach Stimulation mit antigen-negativen Tumorzellen (Abb. 4.35 C) trugen praktisch keine Jurkat-Zellen CD25 auf ihrer Oberfläche (0,4 %). Die Stimulation mit antigenexprimierenden Tumorzellen (Abb. 4.35 D) führte zu einem minimalen Anstieg der CD25-positiven Population. Erst die Stimulation der TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen mit YMN- bzw. YQY-Peptid-beladenen T2-Zellen führte zu einem deutlicheren Anstieg der CD25-positiven Population (4 % bei TyrF8-TCR und 25 % bei TIL26-TCR). Die Beobachtung, dass peptidbeladene T2-Zellen ein stärkeres stimulatorisches Potenzial besitzen war vorher schon gezeigt worden. Es konnte gezeigt werden, dass die spezifische Erkennung eines Peptids durch einen transgenen TCR in Jurkat-Zellen durch einen Anstieg in der CD25-Expression nachgewiesen werden kann. Auffällig war die viel stärkere CD25-Expression nach Stimulation des TIL26-TCR im Gegensatz zur CD25-Expression nach Stimulation des TyrF8-TCR. Der TIL26-TCR gehört zur Gruppe der CD8-unabhängigen TCR, das heißt, dass dieser TCR auch in einer CD8-negativen Zelle, wie z.B. der J76-IVB10 Zelle, eine effiziente Signalweiterleitung zeigt. Der TyrF8-TCR wurde zwar nach Elektroporation fast genau so gut in J76-IVB10-Zellen exprimiert wie der TIL26-TCR (Abb. 4.34), jedoch führte die Stimulation des TCR mit spezifischen Peptid nicht zu einer so hohen CD25-Expression wie beim TIL26-TCR. Möglicherweise ließe sich die Signalweiterleitung des TyrF8-TCR durch das zusätzliche Einbringen von CD8 in die J76-IVB10-Zellen weiter verbessern.

Neben der Expression von CD25 wurde die IL-2-Sekretion 24 h nach Stimulation durch ELISA bestimmt. Zusätzlich zu den oben beschriebenen Stimulationsansätzen wurden die Jurkat-Zellen noch mit PMA alleine, oder mit PMA und antigenexprimierenden Tumorzellen (Mel 624.38 oder RCC26) bzw. PMA und peptidbeladenen T2-Zellen (YMN- bzw. YQY-).

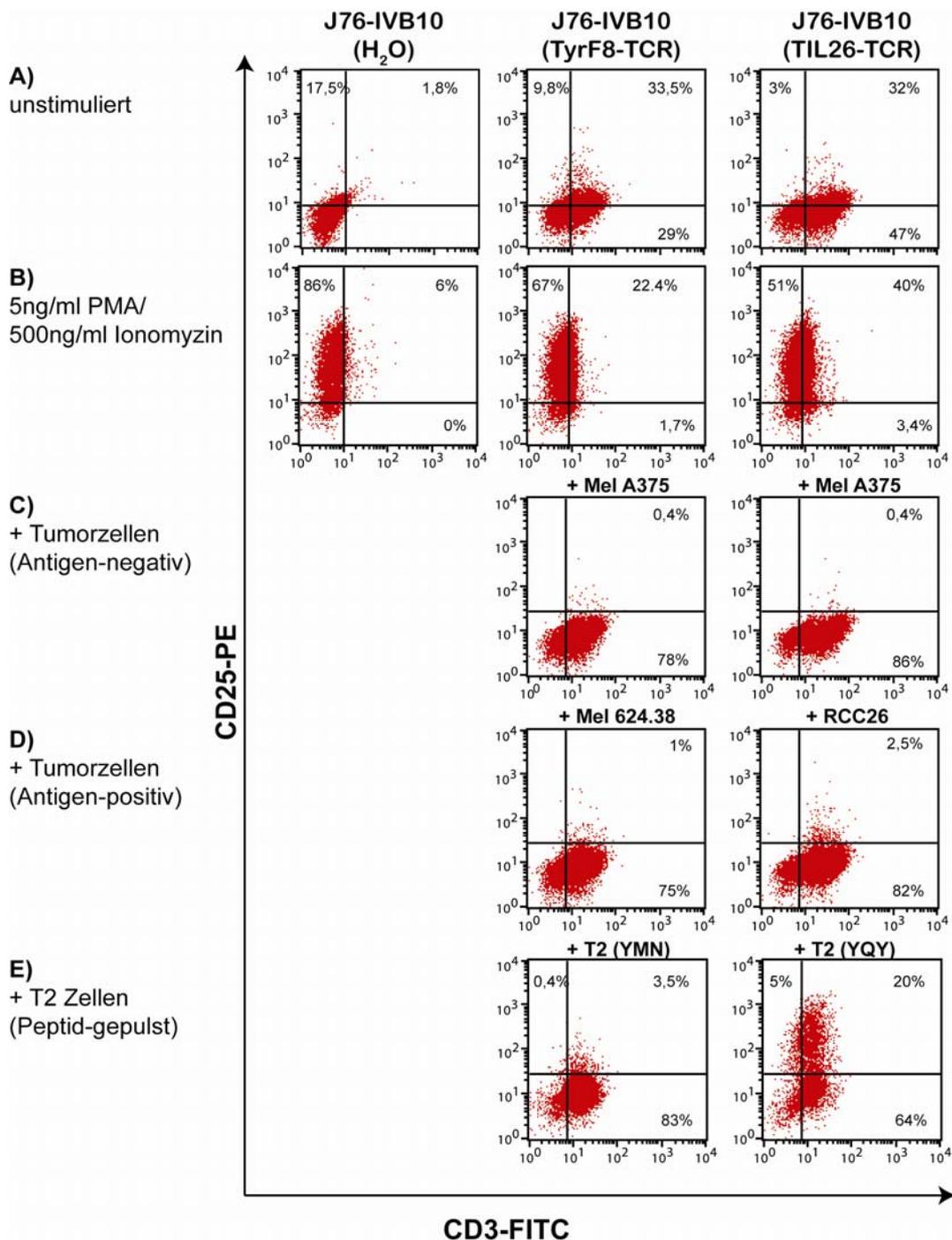


Abb. 4.35: CD3- und CD25-Expression auf J76-IVB10 (TyrF8-TCR) und J76-IVB10 (TIL26-TCR) nach 24 h Stimulation. Es wurden je 1×10^5 J76-IVB10(H₂O), J76-IVB10(TyrF8-TCR) bzw. J76-IVB10(TIL26-TCR) 3 h nach Elektroporation von ivtRNS mit 2×10^5 Zielzellen für 24 h kokultiviert. Die Zellen wurden mit spezifischen Anti-CD3-FITC- und Anti-CD25-PE-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. **A)** Als Negativkontrolle dient unstimulierte J76-IVB10-Zellen. **B)** Als Positivkontrolle wurden die J76-IVB10-Zellen 24 h lang mit 5 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert. **C)** J76-IVB10(TyrF8-TCR) und J76-IVB10(TIL26-TCR) wurden mit antigen-negativen Tumorzellen Mel A375 kokultiviert. **D)** J76-IVB10(TyrF8-TCR) und J76-IVB10(TIL26-TCR) wurden mit den antigenpositiven Tumorzellen Mel 624.38 bzw. RCC26 kokultiviert. **E)** J76-IVB10 (TyrF8-TCR) und J76-IVB10(TIL26-TCR) wurden mit YMD- bzw. TIL26-Peptid-beladenen T2-Zellen stimuliert.

Peptid) kokultiviert. Dadurch sollte untersucht werden, ob PMA möglicherweise in J76-IVB10 einen synergistischen Effekt zur Stimulation über den TCR haben könnte. In Abb. 4.36 A-C ist zu erkennen, dass eine Stimulation der J76-IVB10-Zellen mit PMA alleine zu keiner IL-2-Sekretion führte, nach Stimulation mit PMA und Ionomycin zeigten die Zellen eine sehr hohe IL-2-Sekretion (orange Balken). Unstimulierte Zellen zeigten nur eine sehr geringe IL-2-Sekretion (schwarze Balken).

Eine Stimulation der J76-IVB10-(TyrF8-TCR)-Zellen mit YMN-Peptid-beladenen T2-Zellen (Abb. 4.36 A, weinroter Balken) hatte keinen Einfluss auf die IL-2-Sekretion, erst durch eine Zugabe von PMA konnten circa 100 pg/ml IL-2 detektiert werden (weinroter, gestreifter Balken). Die Stimulation der J76-IVB10-(TyrF8-TCR)-Zellen mit Mel 624.38-Zellen und PMA führte zu einer nur sehr geringen Erhöhung in der IL-2-Sekretion (roter Balken mit gelben Streifen). Insgesamt spiegelte das Ergebnis der IL-2-Sekretion der J76-IVB10-(TyrF8-TCR)-Zellen nach Stimulation das Ergebnis der CD25-Expression nach Stimulation wieder (Abb. 4.35). Ein anderes Bild zeigte sich nach Stimulation der J76-IVB10-(TIL26 LSG TCR)-Zellen (Abb. 4.36 B). Die Stimulation mit YQY-Peptid-beladenen T2-Zellen führte zu einer starken IL-2-Sekretion (1000 pg/ml, weinroter Balken), eine Stimulation der Zellen mit Flu („Influenza“)-Peptid-beladenen T2-Zellen (Negativkontrolle) hatte dagegen keine IL-2-Sekretion zur Folge (hellblauer Balken). Die IL-2-Sekretion nach Stimulation mit YQY-Peptid konnte durch die Zugabe von 5 ng/ml PMA noch deutlich auf 2000 pg/ml IL-2 erhöht werden (weinroter Balken mit gelben Streifen). PMA alleine führte zu keinerlei IL-2-Sekretion (hellrosa Balken), die zusätzliche Stimulation über den transgenen TIL26-TCR führte aber scheinbar zu einer Akkumulation der beiden Signale, was in einer sehr hohen IL-2-Sekretion resultierte. Eine Kokultur der J76-IVB10-(TIL26-TCR)-Zellen mit antigenpräsentierenden RCC26-Tumorzellen hatte dagegen keine Erhöhung der IL-2-Sekretion zur Folge (roter Balken), erst der Zusatz von PMA führte zu einer IL-2-Ausschüttung von über 100 pg/ml (roter Balken mit gelben Streifen), was aber deutlich unter der IL-2-Ausschüttung nach Kokultur mit peptidbeladenen T2-Zellen lag. T2-Zellen konnten somit TCR-transgene Jurkat-Zellen deutlich besser stimulieren und stellten daher die idealen Zielzellen für ein TCR-Testsystem in Jurkat-Zellen dar.

Die mit H₂O elektroporierten J76-IVB10-Zellen (Negativkontrollen) zeigten keinerlei IL-2-Freisetzung nach Kokultur mit YMN- bzw. YQY-beladenen T2-Zellen (Abb. 4.36 C), was die Spezifität der in Abb. 4.36 B gezeigten Ergebnisse unterstrich. T2-Zellen, die mit PMA stimuliert wurden zeigten ebenfalls keinerlei IL-2-Sekretion (Abb. 4.36 C). Somit konnte gezeigt werden, dass die IL-2-Ausschüttung in Abb. 4.36 B nach Stimulation der J76-IVB10-(TIL26-TCR)-Zellen mit PMA und YQY-Peptid-beladenen T2-Zellen nicht auf eine etwaige zusätzliche IL-2-Freisetzung der T2-Zellen in der Kokultur (ausgelöst durch den PMA-Stimulus) zurückzuführen war.

Der TIL26-TCR zeigte wie bei der CD25-Expression eine deutlich stärkere Signalweiterleitung in J76-IVB10 auf eine Stimulation mit spezifischem Peptid, was sich in Abb. 4.36 in einer deutlich höheren IL-2-Sekretion gegenüber dem TyrF8-TCR äußerte.

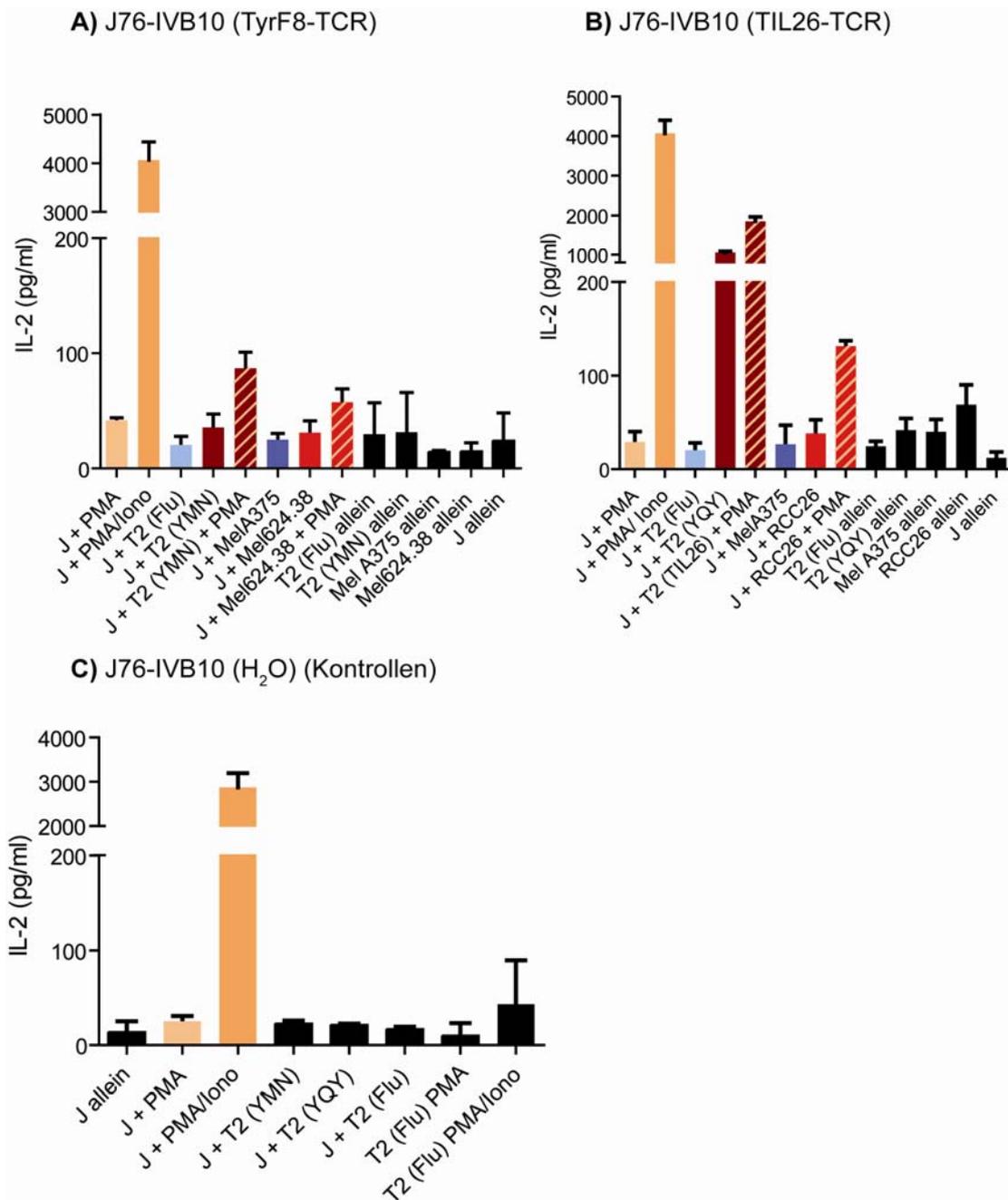


Abb. 4.36: IL-2-Sekretion von J76-IVB10 (TyrF8-TCR) und J76-IVB10 (TIL26-TCR) nach 24 h Stimulation. Es wurden je 2×10^4 J76-IVB10(H₂O), J76-IVB10 (TyrF8-TCR) bzw. J76-IVB10(TIL26-TCR) Zellen 3 h nach Elektroporation von TCR-ivtRNS mit 4×10^4 Zielzellen für 24 h kokultiviert. Die IL-2-Sekretion der J76-IVB10-Zellen wurde aus den Überständen durch ELISA bestimmt. J76-IVB10 wurden entweder mit TyrF8-TCR ivtRNS **A**) oder TIL26-TCR-ivtRNS **B**) oder nur mit H₂O **C**) elektroporiert und 3 h später für 24 h mit spezifischen Zielzellen stimuliert. Die Balken zeigen Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichungen (Abk: J = J76-IVB10).

Die Vermutung lag nahe, dass für eine effiziente Signalweiterleitung nach Stimulation des TyrF8-TCR möglicherweise das kostimulatorische Molekül CD8 nötig wäre. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass für CD8-unabhängige TCR, wie dem TIL26-TCR, ein Spezifitätsnachweis in J76-IVB10-Zellen möglich war.

4.3.4.2 Stimulation von stabilen T58-TCR-transgenen J76-CD8-Zellen und transient T58-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen

Als nächstes wurde verglichen, inwiefern sich die Eigenschaften eines TCR (hier: Tyrosinase-spezifischer T58-TCR) IL-2 zu sezernieren bzw. CD25 zu exprimieren im isolierten J76-Klon J76-IVB10 und in der stabilen Transduktante J76-CD8-T58 (vgl. 4.3.2.2) unterschieden. In den J76-IVB10-Zellen wurde der Tyrosinase-spezifische T58-TCR nach Elektroporation von T58-TCR-*ivt*RNS nur transient exprimiert, zudem waren die Zellen CD8-defizient. Die J76-CD8-T58-Zellen dagegen exprimierten den TCR und das CD8-Molekül stabil auf ihrer Oberfläche. Diese Unterschiede führen möglicherweise zu einer veränderten Signaltransduktion nach Quervernetzung der TCR in der Zelle, was zu unterschiedlichen Eigenschaften in der IL-2-Sekretion und CD25-Expression führen könnte.

J76-IVB10-Zellen wurden mit je 6 μ g T58-TCR α - und T58-TCR β -Ketten-*ivt*RNS elektroporiert und 3 h nach Elektroporation mit Anti-CD8-PE- und Anti-CD3-FITC-Antikörpern gefärbt. Die CD8- und die CD3-Expression beider T-Zell-Varianten wurde durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 4.37). J76-IVB10 (T58) waren CD8-negativ, circa 86 % der J76-CD8-T58 Zellen exprimierten stabil das CD8-Molekül.

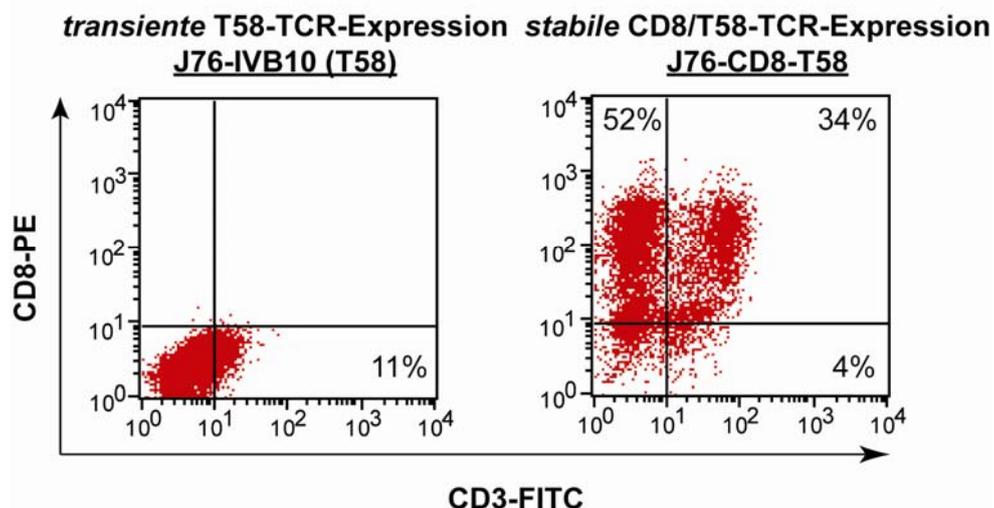


Abb. 4.37: Expression von CD3 und CD8 auf J76-IVB10 (T58) und J76-CD8-T58. Die transiente T58-TCR-Transfektante J76-IVB10 (T58) wurde 3 h nach Elektroporation von 6 μ g T58-TCR α - und 6 μ g T58-TCR β -*ivt*RNS mit Anti-CD8-PE- und Anti-CD3-FITC-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert, ebenso wie die stabile J76-CD8-T58-Transduktante.

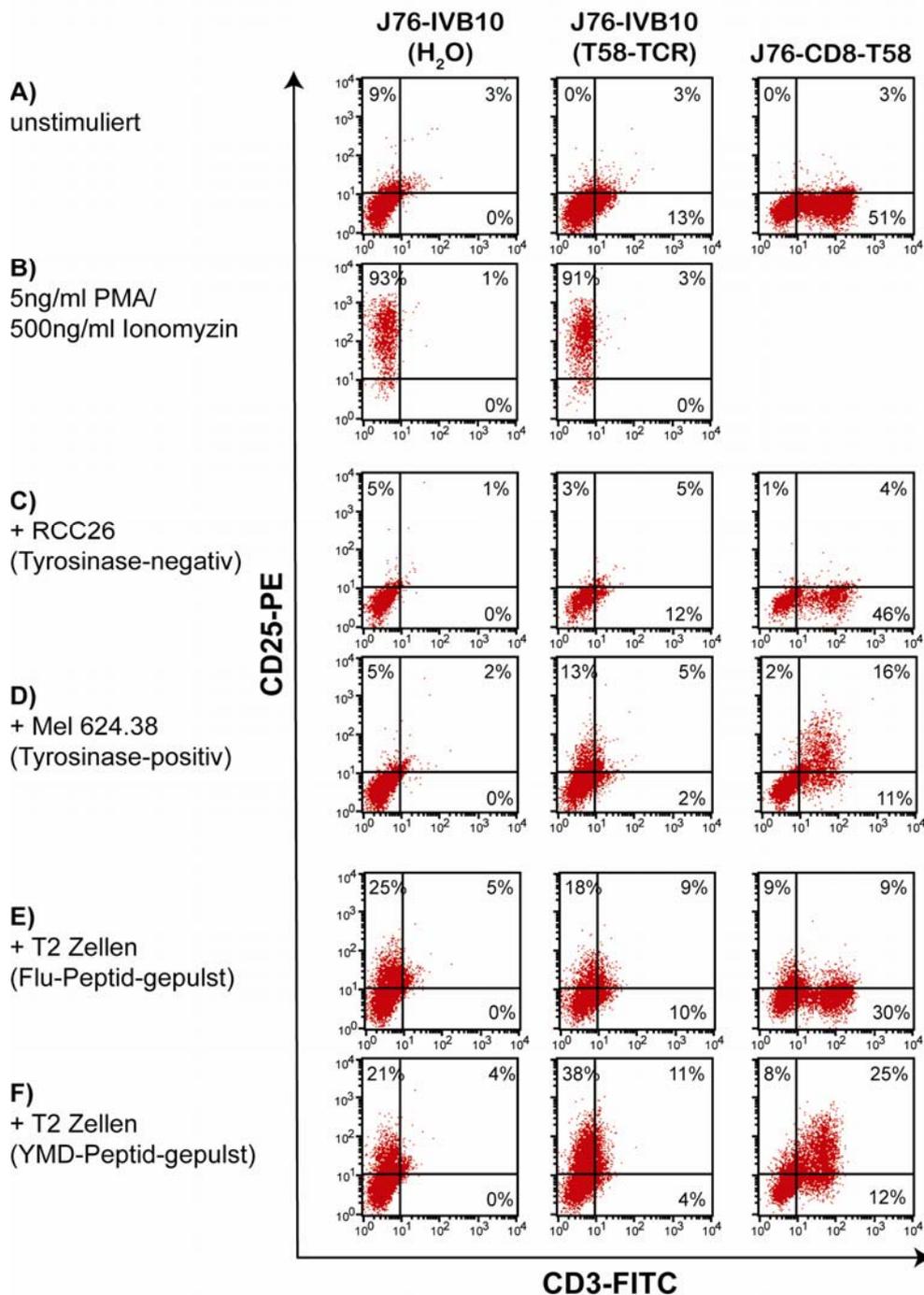


Abb. 4.38: CD3- und CD25-Expression auf J76-IVB10 (H₂O), J76-IVB10 (T58) und J76-CD8-T58-Zellen nach 24 h Stimulation. Es wurden je 1×10^5 J76-IVB10 (H₂O) und J76-IVB10 (T58-TCR) 3 h nach Elektroporation von ivtRNS mit 2×10^5 Zielzellen für 24 h kokultiviert. Die stabile Zelllinie J76-CD8-T58 wurde mit denselben Zielzellen wie die transiente Transfektante J76-IVB10 (T58) inkubiert. Die Zellen wurden mit spezifischen Anti-CD3-FITC- und Anti-CD25-PE-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. **A)** Unstimulierte Jurkat-Zellen. **B)** Als Positivkontrolle wurden die Jurkat-Zellen 24 h mit 5 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert. **C)** Jurkat-Zellen wurden mit Tyrosinase-negativen Tumorzellen RCC26 stimuliert. **D)** Jurkat-Zellen wurden mit den Tyrosinase-positiven Tumorzellen Mel 624.38 stimuliert. **E)** Jurkat-Zellen wurden mit Flu-Peptid-beladenen T2-Zellen stimuliert. **F)** Jurkat-Zellen wurden mit YMD-Peptid-beladenen T2-Zellen stimuliert.

Die T58-TCR-Expression, die über die CD3-Expression in J76-IVB10 nachgewiesen wurde, lag mit 11 % CD3-positiven Zellen deutlich unter der CD3-Expression in J76-CD8-T58-Zellen (Abb. 4.37, 38 % CD3-positive Zellen). Dies war zu erwarten, da die J76-CD8-T58-Zellen stabile Transduktanten für den T58-TCR und CD8 sind. Als Kontrolle wurden J76-IVB10-Zellen mit H₂O elektroporiert, worauf nach circa 24 h keine CD3-Expression zu detektieren war (Abb. 4.38 A).

J76-CD8-T58, sowie die mit H₂O bzw. T58-TCR-*ivt*RNS elektroporierten J76-IVB10-Zellen, wurden mit spezifischen Zielzellen für 24 h kokultiviert. Als Tyrosinase-negative Zielzellen dienten RCC26-Tumorzellen, als Tyrosinase-positive Zielzellen wurden Mel 624.38 verwendet. Außerdem wurden die Jurkat-Zellen mit Flu-Peptid- bzw. YMD-Peptid-beladenen T2-Zellen kokultiviert. Als Positivkontrolle dienten Jurkat-Zellen, die mit 5 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin für 24 h stimuliert wurden. Nach 24-stündiger Stimulation wurde eine Oberflächenfärbung der Zellen mit Anti-CD3-FITC- und Anti-CD25-PE-Antikörpern durchgeführt (Abb. 4.38).

Unstimulierte J76-IVB10-Zellen und J76-CD8-T58-Zellen trugen kaum CD25 auf ihrer Oberfläche (Abb. 4.38 A), nach Stimulation mit PMA und Ionomycin zeigten fast alle J76-IVB10-Zellen eine deutliche CD25-Expression (Abb. 4.38 B). Die Kokultur der Jurkat-Zellen mit Tyrosinase-negativen Tumorzellen (Abb. 4.38 C) führte zu keinem Anstieg der CD25-positiven Zellen, wohingegen die Kokultur mit Tyrosinase-positiven Mel 624.38 Zellen (Abb. 4.38 D) bei J76-IVB10 (T58) und J76-CD8-T58 in beiden Fällen zu einem Anstieg des Anteils der CD25-positiven Zellen auf 18% zur Folge hatte (Abb. 4.38 D). Die Stimulation der Jurkat-Zellen mit Flu-Peptid-beladenen T2-Zellen führte schon zu einem höheren Hintergrund an CD25-positiven Zellen (Abb. 4.38 E), aber die spezifische Stimulation der Jurkat-Zellen mit YMD-(Tyrosinase)-Peptid-beladenen T2-Zellen zeigte eine deutliche Erhöhung des Anteils der CD25-positiven Zellen (Abb. 4.38 F). Es wurde deutlich, dass die Quervernetzung der T58-TCR in beiden J76-Klonen zu einer Signaltransduktion führen konnte, die sich in einer verstärkten Expression von CD25 äußerte.

Ferner wurde der IL-2-Gehalt aus den Überständen nach 24-stündiger Kokultur bestimmt. Neben den oben beschriebenen Kokulturen wurden die Jurkat-Zellen wiederum zusätzlich zu den Tyrosinase-Peptid-exprimierenden Zielzellen mit PMA stimuliert (vgl. Abb. 4.36). In Abb. 4.39 A ist zu erkennen, dass J76-IVB10 (T58) Zellen nach Stimulation mit PMA und Ionomycin circa 400 pg/ml IL-2 sezernieren konnten. Dieser Wert lag deutlich unter den in Abb. 4.36 sezernierten 4000 pg/ml IL-2, die J76-IVB10-Zellen nach Stimulation mit PMA und Ionomycin produzieren konnten. Dies konnte auf gewisse temporäre Schwankungen des J76-IVB10-Klons in der Fähigkeit, IL-2 zu sezernieren, hindeuten oder aber darauf, dass sich dieser Jurkat-Klon im Laufe seiner Kultivierung schon verändert hatte. Nach Kokultur mit YMD-Peptid-beladenen T2-Zellen konnten J76-IVB10 (T58) dennoch eine IL-2-Sekretion

aufweisen (Abb. 4.39 A, weinroter Balken), die durch Zugabe von PMA noch etwas gesteigert werden konnte. Die Kokultur mit Tyrosinase-positiven Tumorzellen Mel 624.38 führte zu keinerlei IL-2-Sekretion, wohingegen die Zugabe von PMA wiederum zu einer gerade noch detektierbaren IL-2-Sekretion führte. Im Gegensatz dazu zeigte die Stimulation von J76-CD8-T58-Zellen ein sehr unklares Bild (Abb. 4.39 B).

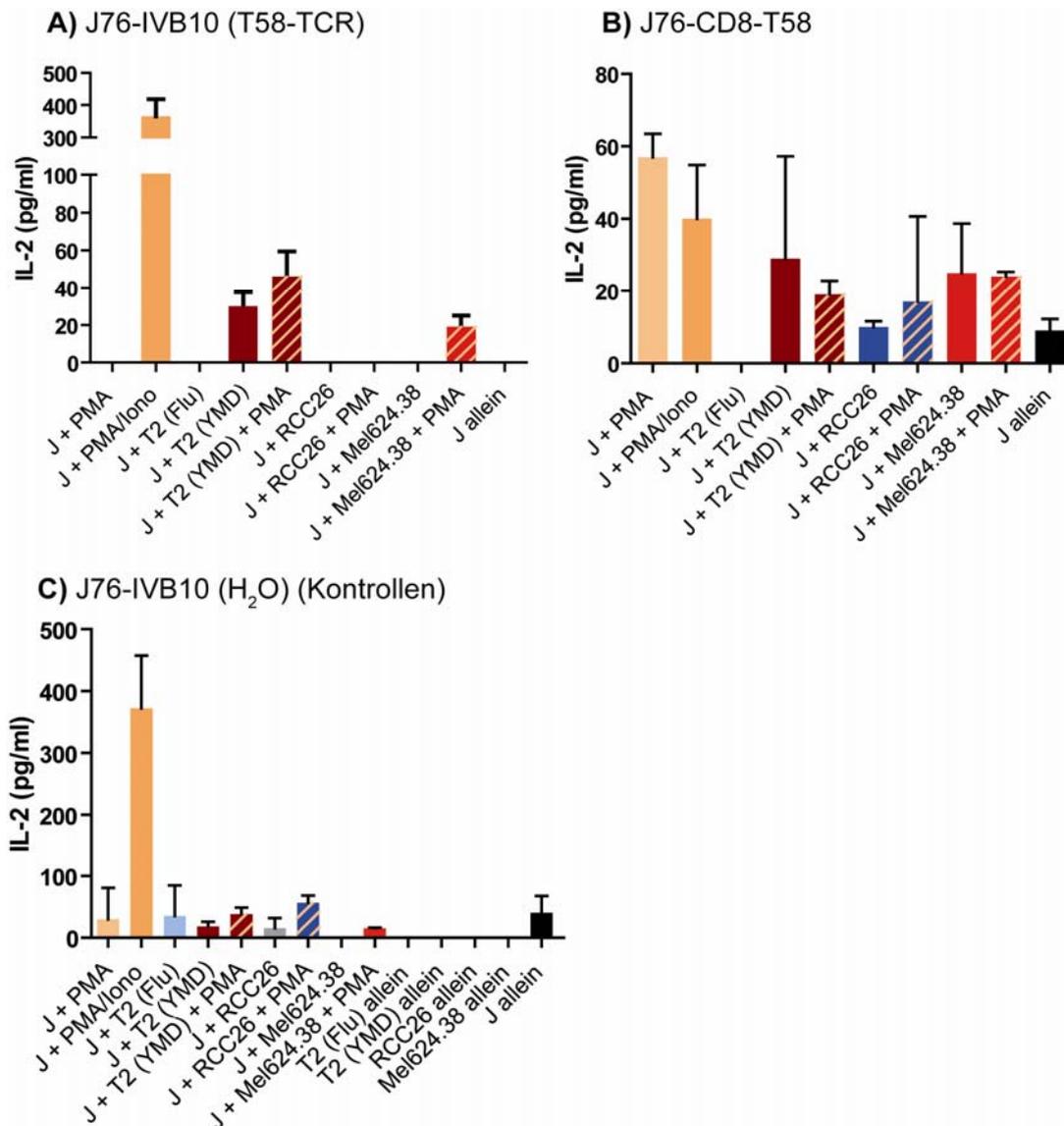


Abb. 4.39: IL-2-Sekretion von J76-IVB10 (H₂O), J76-IVB10 (T58) und J76-CD8-T58 nach 24 h Stimulation. Es wurden je 2×10^4 J76-IVB10 (H₂O) und J76-IVB10 (T58-TCR) 3 h nach Elektroporation von TCR-ivtRNS mit 4×10^4 Zielzellen für 24 h kokultiviert. Die stabile J76-CD8-T58-Transduktante wurde ebenfalls mit Zielzellen koinkubiert. Die IL-2-Sekretion der Jurkat-Zellen wurde aus den Überständen durch ELISA bestimmt. **A)** 3 h nach Elektroporation von J76-IVB10-Zellen mit T58-TCR-ivtRNS wurden diese Zellen mit spezifischen Zielzellen stimuliert. **B)** Die J76-CD8-T58-Zelllinie wurde mit denselben Zielzellen wie die J76-IVB10 (T58) Zellen stimuliert. **C)** 3 h nach Elektroporation von J76-IVB10-Zellen mit H₂O (Kontrollen) wurden diese Zellen mit spezifischen Zielzellen stimuliert. Die Balken zeigen Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichungen.

Die Stimulation mit PMA und Ionomycin führte nur zu einer sehr geringen IL-2-Produktion und auch die Stimulation mit Tyrosinase-Peptid-positiven Zielzellen führte zu keiner klaren Erhöhung der IL-2-Sekretion im Vergleich zu den Kontrollen. Dies machte die Überlegenheit des sortierten J76-IVB10-Klons in der Sekretion von IL-2 auf ein spezifisches Signal über den TCR, aber auch in der Menge an sezerniertem IL-2 auf einen starken unspezifischen Stimulus wie PMA/Ionomycin deutlich.

4.3.4.3 Verbesserte CD25-Expression und IL-2-Sekretion von J76-IVB10-Zellen durch Kostimulation über B7-Moleküle

Im Gegensatz zu Tumorzellen zeigten peptidbeladene T2-Zellen eine höhere stimulatorische Kapazität, was eine deutlich höhere CD25-Expression und IL-2-Sekretion nach Stimulation zur Folge hatte. Daher lag die Vermutung nahe, dass T2-Zellen möglicherweise über die B7-Familien-Moleküle CD80 und CD86 verfügen, die durch eine Bindung an CD28 auf J76-IVB10-Zellen (siehe 4.3.3.2) ein kostimulatorisches Signal in den Jurkat-Zellen auslösen könnten, was eine verbesserte Signaltransduktion nach sich ziehen würde. Durch eine Oberflächenfärbung der T2-Zellen mit Anti-CD80-FITC- und Anti-CD86-PE-Antikörpern konnte die Expression von CD80 und CD86 auf der Oberfläche von T2-Zellen im Durchflusszytometer nachgewiesen werden (Abb. 4.40).

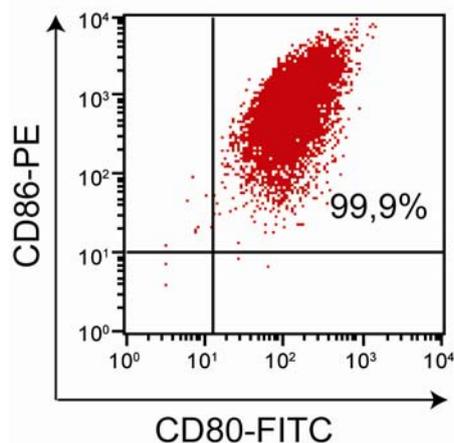


Abb. 4.40: Expression von CD80 und CD86 auf T2-Zellen. Circa 1×10^5 T2-Zellen wurden mit einem Anti-CD80-FITC- und einem Anti-CD86-PE-Antikörper auf die Expression der B7-Moleküle CD80 und CD86 gefärbt. Die Expression wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

Dies unterstrich die wichtige kostimulatorische Rolle von CD28 auf J76-IVB10-Zellen, das an CD80 und/oder CD86 bindet. Wie in den vorherigen Kapiteln gezeigt wurde, ist diese Kostimulation der Jurkat-Zellen durch CD28 essenziell für eine IL-2-Sekretion nach Quervernetzung der TCR und somit wichtiger Bestandteil des Testsystems für TCR-Spezifität.

4.3.4.4 Generierung von CD8-positiven J76-IVB10

Neben einer Kostimulation von J76-IVB10 über CD28 könnte auch ein zusätzliches kostimulatorisches Signal über den Korezeptor CD8 für eine verstärkte Signaltransduktion hilfreich sein. Bei CD8-abhängigen TCR ist diese Kostimulation durch CD8 sogar essenziell für eine Reaktion auf ein spezifisches Antigen. Das Zelladhäsionsmolekül CD8, das an MHC-Klasse-I-Moleküle binden kann, wird als α/α -Homodimer oder als α/β -Heterodimer auf zytotoxischen T-Lymphozyten exprimiert. Die zytoplasmatische Region von CD8 α ist mit der Tyrosin-Kinase p56^{lck} assoziiert (Abb. 1.1). p56^{lck} aktiviert die Proteintyrosinkinase ZAP70, die mit dem TCR:CD3-Komplex assoziiert ist und eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung des TCR-Signals spielt. Außerdem kann die Bindung von CD8 an das Peptid/MHC-Molekül zu einer zusätzlichen Stabilisierung der TCR-Peptid/MHC-Interaktion führen und dadurch die T-Zellsensitivität erhöhen. Für schwache Agonist-Peptid/MHC-Komplexe ist die Interaktion zwischen CD8 und Peptid/MHC für eine Signalweiterleitung notwendig. Möglicherweise war die schwache CD25-Expression bzw. IL-2-Sekretion der J76-IVB10-Zellen nach spezifischer Stimulation des TyrF8-TCR (siehe 4.3.4.1) auf eine fehlende CD8-Kostimulation zurückzuführen. Um das Jurkat-System weiter zu optimieren, sollte der Korezeptor CD8 transient in J76-IVB10 eingebracht werden. Dazu wurde die CD8 α -Kette des CD8-Moleküls in den pCDNA3.1/Hygro-Vektor kloniert, der über einen T7-Promotor verfügt. Dadurch konnte mithilfe einer T7-Polymerase CD8 α -*ivt*RNS hergestellt und dann in J76-IVB10-Zellen elektroporiert werden. Da das CD8 α -Molekül, wie oben erwähnt, CD8 α/α -Homodimere bilden kann, war die Transfektion der CD8 α -Kette ausreichend um ein funktionsfähiges CD8-Molekül auf der Oberfläche der Zellen zu erhalten.

4.3.4.4.1 Transiente Koexpression von CD3 und CD8 in J76-IVB10

In einem TCR-Testsystem muß neben der CD8 α -*ivt*RNS auch TCR-*ivt*RNS in J76-IVB10-Zellen eingebracht werden. Daher sollte zunächst die minimale Menge an CD8 α -*ivt*RNS bestimmt werden, die nötig war, um eine ausreichende CD8-Expression zu erzielen. Zu diesem Zweck wurden J76-IVB10-Zellen mit 5 μ g bzw. 10 μ g CD8 α -*ivt*RNS elektroporiert und 2 h, 4 h, 6 h und 20 h nach Elektroporation mit einem Anti-CD8-FITC-Antikörper gefärbt. Die CD8-Expression wurde durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 4.41). Es zeigte sich, dass nur 5 μ g *ivt*RNS ausreichend waren, um schon 2 h nach der Elektroporation eine deutliche CD8-Expression auf der Mehrheit der Zellen zu erhalten. Der Höhepunkt der CD8-Expression wurde 4-6 h nach der Elektroporation erreicht, aber auch nach 20 h waren fast noch genau so viele CD8-positive Zellen zu detektieren.

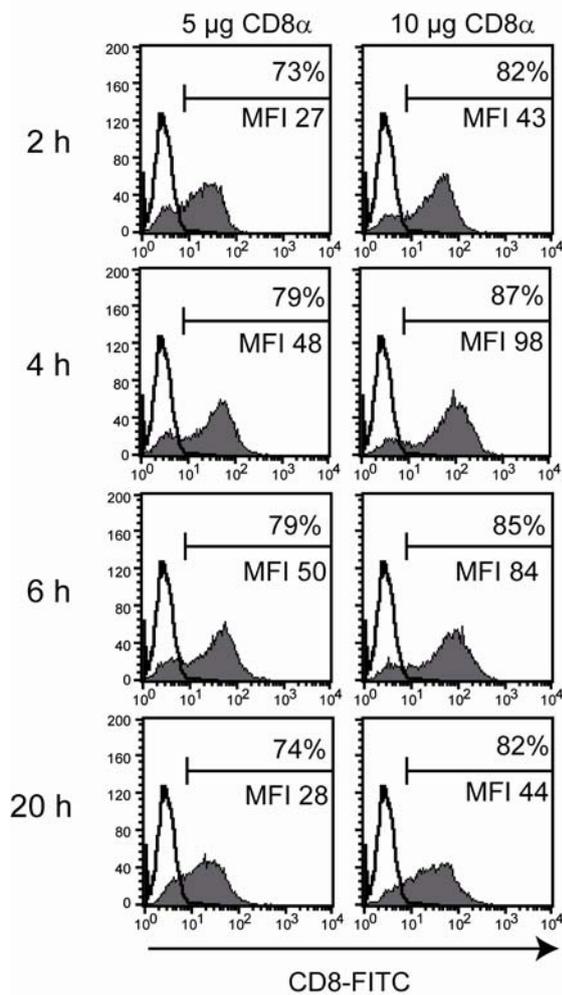


Abb. 4.41: Expression von CD8 auf J76-IVB10 nach Elektroporation von CD8α-ivtRNS. Je 2×10^6 J76-IVB10-Zellen wurden mit 5 µg bzw. 10 µg CD8α-ivtRNS elektroporiert. 2 h, 4 h, 6 h und 20 h nach Elektroporation wurden die Zellen mit einem Anti-CD8-FITC-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die schwarzen, offenen Histogramme zeigen Zellen, die nur mit H₂O elektroporiert worden waren. Die grau hinterlegten Histogramme zeigen die CD8-Expression nach Elektroporation von CD8α-ivtRNS.

Anschließend wurde die Koexpression von CD8 und dem Tyrosinase-spezifischen TCR TyrF8 in J76-IVB10 analysiert. Um zu überprüfen, ob die CD8-Expression möglicherweise durch eine Koelektroporation von TCR-ivtRNS beeinträchtigt werden würde, wurden J76-IVB10 mit CD8α-ivtRNS alleine oder mit CD8α-ivtRNS zusammen mit TyrF8-TCR-ivtRNS elektroporiert. Als Negativkontrolle dienten J76-IVB10-Zellen, elektroporiert mit H₂O. Die Zellen wurden 3 h, 6 h und 20 h nach Elektroporation mit Anti-CD3-FITC- und Anti-CD8-PE-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 4.42). Die Elektroporation der Zellen mit 5 µg CD8α-ivtRNS (J76-IVB10/CD8) führte dazu, dass der Großteil der Zellen 3 h nach Transfektion das CD8-Molekül auf der Oberfläche exprimierten. 20 h nach Elektroporation war noch knapp die Hälfte der J76-IVB10-Zellen CD8-positiv. Die Koelektroporation von CD8α-ivtRNS und TyrF8-TCR-ivtRNS führte 3 h nach der Elektroporation dazu, dass beinahe die Hälfte der J76-IVB10-Zellen CD3- und CD8-doppelt-positiv waren. Nach 20 h exprimierten allerdings nur noch sehr wenige Zellen CD3 und CD8, aber noch über die Hälfte der Zellen das CD8-Molekül. Die TCR-Expression nahm also im Gegensatz zur CD8-Expression schnell ab, die CD8-Expression blieb über längere Zeit relativ stabil. Es zeigt sich, dass eine ausreichende, transiente Koexpression von CD3 und

CD8 nach Koelektroporation der beiden *ivtRNS*-Spezies in J76-IVB10-Zellen erzielt werden konnte.

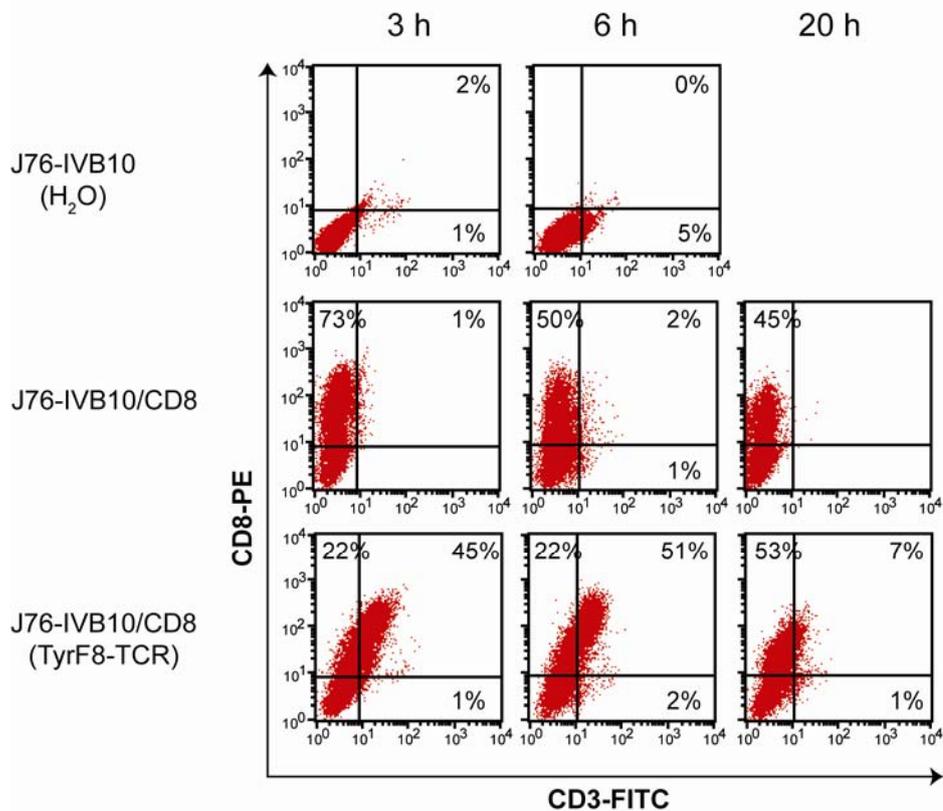


Abb. 4.42: Koexpression von CD3 und CD8 auf J76-IVB10 nach Elektroporation von CD8 α -*ivtRNS* und TCR-*ivtRNS*. J76-IVB10 wurden mit H₂O, CD8 α -*ivtRNS* oder CD8 α -*ivtRNS* und TyrF8-TCR-*ivtRNS* elektroporiert. Die Zellen wurden nach 3 h, 6 h und 20 h mit einem Anti-CD3-FITC-Antikörper und einem Anti-CD8-PE-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

4.3.4.4.2 Quantitativer Nachweis der TCR-Affinität

In diesem Kapitel sollten Jurkat-Zellen mit spezifischen Zielzellen kokultiviert werden, um festzustellen, ob die Stimulation von TCR-transgenen J76-IVB10/CD8 Zellen zu einem stärker messbaren Effekt führte als die Stimulation von TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen ohne CD8-Expression. J76-IVB10-Zellen wurden mit H₂O, TCR-*ivtRNS* alleine (TIL26-TCR bzw. T58-TCR), CD8 α -*ivtRNS* alleine oder mit CD8 α -*ivtRNS* und TCR-*ivtRNS* gleichzeitig elektroporiert und nach 3 h mit Anti-CD3-FITC- und Anti-CD8-PE-Antikörpern gefärbt (Abb. 4.43 A und B).

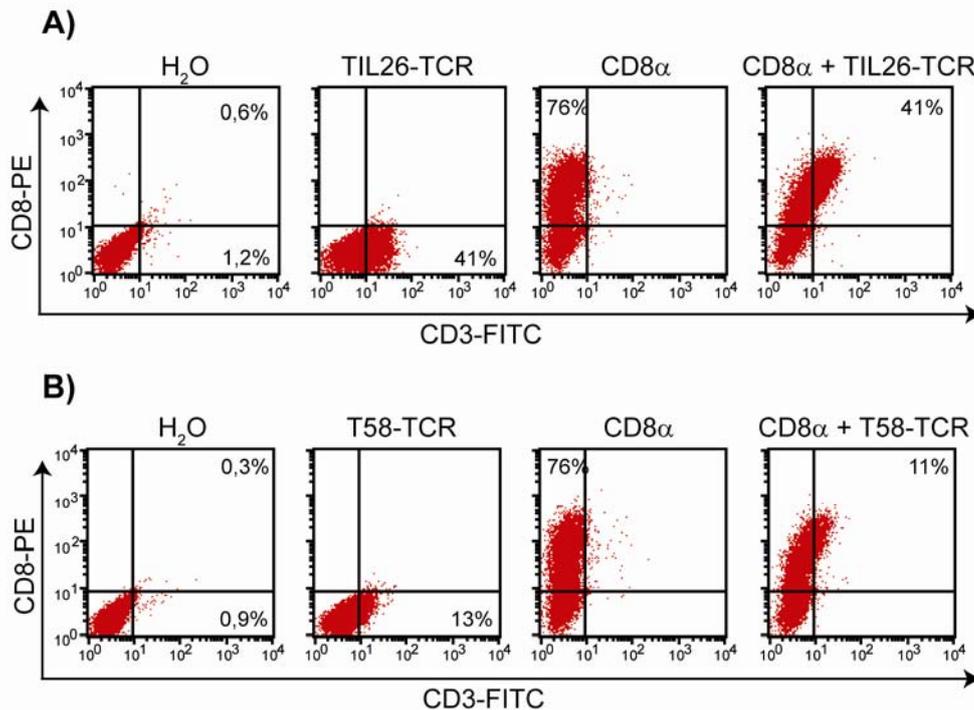


Abb. 4.43: Koexpression von CD3 und CD8 auf J76-IVB10 nach Elektroporation von CD8 α -*ivtRNS* und TCR-*ivtRNS*. J76-IVB10-Zellen wurden mit H₂O, TCR-*ivtRNS*, CD8 α -*ivtRNS* oder CD8 α -*ivtRNS* und TCR-*ivtRNS* elektroporiert. 3 h nach Elektroporation wurden die Zellen mit einem Anti-CD3-FITC-Antikörper und einem Anti-CD8-PE-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. **A)** J76-IVB10-Zellen wurden mit H₂O, TIL26-TCR-*ivtRNS*, CD8 α -*ivtRNS* oder CD8 α - und TIL26-TCR-*ivtRNS* elektroporiert. **B)** J76-IVB10-Zellen wurden mit H₂O, T58-TCR-*ivtRNS*, CD8 α -*ivtRNS* oder CD8 α - und T58-TCR-*ivtRNS* elektroporiert.

Nach Elektroporation mit TCR-*ivtRNS* waren 41 % der J76-IVB10-Zellen positiv für den TIL26-TCR, nur wenige Zellen dagegen positiv für den T58-TCR. Die Elektroporation mit CD8 α -*ivtRNS* alleine führte dazu, dass die Mehrzahl der Jurkat-Zellen als CD8-positiv zu detektieren waren. Die Koelektroporation von CD8 α -*ivtRNS* und TCR-*ivtRNS* führte zu 41 % CD8/TIL26-TCR-positiven Zellen bzw. 11 % CD8/T58-TCR-positiven Zellen. Somit entsprach der Anteil an CD8/CD3-positiven Zellen nach Koelektroporation von CD8 α -*ivtRNS* und TCR-*ivtRNS* dem Anteil an CD3-positiven Zellen nach Elektroporation von TCR-*ivtRNS* alleine. Alle TCR-exprimierenden Zellen trugen nach der Koelektroporation von CD8 α -*ivtRNS* auch das CD8-Molekül auf ihrer Oberfläche.

Drei Stunden nach der Elektroporation mit TIL26-TCR-*ivtRNS* (Abb. 4.43 A) wurden die J76-IVB10-Zellen mit YQY-Peptid-beladenen T2-Zellen für 24 h kokultiviert. Es sollte außerdem untersucht werden, ob durch die IL-2-Sekretion der Zellen nach Stimulation der transgenen TIL26-TCR auch die Affinität der TCR, also die Bindungsstärke der TCR an die YQY-Peptid/MHC-Moleküle, genauer bestimmt werden könnte. Unter Affinität versteht man die Bindungsstärke eines TCR an seinen MHC/Peptid-Liganden. Hoch-affine TCR erkennen schon geringe Konzentrationen an spezifischem Peptid/MHC auf der Oberfläche von

Zielzellen, wohingegen niedrig-affine TCR deutlich höhere Peptidkonzentrationen für eine ausreichende Erkennung benötigen. Um die Affinität der TIL26-TCR zu bestimmen, wurde eine Peptidtitration von YQY-Peptid auf T2-Zellen durchgeführt, d.h. T2-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen YQY-Peptid (10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M) beladen und für die Kokultur mit den TIL26-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen verwendet. Die IL-2-Sekretion der TIL26-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen wurde aus den Überständen durch ELISA bestimmt (Abb. 4.44).

Nach Kokultur mit T2(10^{-5} M YQY)-Zellen sezernierten die TIL26-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen circa 250 pg/ml IL-2, nach Kokultur mit T2(10^{-6} M YQY) waren immerhin noch circa 150 pg/ml IL-2 zu detektieren. Dies zeigte, dass der TIL26-TCR in der Lage war, nur sehr geringe Konzentrationen Peptid auf T2-Zellen zu erkennen.

Das zusätzliche Einbringen von CD8 α -*ivt*RNS in J76-IVB10(TIL26)-Zellen führte zu keiner weiteren Erhöhung der IL-2-Sekretion. J76-IVB10/CD8-(TIL26)-Zellen sezernierten nach Kokultur mit YQY-beladenen T2-Zellen keine höhere Menge an IL-2 als die J76-IVB10 (TIL26)-Zellen, die kein CD8 auf ihrer Oberfläche trugen. Dies könnte damit erklärt werden, dass der TIL26-TCR, wie vorher schon beschrieben, ein CD8-unabhängiger TCR ist, d.h. für eine effiziente Signalweiterleitung innerhalb der Zelle ist eine zusätzliche Kostimulation durch CD8 nicht nötig. Nach Stimulation mit PMA und Ionomyzin sezernierten die J76-IVB10-Zellen circa 1400 pg/ml IL-2 (Abb. 4.44 B).

Nun sollte mithilfe des T58-TCR, der ohne CD8 nur eine sehr geringe IL-2-Sekretion nach Stimulation gezeigt hatte (Abb. 4 39), untersucht werden, ob die Reaktivität dieses TCR durch zusätzliches Einbringen des CD8 α / α -Homodimers verstärkt werden könnte. Drei Stunden nach Elektroporation mit T58-TCR-*ivt*RNS (Abb. 4.43 B) wurden die J76-IVB10-Zellen mit YMD-beladenen T2-Zellen kokultiviert. Die T2-Zellen wurden, wie auch schon oben beschrieben, mit unterschiedlichen Mengen YMD-Peptid beladen (10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M) und für eine 24-stündige Kokultur mit den T58-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen verwendet.

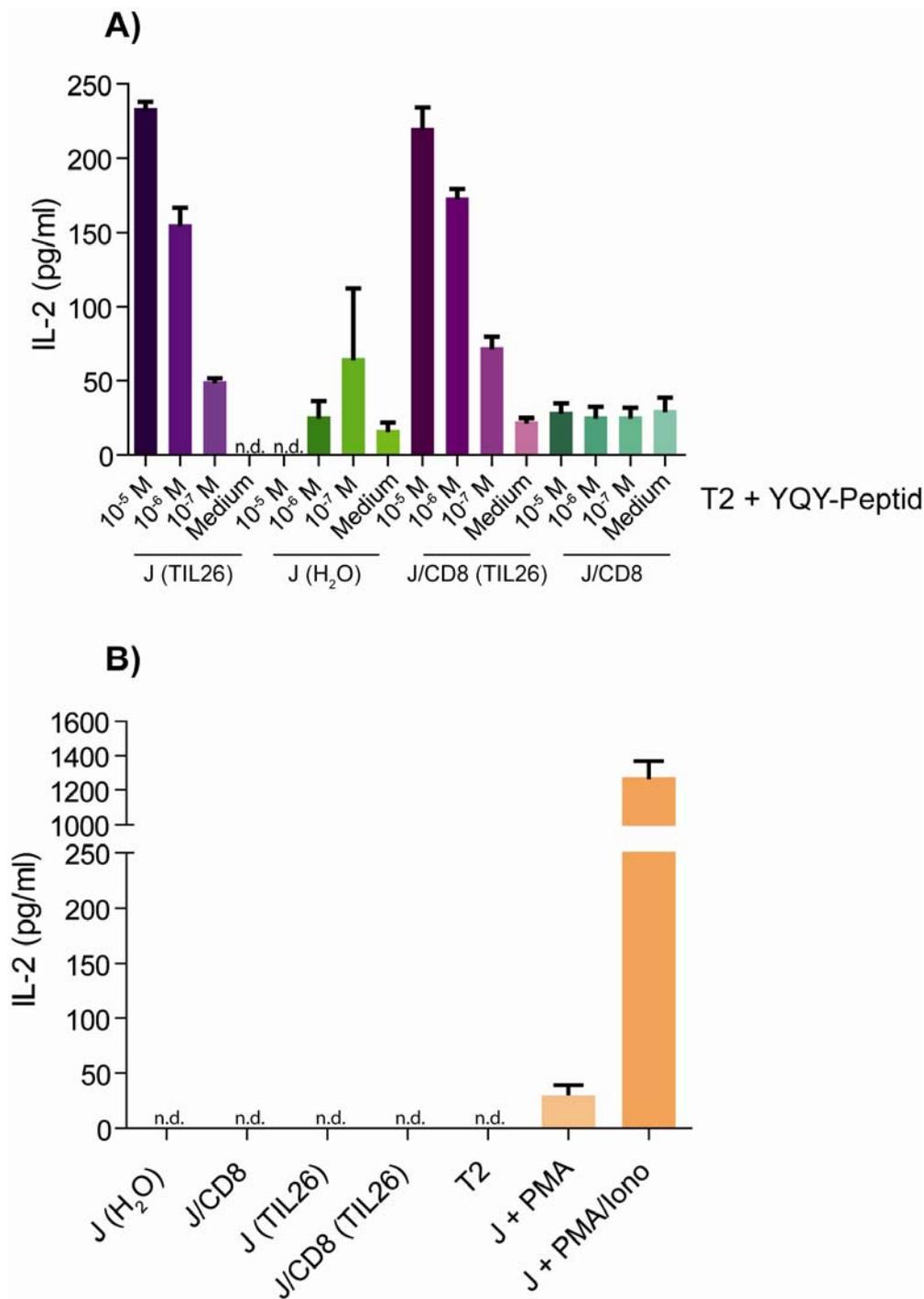


Abb. 4.44: IL-2-Sekretion von J76-IVB10 (TIL26-TCR) und J76-IVB10/CD8 (TIL26-TCR) nach spezifischer Stimulation mit YQY-Peptid-beladenen T2-Zellen. A) J76 IVB10 (TIL26), J76 IVB10 (H₂O), J76 IVB10/CD8 (TIL26) und J76 IVB10/CD8 wurden 3 h nach Elektroporation der ivtRNS (siehe Abb. 4.43) mit YQY-Peptid-beladenen T2-Zellen (10⁻⁵ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M und Medium) für 24 h kokultiviert. **B)** Kontrollen. Die IL-2-Sekretion der J76-IVB10-Zellen wurde aus den Überständen der Kokultur mittels ELISA bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichungen (Abk.: J = J76-IVB10; n.d. = nicht detektierbar).

Nach 24-stündiger Kokultur wurden die Zellen mit Anti-CD3-FITC- und Anti-CD25-PE-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 4.45). Bei allen Proben war die TCR:CD3-Expression kaum mehr zu detektieren, der transgene T58-TCR wurde 27 h nach Elektroporation der T58-TCR-*ivt*RNS nicht mehr auf der Oberfläche der J76-IVB10-Zellen exprimiert. Mit H₂O elektroporierte J76-IVB10-Zellen [J (H₂O)] exprimierten nach Kokultur mit YMD-Peptid-beladenen T2-Zellen kaum CD25. Ebenso verhielt es sich mit J76-IVB10-Zellen, die nur mit CD8 α -*ivt*RNS elektroporiert worden waren (J/CD8). Über 14 % der T58-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen [J (T58)] exprimierten dagegen nach Kokultur mit T2-Zellen, die mit 10⁻⁵ M YMD-Peptid beladenen worden waren, CD25.

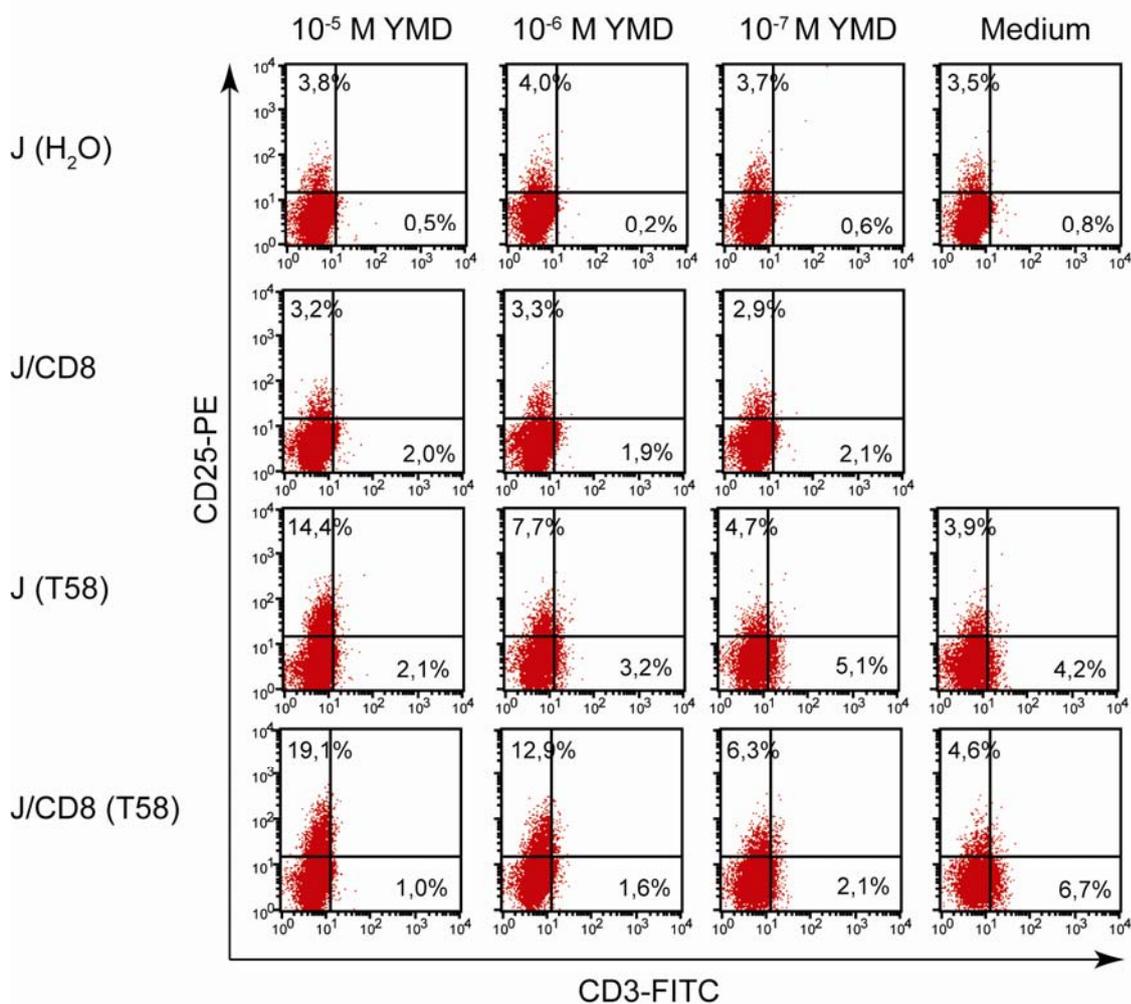


Abb. 4.45: Koexpression von CD3 und CD25 auf TCR-transgenen J76-IVB10 nach 24 h Stimulation mit YMD-Peptid-beladenen T2-Zellen. J76-IVB10 (H₂O), J76-IVB10/CD8, J76-IVB10 (T58) und J76-IVB10/CD8 (T58) wurden 3 h nach Elektroporation der *ivt*RNS (siehe Abb. 4.43) mit YMD-Peptid-beladenen T2-Zellen (10⁻⁵ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M und Medium) für 24 h kokultiviert. Die Zellen wurden mit einem Anti-CD3-FITC-Antikörper und einem Anti-CD25-PE-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Angegeben ist jeweils der prozentuale Anteil CD25-positiver bzw. CD3-positiver Zellen in der Kokultur (Abk.: J = J76-IVB10).

T58-TCR-transgene J76-IVB10-Zellen zeigten eine konzentrationsabhängige Expression von CD25, d.h. eine Titration des YMD-Peptids auf T2-Zellen führte zu einer sukzessiven Verringerung des Anteils CD25-positiver J76-IVB10-Zellen in der Kokultur.

Zusätzlich mit CD8 α -*ivf*RNS transfizierte T58-TCR-transgene J76-IVB10-Zellen [J/CD8 (T58)] zeigten einen noch größeren Anteil CD25-positiver Zellen nach Kokultur mit YMD-Peptid-beladenen T2-Zellen als die T58-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen ohne CD8-Expression. Dies war vermutlich auf eine verstärkte Signaltransduktion innerhalb der J76-IVB10/CD8-Zellen, ausgelöst durch den Korezeptor CD8, zurückzuführen. Eine verbesserte Bindung des TCR an das MHC/Peptid-Molekül durch die zusätzliche Bindung von CD8 könnte auch zu einer verstärkten Signalkaskade führen.

Neben der CD25-Expression wurde die IL-2-Sekretion der T58-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen nach Kokultur mit YMD-Peptid-beladenen T2-Zellen aus den Überständen der Kokulturen mittels ELISA bestimmt (Abb. 4.46). Hier wurden ähnliche Werte, wie schon für die CD25-Expression der J76-IVB10-Zellen nach Kokultur mit peptidbeladenen T2-Zellen erhalten. J76-IVB10 (T58) zeigten die stärkste IL-2-Sekretion von circa 90 pg/ml IL-2 bei höchster Peptidkonzentration, mit abnehmender Peptidkonzentration sank auch die IL-2-Sekretion. Die J76-IVB10/CD8 (T58)-Zellen hingegen sezernierten höhere Mengen an IL-2 nach Kokultur mit YMD-Peptid-beladenen T2-Zellen als J76-IVB10 (T58)-Zellen ohne CD8-Expression. Dies bedeutet, dass auch die IL-2-Sekretion von T58-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen durch die kostimulatorische Wirkung von CD8 bzw. die durch CD8 vermittelte, verbesserte Bindung des TCR an den MHC/Peptid-Molekül verstärkt werden konnte. Nur mit CD8 α -*ivf*RNS elektroporierte J76-IVB10-Zellen zeigten dagegen eine kaum detektierbare IL-2-Sekretion (Abb. 4.46 A). Für Jurkat-Zellen alleine konnte keine IL-2-Sekretion gemessen werden, erst bei Stimulation mit PMA und Ionomycin konnten mehr als 500 pg/ml IL-2 detektiert werden (Abb. 4.46 B).

Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass der T58-TCR zumindest in der Stärke der Signalweiterleitung von der CD8-Expression abhängig war (Abb. 4.47). Es war aber zu erkennen, dass der T58-TCR auch ohne Kostimulation durch CD8, nach einer spezifischen Bindung des MHC/Peptid-Moleküles, eine erhöhte CD25-Expression bzw. IL-2-Sekretion aufwies.

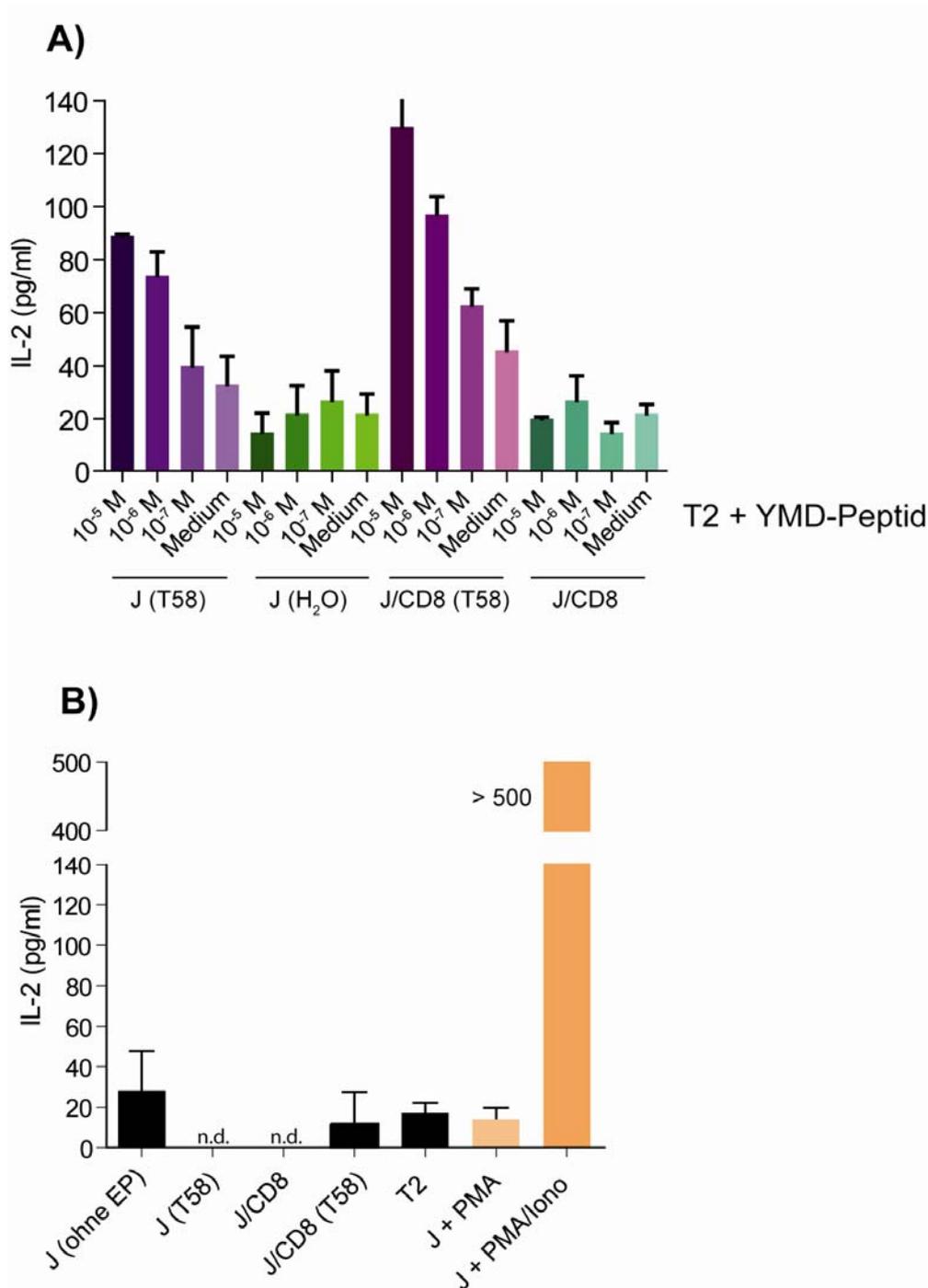


Abb. 4.46: IL-2-Sekretion von J76-IVB10 (T58) und J76-IVB10/CD8 (T58) nach spezifischer Stimulation mit T2-Zellen. **A)** J76-IVB10 (T58), J76-IVB10 (H₂O), J76-IVB10/CD8 (T58) und J76-IVB10/CD8 wurden 3 h nach Elektroporation der ivtRNS (siehe Abb. 4.43) mit YMD-Peptid-beladenen T2-Zellen (10⁻⁵ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M und Medium) für 24 h kokultiviert. **B)** Kontrollen. Die IL-2-Sekretion der J76-IVB10-Zellen wurde aus den Überständen der Kokultur mittels ELISA bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichungen (Abk.: J = J76-IVB10; n.d. = nicht detektierbar).

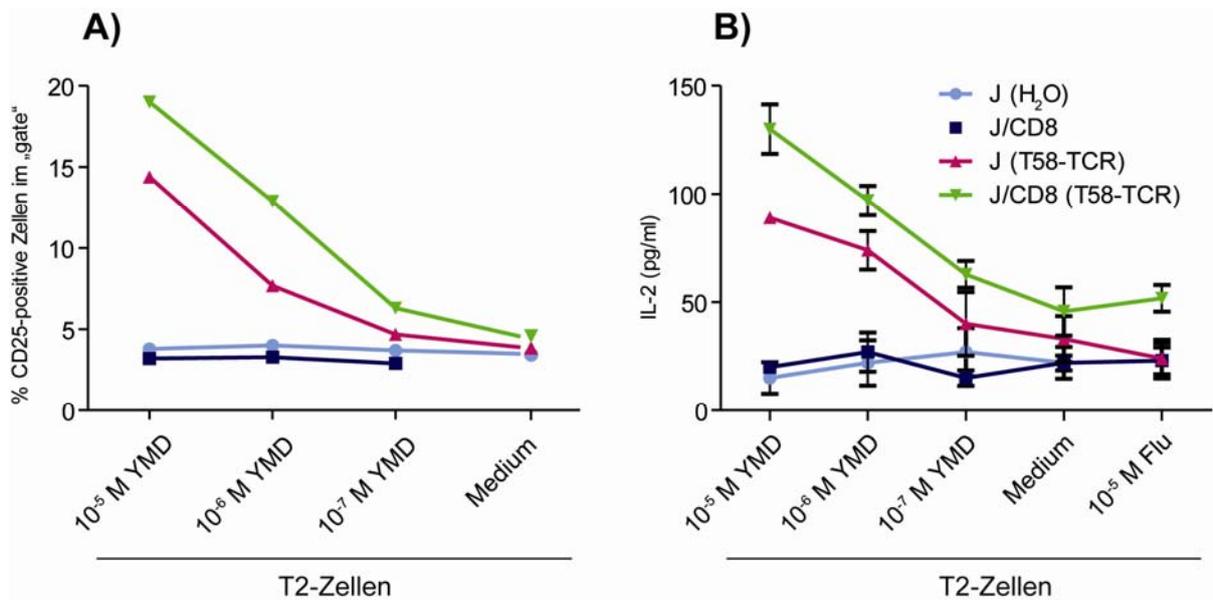


Abb. 4.47: Quantitativer Nachweis der Spezifität des T58-TCR. **A)** Anteil der CD25-positiven Zellen nach 24 h Kokultur von J76-IVB10-Zellen mit YMD-Peptid-beladenen T2-Zellen. **B)** IL-2-Sekretion von J76-IVB10-Zellen nach 24 h Kokultur mit YMD-Peptid-beladenen T2-Zellen (Zusammenfassung der Abb. 4.46 und 4.47; Abk.: J = J76-IVB10).

Die CD25-Expression und die IL-2-Sekretion nahmen in vergleichbarer Weise mit stetiger Verdünnung des YMD-Peptids auf den für die Kokulturen verwendeten T2-Zellen ab (Abb. 4.47 A und B). Auffällig war außerdem, dass die IL-2-Sekretion der T58-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen auch durch die Kostimulation mit CD8 nicht die Höhe der IL-2-Sekretion der TIL26-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen erreichte (Abb. 4.44 A und 4.46 A). Dies könnte auf die deutlich bessere Expression des TIL26-TCR nach Elektroporation der TIL26-TCR-*ivf*RNS in den J76-IVB10 gegenüber der Expression des T58-TCR zurückzuführen sein (Abb. 4.43).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Spezifität bzw. Funktionalität von unterschiedlichen TCR durch die transiente Expression in J76-IVB10-Zellen analysiert werden konnte. Die Methode könnte eventuell auch ein Mittel dafür sein, Aussagen über die CD8-Abhängigkeit bzw. CD8-Unabhängigkeit eines TCR zu treffen.

4.3.4.5 Analyse der V α 19/V β 5.2-(„WT1“-TCR)-Spezifität

In dem in dieser Arbeit beschriebenen „semi-allogenen“ De-novo-Induktionsansatz konnte eine T-Zelllinie generiert werden, die in der Lage war, WT1⁺/HLA-A2⁺ Tumorzellen zu lysieren. Obwohl die WT1-spezifischen T-Zellen im Laufe der Kultivierung von unspezifischen T-Zellen überwachsen wurden und daher nicht genauer getestet werden konnten, konnten die TCR-Ketten V α 19, V β 5.2 und V β 13.2 als mögliche TCR-Ketten eines WT1-spezifischen TCR identifiziert werden. Die Spezifität der V α 19-, V β 5.2- und V β 13.2-Ketten gegenüber dem Antigen WT1, bzw. genauer gesagt gegenüber dem auf HLA-A2 präsentierten WT1-Peptid RMFPNAPYL (RMF-Peptid) sollte nun mithilfe des hier etablierten Systems in J76-IVB10-Zellen analysiert werden. Nachdem die drei verschiedenen V α - und V β -Ketten-cDNS in pGEM4Z-100A-Vektoren (freundlicherweise bereitgestellt von S. Milošević) kloniert wurden, konnte durch *in-vitro*-Transkription *ivt*RNS dieser TCR-Ketten generiert werden.

Zunächst musste bestimmt werden, welche V α /V β -Paarung prinzipiell in J76-IVB10-Zellen stattfinden konnte und zur Expression eines TCR:CD3-Komplexes auf der Zelloberfläche führte. Zu diesem Zweck wurden je 6 μ g der V α 19- und V β 5.2-Ketten-*ivt*RNS bzw. der V α 19- und V β 13.2-Ketten-*ivt*RNS in J76-IVB10-Zellen elektroporiert.

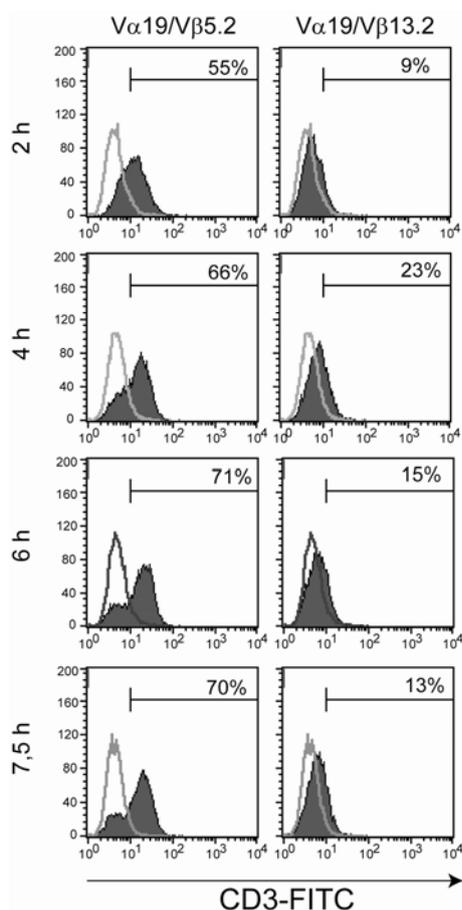


Abb. 4.48: Transiente CD3-Expression auf J76-IVB10 nach Elektroporation von „WT1“-TCR-*ivt*RNS. Je 3×10^6 J76-IVB10-Zellen wurden mit 6 μ g V α 19-*ivt*RNS und 6 μ g V β 5.2-*ivt*RNS bzw. 6 μ g V α 19-*ivt*RNS und 6 μ g V β 13.2-*ivt*RNS elektroporiert. Die CD3-Expression wurde 2 h, 4 h, 6 h und 7,5 h nach Elektroporation durch eine Oberflächenfärbung mit einem FITC-gekoppelten Anti-CD3-Antikörper im Durchflusszytometer bestimmt. Die grauen, offenen Histogramme zeigen die CD3-Expression in J76-IVB10-Zellen nach der Elektroporation mit H₂O (Negativkontrolle), die grau unterlegten Histogramme zeigen die CD3-Expression nach Elektroporation der „WT1“-TCR-Alpha und-Beta-Ketten.

Die Koexpression der TCR α - und β -Ketten wurde indirekt durch eine Färbung der J76-IVB10-Zellen 2 h, 4 h, 6 h und 7,5 h nach der Elektroporation mit einem Anti-CD3-FITC-Antikörper durchflusszytometrisch nachgewiesen (Abb. 4.48). Bereits 2 h nach Koelektroporation von V α 19-*ivt*RNS und V β 5.2-*ivt*RNS exprimierten 55 % der J76-IVB10-Zellen CD3 auf ihrer Oberfläche.

6 h nach Transfektion waren sogar 71 % der J76-IVB10-Zellen CD3-positiv. Die Koelektroporation von V α 19-*ivt*RNS und V β 13.2-*ivt*RNS führte dagegen nur zu einer geringen CD3-Expression auf J76-IVB10-Zellen. Vermutlich kam diese CD3-Expression dadurch zu Stande, dass nach der Elektroporation relativ große Mengen an V α - und V β -*ivt*RNS in den Zellen zur Verfügung standen und dadurch auch ein kleiner Teil der V α 19- und V β 13.2-Ketten paaren konnte, was höchstwahrscheinlich keine produktive TCR-Paarung darstellte. Die V α 19-Kette und die V β 5.2-Kette zeigten dagegen nach Elektroporation von *ivt*RNS eine deutliche CD3-Expression und bildeten wahrscheinlich zusammen einen funktionalen TCR. Für die nächsten Versuche wurden daher stets diese beiden Ketten koelektroporiert.

In den folgenden Versuchen wurden J76-IVB10- und J76-IVB10/CD8-Zellen mit V α 19- und V β 5.2-*ivt*RNS elektroporiert und mit RMF-Peptid-beladenen T2-Zellen koinkubiert. Durch die IL-2-Sekretion der V α 19/V β 5.2 transgenen J76-IVB10-Zellen sollte analysiert werden, ob die Zellen das RMF-Peptid erkennen können bzw. ob der V α 19/V β 5.2-TCR WT1-spezifisch ist.

Für die folgende Kokultur sollten daher CD8-exprimierende, TCR-transgene J76-IVB10-Zellen generiert werden.

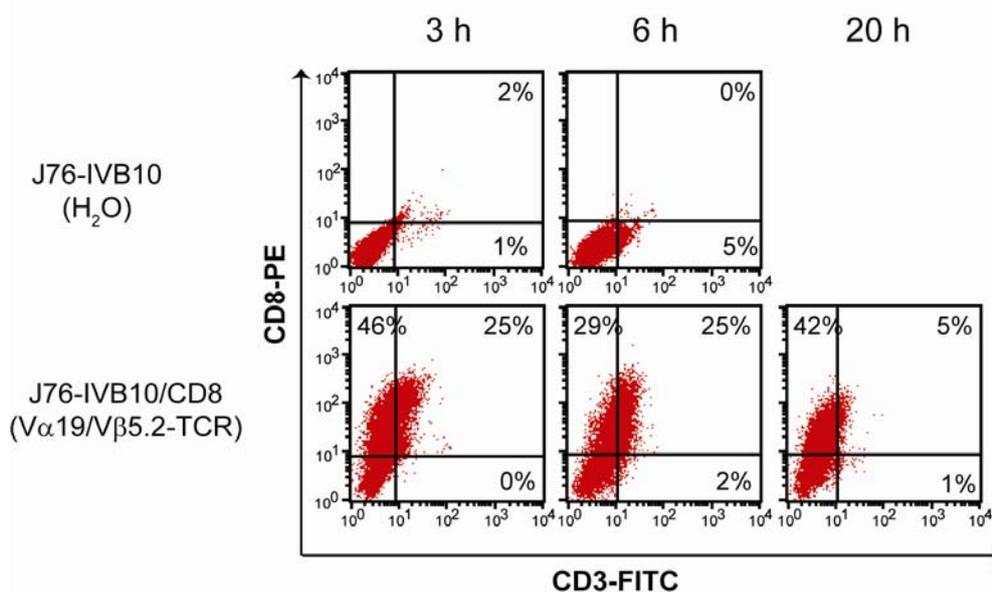


Abb. 4.49: Koexpression von CD3 und CD8 auf J76-IVB10/CD8 (V α 19/V β 5.2-TCR). J76-IVB10 wurden mit H₂O oder CD8 α -*ivt*RNS und V α 19/V β 5.2-TCR-*ivt*RNS elektroporiert. Die Zellen wurden 3 h, 6 h und 20 h nach EP mit einem Anti-CD3-FITC-Antikörper und einem Anti-CD8-PE-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Wie in Abb. 4.49 zu erkennen ist, exprimierten 3 h nach Koelektroporation von CD8 α -*ivtRNS* und V α 19/V β 5.2-TCR-*ivtRNS* 25 % der J76-IVB10-Zellen CD3 und CD8. Diese Expression blieb auch 6 h nach Koelektroporation stabil. 20 h nach Elektroporation exprimierten jedoch nur noch 5 % der Zellen den TCR. Die TCR-Expression nahm also im Gegensatz zur CD8-Expression schnell ab. Dieses Ergebnis war vergleichbar mit der Koexpression des TyrF8-TCR und CD8 (Abb. 4.42).

Für die folgende Kokultur mit peptidbeladenen T2-Zellen wurde der TyrF8-TCR mit der bekannten Spezifität für das YMN-Tyrosinase-Peptid als Kontrolle verwendet.

Es wurden J76-IVB10-Zellen mit TyrF8-TCR-*ivtRNS* bzw. „WT1“-TCR-*ivtRNS* (V α 19/V β 5.2) mit bzw. ohne CD8 α -*ivtRNS* elektroporiert. 3 h nach Elektroporation wurden die J76-IVB10-Zellen mit Anti-CD3-FITC- und Anti-CD8-PE-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 4.50). Nach Elektroporation der TCR alleine exprimierten 58 % der J76-IVB10-Zellen den TyrF8-TCR, 46 % den „WT1“-TCR.

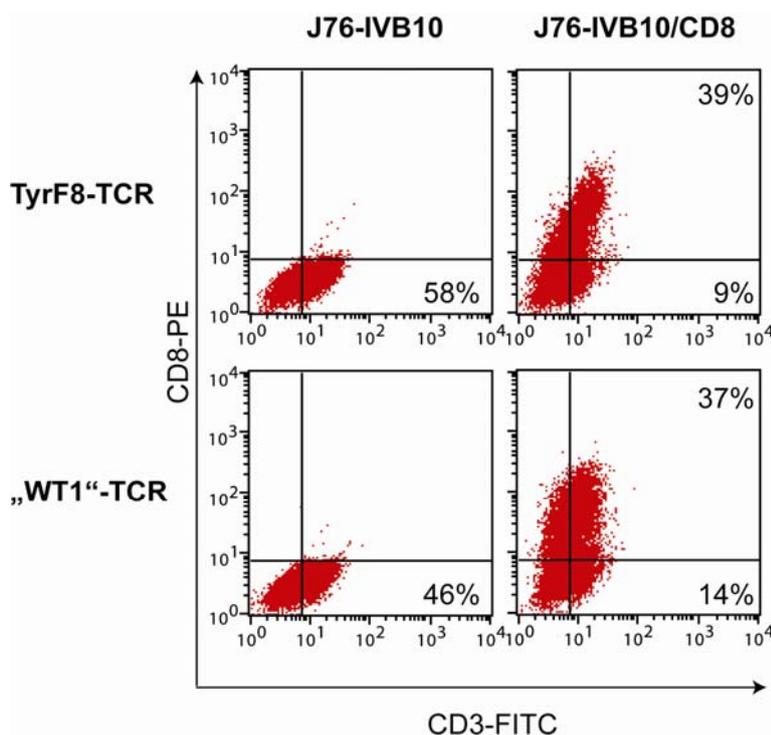


Abb. 4.50: CD3- und CD8-Koexpression auf J76-IVB10 3 h nach Elektroporation von TCR- und CD8 α -*ivtRNS*. J76-IVB10-Zellen wurden entweder mit TCR-*ivtRNS* alleine (TyrF8-TCR oder „WT1“-TCR) oder mit TCR-*ivtRNS* und CD8 α -*ivtRNS* elektroporiert. Nach 3 h wurden die Zellen mit einem Anti-CD3-FITC- und einem Anti-CD8-PE-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Die Koelektroporation von TCR-*ivtRNS* und CD8 α -*ivtRNS* führte zu einer Koexpression von CD3 und CD8 bei 39 % der mit TyrF8-TCR-*ivtRNS* elektroporierten J76-IVB10-Zellen und bei 37 % der mit „WT1“-TCR-*ivtRNS* elektroporierten J76-IVB10-Zellen. Es gab jedoch auch J76-IVB10-Zellen, die nur CD3 oder nur CD8 exprimierten. Die TyrF8- bzw. „WT1“-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen wurden mit T2-Zellen 24 h kokultiviert, die mit 10⁻⁵ M YMN- (Tyrosinase)-Peptid bzw. 10⁻⁵ M RMF-(WT1)-Peptid beladen wurden. Um eine mögliche Verstärkung der Signalkaskade nach Stimulation des TCR zu erreichen, wurden die Zellen in einigen Ansätzen zusätzlich mit 5 ng/ml PMA stimuliert. Die IL-2-Sekretion der TCR-

transgenen Jurkat-Zellen wurde aus den Überständen der Kokulturen mittels ELISA bestimmt (Abb. 4.51).

Die mit TyrF8-TCR-*ivt*RNS elektroporierten J76-IVB10-Zellen sezernierten nach Kokultur mit Flu-Peptid-beladenen T2-Zellen (blaue Balken), die als Negativkontrolle dienten und nicht erkannt werden sollten, ähnlich viel IL-2 wie nach Kokultur mit YMN-Peptid-beladenen T2-Zellen (weinrote Balken, Abb. 4.51 A).

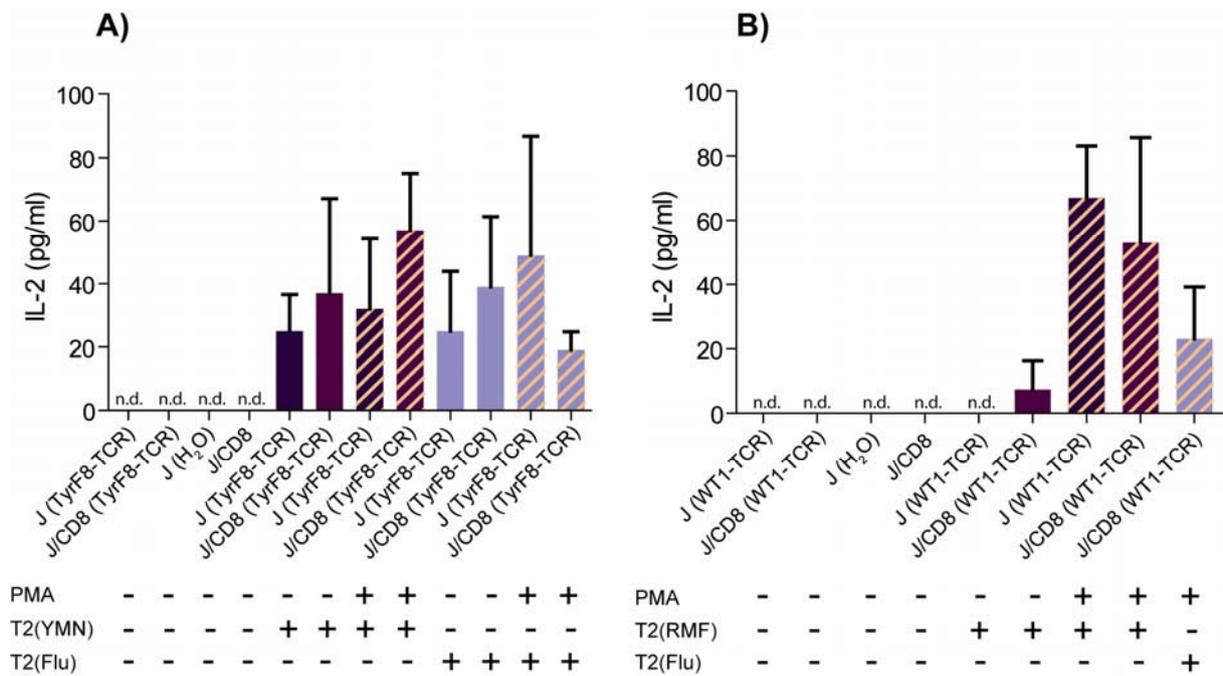


Abb. 4.51: IL-2-Sekretion von J76-IVB10 (TyrF8-TCR) und J76-IVB10 („WT1“-TCR) nach 24 h Kokultur mit YMN- bzw. RMF-Peptid-beladenen T2-Zellen. J76-IVB10-Zellen wurden mit TyrF8-TCR-*ivt*RNS, „WT1“-TCR-*ivt*RNS oder mit TCR-*ivt*RNS und CD8 α -*ivt*RNS elektroporiert (siehe Abb. 4.50). 3 h nach Elektroporation wurden die Zellen für 24 h mit peptidbeladenen T2-Zellen kokultiviert. In einigen Ansätzen wurde zusätzlich mit 5 ng/ml PMA stimuliert. Die IL-2-Sekretion der J76-IVB10-Zellen wurde aus dem Überstand der Kokultur durch ELISA bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichungen. **A)** J76-IVB10- und J76-IVB10/CD8-Zellen wurden mit TyrF8-TCR-*ivt*RNS elektroporiert und mit YMN-Peptid-beladenen T2-Zellen kokultiviert. **B)** J76-IVB10- und J76-IVB10/CD8-Zellen wurden mit „WT1“-TCR-*ivt*RNS elektroporiert und mit RMF-Peptid-beladenen T2-Zellen kokultiviert (Abk.: J = J76-IVB10; n.d. = nicht detektierbar).

Auch durch eine Zugabe von PMA konnte keine spezifische Erhöhung der IL-2-Sekretion erreicht werden (gelbe Streifen in Balken, Abb. 4.51 A). Die zusätzliche Kostimulation durch das CD8 α / α -Homodimer führte bei diesem TCR zu keiner verstärkten Signalweiterleitung, daher konnte die Spezifität und Funktionalität des TyrF8-TCR in diesem Jurkat-System nicht nachgewiesen werden. Ähnliches war auch für den möglichen „WT1“-spezifischen TCR zu beobachten (Abb. 4.51 B). Die Stimulation von CD8-exprimierenden, „WT1“-TCR-positiven J76-IVB10-Zellen mit RMF-Peptid-beladenen T2-Zellen und PMA führte zwar zu einer höheren IL-2-Sekretion als die Stimulation dieser Zellen mit Flu-(Influenza)-Peptid-beladenen

T2-Zellen und PMA, jedoch war diese Erhöhung nur sehr gering und die Schwankungen innerhalb des ELISAs bei diesen niedrigen Werten zu groß, um eine eindeutige Aussage treffen zu können. Im Gegensatz zum T58-TCR und dem TIL26-TCR war für den TyrF8-TCR und den „WT1“-TCR kein definitiver Spezifitätsnachweis in diesem Jurkat-System möglich.

Für CD8-unabhängige TCR, wie z.B. dem TIL26-TCR, war es aber möglich, die Spezifität, die Affinität und die Funktionalität des TCRs durch IL-2-Sekretion bzw. CD25-Expression in J76-IVB10-Zellen zu bestimmen. Für den Spezifitätsnachweis für CD8-abhängige TCR müsste das System vermutlich noch weiter optimiert werden, möglicherweise durch die zusätzliche Stimulation über ein CD8 α/β -Heterodimer. Es konnte in der Literatur schon gezeigt werden, dass bestimmte CD8-abhängige TCR nur in Anwesenheit der CD8 β -Kette in der Lage waren, nach Kokultur mit peptidbeladenen Zellen eine IFN γ -Sekretion in T-Zellen auszulösen (McNicol et al., 2007).

Eine andere Möglichkeit der Optimierung wäre eine Kodon-Optimierung bzw. die Herstellung eines chimären TCR durch Austausch der humanen konstanten Region des TCR durch eine murine konstante Region, was zu einer verbesserten Expression des transgenen TCR nach Elektroporation von TCR-*ivt*RNS führen könnte, wodurch wiederum die Signalweiterleitung nach Erkennung des spezifischen Antigens innerhalb der T-Zelle verstärkt werden könnte.

Weitere Analysen waren aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht mehr möglich.

5 DISKUSSION

5.1 DE-NOVO-INDUKTION HLA-A2-RESTRINGIERTER, WT1-SPEZIFISCHER CD8⁺ T-ZELLEN

Die adoptive T-Zelltherapie stellt eine vielversprechende Therapieform für Tumorpatienten dar. Um an geeignete TCR für eine solche Therapie zu gelangen, müssen zunächst antigenspezifische, hoch-afide T-Zellen identifiziert und analysiert werden. In unserem Labor wurde eine Methode entwickelt, die es durch die De-novo-Induktion naiver T-Zellen ermöglichte, TCR spezifisch für Tumorantigene zu isolieren (Wilde et al., 2009).

Ziel des ersten Teils der vorliegenden Doktorarbeit war die Generierung von HLA-A2-restringierten, WT1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. WT1-spezifische TCR, die man aus diesen T-Zellen isolieren könnte, könnten für eine adoptive T-Zelltherapie verwendet werden, d.h. die TCR könnten in PBL eines HLA-A2⁺ Patienten transferiert werden und anschließend WT1-exprimierende Tumorzellen erkennen und eliminieren.

Das *WT1*-Gen wurde ursprünglich als Tumorsuppressorgen im Wilm's Tumor oder Nephroblastom, einem pädiatrischen Nierentumor, beschrieben, das in 5-10 % der Wilm's Tumoren homozygot mutiert ist (Gessler et al., 1994). Das *WT1*-Gen besitzt eine Länge von 50 kb und besteht aus 10 Exons, die unterschiedlich gespleißt werden können. Durch zusätzliches „RNS-Editing“ und alternative Translations-Initiationsstellen können insgesamt mehr als 24 verschiedene Isoformen von WT1 beschrieben werden (Scharnhorst et al., 1999). Mittlerweile wurde eine Überexpression von WT1 bei akuter myeloischer Leukämie (AML), akuter lymphoide Leukämie (ALL), chronischer myeloischer Leukämie (CML), sowie in mehreren soliden Tumoren, wie z.B. Brustkarzinomen, Ovarialkarzinomen und Kolonkarzinomen festgestellt, wobei das Maß der WT1-Expression mit einer schlechten Prognose für den Patienten korrelierte (Bergmann et al., 1997; Menssen et al., 1995). Eine Überexpression von WT1 konnte in über 90 % der Brustkarzinome nachgewiesen werden, außerdem konnten WT1-spezifische, zytotoxische T-Zellen (CTL) in Patienten mit Brustkrebs detektiert werden, die WT1-Peptid-präsentierende Zellen eliminieren konnten (Gillmore et al., 2006). Im Gegensatz zum Wilm's Tumor stellt WT1 hier also ein Onkogen dar, das bei Überexpression zu Tumorentwicklung führt. WT1 wird in allen Stadien der normalen embryonalen Nierenentwicklung exprimiert, aber auch in weiteren Geweben wie Uterus, Milz, Leber und Thymus (Kreidberg et al., 1993). Die WT1-Expression wird in den meisten adulten Geweben abgeschaltet und ist nur noch in wenigen Zelltypen, wie z.B. hämatopoetischen

Vorläuferzellen vorhanden, jedoch meistens in deutlich geringerem Maße als auf Tumorzellen, wie z.B. Leukämiezellen (Gillmore et al., 2006; Hosen et al., 2002). Diese verbreitete Überexpression von WT1 in verschiedensten Tumortypen und die sehr geringe Expression in normalen Geweben macht WT1 zu einem interessanten Zielantigen für verschiedene Immuntherapieansätze.

In der Literatur werden beispielsweise verschiedene Studien beschrieben, in denen AML-Patienten WT1-Peptide mit Adjuvantien verabreicht wurden. Dadurch wurden WT1-spezifische T-Zellen induziert, die eine Verminderung der Tumorlast oder sogar eine komplette Remission des Tumors bewirken konnten (Mailander et al., 2004; Oka et al., 2004). Trotz der WT1-Expression in normalen, hämatopoetischen Vorläuferzellen kam es bei diesen Ansätzen bisher kaum zu autoimmunen Nebeneffekten (Rosenfeld et al., 2003). Es konnte auch gezeigt werden, dass *in vitro* generierte, WT1-spezifische T-Zellen leukämische CD34⁺ Vorläuferzellen töten konnten, normale CD34⁺ Vorläuferzellen aber verschont wurden. Dies war vermutlich auf die deutlich geringere WT1-Expression in normalen CD34⁺ Zellen im Gegensatz zu leukämischen CD34⁺ Zellen zurückzuführen (Gao et al., 2000).

Einen anderen immuntherapeutischen Ansatz stellt der adoptive T-Zell-Transfer dar. Bei dieser Methode wird ein für ein tumorassoziiertes Antigen spezifischer TCR in humane PBL eingebracht. Es konnte schon von verschiedenen Gruppen *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass ein Transfer von TAA-spezifischer-TCR-cDNS in PBL die Spezifität des jeweiligen TCR nicht veränderte und dass TCR-transgene PBL in der Lage waren, Tumorzellen zu erkennen und zu töten (Clay et al., 1999; Johnson et al., 2009; Morgan et al., 2006). So waren beispielsweise WT1-TCR-transgene T-Zellen in der Lage Leukämiezellen *in vitro* und in einem Mausmodell *in vivo* zu eliminieren (Xue et al., 2005).

Um nun *in vitro* hoch-avide, WT1-spezifische T-Zellen zu generieren, also T-Zellen, die schon geringe Mengen an WT1-Peptid auf der Oberfläche von Tumorzellen erkennen können, wurde eine De-novo-Induktion von HLA-A2-restringierten, WT1-spezifischen T-Zellen im so genannten „semi-allogenen“ System durchgeführt. Im „semi-allogenen“ System wurden DC eines HLA-A2-negativen Spenders mit HLA-A2-*ivt*RNS und WT1-*ivt*RNS transfiziert und zur Stimulation von autologen CD8⁺ T-Zellen verwendet. Durch das Einbringen dieses Allo-MHC-Moleküls (HLA-A2) in die DC war es möglich, ein T-Zell-Repertoire abzugreifen, das im Thymus noch nicht negativ gegen das körpereigene Protein WT1 selektiert worden war. Die spezifischen TCR, die man aus einem solchen „semi-allogenen“ Stimulationsansatz isolieren kann, sollten daher höher avid gegenüber dem präsentierten WT1-Peptid sein, als aus einem „autologen“ Stimulationsansatz gewonnene TCR. In einem „autologen“ Stimulationsansatz wird keine Allo-MHC-Komponente in die

Zellen eingebracht, wodurch nur T-Zellen induziert werden können, die schon negativ gegen das entsprechende Antigen selektiert wurden (Wilde et al., 2009).

Im Gegensatz zu den bisher in unserem Labor durchgeführten De-novo-Induktionsansätzen, sollten die naiven CD8⁺ T-Zellen nur einmal mit DC stimuliert werden, für die folgenden zwei Stimulationen wurden PBMC verwendet. Studien mehrerer Gruppen haben gezeigt, dass Mehrfachstimulationen mit DC zu einem Verlust von antigenspezifischen T-Zellen führen können, vermutlich durch den Prozess des „aktivierungsinduzierten Zelltods“ (Mehrotra et al., 2003). Wurden im Gegensatz dazu nach der Primärstimulation mit DC PBMC für die weiteren Stimulationen von naiven T-Zellen verwendet, konnten antigenspezifische T-Zellen effektiv expandiert werden (Ho et al., 2006). Ho et al. konnten außerdem zeigen, dass DC, die in nur zwei Tagen ausgereift wurden („Fast DC“) (Dauer et al., 2003) ein höheres Potenzial hatten, WT1-spezifische T-Zellen zu induzieren als reguläre DC, die innerhalb einer Woche aus Monozyten generiert wurden (7d DC). Dies war möglicherweise darauf zurückzuführen, dass „Fast DC“ noch nicht in dem Maße ausdifferenziert waren wie die regulären 7d DC und somit vermutlich noch nicht erschöpft waren, z.B. im Bezug auf die Zytokinsekretion. Bisher wurden für De-novo-Induktionen in unserem Labor 7d DC verwendet.

Ein wichtiger Unterschied bei der in dieser Doktorarbeit beschriebenen De-novo-Induktion gegenüber dem De-novo-Induktions-Protokoll, das von Ho et al. beschrieben wurde, war die Verwendung von *ivt*RNS um HLA-A2-positive, WT1-Peptid-präsentierende DC aus HLA-A2-negativen DC zu generieren und HLA-A2-allorestingierte, WT1-spezifische T-Zellen zu erhalten. Es gibt jedoch verschiedene Methoden, um an allorestingierte, peptidspezifische, zytotoxische T-Zellen zu gelangen. DC oder T2-Zellen werden häufig von außen mit Peptiden beladen (Ho et al., 2006; Sadovnikova et al., 1998; Schuster et al., 2007). T2-Zellen (eine Hybridzelllinie aus T- und B-Zelle) eigneten sich sehr gut für derartige Ansätze, da sie defizient für den TAP-Transporter sind und daher keine endogenen Peptide auf MHC-Moleküle laden können (Salter und Cresswell, 1986; Salter et al., 1985). Somit präsentieren T2-Zellen nach einer extrazellulären Peptidbeladung hohe Konzentrationen der gewünschten Peptide auf der Oberfläche. Extrazelluläre Beladung von DC bzw. T2-Zellen mit Peptiden birgt aber verschiedene Limitationen. Beispielsweise muss das immunogene Epitop des jeweiligen Antigens bekannt sein. Bei Verwendung von *ivt*RNS dagegen wird nur die cDNS des gewünschten Antigens benötigt. Aus dieser cDNS kann über *in-vitro*-Transkription *ivt*RNS generiert werden, die nach Elektroporation in den DC prozessiert wird. Verschiedene Epitope des jeweiligen Antigens können dadurch auf verschiedenen MHC-Molekülen der DC präsentiert werden, wodurch T-Zellen mit Spezifitäten für unterschiedliche Epitope desselben Antigens induziert werden können. Für die Elektroporation wurden reife 3d DC (3d mDC) verwendet, da schon vorher in unserer Gruppe gezeigt werden konnte, dass reife 7d DC (7d

mDC) nach Elektroporation von *ivtRNS* eine höhere Proteinexpression als unreife 6d DC (6d iDC) zeigten (Javorovic et al., 2005).

Wie in Abb. 4.2 gezeigt wurde, exprimierten sowohl die DC, als auch die PBMC nach Elektroporation der *ivtRNS* von HLA-A2 und WT1 große Mengen des MHC-Moleküls auf ihrer Oberfläche. Die Expression des Transkriptionsfaktors WT1 war im Gegensatz dazu sehr gering. Wie bereits beschrieben wurde, könnte dies darauf zurückzuführen sein, dass WT1 sehr schnell aus dem Zytosol in den Nukleus transportiert wird und somit nur geringe Mengen an WT1 im Zytosol detektierbar waren (van Tendeloo et al, unveröffentlichte Ergebnisse). Wieviele WT1-Peptid/MHC-Moleküle tatsächlich auf den DC nach Elektroporation exprimiert wurden, konnte nicht bestimmt werden. Da die beiden *ivtRNS*-Spezies jedoch kotransfiziert wurden, konnte davon ausgegangen werden, dass beide *ivtRNS*-Spezies in die Zelle gelangt waren.

Wie schon bei Ho et al. beschrieben wurde, konnten vor der ersten Stimulation der T-Zellen kaum WT1-spezifische T-Zellen in einem gesunden Spender detektiert werden (Ho et al., 2006). Dies war zu erwarten, da WT1 schon während der Entwicklung in verschiedenen Geweben exprimiert wird und die meisten T-Zellen, die spezifisch gegen WT1 sind, während der T-Zell-Reifung negativ selektiert werden, um mögliche autoimmune Effekte dieser gegen das körpereigene Antigen WT1 gerichteten T-Zellen zu verhindern. WT1-spezifische, CD8⁺ T-Zellen konnten im Laufe der drei Stimulationsrunden angereichert werden, wenngleich nur eine sehr geringe Zahl an HLA-A2/WT1-Multimer-positiven T-Zellen aus der Kokultur herausortiert werden konnte. Es wurden HLA-A2/WT1-Multimere für die Färbung und Sortierung der WT1-spezifischen T-Zellen verwendet, da es möglich ist mit diesen Multimeren sehr niedrige Frequenzen antigenspezifischer T-Zellen im Blut zu detektieren und zu isolieren (Busch et al., 1998). Ein Nachteil der T-Zell-Sortierung mittels Multimer ist jedoch die Tatsache, dass nur T-Zellen isoliert werden können, die spezifisch für ein einziges Epitop, hier das immunogene WT1₁₂₆₋₁₃₄-Epitop RMFPNAPYL, sind. Um dieses Problem zu umgehen, wurde in der Literatur eine Methode beschrieben, bei der stimulierte T-Zellen anhand des Aktivierungsmarkers CD137 (4-1BB) separiert werden können (Wehler et al., 2007; Wolf et al., 2007).

Aus der Multimer-sortierten T-Zelllinie konnte eine T-Zelllinie generiert werden. Diese Linie war vier Wochen nach der Sortierung in der Lage, WT1⁺/HLA-A2⁺ Tumorzellen in einem ⁵¹Chrom-Freisetzung-Versuch zu lysieren. WT1⁺/HLA-A2⁺ Tumorzellen wurden dagegen nicht erkannt, was bedeutet, dass es möglicherweise T-Zellklone in dieser T-Zelllinie gab, die spezifisch für WT1 waren. Diese T-Zellklone erkannten demnach das WT1-Peptid auf HLA-A2-Molekülen der Tumorzellen, aber nicht HLA-A2-Moleküle unabhängig vom präsentierten Peptid. Nach weiteren Restimulationsrunden ging jedoch diese zytotoxische Aktivität der T-Zelllinie gegenüber WT1⁺/HLA-A2⁺ Tumorzellen verloren, vermutlich wurden die spezifischen

T-Zellklone innerhalb der T-Zelllinie von unspezifischen T-Zellen überwachen. Durch eine T-Zellrezeptor-Analyse der T-Zelllinie konnten TCR-Ketten identifiziert werden, die möglicherweise einen WT1-spezifischen TCR bilden könnten. Da diese TCR-Analysen sowohl zu dem Zeitpunkt, an dem eine zytotoxische Aktivität der T-Zelllinie gegenüber WT1⁺/HLA-A2⁺ Tumorzellen zu detektieren war, als auch zu dem Zeitpunkt, an dem diese Aktivität nicht mehr detektiert werden konnte, durchgeführt wurden, konnte man TCR-Ketten identifizieren, die eventuell zu einem WT1-spezifischen TCR gehören könnten. Die Sequenzen dieser TCR α - und β -Ketten wurden analysiert und die korrespondierende cDNS von der Firma Geneart synthetisiert, da die gesamte T-Zell-RNS bzw. amplifizierte TCR-cDNS für die TCR-Repertoire-Analysen verwendet wurde. Die Spezifität dieser potenziell WT1-spezifischen TCR wurde anschließend mithilfe eines, im Rahmen dieser Doktorarbeit neu entwickelten Systems analysiert. Diese Analysen werden später ausführlich diskutiert.

Zunächst stellte sich jedoch die Frage, warum der optimierte De-novo-Induktionsansatz nur zu einer minimalen Anreicherung potenziell WT1-spezifischer T-Zellen führte.

Möglicherweise konnten aufgrund der geringen WT1-Expression im Zytosol der DC nur minimale Mengen an WT1-Peptid über HLA-A2-Moleküle präsentiert werden. Die Dichte an HLA-A2/WT1-Peptid-Molekülen war daher vermutlich zu gering um naive T-Zellen effektiv zu stimulieren. Die schlechte WT1-Expression war vermutlich nicht primär auf eine ungenügende Elektroporationseffizienz zurückzuführen, da die HLA-A2-*ivt*RNS in ausreichendem Maße in die Zelle gelangt war, was durch die Proteinexpression detektiert werden konnte (Abb. 4.2). Eine Erklärungsmöglichkeit für die schlechte WT1-Expression könnte eventuell der schnelle Transport des Transkriptionsfaktors WT1 in den Nukleus sein. Innerhalb der Zink-Finger-Regionen des Proteins WT1 befinden sich zwei unterschiedliche Zellkernlokalisierungssignale (siehe Abb. 1.1) (Bruening et al., 1996). Mundlos et al. konnten zeigen, dass das WT1-Protein in gesunden und malignen Geweben fast ausschließlich im Nukleus vorkommt (Mundlos et al., 1993). Später wurde jedoch beobachtet, dass das WT1-Protein zwar hauptsächlich im Nukleus lokalisiert ist, ein gewisser Anteil des Proteins jedoch zwischen Nukleus und Zytoplasma hin- und herwandern kann. Im Nukleus ist WT1 an transkriptionellen oder post-transkriptionellen Prozessen beteiligt und wird als Komplex zusammen mit mRNS aus dem Nukleus in das Zytoplasma transportiert, wo es dann die letzten Schritte in der Genexpression regulieren kann. Es wurde außerdem gezeigt, dass unterschiedliche Isoformen von WT1 die Fähigkeit des Hin- und Herwanderns in gleichem Maße aufweisen, auch wenn sie teilweise unterschiedliche Funktionen besitzen (Niksic et al., 2004). Interessanterweise wurde aber auch beschrieben, dass WT1 im Zytosol nicht akkumuliert sondern wieder relativ schnell in den Nukleus reimportiert wird. Die geringen detektierbaren Mengen an WT1 im Zytoplasma könnten außerdem dadurch erklärt werden,

dass das WT1-Protein im Nukleus zurückgehalten wird, sobald es an andere Proteine gebunden vorliegt, oder in anderen Worten, dass der Export von WT1 aus dem Nukleus von der Dissoziation von WT1-Bindeproteinen abhängt (Vajjhala et al., 2003). Andere Gruppen, die erfolgreich WT1-spezifische T-Zellen generieren konnten, haben dieses Problem durch direkte Beladung von WT1-Peptiden auf die MHC-Moleküle von DC umgangen (Ho et al., 2006). Um eine ausreichende zytoplasmatische Expression von WT1 nach Elektroporation von *ivtRNS* zu erreichen, werden zur Zeit verschiedene Strategien verfolgt. Als vielversprechend stellte sich die Deletion des Kernlokalisierungssignals innerhalb des *WT1*-Gens heraus, wodurch verhindert werden konnte, dass das WT1-Protein in den Zellkern transportiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass solch eine Deletion zu einer deutlich verstärkten WT1-Expression innerhalb des Zytosols nach WT1-*ivtRNS*-Transfer führte, wodurch vermutlich größere Menge des Proteins prozessiert und auf MHC-Moleküle geladen werden könnten (van Tendeloo et al, unpublizierte Daten). Versuche, WT1-spezifische T-Zellen mithilfe dieses modifizierten WT1-Konstruktes zu generieren sind in unserer Gruppe in Planung.

5.2 FÄHIGKEIT VON 3d DC ZUR PEPTIDPROZESSIERUNG BZW. – PRÄSENTATION UND STIMULATION VON T-ZELLEN

Neben der geringen WT1-Expression könnte auch die Verwendung von 3d DC ein Problem bei der De-novo-Induktion dargestellt haben. Für die in unserer Gruppe schon erfolgreich durchgeführten De-novo-Induktionen wurden reguläre 7d DC, also DC, die *in vitro* innerhalb einer Woche aus Monozyten zu reifen DC ausdifferenziert wurden, verwendet (Wilde et al., 2009). Für den hier beschriebenen Stimulationsansatz wurden die DC in Anlehnung an das „Fast DC“-Protokoll von Dauer und Kollegen in nur drei Tagen aus Monozyten ausgereift (Dauer et al., 2003). Da in dem hier beschriebenen De-novo-Induktionsansatz keine WT1-spezifischen T-Zellklone generiert werden konnten, stellte sich die Frage, ob 3d DC schlechter in der Lage waren, T-Zellen zu stimulieren als 7d DC. Ho et al konnten jedoch schon in einem De-novo-Induktionsversuch zeigen, dass „Fast DC“ sogar noch potentere Stimulatorzellen waren als 7d DC (Ho et al., 2006). In diesen Stimulationsansätzen wurden die DC jedoch extrazellulär mit Peptid beladen, daher konnte nicht ausgeschlossen werden, dass 3d DC gegenüber den 7d DC nach Elektroporation mit *ivtRNS* Unterschiede in ihrer Fähigkeit zur Antigenprozessierung und Antigenpräsentation aufwiesen. Aus diesem Grund und wegen der geplanten Verwendung von *ivtRNS*-transfizierten 3d DC innerhalb einer DC-Vakzine-Studie bei AML-Patienten, sollte die Fähigkeit von 3d DC zur Antigenaufnahme, Prozessierung und Präsentation im Vergleich zu 7d DC näher untersucht werden.

Sämtliche mDC wurden in diesen Arbeiten durch Zugabe des „Jonuleit-Cocktails“ generiert, der als „goldener Standard“ der Reifungs-Cocktails gilt (Jonuleit et al., 1996). Zwar werden in der Literatur viele verschiedene Reifungs-Cocktails diskutiert, die je nach Zusammensetzung verschiedene Eigenschaften der DC wie z.B. deren Zytokinsekretion beeinflussen können (Zobywalski et al., 2007), für die Fragestellung in der vorliegenden Arbeit war jedoch nur die Zeitspanne der DC-Generierung interessant.

In den ersten Versuchen zeigte sich, dass 3d DC morphologisch deutlich kleiner waren und eine geringere Granularität aufwiesen als 7d DC, was vor allem bei den reifen DC auffiel (Abb. 4.10). Möglicherweise wiesen diese kleineren und somit vermutlich robusteren 3d DC andere Eigenschaften in der Antigenaufnahme als die 7d DC auf. Der Phänotyp der 3d DC war allerdings vergleichbar mit dem Phänotyp der 7d DC, das heißt wichtige DC-charakteristische und kostimulatorische Moleküle wurden auf den 3d DC exprimiert, was auch bereits für die „2d DC“ (= „Fast DC“) gezeigt werden konnte (Obermaier et al., 2003). Die reifen 3d DC exprimierten jedoch weniger CD274-Moleküle auf ihrer Oberfläche als die 7d DC, dafür aber verhältnismäßig größere Mengen an CD80 (Abb. 4.12), was auch in früheren Versuchen unserer Gruppe gezeigt werden konnte. CD274 (B7-H1) gehört zur Familie der B7-Moleküle wie auch CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2), besitzt aber im Gegensatz zu den beiden kostimulatorischen Molekülen eine inhibitorische Funktion. Der Bindungspartner von CD274 ist CD279 (PD-1), ein CD28-Homolog und inhibitorischer Rezeptor auf T-Zellen (Selenko-Gebauer et al., 2003). DC, die größere Mengen an CD274 auf ihrer Oberfläche exprimieren, könnte man daher einen eher inhibitorischen bzw. toleranz-induzierenden Effekt auf T-Zellen zusprechen. 3d DC haben daher im Vergleich zu 7d DC möglicherweise einen Vorteil in der Stimulation von T-Zellen, da sie größere Mengen an stimulatorischen CD80-Molekülen im Gegensatz zu inhibitorischen CD274-Molekülen auf ihrer Oberfläche exprimieren. Der Phänotyp der 3d DC blieb nach Elektroporation der Zellen stabil, was schon früher für 7d DC gezeigt werden konnte (Javorovic et al., 2005). Dies war eine wichtige Voraussetzung um mit *ivf*RNS elektroporierte 3d DC für eine Stimulation von T-Zellen einsetzen zu können, da die auf den DC exprimierten kostimulatorischen Moleküle wie CD80 und CD86 eine essenzielle Rolle bei der Stimulation von T-Zellen spielen.

Einen weiteren Beweis für den vergleichbaren kostimulatorischen Phänotyp und eine vergleichbare Funktion von 3d DC und 7d DC lieferte die Erkennung von HLA-A2-restringiertem, kurzen Melan-A-Peptid (ELAGIGILTV) auf den DC durch die Melan-A-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten A42, die durch die Menge von durch die T-Zellen sezerniertem IFN γ nachgewiesen werden konnte. Es wurde ursprünglich beschrieben, dass A42 CTL das Melan-A-Peptid EAAGIGILTV neben einiger anderer Melan-A-Peptide erkennen können (Kawakami et al., 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde das leicht modifizierte Peptid ELAGIGILTV verwendet, das ein Analog zum natürlich vorkommenden

Melan-A-Peptid EAAGIGILTV darstellt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Austausch des Alanins (A) durch ein Leucin (L) zu einer stabileren Bindung des Melan-A-Peptids an das MHC-Molekül und zu einer besseren Erkennung des Peptids durch CTL führt (Valmori et al., 1998). Die A42 CTL sezernierten vergleichbare Mengen an IFN γ nach Kokultur mit Melan-A-Peptid-beladenen 3d DC und 7d DC, was für ein vergleichbares stimulatorisches Potenzial der beiden DC-Typen sprach.

3d DC besaßen also stimulatorisches Potenzial, wenn ein intaktes MHC/Peptid-Molekül vorhanden war. Es stellte sich die Frage, ob 3d DC auch in der Lage waren, Antigen aus der Umgebung aufzunehmen, zu prozessieren und korrekt für T-Zellen zu präsentieren. Eine erste Analyse hierzu war die Bestimmung der Makropinozytosefähigkeit von 3d DC und 7d DC. Als Modellsystem für die Makropinozytose diente die Aufnahme von FITC-gekoppeltem Dextran durch die DC nach einer Stunde Inkubation bei 37°C (Abb. 4.15). Unreife DC (2d iDC und 6d iDC) konnten deutlich mehr FITC-Dextran aufnehmen als reife DC, was zu erwarten war, da die Aufnahme von Antigenen eine Schlüsselfähigkeit von unreifen DC ist. Aber auch reife DC (3d DC und 7d DC) waren in der Lage FITC-Dextran aufzunehmen, jedoch in deutlich reduziertem Maße, was den Wechsel im Reifestadium der DC auch in funktionaler Hinsicht deutlich machte. In der Literatur wurde ebenfalls schon beschrieben, dass sich 3d DC und 7d DC in ihrer Fähigkeit FITC-Dextran aufzunehmen kaum unterscheiden (Landi et al., 2007).

3d DC waren also prinzipiell in der Lage, Antigen zu internalisieren. Ob ein aufgenommenes Antigen in beiden DC-Typen gleich effizient prozessiert und auf MHC-Moleküle geladen werden konnte, sollte mithilfe eines Peptids untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde ein 23 Aminosäuren langes Melan-A-Peptid (p70) verwendet. Vor einer Ladung auf MHC-I-Moleküle musste dieses Peptid zuerst durch das Proteasom in kürzere Fragmente zerteilt werden, da auf MHC-I-Molekülen nur Peptide mit einer Länge von 8-11 Aminosäuren präsentiert werden können (Falk et al., 1991; Rammensee et al., 1993). Nach Elektroporation des langen Peptids zeigten beide DC-Typen eine ähnlich gute Prozessierung und Präsentation des Melan-A-Peptids, was indirekt durch die IFN γ -Freisetzung von A42 CTL nach Kokultur mit den DC nachgewiesen werden konnte. Erfolgte die Aufnahme des langen Peptids jedoch nicht durch Elektroporation sondern auf dem natürlichen Weg der Makropinozytose, konnte sowohl für die iDC als auch für die mDC festgestellt werden, dass 3d DC die Melan-A-spezifischen T-Zellen deutlich besser stimulieren konnten als 7d DC.

Da für unsere Versuche allerdings *ivt*RNS als Antigenquelle dienen soll, wurde die Aufnahme von *ivt*RNS nach Elektroporation und die darauffolgende Proteinexpression in den 3d DC genauer untersucht. Eine gute stimulatorische Fähigkeit von 2d DC, die mit Gesamt-Tumor-mRNS transfiziert worden waren, auf autologe CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen wurde bereits in der Literatur gezeigt (Jarnjak-Jankovic et al., 2007). Im Gegensatz dazu wurden in den hier

durchgeführten Ansätzen DC mit *ivtRNS* eines genau definierten Antigens (Melan-A) transfiziert und mit Melan-A-spezifischen A42 CTL kokultiviert, um quantitative Unterschiede in der Proteinexpression in 3d DC und 7d DC zu bestimmen.

In Abschnitt 4.1 wurde schon gezeigt, dass 3d DC nach Elektroporation mit *ivtRNS* eine relativ schlechte Proteinexpression zeigten. Die Elektroporation von 3d DC und 7d DC mit gleichen Mengen Tyrosinase-*ivtRNS* bzw. Melan-A-*ivtRNS* unter gleichen Bedingungen machte deutlich, dass die Proteinexpression in 3d DC deutlich schlechter war als die Proteinexpression in 7d DC. Dies konnte für beide Antigene beobachtet werden und schien somit auf ein allgemeines Expressionsproblem in 3d DC hinzuweisen. Die verminderte Melan-A-Expression in 3d DC konnte durch die Elektroporation deutlich höherer *ivtRNS*-Mengen kompensiert werden, was aber aufgrund des dadurch entstehenden hohen Verbrauchs an *ivtRNS* unbefriedigend war. Aus diesem Grund wurde eine Reihe von verschiedenen Elektroporationsbedingungen für die Transfektion von eGFP-*ivtRNS* in 3d DC getestet. Die veränderten Bedingungen von 300 V und 300 μ F führten auch bei der Verwendung nur geringer Mengen an *ivtRNS* zu einer optimalen Proteinexpression in den 3d DC. Vermutlich war die unterschiedliche Elektroporierbarkeit der 3d DC gegenüber den 7d DC auf die Unterschiede in der Morphologie der Zellen zurückzuführen. Die relativ kleinen und kompakten 3d DC benötigten einen stärkeren elektrischen Puls um RNS-Moleküle aufzunehmen als die größeren 7d DC. 3d DC mit einer verbesserten Melan-A-Expression wiesen auch eine deutlich verbesserte T-Zellstimulationsfähigkeit auf.

Neben der Aufnahme und Präsentation von Antigen, spielt auch die Migration der DC *in vivo* eine essenzielle Rolle. Nur durch eine erfolgreiche Migration von mit Antigen beladenen DC in die Lymphknoten können naive T-Zellen auf ihr entsprechendes Antigen treffen und dadurch de novo induziert werden. Als Signal für die Migration in die Lymphknoten dienen die Chemokine CCL19 und CCL21, die an den auf den DC exprimierten Chemokinrezeptor CCR7 binden können und die DC entlang eines Chemokingradienten in die Lymphknoten leiten (Saeki et al., 1999; Sallusto et al., 1998). *In vitro* kann das prinzipielle Migrationsvermögen von Zellen in einem „Transwell“-Migrationsversuch analysiert werden (Schaff et al., 2005). Es zeigte sich, dass unreife DC kaum in der Lage waren zu migrieren, obwohl auch unreife DC CCR7 auf ihrer Oberfläche exprimieren und man davon ausgeht, dass DC *in vivo* bei ihrer Migration in den Lymphknoten noch unreif sind. Erstaunlich war außerdem, dass reife 3d DC eine deutlich bessere Migrationsfähigkeit zeigten als 7d DC, obwohl beide DC-Typen ähnliche Mengen an CCR7 exprimierten. Möglicherweise war die größere Aktivität bzw. Migrationsfähigkeit der 3d DC gegenüber den 7d DC auf ihre geringere Größe und die kürzere Generierungsdauer zurückzuführen.

Es konnte gezeigt werden, dass 3d DC den 7d DC in vielen Eigenschaften ebenbürtig und in einigen Aspekten, wie der Expression von CD274, der Aufnahme von Antigen in Form von langem Peptid und darauffolgenden Stimulation von T-Zellen sowie der Migration sogar überlegen sind. Deutliche Unterschiede waren in der Elektroporierbarkeit der DC zu beobachten, wobei die 3d DC nach Elektroporation von *ivtRNS* unter optimierten Elektroporationsbedingungen eine ebenso starke Proteinexpression zeigen konnten wie die 7d DC.

5.3 ENTWICKLUNG EINES TESTSYSTEMS FÜR TCR-SPEZIFITÄT IN JURKAT-ZELLEN

Nach einer Sortierung und Klonierung von antigenspezifischen T-Zellen steht man häufig vor dem Problem, dass nur eine limitierte Anzahl von T-Zellen für Spezifitätstests verfügbar ist, da die Zellen oft nur über einen kurzen Zeitraum proliferieren können. Daher ist es wichtig, die TCR-Sequenzen der T-Zellklone so früh wie möglich durch PCR zu amplifizieren und zu identifizieren. Diese so isolierten TCR können dann beispielsweise in PBMC oder immortalisierten Zellen, wie z.B. Jurkat-T-Zellen, wieder exprimiert und auf verschiedene Eigenschaften getestet werden. Hier sollte nun ein System entwickelt werden, mit dessen Hilfe die TCR-Spezifität in relativ kurzer Zeit bestimmt werden kann.

Nachdem in der De-novo-Induktion dieser Doktorarbeit eine mögliche WT1-spezifische TCR α -Kette (V α 19) und zwei mögliche WT1-spezifische TCR β -Ketten (V β 5.2, V β 13.2) identifiziert werden konnten (siehe 5.1), sollte die tatsächliche Spezifität der TCR-Ketten in einem Testsystem mit TCR-defizienten Jurkat-T-Zellen analysiert werden. Die meisten Systeme mit denen man bisher die TCR-Spezifität und –Funktionalität außerhalb der ursprünglichen T-Zelle testen konnte, bargen verschiedene Probleme und/oder waren eher zeitaufwendig.

Jurkat-T-Zellen eignen sich besonders für TCR-Analysen, da sie immortalisiert sind und je nach Fragestellung verschiedene TCR α - und/oder TCR β -Ketten-defiziente Jurkat-T-Zellen zur Verfügung stehen.

So wurden beispielsweise Jurkat-T-Zellen, die einen endogenen TCR exprimierten, mit cDNS eines Melan-A-spezifischen TCR transfiziert und die Spezifität dieses TCR durch IL-2-Sekretion nach spezifischer Stimulation nachgewiesen (Cole et al., 1995). Hier stand man jedoch vor dem Problem, dass diese Jurkat-Zellen nach Elektroporation mit TCR-cDNS nicht nur den transfizierten, sondern auch ihren endogenen TCR bzw. Misch-TCR aus transgenen und endogenen TCR-Ketten auf der Oberfläche trugen und man daher diese Jurkat-Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen die endogene TCR β -Kette behandeln musste, um die Expression des endogenen TCR herunterzuregulieren. Außerdem war die Generierung von

stabilen, TCR-transgenen Jurkat-Zellen nach der Elektroporation mit cDNS sehr zeitaufwendig.

Eine andere Gruppe konnte zeigen, dass die Spezifität von TCR in einer TCR β -Jurkat-Reporterzelllinie, die eine Luciferase-Aktivität unter der transkriptionellen Kontrolle von NFAT aufwies, nachgewiesen werden konnte. Die Aktivierung des TCR wurde durch die Aktivierung eines Luciferase-Gens nachgewiesen, das wiederum durch die TCR-Signalkaskade aktiviert wurde. Nach retroviralem Transfer des TCR in diese Reporterzelllinie exprimierten jedoch nur relativ wenige Zellen den transgenen TCR, außerdem konnten sich hier Misch-TCR aus der endogenen TCR α -Kette und der transgenen TCR β -Kette bilden. Dies machte eine Klonierung der transduzierten Jurkat-Zellen notwendig. Nur bei Jurkat-Klonen, die eine gute TCR-Expression zeigten konnte das Luciferase-Gen nach spezifischer Stimulation des transgenen TCR aktiviert werden (Aarnoudse et al., 2002).

In dieser Doktorarbeit sollte die Expression von transgenen TCR in Jurkat-Zellen nach Elektroporation von TCR-*ivt*RNS erfolgen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass primäre T-Lymphozyten und Jurkat-Zellen sehr effektiv und mit einer nur geringen Mortalitätsrate mit TCR-*ivt*RNS elektroporiert werden konnten und dadurch eine gute TCR-Expression erreicht werden konnte (Johnson et al., 2006; Zhao et al., 2006). Um eine Fehlpaarung endogener TCR-Ketten mit den transfizierten TCR-Ketten zu verhindern, die zur Expression von TCR mit neuen Spezifitäten führen könnte, wurden TCR α / β -defiziente Jurkat-76-Zellen verwendet (Heemskerk et al., 2003). Eine erfolgreiche Elektroporation der J76-Zellen mit TCR α - und TCR β -*ivt*RNS konnte indirekt über die CD3-Expression nachgewiesen werden, da die TCR α / β -defizienten J76-Zellen zwar endogenes CD3 exprimieren, dieses CD3 aber nur im Komplex mit der TCR α - und TCR β -Kette an die Oberfläche der Zellen gebracht wird (Saito et al., 1987). Bei TCR α / β -defizienten J76-Zellen konnte man sicher sein, dass die CD3-Expression nach Elektroporation nur auf die transfizierten TCR-Ketten zurückzuführen war und nicht auf etwaige Misch-TCR aus endogenen und transfizierten TCR-Ketten. Dies war ein entscheidender Vorteil, da so für den Nachweis der Expression verschiedenster transgener TCR α - und TCR β -Ketten in J76-Zellen keine TCR-Ketten-spezifischen Antikörper nötig waren, sondern eine CD3-Oberflächenfärbung für diesen Nachweis ausreichte. Zur Analyse der TCR-Spezifität sollten die mit transgenen TCR transfizierten J76-Zellen mit spezifischen Zielzellen kokultiviert werden und ihre Aktivierung über IL-2-Sekretion nach Stimulation oder eine veränderte Expression von Oberflächenmolekülen detektiert werden.

5.3.1 HETEROGENITÄT VERSCHIEDENER J76-TRANSDUKTANTEN

Da kaum Daten über die Expression von Aktivierungsmarkern bei J76 bekannt sind, wurde zunächst die Expression verschiedener T-Zell-typischer Oberflächenmoleküle auf J76 und

J76-TCR26 vor und nach unspezifischer Stimulation mit dem Phorbolöster PMA und dem Kalziumionophor Ionomycin bestimmt. Die J76-TCR26-Transduktante wurde ursprünglich durch einen retroviralen Transfer des TCR26 in TCR-defiziente J76-Zellen und eine Klonierung der transduzierten Zellen generiert. Die TCR26-Sequenz stammte aus dem TIL26-Klon, der aus einem Nierenzellkarzinom-Patienten („Patient 26“) isoliert werden konnte und zeigte eine Erkennung der RCC26-Tumorzelllinie (Engels et al., 2005; Sommermeyer et al., 2006). Eine Stimulation mit PMA und Ionomycin aktiviert die Proteinkinase-C und erhöht die intrazelluläre Kalziumkonzentration, wodurch eine Signalkaskade ausgelöst wird, die identisch ist mit proximalen Ereignissen der Signalkaskade nach spezifischer TCR-Stimulation (Truneh et al., 1985). Die beiden Zelllinien zeigten eine relativ heterogene Beschaffenheit in der Expression ihrer Oberflächenmoleküle. Ein auffälliger Unterschied war in der Expression von CD28, einem kostimulierenden Molekül auf T-Zellen und Liganden für CD80 und CD86, zu beobachten. Während die J76-Zellen CD28 exprimierten, war auf den J76-TCR26-Zellen keine CD28-Expression zu detektieren. CD25, die α -Kette des IL-2-Rezeptors, wurde dagegen in beiden Zelllinien exprimiert und nach Stimulation mit PMA/Ionomycin noch weiter hochreguliert. Eine Hochregulation der CD25-Expression konnte auch in den Tyrosinase-spezifischen T58-TCR-transgenen bzw. D115-TCR-transgenen J76-CD8-Zellen (Wilde et al., 2009) nach spezifischer Stimulation der Tyrosinase-spezifischen TCR durch Tyrosinase-exprimierende Tumorzellen oder YMD-(Tyrosinase)-Peptid-beladene T2-Zellen beobachtet werden. Dies deutete darauf hin, dass möglicherweise die Hochregulation von CD25 als Indikator für eine Stimulation eines spezifischen TCR in Jurkat-Zellen verwendet werden könnte.

Die verschiedenen getesteten J76-Zelllinien zeigten auch funktionale Unterschiede, z.B. bei der Fähigkeit IL-2 nach Aktivierung zu sezernieren. IL-2 wird von T-Zellen nach einer Aktivierung der TCR-Signalkaskade produziert und führt zur Proliferation der T-Zellen. Es wird in der Literatur beschrieben, dass Jurkat-Zellen generell auf eine Stimulation mit PMA und Ionomycin mit einer Sekretion von IL-2 reagieren können (Weiss und Stobo, 1984). Während J76 und J76-TCR26 in der Lage waren, nach Stimulation mit PMA/Ionomycin IL-2 zu sezernieren, besaßen J76-CD8-Zellen (stabile J76-Transduktanten für CD8 α) diese Fähigkeit nicht. Nach einer spezifischen Stimulation des TCR durch Kokultur mit antigen-positiven Tumorzellen konnten aber auch J76-TCR26-Zellen kein IL-2 sezernieren. Dies könnte möglicherweise dadurch erklärt werden, dass für eine IL-2-Sekretion nach TCR-Stimulation zwei Signale nötig sind, nämlich die Stimulation durch spezifische Peptid/MHC-Moleküle (Signal 1) und die Stimulation durch kostimulatorische Moleküle wie CD28 (Signal 2) (Baxter und Hodgkin, 2002). J76-TCR26 exprimierten kein CD28, wodurch keine Kostimulation der Zellen nach Bindung der TCR an die Peptid/MHC-Moleküle stattfinden konnte. Es wird vermutet, dass eine Stimulation von T-Zellen über den TCR alleine nur eine

Transkription von IL-2 nach sich zieht, zu einer Sekretion von IL-2 kommt es nur nach dem zusätzlichen kostimulatorischen Signal über CD28 (Guinan et al., 1994).

Aufgrund der Heterogenität der verschiedenen Jurkat-76-Zelllinien im Bezug auf die Oberflächenexpression verschiedener Moleküle und die Fähigkeit zur IL-2-Sekretion nach Stimulation, schien es notwendig, einen geeigneten J76-Klon aus der Gesamtpopulation herauszusortieren, der generell in der Lage war, nach Stimulation mit PMA/Ionomycin CD25 hochzuregulieren und IL-2 zu sezernieren, um ein verlässliches System zum Nachweis von TCR-Spezifität mit Jurkat-Zellen zu etablieren. Außerdem sollte der J76-Klon CD28 exprimieren, um kostimulatorische Signale durch die Bindung von CD80 und CD86 an CD28 erhalten zu können, wodurch eine Stimulation des J76-Klons über einen transgenen TCR verstärkt und die IL-2-Sekretion ausgelöst werden könnte.

5.3.2 NACHWEIS VON TCR-SPEZIFITÄT IN J76-IVB10-ZELLEN

Zur Identifikation eines optimalen J76-Klons wurde ein IL-2-Sekretions-Versuch mit J76-Zellen durchgeführt, mit dessen Hilfe diejenigen J76-Zellen angereichert werden konnten, die nach Stimulation mit PMA/Ionomycin IL-2 sezernierten. Nachdem diese IL-2-sezernierenden Zellen durch limitierendes Verdünnungsverfahren kloniert worden waren, konnten verschiedene J76-Klone auf ihre extrazelluläre CD25-Expression und intrazelluläre IL-2-Expression nach Stimulation mit PMA/Ionomycin getestet werden. Der Klon J76-IVB10 zeigte dabei die stärkste Hochregulation von CD25 und die beste IL-2-Expression. Zudem exprimierte J76-IVB10 CD28, was eine wichtige Voraussetzung für die spätere Sekretion von IL-2 nach antigenspezifischer Stimulation darstellte.

Um zu zeigen, dass ein Testsystem für TCR-Spezifität mit Jurkat-Zellen funktioniert, wurden zwei TCR mit bekannter Spezifität verwendet: der Tyrosinase-(YMD-Peptid)-spezifische TyrF8-TCR und der RCC26-spezifische TIL26-TCR. Das RCC26-spezifische Epitop, das von TIL26 erkannt wird, ist zwar noch nicht definiert, es existiert jedoch ein Surrogat-Peptid (YQY-Peptid), das mithilfe der PS-SCL-Technologie (Rubio-Godoy et al., 2002) identifiziert wurde und zur spezifischen Aktivierung von TIL26 führt (Schendel et al., 1993; Visseren et al., 1995).

Die TCR wurden mittels Elektroporation der entsprechenden *ivf*RNS in J76-IVB10 exprimiert und analysiert. J76-IVB10-Zellen zeigten schon kurz nach der Elektroporation von TCR-*ivf*RNS eine deutliche CD3-Expression. Die Koelektroporation von *ivf*RNS der TCR α - und TCR β -Ketten führte also zu einer deutlichen CD3:TCR-Komplex-Expression auf J76-IVB10. Nach Stimulation der TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen mit spezifischen Zielzellen, zeigten die TyrF8-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen nur eine minimale Hochregulation des IL-2-Rezeptors CD25. TIL26-TCR-transgene J76-IVB10-Zellen dagegen konnten CD25 nach

Stimulation mit RCC26-Tumorzellen in geringem Maße, nach Stimulation mit YQY-Peptid-beladenen T2-Zellen stark hochregulieren.

Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei der IL-2-Sekretion der TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen nach spezifischer Stimulation. Die TyrF8-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen sezernierten nur sehr geringe Mengen an IL-2 während die TIL26-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen nach Kokultur mit YQY-Peptid große Mengen an IL-2 sezernieren konnten. Erstaunlicherweise führte die Kokultur mit den spezifischen Tumorzellen RCC26 zu keiner IL-2-Sekretion. Dies könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass die T2-Zellen im Gegensatz zu Tumorzellen größere Mengen an Peptid/MHC-Molekülen präsentierten und daher die TCR-transgenen Jurkat-Zellen besser stimulierten konnten. Eine weitere Erklärung wäre die fehlende Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD80 oder CD86 auf Tumorzellen, die auf T2-Zellen in hohen Mengen exprimiert werden. Eine ineffiziente Erkennung von Tumorzellen durch TCR-transgene Jurkat-Zellen wurde bereits in anderen Systemen beschrieben. Tumorzellen, die zusätzlich mit Antigen-cDNS transfiziert oder mit Peptid beladen worden waren, konnten eine NFAT-Aktivität bei Jurkat-Zellen stimulieren, was für die Theorie sprach, dass Tumorzellen aufgrund ihrer geringeren Antigenpräsentation schlechter als peptidbeladene T2-Zellen von TCR⁺ Jurkat-Zellen erkannt werden konnten (Aarnoudse et al., 2002). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch sehr geringe Mengen an Peptid auf T2-Zellen ausreichten um TCR⁺ Jurkat-Zellen zu stimulieren, was dafür sprach, dass die Konzentration der Peptid/MHC-Moleküle auf der Oberfläche der Zielzellen nicht die limitierende Komponente für die Stimulation war, sondern dass verschiedenen Zelladhäsionsmoleküle auf den T2-Zellen eine essenzielle Rolle bei der Stimulation von T-Zellen spielten (Cole et al., 1995).

Die IL-2-Sekretion der TIL26-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen ließ sich nach Stimulation mit peptidbeladenen T2-Zellen durch die Zugabe des Phorbolesters PMA auf das doppelte steigern, wobei die Stimulation mit PMA alleine zu keiner IL-2-Sekretion führte. Dies deutete auf einen synergistischen Effekt der beiden stimulatorischen Signale hin, was auch schon in der Literatur beschrieben wurde (Weiss et al., 1984).

Woran konnte es nun liegen, dass die TyrF8-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen im Gegensatz zu TIL26-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen kein IL-2 nach Stimulation mit peptidbeladenen T2-Zellen sezernieren konnten? Für den TIL26-TCR, der ursprünglich einer CD8⁺ T-Zelle entstammt, ist bekannt, dass er auch nach Transfer in eine CD8-negative T-Zelle Funktionalität zeigt, d.h. dieser TCR ist CD8-unabhängig in seiner Funktion (Nössner et al, nicht publizierte Daten). Dies konnte anhand der IL-2-Sekretion von CD8-negativen, TIL26-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen bestätigt werden. Möglicherweise war die mangelnde Funktion der TyrF8-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen auf das fehlende kostimulatorische Signal durch CD8 zurückzuführen, was darauf hinweisen könnte, dass der

TyrF8-TCR CD8-abhängig ist. Es könnte also möglich sein, eine IL-2-Sekretion nach Stimulation von TyrF8-TCR-transgenen J76-IVB10 durch eine zusätzliche Transfektion des CD8-Moleküls zu erreichen. So konnte beispielweise gezeigt werden, dass CD8 α -transduzierte, TCR⁺ Jurkat-Zellen in der Lage waren, Tumorzellen zu erkennen, im Vergleich zu CD8-negativen Jurkat-Zellen (Aarnoudse et al., 2002). Ob diese Strategie im Falle des TyrF8-TCR erfolgreich war, wird im nächsten Kapitel diskutiert.

Am Beispiel des Tyrosinase-spezifischen T58-TCR wurde untersucht, ob sich die Signalweiterleitung und die darauffolgende CD25-Hochregulation bzw. IL-2-Sekretion nach Stimulation des TCR in den transient T58-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen und den stabil T58-TCR-transgenen J76-CD8-Zellen unterscheidet. Die J76-CD8-T58-Zellen waren zudem CD8 positiv im Gegensatz zu J76-IVB10. Der T58-TCR wurde aus einem „semi-allogenen“ Stimulationsansatz isoliert (Wilde et al., 2009).

Es war zu beobachten, dass eine Stimulation der Jurkat-Zellen mit peptidbeladenen T2-Zellen zu einer deutlichen Steigerung der CD25-Expression führte. Im Gegensatz zu den früher beschriebenen Experimenten zeigten auch die mit Tumorzelllinien stimulierten Jurkat-Zellen eine Hochregulation ihrer CD25-Expression, wenn auch in geringerem Maße als die mit Tyrosinase-Peptid-beladenen T2-Zellen stimulierten Jurkat-Zellen. Möglicherweise war das auf die Tatsache zurückzuführen, dass der Tyrosinase-spezifische T58-TCR ein hoch-avidier TCR ist, der auch geringe Mengen an Peptid auf der Oberfläche von Tumorzellen erkennen konnte (Wilde et al., 2009). Ferner wäre es möglich, dass die Melanomzellen Mel 624.38 verschiedene kostimulatorische Moleküle exprimierten und daher eine verstärkte CD25-Expression auf den T58-TCR-transgenen Jurkat-Zellen nach Kokultur mit Mel 624.38 Zellen zu beobachten war. Dies wurde jedoch nicht näher untersucht. Interessant war, dass sich die CD25-Expression zwischen den beiden T58-TCR-transgenen Jurkat-Linien nicht unterschied. Also schien die relativ kurz andauernde TCR-Expression, die 24 h nach Elektroporation der TCR-*ivt*RNS kaum mehr zu detektieren war eine Stimulation der TCR⁺ Jurkat-Zellen zu ermöglichen, die mit der Stimulationsfähigkeit der stabilen TCR-Transduktanten vergleichbar war.

Ein anderes Bild zeigte sich bei der Analyse der IL-2-Sekretion. Die T58-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen sezernierten nach Stimulation mit Tyrosinase-Peptid-beladenen T2-Zellen IL-2, wenn auch in viel geringeren Mengen als bei den TIL26-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen beobachtet werden konnte. Dies war wohl nicht nur auf Eigenschaften der zwei verschiedenen TCR zurückzuführen, sondern auch auf die generelle Fähigkeit der J76-IVB10-Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten IL-2 zu sezernieren. Nach unspezifischer Stimulation mit PMA/Ionomycin sezernierten die J76-IVB10-Zellen zu dem Zeitpunkt, als der TIL26-TCR getestet wurde über 4000 pg/ml IL-2, zu dem späteren Zeitpunkt, als der T58-TCR in die J76-IVB10-Zellen transferriert wurde nur noch circa 400 pg/ml. Die Fähigkeit der

J76-IVB10-Zellen zur IL-2-Sekretion schien also über einen gewissen Zeitraum hinweg zu schwanken.

In diesem Experiment wurde aber dennoch die „Überlegenheit“ des sortierten J76-IVB10-Klons deutlich: während transient T58-TCR-transgene J76-IVB10-Zellen nach Kokultur mit Tyrosinase-Peptid-beladenen T2-Zellen IL-2 sezernieren konnten, zeigte die stabile Transduktante J76-CD8-T58 keine spezifisch induzierbare IL-2-Sekretion. Selbst nach dem starken Stimulus von PMA/Ionomycin produzierten die J76-CD8-T58-Transduktanten nur geringe Mengen an IL-2.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass der TIL26-TCR und der T58-TCR sehr gut in J76-IVB10 getestet werden konnten. Der TyrF8-TCR dagegen wies nach spezifischer Stimulation keine Signalweiterleitung auf.

5.3.3 KOSTIMULATION DURCH CD8

Nun stellte sich die Frage, warum die Spezifität des TyrF8-TCR in J76-IVB10-Zellen nicht nachgewiesen werden konnte. Es wurde spekuliert, dass dies möglicherweise auf die fehlende CD8-Expression in den J76-IVB10-Zellen zurückzuführen war. Eine zusätzliche Transfektion der TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen mit CD8-*ivt*RNS könnte dieses Problem möglicherweise lösen, da ein kostimulatorisches Signal über CD8 eventuell eine Verstärkung des TCR-Signals zur Folge hätte.

Wie schon von verschiedenen Gruppen gezeigt werden konnte, benötigen hoch-affine TCR keinen CD8-Korezeptor um ihr spezifisches Antigen in ausreichendem Maße zu binden. Die hoch-affinen Interaktionen zwischen MHC/Peptid-Molekülen und TCR induzieren ein starkes TCR-Signal, wodurch T-Zellen auch ohne Beteiligung von CD8 aktiviert werden können (Kerry et al., 2003; Roszkowski et al., 2003). Eine CD8-unabhängige Aktivierung konnte für den TIL26-TCR und den T58-TCR gezeigt werden, woraus man folgern könnte, dass diese TCR hoch-affin für ihr jeweiliges Antigen sind. In der Tat wurde der T58-TCR als hoch-affiner TCR identifiziert (Wilde et al., 2009).

TCR, die nur eine niedrige Affinität für ihr Antigen aufweisen, benötigen eine zusätzliche Kostimulation durch CD8 um eine Aktivierung der T-Zellen zu induzieren (Kerry et al., 2003). Man könnte daher vermuten, dass der TyrF8-TCR, dessen Stimulation durch Tyrosinase-Peptid-präsentierende Zellen in CD8-negativen J76-IVB10-Zellen keine Signalweiterleitung zur Folge hatte, nur niedrig-affin für das Tyrosinase-Peptid ist und für eine ausreichende Aktivierung von T-Zellen die Kostimulation durch CD8 benötigt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde das CD8 α -Molekül mittels Elektroporation von *ivt*RNS in J76-IVB10 exprimiert. Da nur CD8 α -*ivt*RNS transfiziert wurde, konnten sich in den J76-IVB10-Zellen nur CD8 α / α -Homodimere bilden. *In vivo* wird CD8 jedoch nicht nur als CD8 α / α -Homodimer auf

T-Zellen exprimiert, sondern auch als CD8 α / β -Heterodimer (Terry et al., 1990). Die CD8-Moleküle konnten schon sehr kurze Zeit nach Transfektion auf den Jurkat-Zellen nachgewiesen werden und ihre Expression blieb über einen längeren Zeitraum hinweg stabil. Nach Kotransfektion von TCR-*ivt*RNS und CD8 α -*ivt*RNS waren CD8⁺/TCR⁺-J76-IVB10-Zellen schon 2 h nach Elektroporation zu detektieren. Die TCR-Expression verschwand nach spätestens 20 h wieder, wohingegen CD8 über einen längeren Zeitraum auf der Oberfläche nachzuweisen war. Weder die CD8- noch die TCR-Expression wurden durch die Kotransfektion der zwei *ivt*RNS-Spezies inhibiert. Somit konnte man J76-IVB10-Zellen gleichzeitig mit CD8 α - und TCR-*ivt*RNS transfizieren um die Spezifität von TCR zu testen.

In den folgenden Versuchen sollten verschiedene Fragen geklärt werden: Inwiefern unterscheidet sich die CD25-Expression bzw. IL-2-Sekretion eines TCR nach Stimulation in CD8-negativen und CD8-positiven J76-IVB10-Zellen? Ist es möglich in diesem Jurkat-System neben Aussagen über die Spezifität auch Aussagen über die Affinität von TCR zu treffen? Die Affinität von TCR könnte beispielsweise anhand der IL-2-Sekretion nach Stimulation mit unterschiedlichen Peptidkonzentrationen bestimmt werden. Hoch-affine TCR erkennen schon niedrige Konzentrationen an Peptid, wohingegen niedrig-affine TCR deutlich höhere Konzentrationen an Peptid benötigen, um eine TCR-Signalkaskade auszulösen.

Für den hoch-affinen TIL26-TCR konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Stimulation der J76-IVB10-Zellen durch CD8 α / α keine erhöhte IL-2-Sekretion zur Folge hatte wenn TIL26-TCR mit YQY-Peptid stimuliert wurde. Auch nach Stimulation der TIL26-TCR-transgenen J76-IVB10-Zellen mit geringeren Peptidkonzentrationen zeigte sich keine CD8-Abhängigkeit des TIL26-TCR. TIL26-TCR ist vermutlich hoch-affin für das YQY-Peptid, so dass eine zusätzliche Stabilisierung der Bindung durch CD8 keinen verstärkenden Effekt auf die IL-2-Sekretion zeigt.

Im Gegensatz dazu zeigten T58-TCR-transgene J76-IVB10-Zellen eine CD8-abhängige Aktivierung, die sich in einer verstärkten IL-2-Sekretion nach Stimulation der CD8⁺/T58-TCR⁺-J76-IVB10-Zellen äußerte. Auch die CD25-Expression war in CD8-positiven J76-IVB10 am höchsten. Man könnte nun also die Hypothese aufstellen, dass der T58-TCR zwar hoch-affin ist, da seine Stimulation mit spezifischem Peptid auch ohne die Kostimulation von CD8 zu einer Hochregulation von CD25 bzw. zu einer IL-2-Sekretion führte, aber dass für diesen TCR eine Optimierung der Signalweiterleitung in CD8 positiven Zellen dennoch möglich war. Möglicherweise gibt es hoch-affine TCR, wie den TIL26-TCR, deren Signalweiterleitung durch CD8 nicht verbessert werden kann und weniger hoch-affine TCR, wie den T58-TCR, deren Signalweiterleitung durch CD8 optimiert wird.

5.3.4 ANALYSE DER SPEZIFITÄT DES V α 19/V β 5.2-TCR

Nach der Analyse verschiedener TCR bekannter Spezifität, sollte nun die Spezifität der möglicherweise WT1-spezifischen TCR-Ketten V α 19, V β 5.2 und V β 13.2, die in 4.1 in einem „semi-allogenen“ Stimulationsansatz generiert wurden, in den hier etablierten J76-IVB10-Zellen nachgewiesen werden. Zunächst musste bestimmt werden, welche TCR α - und TCR β -Kombinationen paaren und zusammen mit CD3 als TCR:CD3-Komplex auf der Oberfläche der Jurkat-Zellen exprimiert werden konnten. Dazu wurden J76-IVB10-Zellen mit V α 19-*ivt*RNS und V β 5.2-*ivt*RNS bzw. mit V α 19-*ivt*RNS und V β 13.2-*ivt*RNS transfiziert. Da nur nach Transfektion von V α 19- und V β 5.2-*ivt*RNS eine deutliche CD3-Expression zu detektieren war, konnte man davon ausgehen, dass die V α 19-Kette und die V β 5.2-Kette zusammen einen funktionalen TCR bilden, der möglicherweise WT1-Peptid-exprimierende Zielzellen erkennen könnte. Um dies zu untersuchen, wurde V α 19/V β 5.2-*ivt*RNS in CD8-positive J76-IVB10-Zellen elektroporiert und diese Zellen mit WT1-Peptid-beladenen T2-Zellen kokultiviert. Leider konnte nach der Kokultur keine erhöhte IL-2-Sekretion im Vergleich zu den Kontrollen detektiert werden. Dies war auch für CD8-positive, TyrF8-TCR-transgene J76-IVB10-Zellen zu beobachten. Wie schon vorher gezeigt wurde, konnte eine Stimulation des TyrF8-TCR ohne eine Kostimulation über CD8 keine IL-2-Sekretion auslösen, was die Vermutung unterstützte hatte, dass dieser TCR möglicherweise niedrig-affin für sein Antigen ist und eine zusätzliche Bindung von CD8-Molekülen für seine Funktionalität benötigt. Wie nun gezeigt werden konnte, konnte die IL-2-Sekretion nach Stimulation des TyrF8-TCR jedoch auch nach Kostimulation durch CD8 nicht induziert werden.

Eine mögliche Erklärung für die Unfähigkeit der T-Zellen, nach Aktivierung IL-2 zu sezernieren, könnte die Tatsache sein, dass nur CD8 α / α -Homodimere exprimiert wurden. *In vivo* können T-Zellen neben CD8 α / α -Homodimeren aber auch CD8 α / β -Heterodimere exprimieren. Es wurde schon beschrieben, dass verschiedene CD8-abhängige TCR die Expression der CD8 β -Kette benötigen um eine Erkennung von spezifischen Zielzellen zu gewährleisten und eine Zytokinsekretion der T-Zellen auszulösen. Entgegen der Vermutung, dass dies im Besonderen für niedrig-affine TCR gelten würde, konnte eine Inhibierung der IFN γ -Sekretion in CD8 β -negativen Zellen für einen hoch-affinen TCR gezeigt werden, wohingegen niedrig-affine TCR in CD8 β -negativen Zellen nur eine reduzierte Fähigkeit in der Erkennung von niedrigen Mengen Peptid zeigten (McNicol et al., 2007). Die verbesserte Stimulation durch CD8 α / β -Heterodimere im Gegensatz zu CD8 α / α -Homodimeren ist vermutlich nicht auf eine stärkere Adhäsion von T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen durch die Bindung von CD8 α / β zurückzuführen, da beide CD8-Formen eine ähnliche Affinität für MHC-I-Moleküle zeigen (Sun und Kavathas, 1997). Es wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt, die eine unterschiedliche Kostimulation von T-Zellen durch CD8 α / α -Homodimere und CD8 α / β -Heterodimere erklären könnten. Es wurde beispielsweise beschrieben, dass die

Bildung eines CD8 α / β -Heterodimers eng mit der Rekrutierung von Lipidflößen (engl.: lipid rafts) verbunden ist, die bei CD8 α / α -Homodimeren nicht stattfindet (Pang et al., 2007). Es wird vermutet, dass Lipidflöße in der Plasmamembran Schlüssel-Stellen für die TCR-Signalweiterleitung darstellen. Eine Palmitoilierungsstelle im zytoplasmatischen Bereich der CD8 β -Kette soll das CD8 α / β -Molekül und den assoziierten TCR zu Lipidflößen lenken (Arcaro et al., 2001).

Es könnte also der Fall sein, dass der TyrF8-TCR nach Bindung an einen MHC/Peptid-Molekül nur in Kombination mit einem CD8 α / β -Heterodimer zu einer ausreichenden Signalweiterleitung in der Lage ist.

Für den V α 19/V β 5.2-TCR mit noch nicht geklärter Spezifität gibt es nun zwei Möglichkeiten: der TCR könnte entweder unspezifisch sein, oder spezifisch für WT1 und in seiner Signalweiterleitung von einem CD8 α / β -Heterodimer abhängig. Um diese Frage zu klären, müsste man die J76-IVB10-Zellen neben der CD8 α -*ivf*RNS auch mit CD8 β -*ivf*RNS transfizieren und den V α 19/V β 5.2-TCR in diesen CD8 α / β ⁺-Jurkat-Zellen mit WT1-positiven Zielzellen stimulieren. Außerdem könnte man die Expression des TCR durch eine Kodon-Optimierung und eine Murinisierung der TCR-Sequenz verbessern. Bei einer Kodon-Optimierung werden Nukleotide in der TCR-Sequenz durch häufiger vorkommende Nukleotide ersetzt, ohne jedoch die kodierte Aminosäuresequenz zu verändern. Dies führt zu einer verbesserten Genexpression. Außerdem wird beschrieben, dass der Austausch der humanen konstanten Region durch murine Sequenzen in einer effizienteren Expression der Hybrid-TCR resultiert, ohne die TCR-Spezifität zu verändern. Vermutlich ist dies auf die verbesserte Interaktion der human/murinen Hybrid-TCR mit CD3 Molekülen zurückzuführen (Cohen et al., 2006; Scholten et al., 2006).

Hier könnte man nun spekulieren, dass der TyrF8-TCR, dessen Spezifität für das YMD-Tyrosinase-Peptid bekannt ist und der trotzdem in J76-IVB10 nach Stimulation mit dem spezifischen YMD-Peptid keine CD25-Hochregulation bzw. IL-2-Sekretion zeigte, und der V α 19/V β 5.2-TCR möglicherweise ähnliche kostimulatorische Ereignisse benötigen um eine ausreichende Signalweiterleitung nach Stimulation zu ermöglichen (Tab. 5.1). Eindeutigere Aussagen über die Spezifität des V α 19/V β 5.2-TCR könnten nur dann gemacht werden, wenn das Nachweissystem in J76-IVB10-Zellen insofern optimiert wäre, dass sämtliche TCR-Typen, wie z.B. CD8-abhängige TCR oder sehr niedrig-affine TCR nach Stimulation mit spezifischem Peptid eine messbare Aktivierung zeigen würden.

Wie gezeigt werden konnte, eignete sich das J76-IVB10-TCR-Nachweissystem sehr gut für CD8-unabhängige TCR. Eine Stimulation dieser TCR resultierte in einer IL-2-Sekretion und einer Hochregulation der J76-IVB10-Zellen (Tab. 5.1). Außerdem konnte durch die Erkennung verschiedener Peptidkonzentrationen auch eine Aussage über die Affinität der TCR getroffen werden. Für eine Anwendung des Systems bei CD8-abhängigen TCR, müsste

das System jedoch noch weiter optimiert werden. Aus zeitlichen Gründen war in dieser Arbeit die Durchführung weiterer Analysen nicht mehr möglich.

TCR	<i>transiente</i> TCR-Expression in J76-IVB10				<i>stabile</i> TCR-Expression in J76			
	IL-2	CD25	IL-2	CD25	IL-2	CD25	IL-2	CD25
TIL26-TCR	+++	++	+++	++*	-	-*	n.u.	n.u.
TyrF8-TCR	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
T58-TCR	+	++	++	+++	n.u.	n.u.	-	+++
V α 19/V β 5.2-TCR	-	-*	-	-*	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.

Tab. 5.1: Zusammenfassung der IL-2-Sekretion bzw. CD25-Expression von TCR-transgenen J76-IVB10 nach Stimulation mit spezifischem Peptid (+++ sehr stark detektierbar; ++ stark detektierbar; + deutlich detektierbar; - nicht detektierbar; * Test durchgeführt aber nicht gezeigt; n.u. = nicht untersucht).

5.3.5 MÖGLICHES PROBLEM DES JURKAT-SYSTEMS UND AUSBLICK

Ein mögliches Problem bei der Verwendung von Jurkat-Zellen ist ihre genetische Instabilität. Jurkat-Zellen sind Zellen eines humanen T-Zell-Lymphoms und zeichnen sich, wie andere Tumorzellen auch, durch häufige Mutationsereignisse aus. In einer Studie wurde beschrieben, dass ein Tumor durchschnittlich mehr als 1×10^4 Mutationen enthält (Stoler et al., 1999). Durch häufige Mutationen bilden sich Tumorzellsubklone, die es dem Tumor durch ihre veränderten Eigenschaften erlauben, dem Immunsystem zu entkommen und weiter zu wachsen („Tumorflucht“).

In unserem Labor vorhandene J76-Transduktanten unterschieden sich deutlich in Eigenschaften wie Expression von Oberflächenmolekülen oder IL-2-Sekretion nach Stimulation, obwohl sie alle aus der ursprünglichen TCR α/β -defizienten J76-Zelllinie generiert wurden. Es könnte möglich sein, dass sich die Eigenschaften der Jurkat-Zellen durch das Einbringen eines TCR verändert hatten. Die unterschiedlichen Eigenschaften könnten auch darauf zurückzuführen sein, dass bei den TCR-transgenen J76-Klonen eine zufällige Zelle aus der Gesamtpopulation auskloniert wurde, die möglicherweise nicht alle Fähigkeiten zeigte.

Möglicherweise veränderten sich die Jurkat-Zellen aber auch im Laufe der Kultivierungszeit aufgrund verschiedener Mutationsereignisse. Es konnte beobachtet werden, dass sich der J76-IVB10-Zellklon in seiner Fähigkeit zur IL-2-Sekretion nach unspezifischer Stimulation mit der Zeit veränderte. So sezernierten J76-IVB10 zunächst 4000 pg/ml IL-2 nach

unspezifischer Stimulation mit PMA und Ionomycin, nach mehreren Wochen Kultivierung waren es nur noch 400 pg/ml, also 10 % des vorherigen Wertes. Diese deutlich geringere Fähigkeit zur IL-2-Sekretion könnte möglicherweise dazu führen, dass die Spezifität von nur niedrig-aviden TCR nicht mehr nachzuweisen wäre, da eine Stimulation des TCR nicht mehr zu einer IL-2-Sekretion der J76-IVB10-Zellen führen würde.

Aufgrund dieser Veränderungen wäre es sinnvoll eine Zellbank mit IL-2-sezernierenden J76-IVB10-Zellen anzulegen und die Zellen nur über einen kurzen Zeitraum in Kultur zu halten. Doch selbst dann wären Mutationsereignisse bei den schnell proliferierenden Lymphomzellen möglicherweise nicht zu vermeiden.

Eine Alternative zu Jurkat-Zellen könnten eventuell TCR α/β -defiziente T-Zellen sein, die keine Tumorzellen sind und daher stabilere Eigenschaften aufweisen. Die Erfahrungen, die hier für *ivtRNS*-transfizierte Jurkat-Zellen gewonnen wurden, machten deutlich, welche Eigenschaften T-Zellen aufweisen müssten, um für ein TCR-Testsystem nützlich zu sein. Da für die beschriebenen Tests hohe Zellzahlen nötig waren, müssten die T-Zellen sehr gut proliferieren. Sie sollten außerdem keinen endogenen TCR besitzen, d.h. sie sollten TCR α/β -defizient sein, um zu verhindern, dass sich nach Transfer eines transgenen TCR Misch-TCR mit unbekannter Spezifität bilden könnten. Um eine Signalweiterleitung nach Stimulation eines transgenen TCR zu verstärken, sollten die Zellen CD8 α/β -positiv sein und über das kostimulatorische Molekül CD28 verfügen. Da sich die transgene TCR-Expression nach Elektroporation von *ivtRNS* für eine Analyse der TCR-Spezifität als geeignet erwiesen hatte, sollten die T-Zellen für ein TCR-Testsystem leicht und effektiv zu elektroporieren sein. Zuletzt sollten die T-Zellen dazu fähig sein, auf eine spezifische Stimulation über einen transgenen TCR eine Zytokinsekretion oder eine zytotoxischen Aktivität zu induzieren.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Aarnoudse CA, Kruse M, Konopitzky R, Brouwenstijn N, Schrier PI. TCR reconstitution in Jurkat reporter cells facilitates the identification of novel tumor antigens by cDNA expression cloning. *Int J Cancer*. 2002;99:7-13.

Albert ML, Pearce SF, Francisco LM et al. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha5beta1 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*. 1998;188:1359-1368.

Arcaro A, Gregoire C, Bakker TR et al. CD8beta endows CD8 with efficient coreceptor function by coupling T cell receptor/CD3 to raft-associated CD8/p56(lck) complexes. *J Exp Med*. 2001;194:1485-1495.

Azuma M, Ito D, Yagita H et al. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature*. 1993;366:76-79.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392:245-252.

Barton K, Muthusamy N, Chanyangam M, Fischer C, Clendenin C, Leiden JM. Defective thymocyte proliferation and IL-2 production in transgenic mice expressing a dominant-negative form of CREB. *Nature*. 1996;379:81-85.

Baxter AG, Hodgkin PD. Activation rules: the two-signal theories of immune activation. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:439-446.

Bellantuono I, Gao L, Parry S et al. Two distinct HLA-A0201-presented epitopes of the Wilms tumor antigen 1 can function as targets for leukemia-reactive CTL. *Blood*. 2002;100:3835-3837.

Bergmann L, Miething C, Maurer U et al. High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood*. 1997;90:1217-1225.

Bickmore WA, Oghene K, Little MH, Seawright A, van Heyningen V, Hastie ND. Modulation of DNA binding specificity by alternative splicing of the Wilms tumor wt1 gene transcript. *Science*. 1992;257:235-237.

Birkeland SA, Storm HH, Lamm LU et al. Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986. *Int J Cancer*. 1995;60:183-189.

Bretscher P, Cohn M. A theory of self-nonsel self discrimination. *Science*. 1970;169:1042-1049.

Britten CM, Meyer RG, Kreer T, Drexler I, Wolfel T, Herr W. The use of HLA-A*0201-transfected K562 as standard antigen-presenting cells for CD8(+) T lymphocytes in IFN-gamma ELISPOT assays. *J Immunol Methods*. 2002;259:95-110.

Bruening W, Moffett P, Chia S, Heinrich G, Pelletier J. Identification of nuclear localization signals within the zinc fingers of the WT1 tumor suppressor gene product. *FEBS Lett.* 1996;393:41-47.

Bruening W, Pelletier J. A non-AUG translational initiation event generates novel WT1 isoforms. *J Biol Chem.* 1996;271:8646-8654.

Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.* 1970;13:1-27.

Busch DH, Pilip IM, Vijn S, Pamer EG. Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity.* 1998;8:353-362.

Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature.* 1997;388:782-787.

Cella M, Salio M, Sakakibara Y, Langen H, Julkunen I, Lanzavecchia A. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med.* 1999;189:821-829.

Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell.* 1992;71:649-662.

Clay TM, Custer MC, Sachs J, Hwu P, Rosenberg SA, Nishimura MI. Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity. *J Immunol.* 1999;163:507-513.

Cohen CJ, Zhao Y, Zheng Z, Rosenberg SA, Morgan RA. Enhanced antitumor activity of murine-human hybrid T-cell receptor (TCR) in human lymphocytes is associated with improved pairing and TCR/CD3 stability. *Cancer Res.* 2006;66:8878-8886.

Cole DJ, Weil DP, Shilyansky J et al. Characterization of the functional specificity of a cloned T-cell receptor heterodimer recognizing the MART-1 melanoma antigen. *Cancer Res.* 1995;55:748-752.

Colella TA, Bullock TN, Russell LB et al. Self-tolerance to the murine homologue of a tyrosinase-derived melanoma antigen: implications for tumor immunotherapy. *J Exp Med.* 2000;191:1221-1232.

Cunningham AJ, Lafferty KJ. A simple, conservative explanation of the H-2 restriction of interactions between lymphocytes. *Scand J Immunol.* 1977;6:1-6.

Dauer M, Obermaier B, Herten J et al. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J Immunol.* 2003;170:4069-4076.

Dembic Z, Haas W, Zamoyska R, Parnes J, Steinmetz M, von Boehmer H. Transfection of the CD8 gene enhances T-cell recognition. *Nature.* 1987;326:510-511.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002;3:991-998.

Elliott TJ, Eisen HN. Cytotoxic T lymphocytes recognize a reconstituted class I histocompatibility antigen (HLA-A2) as an allogeneic target molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:5213-5217.

Engels B, Noessner E, Frankenberger B, Blankenstein T, Schendel DJ, Uckert W. Redirecting human T lymphocytes toward renal cell carcinoma specificity by retroviral transfer of T cell receptor genes. *Hum Gene Ther*. 2005;16:799-810.

Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*. 1991;351:290-296.

Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA et al. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science*. 1993;262:909-911.

Gao L, Bellantuono I, Elsasser A et al. Selective elimination of leukemic CD34(+) progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT1. *Blood*. 2000;95:2198-2203.

Gao L, Yang TH, Tourdot S, Sadovnikova E, Hasserjian R, Stauss HJ. Allo-major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocytes engraft in bone marrow transplant recipients without causing graft-versus-host disease. *Blood*. 1999;94:2999-3006.

Garcia KC, Adams EJ. How the T cell receptor sees antigen--a structural view. *Cell*. 2005;122:333-336.

Garcia KC, Scott CA, Brunmark A et al. CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes. *Nature*. 1996;384:577-581.

Gessler M, Konig A, Arden K et al. Infrequent mutation of the WT1 gene in 77 Wilms' Tumors. *Hum Mutat*. 1994;3:212-222.

Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GA. Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature*. 1990;343:774-778.

Gilboa E. DC-based cancer vaccines. *J Clin Invest*. 2007;117:1195-1203.

Gillmore R, Xue SA, Holler A et al. Detection of Wilms' tumor antigen--specific CTL in tumor-draining lymph nodes of patients with early breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12:34-42.

Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG et al. B-cell surface antigen B7 provides a costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:6575-6579.

Guinan EC, Gribben JG, Boussiotis VA, Freeman GJ, Nadler LM. Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity. *Blood*. 1994;84:3261-3282.

Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:258-263.

Hastie ND. The genetics of Wilms' tumor--a case of disrupted development. *Annu Rev Genet.* 1994;28:523-558.

Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med.* 1994;180:631-640.

Heemskerk MH, Hoogeboom M, de Paus RA et al. Redirection of antileukemic reactivity of peripheral T lymphocytes using gene transfer of minor histocompatibility antigen HA-2-specific T-cell receptor complexes expressing a conserved alpha joining region. *Blood.* 2003;102:3530-3540.

Ho WY, Nguyen HN, Wolfl M, Kuball J, Greenberg PD. In vitro methods for generating CD8+ T-cell clones for immunotherapy from the naive repertoire. *J Immunol Methods.* 2006;310:40-52.

Hosen N, Sonoda Y, Oji Y et al. Very low frequencies of human normal CD34+ haematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumour gene WT1 at levels similar to those in leukaemia cells. *Br J Haematol.* 2002;116:409-420.

Huang A, Campbell CE, Bonetta L et al. Tissue, developmental, and tumor-specific expression of divergent transcripts in Wilms tumor. *Science.* 1990;250:991-994.

Ito K, Oji Y, Tatsumi N et al. Antiapoptotic function of 17AA(+)WT1 (Wilms' tumor gene) isoforms on the intrinsic apoptosis pathway. *Oncogene.* 2006;25:4217-4229.

Jain J, Loh C, Rao A. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol.* 1995;7:333-342.

Jain J, McCaffrey PG, Miner Z et al. The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature.* 1993;365:352-355.

Janeway CA, Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today.* 1992;13:11-16.

Javorovic M, Pohla H, Frankenberger B, Wolfel T, Schendel DJ. RNA transfer by electroporation into mature dendritic cells leading to reactivation of effector-memory cytotoxic T lymphocytes: a quantitative analysis. *Mol Ther.* 2005;12:734-743.

Jenkins MK, Schwartz RH. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med.* 1987;165:302-319.

Johnson LA, Heemskerk B, Powell DJ, Jr. et al. 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.* 2006;177:6548-6559.

Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood.* 2009;114:535-546.

Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Cytokines and their effects on maturation, differentiation and migration of dendritic cells. *Arch Dermatol Res.* 1996;289:1-8.

June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today.* 1994;15:321-331.

Kane LP, Weiss A. The PI-3 kinase/Akt pathway and T cell activation: pleiotropic pathways downstream of PIP3. *Immunol Rev.* 2003;192:7-20.

Kawakami Y, Eliyahu S, Sakaguchi K et al. 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.* 1994;180:347-352.

Kennedy D, Ramsdale T, Mattick J, Little M. An RNA recognition motif in Wilms' tumour protein (WT1) revealed by structural modelling. *Nat Genet.* 1996;12:329-331.

Kerry SE, Buslepp J, Cramer LA et al. Interplay between TCR affinity and necessity of coreceptor ligation: high-affinity peptide-MHC/TCR interaction overcomes lack of CD8 engagement. *J Immunol.* 2003;171:4493-4503.

Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol.* 2002;3:999-1005.

Kisselev AF, Akopian TN, Woo KM, Goldberg AL. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem.* 1999;274:3363-3371.

Klein J. *Natural History of the Major Histocompatibility complex.* New York: Wiley; 1986.

Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM et al. WT-1 is required for early kidney development. *Cell.* 1993;74:679-691.

Lafferty KJ, Cunningham AJ. A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 1975;53:27-42.

Lafferty KJ, Misko IS, Cooley MA. Allogeneic stimulation modulates the in vitro response of T cells to transplantation antigen. *Nature.* 1974;249:275-276.

Landi A, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S. High transfection efficiency, gene expression, and viability of monocyte-derived human dendritic cells after nonviral gene transfer. *J Leukoc Biol.* 2007;82:849-860.

Letourneau S, Krieg C, Pantaleo G, Boyman O. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123:758-762.

Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Damle NK, Ledbetter JA. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med.* 1991;173:721-730.

Liu Y, Linsley PS. Costimulation of T-cell growth. *Curr Opin Immunol.* 1992;4:265-270.

Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood.* 1975;45:321-334.

Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH, Jonuleit H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol.* 2002;80:477-483.

Mailander V, Scheibenbogen C, Thiel E, Letsch A, Blau IW, Keilholz U. Complete remission in a patient with recurrent acute myeloid leukemia induced by vaccination with WT1 peptide in the absence of hematological or renal toxicity. *Leukemia.* 2004;18:165-166.

Malek TR. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:453-479.

Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:991-1045.

Maurer U, Weidmann E, Karakas T, Hoelzer D, Bergmann L. Wilms tumor gene (wt1) mRNA is equally expressed in blast cells from acute myeloid leukemia and normal CD34+ progenitors. *Blood.* 1997;90:4230-4232.

McNicol AM, Bendle G, Holler A et al. CD8alpha/alpha homodimers fail to function as co-receptor for a CD8-dependent TCR. *Eur J Immunol.* 2007;37:1634-1641.

Mehrotra R, Marsh D, Peters V, Nissenson AR. Emphasizing patient choice: the modality selection project in ESRD Network 18. *Nephrol News Issues.* 2003;17:30-36.

Menssen HD, Renkl HJ, Rodeck U et al. Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia.* 1995;9:1060-1067.

Mocellin S, Mandruzzato S, Bronte V, Lise M, Nitti D. Part I: Vaccines for solid tumours. *Lancet Oncol.* 2004;5:681-689.

Momburg F, Roelse J, Hammerling GJ, Neefjes JJ. Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. *J Exp Med.* 1994;179:1613-1623.

Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science.* 2006;314:126-129.

Mundlos S, Pelletier J, Darveau A, Bachmann M, Winterpacht A, Zabel B. Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development.* 1993;119:1329-1341.

Niksic M, Slight J, Sanford JR, Caceres JF, Hastie ND. The Wilms' tumour protein (WT1) shuttles between nucleus and cytoplasm and is present in functional polysomes. *Hum Mol Genet.* 2004;13:463-471.

Norment AM, Littman DR. A second subunit of CD8 is expressed in human T cells. *EMBO J.* 1988;7:3433-3439.

- O'Shea JJ, Johnston JA, Kehrl J, Koretzky G, Samelson LE. Key molecules involved in receptor-mediated lymphocyte activation. *Curr Protoc Immunol.* 2001;Chapter 11:Unit 11 19A.
- Obermaier B, Dauer M, Hertel J, Schad K, Endres S, Eigler A. Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes. *Biol Proced Online.* 2003;5:197-203.
- Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T et al. Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:13885-13890.
- Palucka K, Ueno H, Fay J, Banchereau J. Harnessing dendritic cells to generate cancer vaccines. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1174:88-98.
- Pang DJ, Hayday AC, Bijlmakers MJ. CD8 Raft localization is induced by its assembly into CD8alpha beta heterodimers, Not CD8alpha alpha homodimers. *J Biol Chem.* 2007;282:13884-13894.
- Penn I. Posttransplant malignancies. *Transplant Proc.* 1999;31:1260-1262.
- Rammensee HG, Falk K, Rotzschke O. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:213-244.
- Ranheim EA, Kipps TJ. Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *J Exp Med.* 1993;177:925-935.
- Rettig L, McNeill L, Sarner N et al. An essential role for the stalk region of CD8 beta in the coreceptor function of CD8. *J Immunol.* 2009;182:121-129.
- Rosenfeld C, Cheever MA, Gaiger A. WT1 in acute leukemia, chronic myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome: therapeutic potential of WT1 targeted therapies. *Leukemia.* 2003;17:1301-1312.
- Roszkowski JJ, Yu DC, Rubinstein MP, McKee MD, Cole DJ, Nishimura MI. CD8-independent tumor cell recognition is a property of the T cell receptor and not the T cell. *J Immunol.* 2003;170:2582-2589.
- Rotzschke O, Falk K, Faath S, Rammensee HG. On the nature of peptides involved in T cell alloreactivity. *J Exp Med.* 1991;174:1059-1071.
- Rubio-Godoy V, Ayyoub M, Dutoit V et al. Combinatorial peptide library-based identification of peptide ligands for tumor-reactive cytolytic T lymphocytes of unknown specificity. *Eur J Immunol.* 2002;32:2292-2299.
- Sadovnikova E, Jopling LA, Soo KS, Stauss HJ. Generation of human tumor-reactive cytotoxic T cells against peptides presented by non-self HLA class I molecules. *Eur J Immunol.* 1998;28:193-200.

- Saeki H, Moore AM, Brown MJ, Hwang ST. Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol.* 1999;162:2472-2475.
- Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature.* 1986;324:163-166.
- Saito T, Weiss A, Gunter KC, Shevach EM, Germain RN. Cell surface T3 expression requires the presence of both alpha- and beta-chains of the T cell receptor. *J Immunol.* 1987;139:625-628.
- Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P et al. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol.* 1998;28:2760-2769.
- Salter RD, Cresswell P. Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid. *EMBO J.* 1986;5:943-949.
- Salter RD, Howell DN, Cresswell P. Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics.* 1985;21:235-246.
- Sanger F, Air GM, Barrell BG et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature.* 1977;265:687-695.
- Schaft N, Dorrie J, Thumann P et al. Generation of an optimized polyvalent monocyte-derived dendritic cell vaccine by transfecting defined RNAs after rather than before maturation. *J Immunol.* 2005;174:3087-3097.
- Scharnhorst V, Dekker P, van der Eb AJ, Jochemsen AG. Internal translation initiation generates novel WT1 protein isoforms with distinct biological properties. *J Biol Chem.* 1999;274:23456-23462.
- Scharnhorst V, van der Eb AJ, Jochemsen AG. WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene.* 2001;273:141-161.
- Schendel DJ, Gansbacher B, Oberneder R et al. Tumor-specific lysis of human renal cell carcinomas by tumor-infiltrating lymphocytes. I. HLA-A2-restricted recognition of autologous and allogeneic tumor lines. *J Immunol.* 1993;151:4209-4220.
- Scholten KB, Kramer D, Kueter EW et al. Kodon modification of T cell receptors allows enhanced functional expression in transgenic human T cells. *Clin Immunol.* 2006;119:135-145.
- Schuster IG, Busch DH, Eppinger E et al. Allorestricted T cells with specificity for the FMNL1-derived peptide PP2 have potent antitumor activity against hematologic and other malignancies. *Blood.* 2007;110:2931-2939.
- Sharma PM, Bowman M, Madden SL, Rauscher FJ, 3rd, Sukumar S. RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene, WT1. *Genes Dev.* 1994;8:720-731.

- Sherman LA, Chattopadhyay S. The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:385-402.
- Sommermeier D, Neudorfer J, Weinhold M et al. Designer T cells by T cell receptor replacement. *Eur J Immunol.* 2006;36:3052-3059.
- Stack RM, Lenschow DJ, Gray GS, Bluestone JA, Fitch FW. IL-4 treatment of small splenic B cells induces costimulatory molecules B7-1 and B7-2. *J Immunol.* 1994;152:5723-5733.
- Stauber DJ, Debler EW, Horton PA, Smith KA, Wilson IA. Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:2788-2793.
- Stein PH, Fraser JD, Weiss A. The cytoplasmic domain of CD28 is both necessary and sufficient for costimulation of interleukin-2 secretion and association with phosphatidylinositol 3'-kinase. *Mol Cell Biol.* 1994;14:3392-3402.
- Stoler DL, Chen N, Basik M et al. The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:15121-15126.
- Sun J, Kavathas PB. Comparison of the roles of CD8 alpha alpha and CD8 alpha beta in interaction with MHC class I. *J Immunol.* 1997;159:6077-6082.
- Terry LA, DiSanto JP, Small TN, Flomenberg N. Differential expression and regulation of the human CD8 alpha and CD8 beta chains. *Tissue Antigens.* 1990;35:82-91.
- Theobald M, Biggs J, Hernandez J, Lustgarten J, Labadie C, Sherman LA. Tolerance to p53 by A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med.* 1997;185:833-841.
- Torres-Nagel N, Kraus E, Brown MH et al. Differential thymus dependence of rat CD8 isoform expression. *Eur J Immunol.* 1992;22:2841-2848.
- Truneh A, Albert F, Golstein P, Schmitt-Verhulst AM. Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester. *Nature.* 1985;313:318-320.
- Ueda T, Oji Y, Naka N et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in human bone and soft-tissue sarcomas. *Cancer Sci.* 2003;94:271-276.
- Vajjhala PR, Macmillan E, Gonda T, Little M. The Wilms' tumour suppressor protein, WT1, undergoes CRM1-independent nucleocytoplasmic shuttling. *FEBS Lett.* 2003;554:143-148.
- van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science.* 1991;254:1643-1647.
- Veillette A, Bookman MA, Horak EM, Bolen JB. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell.* 1988;55:301-308.

Visseren MJ, van Elsas A, van der Voort EI et al. CTL specific for the tyrosinase autoantigen can be induced from healthy donor blood to lyse melanoma cells. *J Immunol.* 1995;154:3991-3998.

von Herrath MG, Dockter J, Oldstone MB. How virus induces a rapid or slow onset insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model. *Immunity.* 1994;1:231-242.

Wagner KD, Wagner N, Schedl A. The complex life of WT1. *J Cell Sci.* 2003;116:1653-1658.

Wang R, Natarajan K, Margulies DH. Structural basis of the CD8 alpha beta/MHC class I interaction: focused recognition orients CD8 beta to a T cell proximal position. *J Immunol.* 2009;183:2554-2564.

Wange RL, Samelson LE. Complex complexes: signaling at the TCR. *Immunity.* 1996;5:197-205.

Wehler TC, Nonn M, Brandt B et al. Targeting the activation-induced antigen CD137 can selectively deplete alloreactive T cells from antileukemic and antitumor donor T-cell lines. *Blood.* 2007;109:365-373.

Weiss A, Koretzky G, Schatzman RC, Kadlecsek T. Functional activation of the T-cell antigen receptor induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:5484-5488.

Weiss A, Stobo JD. Requirement for the coexpression of T3 and the T cell antigen receptor on a malignant human T cell line. *J Exp Med.* 1984;160:1284-1299.

Weiss A, Wiskocil RL, Stobo JD. The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *J Immunol.* 1984;133:123-128.

Wheeler CJ, von Hoegen P, Parnes JR. An immunological role for the CD8 beta-chain. *Nature.* 1992;357:247-249.

Wilde S, Sommermeyer D, Frankenberger B et al. Dendritic cells pulsed with RNA encoding allogeneic MHC and antigen induce T cells with superior antitumor activity and higher TCR functional avidity. *Blood.* 2009;114:2131-2139.

Wolfel T, Van Pel A, Brichard V et al. Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1994;24:759-764.

Wolf M, Kuball J, Ho WY et al. Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8+ T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities. *Blood.* 2007;110:201-210.

Xue SA, Gao L, Hart D et al. Elimination of human leukemia cells in NOD/SCID mice by WT1-TCR gene-transduced human T cells. *Blood.* 2005;106:3062-3067.

Yasui DH, Genetta T, Kadesch T et al. Transcriptional repression of the IL-2 gene in Th cells by ZEB. *J Immunol.* 1998;160:4433-4440.

Yokochi T, Holly RD, Clark EA. B lymphoblast antigen (BB-1) expressed on Epstein-Barr virus-activated B cell blasts, B lymphoblastoid cell lines, and Burkitt's lymphomas. *J Immunol.* 1982;128:823-827.

Zhao Y, Zheng Z, Cohen CJ et al. High-efficiency transfection of primary human and mouse T lymphocytes using RNA electroporation. *Mol Ther.* 2006;13:151-159.

Zinkernagel RM, Doherty PC. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature.* 1974;248:701-702.

Zobywalski A, Javorovic M, Frankenberger B et al. Generation of clinical grade dendritic cells with capacity to produce biologically active IL-12p70. *J Transl Med.* 2007;5:18.

7 ABKÜRZUNGEN

3d DC	DC, generiert nach dem 3-Tages-Protokoll (engl.: 3-day dendritic cell)
7d DC	DC, generiert nach dem 7-Tages-Protokoll (engl.: 7-day dendritic cell)
7-AAD	7-Aminoaktinomycin D
α	alpha
Abb	Abbildung
Ag	Antigen
AICD	Aktivierungsinduzierter Zelltod (engl.: activation induced cell death)
AMV	Vogel-Myeloblastose-Virus (engl.: avian myeloblastosis virus)
AP-1	engl.: activator protein 1
APC	Antigenpräsentierende Zelle (engl.: antigen presenting cell)
APC	Allophycocyanin
ATCC	engl.: american type culture collection
ATP	Adenosintrisphosphat
β	beta
bp	Basenpaar
BFA	Brefeldin-A
CCR	Chemokin-(CC-Motiv)-Rezeptor
CD	Differenzierungscluster (engl.: cluster of differentiation)
cDNS	Komplementäre DNS (engl.: complementary DNA)
CDR	engl.: complementarity determining region
CTL	Zytotoxischer T Lymphozyt (engl.: cytotoxic T lymphocyte)
Cy5	Cyanin 5
DC	Dendritische Zelle (engl.: dendritic cell)
DC-SIGN	engl.: DC-specific ICAM-grabbing nonintegrin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5-Trisphosphat
ds	doppelsträngig (engl.: double strand)
EBV	Ebstein-Barr-Virus
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	engl.: enhanced green fluorescent protein
ELISA	engl.: enzyme-linked immunoabsorbent assay
EP	Elektroporation
EtOH	Ethanol
F	Farad
Fab	Antigenbindendes Fragment
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer (engl.: fluorescence activated cell sorter)

FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
FKS	Fötale Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl.: forward scatter)
g	Erdbeschleunigung (engl.: earth's gravitational field)
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor
Gy	Gray
h	Stunde (engl.: hour)
H β_2 m	Humanes β_2 -Mikroglobulin
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HPLC	engl.: high performance liquid chromatography
HS	Humanserum
iDC	Unreife Dendritische Zelle (engl.: immature dendritic cell)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMI	Institut für Molekulare Immunologie
Iono	Ionomyzin
ITAM	engl.: immunoreceptor tyrosine-based activation motif
IU	Internationale Einheit (engl.: international Unit)
<i>ivt</i> RNS	<i>In vitro</i> transkribierte RNS
J76	Jurkat-76
Jak	engl.: Janus Kinase
kb	Kilobasen
Kd	Dissoziationskonstante
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
Lck	engl.: lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LPS	Lipopolysaccharid
μ	Mikro (10^{-6})
M	Molar
m	Milli (10^{-3})
MACS	Magnetischer Zellsortierer (magnetic activated cell sorter)
Melan-A/MART-1	engl.: Melanoma Antigen recognized by T-cells 1
mDC	reife Dendritische Zelle (engl.: mature dendritic cell)
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistocompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex)
MIIC	MHC-Klasse-II-reiches Kompartiment (engl.: MHC-class II rich compartment)
Min.	Minuten
mRNS	Boten-RNS (engl.: messenger RNA)
n	Nano (10^{-9})
n.d.	nicht detektierbar
NFAT	engl.: nuclear factor of activated T cells
NF κ B	engl.: nuclear factor κ B
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
OD	Optische Dichte
p	Pico (10^{-12})

PBMC	Periphere Zellen des mononukleären Blutes (engl.: peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
pDNS	Plasmid-DNS
PE	Phycoerythrin
Pen	Penizillin
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PKC	Protein-Kinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat
PI-3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PTK	Proteintyrosinkinase
R	Rezeptor
RCC	Nierenzellkarzinom (engl.: renal cell carcinoma)
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: rotations per minute)
RT	Raumtemperatur
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung
Sek.	Sekunden
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl.: sideward scatter)
Stat	engl.: signal transducer and activator of transcription
Strep	Streptomycin
TAA	Tumorassoziiertes Antigen
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
Tab	Tabelle
TAP	Transportprotein (engl.: transporter associated with antigen processing)
Taq	Thermus aquaticus
TCR	T-Zellrezeptor (engl.: T cell receptor)
TIL	Tumor-infiltrierender-T-Lymphozyt
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Einheit (engl.: Unit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
V-Kette	variable Kette
VLE	sehr wenig Endotoxin (engl.: very low endotoxin)
WT1	Wilm's Tumor 1 Antigen
ZAP-70	engl.: zeta-chain-associated protein kinase 70

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Die Arbeit wird erstmalig einer Prüfungskommission vorgelegt. Diese Dissertation wurde von Frau Prof. Dr. Dolores J. Schendel am Institut für Molekulare Immunologie des Helmholtz Zentrum München betreut und wird von Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß vor der biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München vertreten.

München, den 08.12.2009

(Maja C. Bürdek)

CURRICULUM VITAE

Name: Maja Christina Bürdek
Geboren am: 25.01.1981
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Adresse: Sommerstr. 11A, 81543 München, Deutschland
Adresse (e-mail): maja.buerdek@gmx.de

Schulische Ausbildung:

Grundschule (1987-1991): Grundschule am Mariahilfplatz, München, Deutschland
Gymnasium (1991-2000): Städt. Luisengymnasium, München
Neupracherlicher Zweig (Englisch/Latein/Französisch)
Leistungskurse: Englisch, Musik
Städt. Sing- und Musikschule,
München (1990-2006): Instrumentalunterricht: Klavier/Violoncello
Kammermusik/Orchester
1998-2000: Studienvorbereitende Ausbildung
Wettbewerbe/Kurse: Deutscher Orchesterwettbewerb (Karlsruhe, 2000)
Summit Music Festival (Marymount College, Tarrytown,
N.Y., 2001)
1. Platz Landeswettbewerb "Jugend musiziert",
Kategorie: Kunstlied (Gesang/Klavier) (2002)

Studium:

Grundstudium (2000-2003): Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München
Hauptstudium (2003-2005): Hauptfach: Anthropologie und Humangenetik
Nebenfächer: Zellbiologie, Immunologie und Genetik
Diplomarbeit (2005-2006): AG Prof. Judith Johnson, Institut für Immunologie, München
Thema: „Einfluss von MCAM auf die Expression von an der
Angiogenese beteiligten Genen“

Diplom (Juni 2006): Note: 1,2 („sehr gut“)

Promotion zum Dr. rer. nat.:

- 15.09.2006-15.12.2009: AG Prof. D. J. Schendel
Institut für Molekulare Immunologie
Helmholtz Zentrum München
Thema: „*Generierung WT1-spezifischer T-Zellen und Selektion spezifischer T-Zellrezeptoren mittels transgener Expression in Jurkat-T-Zellen*“
- 2008-2009: Besuch des Graduiertenkollegs des SFB/TR 36

Kenntnisse: Fremdsprachen: Deutsch, Englisch, Kroatisch, Französisch
Gute EDV-Kenntnisse

DANKSAGUNG

Zum Schluss möchte ich noch all denjenigen herzlich danken, die mich während der letzten drei Jahre bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt, beraten und, vor allem, immer wieder ermutigt haben.

Mein herzlicher Dank geht an Fr. Prof. Weiß für die Vertretung meiner Doktorarbeit an der Fakultät für Biologie der LMU München, ihre wertvollen Hinweise und ihre Hilfsbereitschaft.

Bei Fr. Prof. Schendel möchte ich mich herzlich dafür bedanken, dass ich meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen durfte. Vielen Dank für die vielen Ideen, die wissenschaftlichen Gespräche und die Betreuung dieser Arbeit. Und, nicht zuletzt, vielen Dank für die ermutigenden Worte und Lichtblicke, als es nicht so optimal lief.

Ein großer Dank an Dr. Susanne Wilde für die Unterstützung in allen T-Zell-Fragen und für die Hilfe bei der Durchführung der ersten Experimente.

Bei Dr. Christiane Geiger möchte ich mich für ihren Rat und die vielen fachlichen Gespräche zum Thema „DCs“ bedanken. Und, natürlich, für die unermüdlichen Korrekturen an dieser Arbeit.

Vielen Dank an Dr. Bernhard Frankenberger für die Beantwortung fachlicher Fragen, sein offenes Ohr bei verschiedenen Problemen und für die Korrekturen an dieser Arbeit.

An Dr. Slavoljub Milošević meinen großen Dank für die Unterstützung bei Klonierungen und molekularbiologischen Fragen. Vielen Dank an Dr. Judith Hosse für die Hilfe bei der Etablierung der intrazellulären IL-2-Färbung.

Ein großer Dank an Sabine Eichenlaub für die Generierung von DCs, an Adam Slusarski für das unermüdliche Klopfen von ELISA-Platten, an Sonja Kresse für Hilfe bei Maxis und Minis und an Barbara Mosetter für die Hilfe bei vielen praktischen Fragen. Außerdem möchte ich mich bei Dr. Silke Raffegerst, Stefani Spranger, Dr. Markus Schmid, Dr. Miran Javorović und Michaela Hohloch für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken.

Einen ganz herzlichen Dank an Dr. Iris Bigalke und Dr. Stefanie Tippmer vom GMP-Labor für das Bereitstellen so vieler Monozyten.

Einen herzlichen Dank an PD. Dr. Elfriede Nössner und Prof. Ralph Mocikat für ihr stets offenes Ohr für fachliche Fragen.

An Luise Weigand einen lieben Dank für die vielen fachlichen und nicht-fachlichen Gespräche, für die Lernabende und die netten Pausen.

Vielen Dank an Dr. Ingrid Schuster und Dr. Andreas Moosmann für die vielen guten Gespräche und Ratschläge und, nicht zuletzt, für die unzähligen schönen musikalischen Trio-Nachmittage.

Bei Sylvia Donhauser und Allen Nasaka möchte ich mich für ihre Hilfe bei sämtlichen administrativen Fragen bedanken.

Außerdem geht ein herzlicher Dank an alle noch nicht erwähnten Kollegen im IMI, die die letzten drei Jahre in diesem Institut zu etwas Besonderem gemacht haben. Unvergesslich bleiben die vielen gemeinsamen Unternehmungen, Konzerte, Filmabende, die vielen Mittags-Diskussionen, die Firmenläufe, die kulinarischen Höhenflüge im „Lunch-Club“, Stammtisch-Abende und so weiter. Vielen Dank euch allen für die schöne Zeit im Labor und in der Freizeit!

In Berlin möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Thomas Schüler für die Zweit-Betreuung meiner Doktorarbeit und die Kommentare zum Ergebnisteil bedanken. Für das Bereitstellen von Materialien und „know-how“ vielen Dank an Simone Reuss und Mathias Leisegang.

Natürlich haben auch viele Menschen außerhalb des Labors am Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen.

Ein herzlicher Dank allen meinen Freunden, Biologen wie Nicht-Biologen, die mir in den letzten drei Jahren eine wichtige Stütze gewesen sind.

Ein großer Dank geht an meinen Bruder Boris und Sabine, für ihr reges Interesse an meiner Doktorarbeit und die vielen Aufmunterungen.

Für sein stets offenes Ohr für meine Sorgen und das beständige „das wird schon alles gut...“ möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Freund Stephan bedanken. Und dafür, dass er dieses Manuskript als letzter noch einmal durchgegangen ist.

Und zuletzt, „last but not least“, der größte Dank an meine Eltern. Vielen Dank dafür, dass ihr mir die ganzen Jahre hindurch soviel ermöglicht und mich in meinen Plänen immer unterstützt habt. Ihr ward mir ein wichtiger Rückhalt und auch wenn ihr jetzt immer mehr Zeit in Kroatien verbringt, weiß ich, dass ihr für mich da seid. Danke für alles.