

Gezielte MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation für die Generierung und Isolierung Tumor/Testis-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten

Christian Ellinger

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

angefertigt am
Institut für Molekulare Immunologie
Helmholtz Zentrum München
unter der Betreuung von Prof. Dr. Dolores J. Schendel /
Prof. Dr. Elisabeth Weiß

München, 2013

Erstgutachter: Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß
Zweitgutachter: Herr PD Dr. Josef Mautner

Dissertation eingereicht am: 05. März 2013

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juli 2013

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der adoptive T-Zell-Transfer	1
1.2	Indizien für die Notwendigkeit von CD4 ⁺ T-Zellen	3
1.3	Klassische Antigen-Präsentationswege	5
1.4	CD4-T-Zell-Entwicklung	6
1.5	Mögliche Mechanismen der Anti-Tumor-Funktion spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen	10
1.6	MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation	12
1.7	Tumorantigene	15
1.8	Zielsetzung	16
2	Material	17
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterial	17
2.2	Enzyme, Zytokine und sonstige Reagenzien	19
2.3	Kommerzielle Analysesysteme	22
2.4	Kulturmedien	22
2.5	Puffer und Lösungen	23
2.6	Zelllinien und Bakterien	24
2.7	Plasmide, Primer und Oligonukleotide	25
2.8	Peptide und Proteine	30
2.9	Antikörper	30
2.10	Personen	31
3	Methoden	32
3.1	Zellbiologische Methoden	32
3.1.1	Generierung von LCL/mLCL-Zelllinien	32
3.1.2	Kultivierung von LCL/mLCL-Zelllinien	33
3.1.3	Kultivierung etablierter T-Zellklone	33
3.1.4	Anreicherung von PBMC aus Frischblut	34
3.1.5	Generierung Dendritischer Zellen (DZ)	34
3.1.6	<i>Ivt</i> -mRNS-Transfektion von DZ und LCL/mLCL	35
3.1.7	Koinkubation von DZ oder LCL/mLCL mit Proteinen	36
3.1.8	<i>De-novo</i> -Induktion naiver CD4 ⁺ T-Zellen	36
3.1.9	Kultivierung sortierter CD4 ⁺ T-Zellen	37
3.1.10	Koinkubation von T-Zellen und APZ	37
3.1.11	Kultivierung adhärenter HEK-293T-Zellen	38
3.1.12	Transfektion von HEK-293T-Zellen	38

3.2	Molekularbiologische Methoden	39
3.2.1	Bakterienstamm und -kultur	39
3.2.2	DNS-Amplifikation mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
3.2.3	Agarose-Gelelektrophorese von DNS	40
3.2.4	DNS-Extraktion aus Agarosegelen	40
3.2.5	Sequenzierung	40
3.2.6	DNS-Restriktionsverdau	40
3.2.7	Oligo-Hybridisierung	41
3.2.8	Ligation von DNS-Fragmenten	41
3.2.9	Generierung der Vektorkonstrukte	41
3.2.10	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> Bakterien	45
3.2.11	Transformation elektrokompenter Bakterien mit Plasmid-DNS	46
3.2.12	Selektion und Expansion der transformierten Bakterien	46
3.2.13	Plasmid-DNS-Extraktion aus transformierten Bakterien	47
3.2.14	Herstellung von Einzel-Spezies- <i>ivt</i> -mRNS	47
3.2.15	Agarose-Gelelektrophorese von <i>ivt</i> -mRNS-Produkten	48
3.2.16	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	48
3.2.17	Aufreinigung His-Tag-markierter Proteine aus HEK-293T-Zellen	49
3.2.18	HLA-Typisierung	49
3.3	Proteinbiochemische und analytische Methoden	50
3.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	50
3.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
3.3.3	Immunologischer Proteinnachweis	50
3.3.4	IFN- γ - und GM-CSF-ELISA	51
3.4	Durchflusszytometrie	52
3.4.1	Färbung von Oberflächenmolekülen	52
3.4.2	Markierung von T-Zellen mittels Zellfarbstoff	53
3.4.3	CD154-Färbung auf reaktivierten CD4 ⁺ T-Zellen	53
3.4.4	Sortierung CD154-positiver CD4 ⁺ T-Zellen	54
3.5	Analyse des TZR- α/β -Repertoires	55
3.5.1	Isolierung zellulärer Gesamt-RNS	55
3.5.2	Reverse Transkription von mRNS zu cDNS	55
3.5.3	TZR-PCR zur Analyse von TZR- α/β -Sequenzen	55
3.5.4	Analyse klonaler TZR- β -Sequenzen mithilfe degenerierter Primer	56
3.6	Direkte Epitop-Identifizierung (DEPI)	57
3.6.1	Erstellen der C/T-Antigen-Expressions-Bibliothek	57
3.6.2	DEPI Schritt 1 - Mischkolonien	59
3.6.3	DEPI Schritt 2 - Einzelkolonien	59

4	Ergebnisse.....	60
4.1	Etablierung der gezielten MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation	61
4.1.1	Generierung des Vektorsystems	62
4.1.2	Funktionelle Überprüfung des CrossTA _g -Vektor-Systems	63
4.1.3	Synergistischer Mechanismus der zweigeteilten CrossTA _g -Sequenz.....	66
4.1.4	Übertragbarkeit der gezielten MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation.....	69
4.1.5	Weitere Charakterisierung der MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation.....	71
4.2	Methode zur Sortierung lebender Antigen-spezifischer CD4 ⁺ T-Lymphozyten .	74
4.2.1	Etablierung der CD154-Oberflächen-Färbung.....	75
4.2.2	Unspezifische CD154-Expression auf PBL nach <i>De-novo</i> -Induktion.....	78
4.3	<i>De-novo</i> -Induktion Tumor-Antigen-spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen.....	79
4.3.1	Protokoll für die T-Zell- <i>De-novo</i> -Induktion.....	80
4.3.2	Durchflusszytometrische Analyse der Ausgangskultur	82
4.3.3	Klonierung CD154-positiver CD4 ⁺ T-Lymphozyten	84
4.3.4	Suche nach Tumor-Antigen-reaktiven CD4 ⁺ T-Zell-Klonen	87
4.4	Molekulare Charakterisierung TAA-spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen	90
4.4.1	Antigenspezifität isolierter CD4 ⁺ T-Zell-Klone	90
4.4.2	T-Zell-Rezeptor-Sequenzanalyse	92
4.4.3	Phänotypisierung einzelner CD4 ⁺ T-Zell-Klone	93
4.4.4	HLA-Restriktionsanalyse	95
4.4.5	Weiterführende Untersuchung der Antigenerkennung.....	99
4.5	Identifizierung erkannter CD4 ⁺ T-Zell-Epitope	102
4.5.1	Methode zur direkten Epitopidentifizierung.....	102
5	Diskussion	107
5.1	<i>Ivt</i> -mRNS für die gezielte MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation.....	107
5.2	CD154 für die Sortierung Antigen-spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen.....	112
5.3	<i>De-novo</i> -Induktion TAA-spezifischer CD4 ⁺ T-Lymphozyten	114
5.3.1	Antigenauswahl für die T-Zell- <i>De-novo</i> -Induktion.....	114
5.3.2	Aufbau des <i>In-vitro</i> -Kokulturansatzes	116
5.3.3	Ablauf der <i>De-novo</i> -Induktion und CD154-Sortierung.....	119
5.3.4	Identifizierung C/T-Antigen-spezifischer CD4 ⁺ T-Zell-Klone	121
5.3.5	Molekulare Charakterisierung isolierter T-Zell-Klone	123
5.4	Ausblick	126
6	Literaturverzeichnis	130
7	Abkürzungsverzeichnis.....	148
8	Anhang.....	150

Zusammenfassung

Obwohl der adoptive Transfer von CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTL) einen vielversprechenden Therapieansatz zur immunologischen Bekämpfung von Tumorerkrankungen darstellt, zeigten die bisher verfügbaren Protokolle in klinischen Studien jedoch eine sehr geringe Effizienz. Der ergänzende Transfer von CD4⁺ T-Helfer-Zellen könnte in diesem Zusammenhang eine Möglichkeit zur Unterstützung der CD8-T-Zell-Antwort bieten und somit die Effizienz der adoptiven T-Zell-Therapie verbessern. CD4⁺ T-Lymphozyten stellen essentielle Hilfe für CD8⁺ T-Zellen bereit und haben einen kritischen Effekt auf die Etablierung eines lang anhaltenden CD8-T-Zell-Gedächtnisses. Dementsprechend ist die schnelle und effiziente Isolierung und Charakterisierung Tumor-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen von großem Interesse.

In dieser Arbeit wurde ein Ansatz zur effizienten Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen unter Verwendung von *in vitro* transkribierter mRNA (*ivt*-mRNA) weiterentwickelt. Eine mit dem Antigen fusionierte Signalsequenz (CrossTag) ermöglichte in diesem Fall die gezielte MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation endogen translatierter Antigene. Im Gegensatz zu rekombinanten Proteinen kann Qualitäts-kontrollierte *ivt*-mRNA rasch hergestellt werden und enthält keine störenden Kontaminationen. Es konnte nachfolgend gezeigt werden, dass Antigen-präsentierende Zellen (APZ) nach Transfektion mit Antigen-CrossTag-*ivt*-mRNA erfolgreich zur gleichzeitigen Reaktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen eingesetzt werden konnten. Tumor-Antigen-CrossTag-*ivt*-mRNA-transfizierte APZ wurden dementsprechend zur Aktivierung peripherer Blutlymphozyten (PBL) eines gesunden Spenders genutzt. Am Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer konnten daraufhin unterschiedliche Tumor/Testis-Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zell-Klone anhand ihrer Aktivierungs-induzierten CD154-Oberflächen-Expression isoliert werden. Diese CD4⁺ T-Zellen konnten umgehend auf ihre T-Zell-Rezeptor-Sequenz und das zugehörige Restriktionselement hin charakterisiert werden. Die somit generierten Tumor-Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten können zur Identifizierung von CD4-T-Zell-Epitopen eingesetzt werden und in zukünftige Therapieansätze integriert werden.

Mithilfe der Kombination aus *ivt*-mRNS-basierter MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation und Aktivierungs-induzierter CD154-Sortierung konnte folglich eine innovative und zielführende Methode zur Isolierung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen etabliert werden.

Summary

Although adoptive T cell therapy with CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes (CTL) is a promising cancer immunotherapy, high efficacy in a clinical setting has not been established. To increase efficacy, supportive transfer of CD4⁺ helper T cells might offer a possibility to enhance CD8⁺ CTL responses. CD4⁺ T lymphocytes are known to provide pivotal help for CD8⁺ CTL as well as to have a critical effect on the generation of long lasting CD8⁺ memory T cells. The rapid and efficient isolation and characterization of tumor antigen specific CD4⁺ T lymphocytes is therefore of great interest.

A system was adopted to efficiently load MHC class II molecules using *in vitro* transcribed mRNA (*ivt*-mRNA), employing an antigen-coupled targeting signal (Cross-Tag). In contrast to recombinant proteins, quality controlled *ivt*-mRNA can be rapidly produced and carries no immunogenic contaminants. It was observed that antigen-presenting cells (APC) transfected with antigen-CrossTag *ivt*-mRNA were efficiently recognized by CD8⁺ and CD4⁺ T cells simultaneously. Consequently, tumor antigen-CrossTag *ivt*-mRNA-transfected APC were used to prime whole PBL of a healthy donor. Using fluorescence activated cell sorting for CD40 ligand (CD154) expressing CD4⁺ T lymphocytes after antigen-specific restimulation it was possible to isolate multiple CD4⁺ T cell clones directed against different tumor/testis-antigens presented on different MHC class II molecules. Clones generated with this method were characterized for their respective T cell receptor and restriction element. Furthermore, they can be used to identify new epitopes recognized by CD4⁺ T cells and contribute to future therapeutic approaches.

Thus, MHC class II expression targeting and sorting for activation-induced CD154 expression made it possible to establish a high-throughput method for the isolation of antigen-specific CD4⁺ T lymphocytes.

1 Einleitung

Schon im Jahre 1957 postulierte Macfarlane Burnet: dem Immunsystem des Menschen komme neben dem Schutz vor eindringenden Pathogenen möglicherweise auch eine Überwachungsfunktion zur Bekämpfung entarteter Körperzellen zu (Burnet, 1957). Über die letzten Jahrzehnte hinweg hat die weltweite Forschung dazu beigetragen, die immunologischen Mechanismen dieser Tumorabwehr aufzuklären. Im Gegensatz zur Fülle an grundlegenden Informationen auf dem Gebiet der Tumorimmunologie bleiben Vakzinierungsstrategien zur Therapie speziell solider Tumoren bisher objektiv gesehen jedoch weit hinter ihren aussichtsreichen Möglichkeiten zurück (Rosenberg *et al.*, 2004). Diese Ansätze zur „aktiven“ Immunisierung werden oft durch ein negativ wirkendes oder supprimiertes Immunsystem der Tumor-Patienten eingeschränkt (Schlom, 2012; Klebanoff *et al.*, 2005; Sakaguchi, 2005). Nichtsdestotrotz zeigt zum Beispiel eine neue Generation von Vakzinen mit Dendritischen Zellen (DZ) unter Verwendung *in vitro* ausgereifter Tumor-Antigen-beladener DZ Potential zur Verbesserung der Tumor-Immuntherapie (Frankenberger und Schendel, 2012). In Ergänzung zur aktiven Immunisierung existieren mittlerweile jedoch weitere immunologische Anti-Tumor-Therapieansätze. So stellt zum Beispiel der adoptive Transfer von T-Lymphozyten eine vielversprechende Möglichkeit zur immunologischen Bekämpfung von Krebserkrankungen dar. Die adoptive T-Zell-Therapie ist eine Form der Transfusionstherapie mit deren Hilfe aktivierte Tumor-spezifische T-Zellen die Eliminierung von Tumoren herbeiführen und Rezidive verhindern sollen (June, 2007). Gegenüber den vielfältigen Strategien von Anti-Tumor-Vakzinen stützt sich der Ansatz des adoptiven T-Zell-Transfers auf die *Ex vivo*-Stimulation und -Expansion Tumor-reaktiver T-Zellen und ermöglicht nach Reinfusion der T-Lymphozyten somit die effiziente Etablierung einer „passiven“ Tumor-Immunität (Restifo *et al.*, 2012).

1.1 Der adoptive T-Zell-Transfer

Lange Zeit lag verstärkt der adoptive Transfer von CD8⁺ Effektor-T-Zellen im Fokus der Bemühungen zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen. CD8⁺ T-Zellen erkennen endogene Antigene spezifisch im Kontext von MHC-Klasse-I-Molekülen und eignen sich aufgrund ihrer potenten zytotoxischen Eigenschaften zum direkten Einsatz gegen Tu-

morzellen (Hunder *et al.*, 2008; Yee *et al.*, 2002). Negative Interaktionen mit dem vorliegenden Immunsystem des Empfängers konnten nachfolgend durch die erfolgreiche Integration bedingter Lymphozyten-depletierender Chemotherapie-Regime in den Ablauf der Anti-Tumor-Therapie überwunden werden (Wrzesinski *et al.*, 2010; Dudley *et al.*, 2002).

Trotz dieser Voraussetzungen erscheint die Funktion *ex vivo* expandierter CD8⁺ T-Zellen *in vivo* jedoch häufig stark eingeschränkt. In diesem Zusammenhang konnte in Mausmodellen gezeigt werden, dass weitgehend ausdifferenzierte Effektor-T-Zellen entgegen guter *In-vitro*-Anti-Tumor-Funktionen nur eine geringe Effizienz in der Tumor-Therapie *in vivo* aufwiesen (Wilde *et al.*, 2009; Gattinoni *et al.*, 2005). Dementgegen führte der Transfer naiver oder geringfügig differenzierter CD8⁺ T-Lymphozyten in der selben Studie zur Eliminierung großer, etablierter Tumoren. Die Einschränkungen des Transfers aufgrund wiederholter *In-vitro*-Stimulations-Zyklen terminal differenzierter oder erschöpfter Tumor-spezifischer CD8⁺ T-Zellen könnten jedoch durch die Ansätze der T-Zell-Rezeptor-(TZR)-Gen-Therapie teilweise behoben werden (Uttenthal *et al.*, 2012; Schmitt *et al.*, 2009).

Unter TZR-Gen-Therapie versteht man den Transfer isolierter T-Zell-Rezeptor-Gene eines Antigen-spezifischen T-Zell-Klons in zum Beispiel primäre T-Lymphozyten eines HLA-abgestimmten Empfängers, in der Absicht die Spezifität des ursprünglichen Klons auf die Vielzahl der transduzierten oder transfizierten T-Zellen zu übertragen (Dembic *et al.*, 1986). TZR-transgene T-Zellen können somit nach nur kurzer *Ex-vivo*-Manipulation und -Expansion wieder in den Empfänger transfundiert werden und konnten schon zur erfolgreichen Tumor-Immuntherapie eingesetzt werden (Turtle *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2011; Morgan *et al.*, 2006). Die TZR-Gen-Therapie erlaubt zudem den Einsatz hoch-avider T-Zell-Rezeptoren aus zum Beispiel semi-allogenen *De-novo*-Induktionsansätzen sowie deren gezieltes Einbringen in T-Zellen mit vielversprechenden Effektor-Phänotypen (Gattinoni *et al.*, 2012). So konnte etwa gezeigt werden, dass Effektor-T-Gedächtniszellen (T_{EM}, engl. effector memory) im Vergleich zu zentralen T-Gedächtniszellen (T_{CM}, engl. central memory) zwar einen Vorteil in ihrer *In-vitro*-Anti-Tumor-Funktion besaßen, T_{CM} jedoch *in vivo* einen weitaus besseren therapeutischen Erfolg erzielen konnten als T_{EM} (Berger *et al.*, 2008; Klebanoff *et al.*, 2005). Neben T_{CM} werden mittlerweile auch naive T-Zellen und die vor kurzem beschriebenen T-Gedächtnis-Stammzellen (T_{MSC}, engl. T memory stem cell) zur Gruppe der erfolgsversprechenden T-Zell-Populationen für den Transfer TZR-modifizierter T-Lymphozyten gezählt (Klebanoff *et al.*, 2012). Zusätzlich zur Verbesserung der Effizienz hat die TZR-Gen-Therapie das Potential, ein Problem des stark personalisierten adoptiven T-Zell-Transfers zu lösen. Dementsprechend würde durch die transgene Expression charakterisier-

ter Tumor-spezifischer T-Zell-Rezeptoren die Notwendigkeit zur Isolierung hoch-avid-er Tumor-reaktiver T-Zell-Klone aus peripheren Blutlymphozyten (PBL) oder Tumorgewebe eines jeden zu behandelnden Patienten hinfällig.

Die genetische Instabilität vieler Tumoren führt jedoch wiederum dazu, dass der alleinige Transfer Tumor-Antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen zur Adaption des Tumorgewebes durch eine Verringerung der Immunogenität oder die Akquirierung inhibierender Mechanismen führen kann. Die sogenannte Tumorflucht (von engl. tumor escape) versteht sich folglich als darwinistische Evolution unter dem erhöhten Selektionsdruck der Effektorzellen (Dunn *et al.*, 2002). Die eindimensionale Aktivität Tumor-spezifischer CD8⁺ T-Lymphozyten führt oftmals nicht zur raschen Eliminierung des vollständigen Tumorgewebes und ermöglicht damit das zufällige Entstehen immun-evasiver Tumorvarianten (Khong und Restifo, 2002). So können sich Tumorzellen zum Beispiel durch Expression des Fas-Liganden vor der direkten Vernichtung durch Tumor-spezifische CD8⁺ zytotoxische T-Zellen schützen (Hahne *et al.*, 1996). Weitere beschriebene Mechanismen der Tumorflucht sind zum Beispiel der Verlust der MHC-Klasse-I-Expression oder -Antigenpräsentation (Cormier *et al.*, 1999; Restifo *et al.*, 1996) sowie die Sekretion immun-suppressiver Zytokine, wie zum Beispiel TGF- β (Transformierender Wachstumsfaktor; engl. transforming growth factor) (Gorsch *et al.*, 1992).

Entgegen beschriebener Einzelerfolge in der Tumor-Therapie scheint das oft schlechte Überleben adoptiv transferierter CD8⁺ T-Lymphozyten *in vivo* sowie die häufig ineffektiv erfolgende Tumorabstoßung auf die fehlende Fähigkeit der CD8⁺ T-Zellen zur Initiation einer umfassenden und nachhaltigen Immunantwort zurückzuführen zu sein. Dementsprechend könnte die bis heute leider geringe Effizienz der adoptiven T-Zell-Therapie womöglich in der Abwesenheit geeigneter Tumor-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten begründet liegen (Muranski und Restifo, 2009; Bevan, 2004).

1.2 Indizien für die Notwendigkeit von CD4⁺ T-Zellen

CD4⁺ T-Zellen nehmen im Gegensatz zu zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten eine zentrale Rolle bei der Aktivierung und Aufrechterhaltung von Immunantworten ein und sollten somit auch für die gezielte Immuntherapie von Tumorerkrankungen berücksichtigt werden. Nach der „Wiederentdeckung“ der CD4⁺ T-Lymphozyten für die potentielle Optimierung der Tumorthherapie fördern nun Studien vermehrt Indizien zutage, die diese Hypothese stützen.

Die in Mausmodellen beobachtete Übertragbarkeit einer existierenden Antitumor-Immunität durch den adoptiven Transfer von CD4⁺ T-Zellen spricht für eine möglich-

erweise zentrale Rolle der CD4⁺ T-Lymphozyten in der Tumorthherapie (Bogen *et al.*, 1995). So bieten CD4⁺ T-Zellen zum Beispiel essentielle Hilfe für eine Tumor-gerichtete zytotoxische CD8-T-Zell-Antwort (Wang und Livingstone, 2003). Fallarino und Kollegen konnten zeigen, dass der adoptive Transfer Tumor-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Helfer-Zellen zur Initialisierung einer zytotoxischen T-Zell-Antwort in Tumor-tragenden Versuchstieren führte (Fallarino *et al.*, 2000). Unabhängig für die Effizienz der detektierten CD8⁺ T-Zell-Aktivierung war in diesem Fall jedoch, ob es sich bei den transferrierten Lymphozyten um T-Helfer-1-Zellen (Th1) oder T-Helfer-2-Zellen (Th2) handelte. Neben der oben beschriebenen Funktion zur Aktivierung einer effizienten Immunantwort haben CD4⁺ T-Zellen zudem einen entscheidenden Effekt auf die Generierung langlebiger T-Gedächtniszellen (Sun und Bevan, 2003). So konnte wiederholt beobachtet werden, dass die Abwesenheit von CD4⁺ T-Lymphozyten *in vivo* während der primären CD8-T-Zell-Induktionsphase zu einem Ausbleiben einer adäquaten CD8-T-Zell-Antwort nach erneuter Virus-Infektion führte. Die Abwesenheit der CD4⁺ T-Helfer-Zellen während der Phase der wiederholten Infektion hatte jedoch keinen negativen Einfluss auf die Effizienz der sekundären ZTL-Expansion (Janssen *et al.*, 2003; Shedlock und Shen, 2003). Dies spricht dafür, dass naive Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen zum Zeitpunkt ihrer Induktion die Hilfe von CD4⁺ T-Helfer-Zellen für die Differenzierung in langfristig reaktivierbare CD8⁺ T-Gedächtniszellen benötigen.

Betrachtet man die Aktivierung des Immunsystems zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen zudem unter dem Aspekt einer chronisch verlaufenden Immunantwort, werden Parallelen zur CD4-abhängigen Abwehr von chronischen Infektionen augenscheinlich (Ostrand-Rosenberg, 2005). Es ist anerkannt, dass CD4⁺ T-Zellen essentiell für die Aufrechterhaltung der CD8-Effektor-Funktionen während chronischer Virus-Infektionen sind (Zajac *et al.*, 1998). So zeigen zum Beispiel Mausversuche auf der Grundlage einer chronischen LCMV-Infektion, dass die CD8-T-Zell-Antwort in Abwesenheit geeigneter CD4⁺ T-Lymphozyten nicht aufrecht erhalten werden kann (Battegay *et al.*, 1994). Des Weiteren konnte in HIV-Patienten mit Therapie-unabhängiger Kontrolle der Virämie eine langanhaltende und polyklonale CD4⁺ T-Zell-Antwort nachgewiesen werden (Rosenberg *et al.*, 1997). Die Abwesenheit von CD4⁺ T-Zellen wiederum korrelierte in diesem Zusammenhang mit einem stark erhöhten Virustiter. Chronisch stimulierte CD8⁺ T-Zellen scheinen somit abhängig von einer adäquaten CD4-T-Zell-Hilfe zu sein.

In Anbetracht der eindeutig unterstützenden Wirkweisen liegt demnach ein Einsatz von CD4⁺ T-Lymphozyten zur Optimierung und Erweiterung der immunologischen Tumorthherapie nahe. Für eine zusätzliche direkte Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen zur Nutzung möglicher unmittelbarer Anti-Tumor-Mechanismen wäre die Epitop-Präsen-

tation im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen notwendig. Tumorzellen exprimieren jedoch häufig keine MHC-Klasse-II-Moleküle. Trotzdem konnte in Mausmodellen schon mehrfach gezeigt werden, dass auch CD4⁺ T-Zellen alleine in der Lage sind, vor Tumoren unterschiedlicher Herkunft zu schützen (Kerkar *et al.*, 2011; Perez-Diez *et al.*, 2007; Greenberg *et al.*, 1985). Levitsky und Kollegen konnten zudem beobachten, dass es trotz Vakzinierung mit MHC-Klasse-II-negativen Tumorzellen zu einer CD4-abhängigen Abstoßung des Tumors kam. In Folge einer Depletion der vorhandenen CD4⁺ T-Zellen konnte die Tumorabstoßung nicht mehr detektiert werden (Levitsky *et al.*, 1994). Die Depletion der CD8-positiven Lymphozyten-Fraktion hatte jedoch keinen negativen Einfluss auf die Anti-Tumor-Antwort.

In Erweiterung dazu gibt es mittlerweile Berichte, wonach CD4⁺ T-Zellen anscheinend auch als alleinige Effektorzellen dazu befähigt sind, eine direkte Antitumor-Antwort auszuführen (Quezada *et al.*, 2010).

Dies spricht zusammenfassend für eine unmittelbare Funktion Tumor-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten für die immunologische Abwehr von Tumorerkrankungen. Im Folgenden soll demnach zuerst einführend auf die Grundlagen der Antigen-Präsentation sowie der Entwicklung der CD4⁺ T-Lymphozyten eingegangen werden. Im Anschluss daran werden mögliche Mechanismen der Anti-Tumor-Aktivität von CD4⁺ T-Zellen besprochen.

1.3 Klassische Antigen-Präsentationswege

Die Aktivierung von T-Lymphozyten erfolgt allgemein durch einen spezifischen Antigenkontakt anhand des T-Zell-Rezeptors. T-Zellen erkennen dabei Antigene in Form kurzer Peptide (Epitope), präsentiert in der Peptidbindegrube von MHC-Molekülen (pMHC). Die Prozessierung von Antigenen in Antigen-präsentierende Zellen (APZ) erfolgt auf zwei grundsätzlich verschiedenen Präsentationswegen (Germain, 1994). Auf dem klassischen MHC-Klasse-I-Präsentationsweg werden Proteine aus dem Zytosol im Endoplasmatischen Retikulum (ER) auf MHC-Klasse-I-Moleküle (MHCI) geladen und auf der Zelloberfläche an CD8⁺ T-Zellen präsentiert. Endogene Proteine werden hierfür durch das Proteasom geschnitten und über den TAP-Peptid-Transporter (engl. transporter associated with antigen processing) im ER auf neu-synthetisierte MHC-Klasse-I-Moleküle geladen. Auf dem klassischen MHC-Klasse-II-Präsentationsweg hingegen werden MHC-Klasse-II-Moleküle (MHCII) mit Fragmenten exogener Proteine beladen und auf der Zelloberfläche an CD4⁺ T-Lymphozyten präsentiert. Professionell Antigen-

präsentierende Zellen (Dendritische Zellen, B-Lymphozyten und Makrophagen) nehmen Antigene aus der Umgebung endozytotisch auf und prozessieren diese im endosomalen / lysosomalen Kompartiment. Zur Beladung neu-synthetisierter MHC-Klasse-II-Molekülen werden diese aus dem ER vesikulär an eine spezialisiertes endosomales / lysosomales Kompartiment – das MHC-Klasse-II-beladende Kompartiment oder MIIC (von engl. MHC II compartment) – übersandt. Während des Transports verhindert die invariante Kette (Ii) die vorzeitige Beladung der MHC-Klasse-II-Moleküle durch die gezielte Blockierung der Peptid-Bindegrube. Im MIIC angekommen wird die Invariante Kette proteolytisch gespalten und das entstehende CLIP-Fragment (engl. class-II-associated invariant-chain peptide) in der MHC-II-Bindegrube gegen Peptidfragmente aus dem endosomalen / lysosomalen Prozessierungsweg getauscht.

Die so entstehenden pMHCII werden nachfolgend an die Zelloberfläche transportiert und an CD4⁺ T-Zellen präsentiert. Diese „klassischen“ Präsentationswege verlaufen jedoch anscheinend nicht strikt getrennt. So existieren zum Beispiel Mechanismen zur Beladung von MHC-Klasse-I-Molekülen mit Peptiden aus dem endosomalen / lysosomalen Antigen-Prozessierungsweg. Bei der sogenannten MHC-Klasse-I-Kreuzpräsentation werden die MHC-I-Bindegruben demnach mit Peptiden exogener Proteine beladen (Heath *et al.*, 2004). Zudem gibt es Belege dafür, dass auch MHC-Klasse-II-Moleküle zytosolische (endogene) Epitope präsentieren können (Rudensky *et al.*, 1991; Nuchtern *et al.*, 1990). Hierfür beschriebene Mechanismen umfassen zum Beispiel die Präsentation nicht-MHCI-gebundener Peptide aus dem MHC-Klasse-I-Präsentationsweg sowie autophagozytotische Prozesse zum Abbau zytosolischer Proteine im endosomalen / lysosomalen Kompartiment (Nedjic *et al.*, 2009; Tewari *et al.*, 2005). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt.

Festzuhalten bleibt jedoch, dass neben den klassischen MHC-Klasse-I/II-Präsentationswegen auch Mechanismen zur Präsentationsweg-übergreifenden Beladung von MHC-Molekülen bestehen.

1.4 CD4-T-Zell-Entwicklung

Die Vorläuferzellen der T-Lymphozyten stammen wie alle Zellen des hämatopoetischen Systems aus dem Knochenmark. Die Entwicklung neu entstehender T-Zellen findet jedoch fast ausschließlich im zentral-lymphatischen Thymusgewebe statt. Ihr Reifungsprozess ist abhängig von der funktionellen somatischen Rekombination des T-Zell-Rezeptors sowie unterstützenden als auch selektierenden Zell-Zell-Interaktionen. Im Thymus entstehen somit $\gamma\delta$ - oder aber CD4/CD8 positive $\alpha\beta$ -T-Zellen. Die Mehrzahl

späterer peripherer T-Lymphozyten exprimiert einen aus α - und β -Kette zusammengesetzten heterodimeren T-Zell-Rezeptor (TZR). Die beiden Ketten des Rezeptors sind strukturell der Immunglobulin-Superfamilie zuzurechnen und bestehen aus einer geregelten Abfolge stochastisch zusammengefügter Gensegmente. Die einzelnen Ketten tragen aminoterminal (extrazellulär) jeweils eines von ursprünglich vielen in der Keimbahn kodierten variablen (V) Gensegmenten in Fusion mit einer sogenannten verbindenden (J, von engl. joining) Region und werden abschließend durch ein zugehöriges konstantes (C, von engl. constant) Gensegment in der Membran der T-Zelle verankert. Die TZR- β -Kette enthält darüber hinaus ein zusätzliches D-Segment (von engl. diversity) zwischen V- und J-Region. Die außerordentlich hohe Zahl von geschätzt 10^{15} unterschiedlichen TZR-Spezifitäten im unselektierten TZR-Repertoire kommt während der Verknüpfung der V(D)J-Gensegmente zustande (Davis und Bjorkman, 1988). Der Komplex der V(D)J-Rekombinase vollzieht hierbei die Verknüpfung der zufällig gewählten Segmentvarianten, wobei durch Exonuklease-Aktivität und Matrizen-unabhängiges Einfügen einiger weniger Nukleotide eine starke Diversifizierung im Bereich der Verknüpfungsstellen erreicht wird. In der Abfolge der TZR-Sequenz existieren somit unterschiedlich variable Abschnitte. Man unterscheidet Gerüstregionen (FR, engl. framework region) und hypervariable Regionen (HV). Die HV-Regionen umfassen die drei zur pMHC-Erkennung benötigten Komplementaritäts-bestimmenden Regionen (CDR, engl. complementary determining regions). Die CDR3-Regionen der beiden TZR-Ketten liegen im Bereich der V(D)J-Segmentverknüpfungen und dienen aufgrund ihrer stark erhöhten Sequenzvariabilität zur Epitoperkennung. Die Variabilitäten der CDR1- und CDR2-Regionen sind auf vererbte Unterschiede der V-Segmentvarianten zurückzuführen und dienen der „Selbst“-Erkennung der weniger variablen MHC-Moleküle.

Der Prozess der Differenzierung im Thymus endet mit der Selektion des entstehenden T-Zell-Repertoires. Durch die Mechanismen der positiven Selektion wird die erfolgreiche Erkennung von Selbst-MHC-Molekülen überprüft (Starr *et al.*, 2003). Ausschließlich Thymozyten die nach Umlagerung ihrer Rezeptorketten in der Lage sind, Peptid:MHC-Komplexe zu erkennen, erhalten die benötigten Überlebenssignale. Dabei entstehen aus der Population der zunächst CD4-CD8-doppelpositiven $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten zwei funktionell getrennte Untergruppen. Aus der positiven Selektion durch eine MHC-Klasse-I-Interaktion gehen zytotoxische CD8⁺ T-Lymphozyten hervor, aus der erfolgreichen Interaktion mit MHC-Klasse-II-Molekülen entsteht die Fraktion der letztlich CD4-exprimierenden T-Zellen. In einem weiteren Selektionsschritt, der negativen Selektion, werden abschließend Thymozyten mit hoher Affinität für Selbst-Antigene aus dem Repertoire der später freigesetzten naiven T-Lymphozyten entfernt (Hogquist *et al.*, 2005). Der Mechanismus der klonalen Deletion dient der Prävention potentiell auto-reaktiver

T-Zellen und soll somit vor schädlichen Autoimmunerkrankungen schützen. Grundsätzlich kann angenommen werden, dass beide Selektionsschritte durch die Stärke der Interaktion zwischen TZR und thymus-exprimierten Selbst-Peptid:MHC-Komplexen bestimmt werden. Schwach erkannte Liganden aktivieren den Thymozyten nur unvollständig und führen damit zur positiven Selektion. Wohingegen stark aktivierende Liganden eine negative Selektion anhand des Aktivierungs-induzierten Zelltods (AICD, engl. activation induced cell death) hervorrufen (Gascoigne und Palmer, 2011). Dieser äußerst komplexe Prozess ist dennoch teilweise durchlässig, wobei entkommene auto-reaktive T-Zellen wiederum durch die Mechanismen der peripheren Toleranz wie beispielsweise Anergie oder peripherer Deletion an ihrem potentiell negativen Einfluss gehindert werden können (Parish und Heath, 2008; Bouneaud *et al.*, 2000). Eine interessante Ausnahme in diesem Zusammenhang stellen natürlich vorkommende CD25⁺ Foxp3⁺ T-Zellen dar. Diese Lymphozyten der CD4-T-Zell-Fraktion differenzieren mitunter aufgrund ihrer verstärkten Selbst-Peptid-Erkennung zu regulatorischen T-Zellen (Treg) und stehen damit diametral entgegen den Mechanismen der klonalen Deletion im Thymus (Klein und Jovanovic, 2011). Einige Aspekte der vielfältigen Selektionsschritte, die zur Generierung eines MHC-restringierten als auch selbst-toleranten T-Zell-Repertoires beitragen, bleiben somit weiterhin unstimmig (Gascoigne und Palmer, 2011). Da mittlerweile als anerkannt gelten kann, dass das Immunsystem auch Funktionen zur Überwachung entarteter körpereigener Zellen einnimmt – was zu einem gewissen Teil Selbst-Antigen-vermittelt scheint (Schietering *et al.*, 2008) – erscheinen die negative Selektion im Thymus sowie die Mechanismen der peripheren Toleranz als evolutivonärer Grenzgang zwischen positiven und negativen Nebeneffekten.

Die aus dem Thymus entsandten naiven T-Lymphozyten patrouillieren durch sekundäre lymphatische Gewebe und kontrollieren die Umgebung mithilfe ihres Rezeptors auf im Kontext passender MHC-Moleküle präsentierte Antigene (Schlüssel-Schloss-Prinzip). Naive T-Zellen werden durch die Epitop-spezifische Interaktion mit professionell Antigen-präsentierenden Zellen primär aktiviert (induziert). CD8⁺ T-Lymphozyten entwickeln sich daraufhin zu zytotoxischen Effektor-T-Zellen mit direkten Effektorfunktionen (Perforin, Granzym). Naive CD4⁺ T-Zellen differenzieren durch geeignete Antigenstimulation je nach vorliegendem Zytokinmilieu zu verschiedenen Effektorzelluntergruppen, den sogenannten T-Helfer-Zellen (Th) oder aber induzierten regulatorischen T-Zellen (iTreg). Zurzeit sind drei Untergruppen verschiedener T-Helfer-Zellen bekannt, Th1, Th2 und Th17.

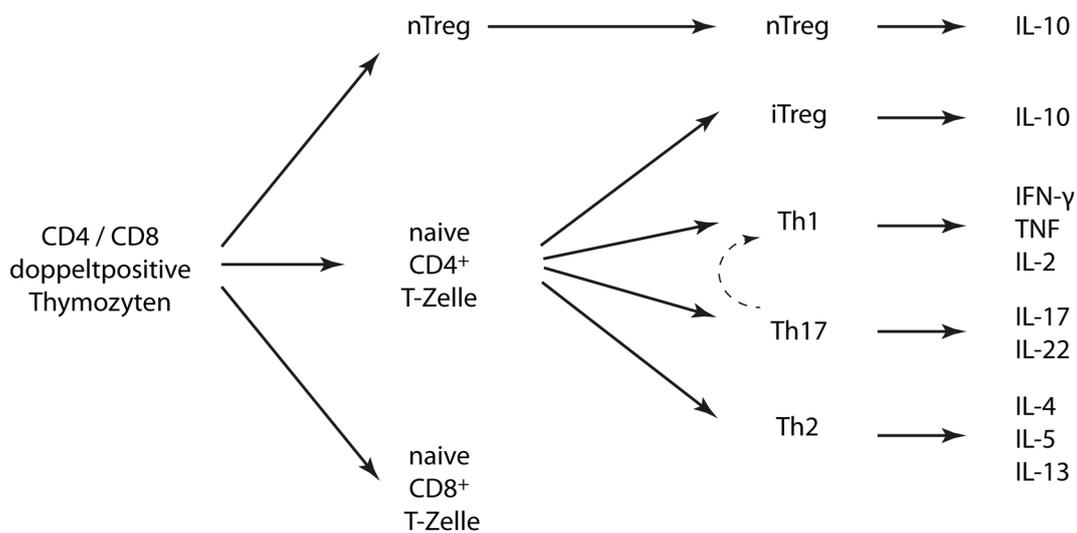


Abb. 1.1. **Differenzierung der verschiedenen CD4-T-Zell-Subpopulationen.** Im Verlauf der positiven und negativen Selektion im Thymus entwickeln sich vorerst CD4-CD8-doppel-positive Thymozyten in später einfach-positive naive CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen sowie CD4⁺ regulatorische T-Zellen (nTreg). Nach spezifischem Antigenkontakt in der Peripherie entwickeln sich naive CD4⁺ T-Lymphozyten je nach vorliegendem Zytokinmilieu in die Subpopulationen der Th1-, Th17- und Th2-Helfer-T-Zellen sowie induzierte regulatorische T-Zellen (iTreg). Th17-Zellen unterliegen anscheinend auch nach erfolgter Polarisierung in der Peripherie einer späten Plastizität (Th17-Differenzierung zu Th1). Neben den verschiedenen CD4-T-Zell-Populationen sind zudem die jeweils typischen Effektor-Zytokine dargestellt. (Abbildung abgeändert nach Swain *et al.*, 2012).

Dem Spektrum der unterschiedlichen CD4⁺ T-Zellen wird ein zum Teil gegensätzliches Potential zur Therapie maligner Erkrankungen zugeschrieben. So scheinen natürliche oder induzierte Treg durch die Suppression der Tumor-gerichteten Immunantwort einen generell negativen Einfluss auf den Krankheitsverlauf zu besitzen und sind allgemein mit dem fortschreitenden Wachstum des Tumorgewebes assoziiert (Antony *et al.*, 2005; Gerloni und Zanetti, 2005). Dahingegen konnte für die beiden klassischen Helfer-Untergruppen der Th1- und Th2-Zellen bereits die Fähigkeit zur effizienten Eliminierung von Tumorzellen nachgewiesen werden, wobei die IFN- γ und IL-2-sekretierenden Lymphozyten des Th1-Subtyps die im Moment anscheinend attraktivsten CD4⁺ Effektor-T-Zellen darstellen (Nishimura *et al.*, 2000; Pardoll und Topalian, 1998). Die Rolle der erst seit kurzem bekannten IL-17-produzierenden pro-inflammatorischen Th17-Zellen ist noch nicht abschließend geklärt (Korn *et al.*, 2007). Muranski und Kollegen konnten in einem Mausmodell jedoch auch unter Einsatz Th17-polarisierter CD4⁺ T-Zellen eine effiziente Abstoßung selbst etablierter Melanome beobachten (Muranski *et al.*, 2008). Der Anti-Tumor-Effekt der Th17-Zellen war in diesen Versuchsreihen jedoch IFN- γ -abhängig, was für eine inhärente Plastizität und eine damit einhergehende späte

Differenzierung der aktivierten Th17-Zellen zu Th1-Zellen spricht (Lee *et al.*, 2009). Die gewünschte Aktivität Tumor-reaktiver CD4⁺ T-Lymphozyten scheint somit nicht nur abhängig von ihrer Spezifität sondern auch vom Grad und der Qualität ihrer Differenzierung.

1.5 Mögliche Mechanismen der Anti-Tumor-Funktion spezifischer CD4⁺ T-Zellen

Bis heute wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen beschrieben, welche es CD4⁺ T-Zellen ermöglichen könnten die treibende Kraft für eine effiziente Tumor-Immunabwehr darzustellen. Diese Mechanismen reichen von der klassischen CD4-T-Zell-Hilfe für CD8⁺ T-Lymphozyten über die Lizensierung von Antigen-präsentierenden Zellen bis hin zur direkten oder indirekten Lyse von Tumorzellen.

CD4⁺ T-Zellen unterstützen das immunologische Milieu allgemein durch die Sekretion von Zytokinen, wie etwa IFN- γ , TNF (Tumornekrosefaktor), GM-CSF (von engl. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) und diverser Th2-Zytokine (Ostrand-Rosenberg, 2005). Durch IL-2-Sekretion können CD4⁺ T-Zellen beispielsweise Antigen-spezifisch aktivierte ZTL zur Proliferation anregen (Cheever und Chen, 1997). Eine seit langem existierende Theorie der CD4-T-Zell-Hilfe ist demnach die Zytokinfreisetzung aktivierter CD4⁺ T-Lymphozyten in unmittelbarer Nachbarschaft zu zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen (Mitchison und O'Malley, 1987; Keene und Forman, 1982).

In Ergänzung dazu können Antigen-spezifisch aktivierte CD4⁺ T-Lymphozyten auch direkt kostimulatorische Signale für CD8⁺ T-Zellen zur Verfügung stellen und damit deren Expansion sowie das Überleben der ZTL während der Effektor-Phase der Anti-Tumor-Antwort fördern (Giuntoli *et al.*, 2002). Dies wird anscheinend über die direkte Interaktion von Oberflächen-Molekülen auf ZTL und CD4⁺ T-Helfer-Zellen vermittelt. Giuntoli und Kollegen führen hierfür CD27, CD137 (4-1BB) und MHC-Klasse-II-Moleküle als potentielle Interaktionspartner auf CD8⁺ T-Zellen in Verbindung mit deren jeweiligen Liganden auf CD4⁺ T-Lymphozyten auf.

Tumor-infiltrierende CD4⁺ T-Lymphozyten haben offenbar zudem die Fähigkeit die Anreicherung Tumor-reaktiver ZTL im Tumorgewebe zu ermöglichen (Marzo *et al.*, 2000). In Übereinstimmung damit berichten auch Wong und Kollegen von der Notwendigkeit Tumor-spezifischer CD4⁺ T-Zellen für die Akkumulation von CD8⁺ T-Lymphozyten im Tumorgewebe und deren Kapazität zur direkten Lyse von Tumorzellen während der akuten Phase der Immunantwort (Wong *et al.*, 2008). CD4⁺ T-

Lymphozyten helfen demnach selbst niedrig-aviden CD8⁺ T-Zellen, den vorliegenden Tumor zu infiltrieren.

Eine weitere anerkannte Rolle der CD4⁺ T-Lymphozyten ist ihre Funktion zur Aktivierung professionell Antigen-präsentierender Zellen (Palucka und Banchereau, 2012). Tumor-infiltrierende APZ nehmen Tumor-Antigene endozytotisch auf und präsentieren prozessierte Epitope auf MHC-Klasse-II-Molekülen. So konnte etwa gezeigt werden, dass Tumor-infiltrierende DZ Tumor-Antigene effizient im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentieren und somit in der Lage waren Tumor-spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten zu aktivieren (Dembic *et al.*, 2000). Die Lizenzierung der Antigen-präsentierenden Zellen durch die Ligation von CD40 auf APZ und CD40-Ligand auf CD4⁺ T-Zellen führt zu einer verstärkten Antigenpräsentation und zur Bereitstellung wichtiger kostimulatorischer Signale (Bennett *et al.*, 1998). Schoenberger und Kollegen konnten in ihren Experimenten zeigen, dass die Blockierung der CD40-CD40-Ligand-Interaktion zu einer Inhibition der CD8⁺ T-Zell-Aktivierung führte (Schoenberger *et al.*, 1998). Diese Beobachtung ist insofern relevant für die Tumorummunologie, als die Abwesenheit Tumor-spezifischer CD4⁺ T-Helfer-Zellen unter Umständen eine effiziente Induktion Tumor-spezifischer CD8⁺ T-Zellen verhindert.

Die Erkennung von Tumor-assoziierten Antigenen (TAA) auf APZ durch CD4⁺ T-Zellen kann neben der CD4-Hilfe für zytotoxische CD8⁺ T-Lymphozyten nachfolgend auch zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems führen (Mumberg *et al.*, 1999). So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die IFN- γ -Sekretion Tumor-spezifischer CD4⁺ T-Zellen die Anti-Tumor-Aktivität Tumor-infiltrierender Makrophagen induzierte (Corthay *et al.*, 2005). Auch Hung und Kollegen beobachteten, dass die Zytokinproduktion nach Induktion von Th1- und Th2-Zellen zur Aktivierung von Makrophagen und Eosinophilen führte. Die Effektor-Zelltypen der angeborenen Immunität waren durch Sekretion von Hyperoxiden und Stickstoffmonoxid daraufhin maßgeblich an der Zerstörung des Tumorgewebes beteiligt (Hung *et al.*, 1998). Die gezielte IFN- γ -Freisetzung durch CD4⁺ T-Helfer-Zellen könnte zudem an der Unterdrückung der Tumor-Angiogenese beteiligt sein (Qin und Blankenstein, 2000; Mumberg *et al.*, 1999). In Ergänzung dazu konnte in Mausversuchen nach adoptivem Transfer Tumor-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten auch ein Zusammenspiel von CD4⁺ T-Zellen und NK-Zellen nachgewiesen werden (Perez-Diez *et al.*, 2007). NK-Zellen infiltrierten hierbei das Tumorgewebe und lieferten einen Beitrag zur langfristigen Beseitigung des Tumors.

CD4⁺ T-Zellen erkennen Antigene im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen, deren Expression für gewöhnlich auf professionell Antigen-präsentierende Zellen (Dendritische Zellen, B-Lymphozyten und Makrophagen) beschränkt ist. Anhand der oben be-

schriebenen Mechanismen können Tumor-spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten jedoch generell dazu beitragen, auch MHC-Klasse-II-negative Tumoren zu bekämpfen (Ossendorp *et al.*, 1998). Darüber hinaus finden sich in einigen Tumoren signifikante Populationen MHC-Klasse-II-positiver Tumorzellen (Cabrera *et al.*, 1995). Zu den Tumoren mit assoziierter erhöhter MHC-Klasse-II-Expression zählen zum Beispiel Melanome, Lungenkarzinome sowie Brust- als auch Osteosarkome (Altomonte *et al.*, 2003). Auf einigen MHC-Klasse-II-negativen Tumorzellen kann die MHC-Klasse-II-Expression zudem durch IFN- γ induziert werden, solange keine IFN- γ -Resistenz vorliegt (Nistico *et al.*, 1990; Koeffler *et al.*, 1984). Durch autophagozytotische Mechanismen können einige Tumore somit Selbst-Antigene direkt auf MHC-Klasse-II präsentieren (Nuchtern *et al.*, 1990). Tumor-Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen könnten in diesem Fall direkte Antitumor-Effektorfunktionen zeigen. So konnten zum Beispiel Quezada und Kollegen in ihrem Melanom-Maus-Modell beobachten, dass die Abstoßung des Tumors durch transferierte Tumor-spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten abhängig war von der unmittelbaren MHC-Klasse-II-Erkennung auf den vorliegenden Melanomzellen (Quezada *et al.*, 2010). Bisher beschriebene direkte Wirkweisen von CD4⁺ T-Lymphozyten auf Tumorzellen umfassen zum Beispiel den Fas/Fas-Ligand-Signalweg, die Granzym-Perforin-vermittelte Lyse und Mechanismen unter Verwendung von TRAIL (von engl. TNF-related apoptosis-inducing-ligand) (Echchakir *et al.*, 2000; Thomas und Hersey, 1998; Schattner *et al.*, 1996).

Zusammenfassend stehen hiermit vielfältige Mechanismen zur Verfügung die es Tumor-Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen potentiell erlauben, einen grundlegenden Beitrag zur Optimierung der Immuntherapie von Tumorerkrankungen zu leisten.

1.6 MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation

Durch die potentiellen Vorteile der Anwendung von CD4⁺ T-Zellen in der Tumor-Immuntherapie steigt das Interesse an Methoden zur Generierung Tumor-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten. Die Isolierung natürlich vorkommender Tumor-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen gestaltet sich jedoch durchaus schwierig. Zur Induktion oder Reaktivierung von CD4⁺ T-Lymphozyten müssen Tumorepitope auf APZ effizient im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden. Die hohe genetische Variabilität der MHC-Klasse-II-Loci erschwert hierbei die molekulare Charakterisierung der TZR-pMHC-Interaktion. Darüber hinaus scheinen CD4⁺ T-Zellen unter *In-vitro*-Bedingungen proliferative Nachteile im Vergleich zu CD8⁺ T-Lymphozyten zu besitzen (Foulds *et al.*, 2002). Neben den geeigneten Kulturbedingungen erscheint somit

eine effektive Antigen-Präsentation als maßgeblich für den Erfolg zur Identifizierung Tumor-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen.

Die Identifizierung vielfältiger Tumor-Antigene sowie die fortlaufende Definition enthaltener immunogener MHC-Klasse-II-Epitope ermöglichen die gezielte Beladung Antigen-präsentierender Zellen für die Generierung Tumor-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten. Synthetische Peptide können zum Beispiel zur direkten Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen eingesetzt werden (Jager *et al.*, 2000). Die Präsentation ist jedoch auf Grund der geringen Halbwertszeit der Peptid:MHC-II-Komplexe äußerst ineffizient. APZ können darüber hinaus auch mit rekombinant exprimierten Proteinen oder Proteinfragmenten koinkubiert werden. Die Zellen nehmen die zur Verfügung gestellten Proteine nachfolgend aus dem Kulturmedium auf und prozessieren diese über den klassischen MHC-Klasse-II-Präsentationsweg (Sallusto *et al.*, 1995). Diese für gewöhnlich ineffektiven endozytotischen Mechanismen können durch den Einsatz bestimmter Zielstrukturen für die Rezeptor-induzierte Aufnahme exogener Proteine unterstützt werden (van Bergen *et al.*, 1999). Die rekombinante Expression von Proteinen ist dessen ungeachtet arbeitsaufwendig und ermöglicht keine kontaminationsfreie Aufreinigung der Zielproteine. So enthalten rekombinant exprimierte Proteine meist Rückstände der bakteriellen oder anderweitig fremdartigen Expressionszellen.

Um die technischen Einschränkungen bei der synthetischen Peptid-Produktion oder rekombinanten Expression von Proteinen zu umgehen, wurden genetische Ansätze für die endogene Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen entwickelt. Für den gezielten zellinternen Versand bekannter MHC-Klasse-II-restringierter Epitope an das MHC-Klasse-II-beladende Kompartiment (MIIC) wurden bisher verschiedene Strategien verfolgt. Zum einen ist es möglich, immunogene Peptidsequenzen über ein flexibles Verbindungsstück (engl. linker) mit dem N-Terminus der MHC-Klasse-II- β -Kette zu fusionieren (Ignatowicz *et al.*, 1995). Ignatowicz und Kollegen konnten in ihren Versuchen somit Transfektanten erzeugen, auf deren Oberfläche eine Präsentation des eingesetzten Epitops auf 99 bis 100% aller zu detektierenden MHC-Klasse-II-Moleküle nachweisbar war. Der sterisch überstehende Teil des Linkers hatte interessanter Weise keinen negativen Einfluss auf die Erkennung der transgenen Epitop:MHC-II-Komplexe durch peptid-spezifische Hybridomzellen (Fusion von T-Zellen mit Zellen einer Thymuskarzinom-Zelllinie; Ignatowicz *et al.*, 1995).

Eine Möglichkeit zum gezielten Versand kurzer Peptidsequenzen an den Ort der MHC-Klasse-II-Beladung ist deren Fusion mit dem C-Terminus der Invarianten Kette (Ii) (Nakano *et al.*, 1997). Durch das Einfügen einer Cathepsin-Schnittstelle werden die Peptide nach Erreichen des lysosomalen /endosomalen Kompartiments enzymatisch abgespaltet. Diese müssen jedoch mit den physiologisch vorhandenen Epitopen um die Bin-

dung auf MHC-Klasse-II-Molekülen konkurrieren (Sponaas *et al.*, 1999). Um nachfolgend die Effizienz der MHC-Klasse-II-Beladung unter Einsatz des Ii-basierten Peptid-Versands zu verbessern, wurden Ansätze zum Austausch des CLIP-Peptids in der Sequenz der Invarianten Kette entwickelt (Malcherek *et al.*, 1998; van Bergen *et al.*, 1997). Nach Zusammenlagerung des Ii:MHC-II-Komplexes im Endoplasmatischen Retikulum (ER) belegt das CLIP-Peptid die MHC-II-Bindungsgrube auf ähnliche Weise wie später gebundene Epitope. Durch den Austausch von CLIP können ausgewählte Peptide demnach bereits im ER auf MHC-Klasse-II-Moleküle geladen werden. Van Bergen und Kollegen war es im Mausmodell somit unter Verwendung eines Tumor-spezifischen CD4-Epitops möglich, eine effiziente Immunantwort gegen die aggressive RMA-Tumor-Zelllinie zu induzieren (van Bergen *et al.*, 2000).

In all diesen Fällen müssen jedoch die erkannten Epitope und die benötigten Restriktions-selemente bekannt sein, um einen effizienten Einsatz zur MHC-II-Beladung zu gewährleisten. Zudem sind die hier genannten Ansätze beschränkt auf die Präsentation von Einzel-Epitopen. Um diese Einschränkungen zu überkommen wurden konsequenter Weise genetische Methoden zum gezielten Einbringen vollständiger Antigene in den MHC-Klasse-II-Präsentationsweg entwickelt. Der zielgerichtete Versand endogener Proteine zur Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen stützt sich auf die Existenz spezifischer zellinterner Sortierungssignale, welche den physiologischen Transport einer Reihe von endosomal / lysosomal assoziierter Proteine gewährleisten (Braulke und Bonifacino, 2009). Diese Proteine sind meist Membran-durchspannend und tragen in ihren zytosolischen Domänen Signalmotive, die den vesikulären Transport hin zum lysosomalen / endosomalen Kompartiment ermöglichen. Die beteiligten Sortierungssignale lassen sich unterteilen in Dileucin-basierte (DXXLL) Motive und Tyrosin-gestützte (YXXØ) Signalmotive (Braulke und Bonifacino, 2009). Eine Vielzahl solcher Sortierungssignale wurde bisher zum erfolgreichen Antigen-Versand an das MHC-Klasse-II-Kompartiment nutzbar gemacht. Beispiele hierfür – um nur eine Auswahl zu nennen – sind die Invariante Kette (Breckpot *et al.*, 2003; Sanderson *et al.*, 1995), die Lysosomen-assoziierten Membranproteine LAMP-1 und LAMP-2 (Su *et al.*, 2002; Bonini *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1993) sowie der Transferrin-Rezeptor (Fernandes *et al.*, 2000). Die mit Abstand am häufigsten in der Literatur beschriebenen Sortierungssignale zur gezielten endogenen Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen sind die letzten 80 N-terminal gelegenen Aminosäuren der Invarianten Kette (Ii80; Dileucin-Motiv) sowie die LAMP-1-Transmembran- und Zytoplasma-Domäne (Tyrosin-Motiv). So konnten zum Beispiel Sanderson und Kollegen mit Ii80-OVA-(Ovalbumin)- und Ii80-HEL-(Hühnerei-Lysozym)-Fusionskonstrukten transfizierte APZ erfolgreich zur Aktivierung spezifischer MHC-Klasse-II-restringierter T-Zell-Hybridome einsetzen (Sander-

son *et al.*, 1995). Wu *et al.* war es dementsprechend in ihren Studien möglich, den zielgerichteten Versand eines E7-(HPV-16-Antigen)-LAMP-1-Fusionsprodukts zum lysosomalen / endosomalen Kompartiment nachzuweisen. Transfizierte B-Zellen präsentierten nachfolgend E7-Epitope im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen und dienten zur Reaktivierung E7-spezifischer T-Zell-Linien (Wu *et al.*, 1995). In Versuchen zum Vergleich der CD4-stimulatorischen Kapazität transfizierter APZ konnte jedoch ein klarer Vorteil des LAMP1-Konstruktes gegenüber der Invarianten Kette beobachtet werden (Bonehill *et al.*, 2004).

Die Ansätze unter Einbezug vollständiger Antigensequenzen haben den Vorteil, dass neben der Präsentation verschiedener Epitope im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen zusätzlich auch eine Prozessierung der eingebrachten Antigene im Rahmen des klassischen MHC-Klasse-I-Präsentationswegs stattfinden kann (Bonehill *et al.*, 2004).

1.7 Tumorantigene

Was sind demnach geeignete Antigene für die Tumor-Immuntherapie mithilfe des adoptiven T-Zell-Transfers? In Tumoren existiert eine Vielzahl verschiedener intrazellulärer Proteine, welche mittlerweile als Tumorantigene anerkannt werden (Rosenberg, 2001). Tumorantigene können generell unterteilt werden in (1) virale Tumorantigene, sowie nicht-virale (2) Tumor-spezifische Antigene und (3) Tumor-assoziierte Antigene. Antigene karzinogener Viren stellen ideale Zielstrukturen für eine immunologische Eliminierung Virus-transformierter Tumorzellen dar, da die Expression der körperfremden Virusproteine auf infizierte Zellen beschränkt sein sollte und virale Proteine im Allgemeinen zum Ablauf einer effizienten Immunantwort führen (Pagano *et al.*, 2004). Virale Infektionen sind geschätzt jedoch nur mit etwa 15% aller weltweiten Tumorerkrankungen assoziiert (Butel, 2000). Eine weitere Klasse bekannter Tumorantigene sind Tumor-assoziierte Mutationen, die sogenannten Tumor-spezifischen Antigene (TSA). TSA sind interessant für die Anti-Tumor-Therapie, da diese wiederum ausschließlich von Tumorzellen exprimiert werden und darüber hinaus oftmals integral für das Überleben des Tumors sind. Tumor-spezifische Antigene sind Neo-Antigene und sollten daher nicht der negativen Selektion im Thymus unterliegen (Huber und Wolfel, 2004). Die auftretenden Mutationen sind jedoch meist individuelle Ereignisse und bedürften daher hoch personalisierter Therapieansätze, wie sie zum jetzigen Zeitpunkt nicht darstellbar sind.

Aus diesem Grund liegt der Fokus der allgemeinen Bemühungen um eine umsetzbare Tumor-Immuntherapie auf den prinzipiell Tumor-übergreifenden Zielstrukturen der

Tumor-assoziierten Antigene (TAA). Die Gruppe der TAA gestaltet sich heterogen und reicht von Gewebe-spezifischen Tumor/Testis-Antigenen (MAGE-A4, Melanom-assoziiertes Antigen 4; NY-ESO1, Tumor/Testis-Antigen 1B) und Differenzierungs-Antigenen (MART-1; von engl. Melanoma antigen recognized by T-cells 1; Tyrosinase, Melanozyten-Antigen; CD20, B-Lymphozyten-Antigen) bis hin zu im Tumor über-exprimierten ubiquitär vorhandenen Selbst-Antigenen (p53, Transkriptionsfaktor; EGFR, von engl. Epidermal growth factor receptor) (Schieter *et al.*, 2008). Der Vorteil der Tumor-assoziierten Antigene ist ihr für gewöhnlich breites Anwendungsspektrum, aufgrund der teils stark verbreiteten Expression der Zielantigene auf gesunden Körperzellen sind allerdings lebensbedrohliche Nebenwirkungen zu befürchten.

Eine in diesem Zusammenhang vielversprechende Untergruppe der TAA sind die im Normalfall ausschließlich Keimbahn-restringierten Tumor/Testis-(engl. Cancer/Testis, C/T)-Antigene (Scanlan *et al.*, 2004). Dessen ungeachtet scheinen genetische Veränderungen im Tumorgewebe zur Reaktivierung generell stillgelegter Keimbahn-Expressions-Programme zu führen. Die daraufhin exprimierten C/T-Antigene sind immunogen, stark Gewebe-gebunden und haben das Potential, eine erfolgreiche Anwendung als Zielantigene für die Anti-Tumor-Therapie zu finden (Simpson *et al.*, 2005).

1.8 Zielsetzung

Da sich die zuverlässige Generierung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zell-Klone nachwievor arbeitsaufwendig und ineffizient gestaltet, sollte in dieser Arbeit eine Methode zur raschen und effizienten Isolierung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten entwickelt werden. Im Hinblick auf die Anwendbarkeit isolierter T-Zellen oder T-Zell-Rezeptoren für die adoptive T-Zell-Therapie von Tumorerkrankungen sollten C/T-Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen generiert werden. Da es sich bei C/T-Antigenen, wie zuvor beschrieben, um Selbst-Antigene handelt, wird der Erfolg der Isolierung auch ein Maß für die Effizienz der hier entwickelten Methode zur generellen Generierung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen sein. Unter Einsatz *ivt*-mRNS-beladener dendritischer Zellen sollten Tumor-Antigen-spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten aus dem Repertoire eines gesunden Spenders aktiviert werden. Nach Sortierung von CD4⁺ T-Lymphozyten anhand des Aktivierungs-induzierten Oberflächenmarkers CD154 (CD40-Ligand, CD40L) sollten etablierte Klone abschließend molekular und funktionell charakterisiert werden.

2 Material

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Tab. 2.1: Geräte

Produkt	Firma, Firmensitz
Bestrahlungsanlage ¹³⁷ Cs, HWM-D-2000	Gammacell, Ottawa (Kanada)
Brutschrank, CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus, München
Cell Quest, FACS™ Software	BD, Heidelberg
Eismaschine	Scottsman, Mailand (Italien)
Elektroporator Gene Pulser Xcell™	Bio-Rad, München
Elisa-Reader Sunrise	Tecan, Crailsheim
Fusion-FX7, Chemilumineszenz-Imaging	PEQLAB, Erlangen
Durchflusszytometer, LSR II	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
InGenius System IG-E	Synoptics, Cambridge (UK)
Intelli Mixer RM-2	LTF Labortechnik, Wasserburg/Bodensee
Kühlzentrifuge 2K15	Sigma, Osterode am Harz
Kühlzentrifuge Eppendorf Centrifuge 54172	Eppendorf, Hamburg
Laborwaagen B6, P120, PC 440	Mettler, Giessen
Lichtmikroskop, Auflicht	Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop, Durchlicht	Zeiss, Göttingen
Magnetrührer IKA RCT	Bachofen, Reutlingen
Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikrowellengerät FM 3510	Moulinex, Frankreich
Milli-Q®, Reinstwasserherstellungssystem	Millipore, Schwalbach
Nalgene „Mr Frosty“ Freezing Container	Thermo-Scientific, Massachusetts (USA)
NanoDrop ND-1000	PEQLAB, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	neo-Lab, München
PCR-Master Cyclers	Eppendorf, Hamburg
PCR-Thermocycler T-1	Biometra®, Göttingen
pH-Meter pH391	WTW, Weilheim
Pipetten Eppendorf/Gilson	Materiallager, Neuherberg
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
Spektralphotometer, Utraspec® 1100 pro	Amersham Biosciences, Amersham (UK)

Produkt	Firma, Firmensitz
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, Massachusetts (USA)
UV-Transluminator, 302 nm / 365 nm	Synoptics Cambridge (UK)
UV-Transluminator, 366 nm	Bachofen, Reutlingen
Wasserbad	Memmert, Schwabbach
XCell II™ Blot Module	Invitrogen, Karlsruhe
XCell SureLock™ Mini-Cell	Invitrogen, Karlsruhe
Zellsortierer, FACS® Aria III	BD, Heidelberg
Zentrifuge Eppendorf Minispin	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge IEC 6000B	ICE, Bedfordshire (UK)
Zentrifuge Megafuge2.0	Heraeus, München

Tab. 2.2: Verbrauchsmaterial

Produkt	Firma, Firmensitz
1,5 ml -Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Einmalpipetten, 5-/10-/25-ml	Greiner, München
Einmalspritzen, 1-/10-/50-ml	BD, Heidelberg
Eismaschine	Scottsman, Mailand (Italien)
Elektroporationsküvetten, 01-/0,4-cm	Bio-Rad, München
FACS™ Röhrchen	Peske OHG, Aindling
Falcon-Röhrchen, 15-/50-ml	BD, Heidelberg
Filterpapier	Materiallager, Neuherberg
Kryo-Röhrchen, 1,8-ml	Nunc, Wiesbaden
Kulturplatten, 24-/48-Loch, Flachboden	BD, Heidelberg
Kulturplatten, 6-/96-Loch, Flachboden	TPP, Trasadingen (Schweiz)
Kulturblock, 96-Tiefloch	Nunc, Wiesbaden
Kulturplatten, 96-Loch, Rundboden	TPP, Trasadingen (Schweiz)
Nitrilhandschuhe	Semperit, Wien (Österreich)
Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 Well	Nunc, Wiesbaden
Nunclon™ Δ Surface Zellkulturflaschen	Thermo-Scientific, Massachusetts (USA)
NuPAGE® Novex Bis-Tris Gels	Invitrogen, Karlsruhe
Pasteurpipetten	Peske OHG, München
PE Folie, selbstklebend	Macherey-Nagel, Düren
Petrischalen (Falcon)	BD, Heidelberg
Pipettenspitzen Eppendorf/Greiner	Materiallager, Neuherberg
Pipettenspitzen, gestopft	Starlab, Ahrensberg
Transfermembran, Hybond	Amersham Bioscience, Amersham (UK)
Zellfilter	BD, Heidelberg
Zellkulturflaschen (25 cm ² und 175 cm ²)	BD, Heidelberg

Produkt	Firma, Firmensitz
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Greiner, München
Zellkulturflaschen (Nunclon™ 25cm ² und 80cm ²)	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatten (35 ml, Nunclon™ 150 x 20)	Nunc, Wiesbaden

2.2 Enzyme, Zytokine und sonstige Reagenzien

Tab. 2.3: Restriktionsenzyme

Produkt	Firma, Firmensitz
<i>Acl</i>	New England BioLabs, Frankfurt/Main
<i>CviI</i>	New England BioLabs, Frankfurt/Main
<i>Eco47II</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>EcoRI</i>	New England BioLabs, Frankfurt/Main
<i>HindIII</i>	New England BioLabs, Frankfurt/Main
<i>KpnI</i>	New England BioLabs, Frankfurt/Main
<i>MnI</i>	New England BioLabs, Frankfurt/Main
<i>MscI</i>	New England BioLabs, Frankfurt/Main
<i>SnaBI</i>	New England BioLabs, Frankfurt/Main
<i>SpeI</i>	New England BioLabs, Frankfurt/Main
<i>XbaI</i>	New England BioLabs, Frankfurt/Main

Tab. 2.4: Zytokine und TLR-Liganden

Produkt	Firma, Firmensitz
GM-CSF, human	Berlex, Seattle (USA)
Interferon- γ (IFN- γ), human	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
Interleukin-1 β (IL-1 β), human	R&D Systems, Wiesbaden
Interleukin-2 (IL-2), human	Chiron Behring, Marburg
Interleukin-4 (IL-4), human	R&D Systems, Wiesbaden
Interleukin-6 (IL-6), human	R&D Systems, Wiesbaden
Interleukin-7 (IL-7), human	Rockland, Pennsylvania (USA)
Poly(I:C) (Hiltonol)	InvivoGen, San Diego
Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
R848	InvivoGen, San Diego
Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), human	R&D Systems, Wiesbaden

Tab. 2.5: Enzyme und sonstige Reagenzien

Produkt	Firma, Firmensitz
1-Brom-3-Chloropropan	Merck, Darmstadt
Agar, SELECT Agar [®]	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose, Ultra Pure	Invitrogen, Karlsruhe
AIM V Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe
BenchMark™ His-tagged Protein Standard	Invitrogen, Karlsruhe
Bi-destilliertes Wasser	neo-Lab, München
CFSE (Vybrant CFDA SE Cell Tracer)	Invitrogen, Karlsruhe
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Steinheim
CIP, Alkalische Phosphatase	Fermentas, St. Leon-Rot
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma, Deisenhofen
DEPC (Diethyl-Pyrocbonat)	Sigma, Deisenhofen
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
DNS-Autragspuffer (6x)	Invitrogen, Karlsruhe
DNS-Oligonukleotide	Sigma-Aldrich, St- Louis (USA)
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Deisenhofen
EDTA [0,5 M]	Applied Biosystems, Darmstadt
Einfriermedium, ibidi Freezing Medium	Ibidi, Planegg/Martinsried
Entwicklerflüssigkeit, Euromed	neo-Lab, München
Ethanol (absolut)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid, 10mg/ml	Merck, Darmstadt
FACS™ Flow und Rinse	BD, Heidelberg
FKS (Fötale Kälberserum)	Invitrogen, Karlsruhe
Ficoll [®]	Biochrom, Berlin
Fixierer, Euromed	neo-Lab, München
Fungizone [®] Antimykotikum (Amphotericin B)	Invitrogen, Karlsruhe
GeneRuler™ 1kb plus DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 100 bp plus DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Glukose	Braun, Melsungen
Glycerin, 87%	Merck, Darmstadt
HCl (Salzsäure)	Merck, Darmstadt
Heparin-Natrium	Braun, Melsungen
HEPES	Invitrogen, Karlsruhe
HS (Humanserum)	IMI, München
Actalbin (Human-Serum-Albumin-Lösung)	Octopharma, Langen
Imidazol	Sigma-Aldrich, Steinheim
IPTG, Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	Fermentas, St. Leon-Rot
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
LB Broth Base (Miller's LB Broth Base)	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Frema, München
MEM (1x), Non Essential Amino Acids (NEAA)	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt

Produkt	Firma, Firmensitz
MRA, Mycoplasma Removal Agent	MP Biomedicals, Illkirch (Frankreich)
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
NP-40	Fluka, Buchs (Schweiz)
NuPAGE [®] MOPS Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE [®] Novex Bis-Tris Gels	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE [®] LDS Sample Buffer (4X)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE [®] Transfer Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
OptEIA [™] TMB Substrate	BD, Heidelberg
OptiMEM I Medium	Invitrogen, Karlsruhe
PBS (very low endotoxin, VLE)	Biochrome AG, Berlin
PCR Master Mix	Promega, Mannheim
PEI, Polyethylenimin	Sigma-Aldrich, Steinheim
PFA, Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
PHA, Purified Phytohaemagglutinin	Remel, Dartford (UK)
PI, Propidiumjodid	ICN, Eschwege
RiboRuler [™] High Range RNA Ladder	Thermo-Scientific, Massachusetts (USA)
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI (very low endotoxin, VLE)	Biochrome AG, Berlin
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Pierce Biotechnology, Rockford (USA)
SeeBlue [®] Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, Karlsruhe
S.O.C.-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
T4-Ligase	New England BioLabs, Frankfurt/Main
T4-Polymerase	New England BioLabs, Frankfurt/Main
TAE (Tris Acetat EDTA) Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Tetracyclin	Merck, Darmstadt
TRI-Reagent [®]	Molecular Research Center, Cincinnati (USA)
Tris, Hydroxymethyl-Aminomethan	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA (10x)	Promega, Mannheim
Tween 20	ICN, Eschwege
Urea	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.3 Kommerzielle Analysesysteme

Tab. 2.6: Kommerzielle Analysesysteme

Produkt	Firma, Firmensitz
BD [®] CompBeads Anti-Mouse Ig, κ Set	BD, Heidelberg
CellTrace Violet Kit	Invitrogen, Karlsruhe
First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche Diagnostics, Mannheim
JETstar Plasmid Purification Maxi Kit	Genomed, Löhne
mMESSAGE mMACHINE™ T7 Kit	Ambion, Corston (UK)
OptEIA™ Human GM-CSF ELISA Set	BD Biosciences
OptEIA™ Human IFN-γ ELISA Set	BD Biosciences
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick [®] Reaction Cleanup Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Pierce [®] BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology Rockford (USA)
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent	Perkin Elmar, Waltham (USA)

2.4 Kulturmedien

Tab. 2.7: Kulturmedien

Medium	Zusammensetzung	Konzentration
293T-Zell-Medium	D-MEM	
	FKS	10 %
	L-Glutamin	2 mM
	Natriumpyruvat	1 mM
	Amphotericin B (Fungizone [®])	1,2 µg/ml
	Gentamycin	70 µg/ml
DC-Medium	RPMI 1640	
	Humanserum	1,5 %
LB-Medium	LB Broth Base (Miller's)	25 g/l
LB-Agar-Medium	LB-Medium	
	Agar	15 g/l
LCL-Medium	RPMI 1640	
	FKS	10 %
	MEM Nichtessentielle Aminosäuren	1x
	L-Glutamin	2 mM
	Natriumpyruvat	1 mM
	Amphotericin B (Fungizone [®])	1,2 µg/ml
	Gentamycin	70 µg/ml
SOB-Medium	Trypton	20 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	0,5 g/l
	MgCl ₂	10 mM
	MgSO ₄	10 mM

Medium	Zusammensetzung	Konzentration
SOC-Medium	SOB-Medium Glucose, steril gefiltert	2 g/l
T-Zell-Medium	AIM V Humanserum HEPES (1 M) L-Glutamin (200 mM) Natriumpyruvat (100 mM) Amphotericin B (Fungizone®) Gentamycin	10 % 10 mM 2 mM 1 mM 1,2 µg/ml 70 µg/ml
Trypsin/EDTA	PBS Trypsin/EDTA (10x)	10 %
Waschmedium	RPMI 1640	

2.5 Puffer und Lösungen

Tab. 2.8: Puffer und Lösungen

Medium	Zusammensetzung	Konzentration
1% Milchpulverlösung (ELISA)	PBS Milchpulver	1 %
1% Milchpulverlösung (Western Blot)	TBST Milchpulver	1 %
5% Milchpulverlösung (Western Blot)	TBST Milchpulver	5 %
DEPC-Wasser (autoklaviert)	DEPC	0,1 %
ELISA-Beschichtungspuffer (pH 9,5)	NaHCO ₃ Na ₂ CO ₃	8,4 g/l 3,56 g/l
ELISA-Waschpuffer	PBS Tween20	0,05 %
Elutions-Puffer (pH 5)	Imidazol	0,5 M
FACS-Puffer	PBS FKS (Fötale Kälberserum)	1 %
SDS-PAGE Laufpuffer	20x NuPAGE MOPS SDS Buffer	5 %
TBS (10x) (pH 8)	Tris Base NaCl	30 g/l 111 g/l
TBST	TBS (10x) Tween20	10 % 0,5 ml/l

Medium	Zusammensetzung	Konzentration
Urea-Lysepuffer (pH 8)	Urea	480 g/l
	Tris	1,23 g/l
	NaH ₂ PO ₄	13,8 g/l
	Tween20	0,5 ml/l
	Imidazol	1,63 g/l
Western Blot Transferpuffer	H ₂ O dest.	
	NuPAGE Transfer Buffer	5 %
	Methanol	20 %

2.6 Zelllinien und Bakterien

Tab. 2.9: Verwendete Zellen und Bakterien

Zellen	Charakteristika	Quelle	Referenz
<i>E. coli</i> XL1 Blue MRF'	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10 TetR</i>] Tetracyclin-Resistenz	Stratagene	
HEK 293T	Embryonale Nierenzelllinie, Transfomiert durch Teile des Humen-Adenovirus-5-Genoms, exprimieren SV40 large T-Antigen	Invitrogen	(Graham <i>et al.</i> , 1977)
LCL #7 ²	EBV transformiert B-Zellen (Überstand Wirtszelllinie B95-8)	J. Mautner	
LCL Ata ²	EBV transformiert B-Zellen (Überstand Wirtszelllinie B95-8)	J. Mautner	
LCL GB	EBV transformiert B-Zellen (Überstand Wirtszelllinie B95-8)	J. Mautner	
LCL LeS ²	EBV transformiert B-Zellen (Überstand Wirtszelllinie B95-8)	J. Mautner	
LCL TK ²	EBV transformiert B-Zellen (Überstand Wirtszelllinie B95-8)	J. Mautner	
LCL UB ²	EBV transformiert B-Zellen (Überstand Wirtszelllinie B95-8)	J. Mautner	
mLCL BW ²	Mini-EBV transformiert B-Zellen (Überstand EBV-Pack-Zelllinie)	S. Milošević	
mLCL EMT ^{1,2}	Mini-EBV transformiert B-Zellen (Überstand EBV-Pack-Zelllinie)	diese Arbeit	
mLCL ME ^{1,2}	Mini-EBV transformiert B-Zellen (Überstand EBV-Pack-Zelllinie)	diese Arbeit	
mLCL MRE ^{1,2}	Mini-EBV transformiert B-Zellen (Überstand EBV-Pack-Zelllinie)	diese Arbeit	

Zellen	Charakteristika	Quelle	Referenz
mLCL VT ^{1,2}	Mini-EBV transformiert B-Zellen (Überstand EBV-Pack-Zelllinie)	diese Arbeit	
T2	Hybrid einer T- sowie B-lymphoblastoiden Zelllinie, TAP-defizient, HLA-A2*01:01-positiv	C. Wehner	(Salter <i>et al.</i> , 1985)
T-Zell-Klon 3H10	CD4 ⁺ , EBNA-3C-spezifisch (AS 628-641, VVRMFMRRERQLPQS), HLA-DRB1*11:01-restringiert	J. Mautner	
T-Zell-Klon G11-3	CD4 ⁺ , BNRF1-spezifisch /AS 1238-1252, TDAWRFAMNYPRNPT), HLA-DRB1*15:01-restringiert	S. Milošević	
T-Zell-Klon IVSB	CD8 ⁺ , Tyrosinase-spezifisch (AS 369-377, YMDGTMSQV), HLA-A*02:01-restringiert	T. Wölfel	

¹ Siehe Methoden, Abschnitt 3.1.4

² HLA-Typisierung siehe Tab. 8.3

2.7 Plasmide, Primer und Oligonukleotide

Tab. 2.10: Plasmide

Plasmid	Eigenschaften / Verwendung	Resistenz	Quelle
pCMV-GFP-cHis	Expressionvektor, CMV-Promotor, Super GFP, cHis ₆ -Marker, BGHpolyA, SV40 ori	Ampicillin	S. Milošević
pCMV-GAGE-1-cHis	Expressionvektor, CMV Promotor, cHis ₆ -Marker, BGHpolyA, SV40 ori	Ampicillin	S. Milošević
pCMV-MAGE-A4-cHis	Expressionvektor, CMV Promotor, cHis ₆ -Marker, BGHpolyA, SV40 ori	Ampicillin	S. Milošević
pCMV-NY-ESO1cHis	Expressionvektor, CMV Promotor, cHis ₆ -Marker, BGHpolyA, SV40 ori	Ampicillin	S. Milošević
pCMV-SSX4-cHis	Expressionvektor, CMV Promotor, cHis ₆ -Marker, BGHpolyA, SV40 ori	Ampicillin	S. Milošević
pCMV-XAGE-1-cHis	Expressionvektor, CMV Promotor, cHis ₆ -Marker, BGHpolyA, SV40 ori	Ampicillin	S. Milošević
pGEM-A120 ¹	T7-Promotor, polyA ₁₂₀ -Abschnitt	Ampicillin	S. Milošević
pGEM-eGFP-A120	T7-Promotor, polyA ₁₂₀ -Abschnitt, eGFP-cDNS	Ampicillin	S. Milošević
pGEM-BNRF1(1kb)-A120 ¹	T7-Promotor, polyA ₁₂₀ -Abschnitt, BNRF1(1kb; AS 1021-1318)-cDNS	Ampicillin	diese Arbeit
pGEM-EBNA-3C(1kb)-A120 ¹	T7-Promotor, polyA ₁₂₀ -Abschnitt, EBNA-3C(1kb; AS 421-780)-cDNS	Ampicillin	diese Arbeit
pGEM-Tyrosinase-A120 ¹	T7-Promotor, polyA ₁₂₀ -Abschnitt, Tyrosinase(YMD-Variante)-cDNS	Ampicillin	diese Arbeit

pGEM-GAGE-1-A120	T7-Promotor, polyA ₁₂₀ -Abschnitt, GAGE-1-cDNS	Ampicillin	C. Wehner
pGEM-MAGE-A4-A120	T7-Promotor, polyA ₁₂₀ -Abschnitt, MAGE-A4-cDNS	Ampicillin	C. Wehner
pGEM-NY-ESO1-A120	T7-Promotor, polyA ₁₂₀ -Abschnitt, NY-ESO1-cDNS	Ampicillin	C. Wehner
pGEM-SSX4-A120	T7-Promotor, polyA ₁₂₀ -Abschnitt, SSX4-cDNS	Ampicillin	C. Wehner
pGEM-XAGE-1-A120	T7-Promotor, polyA ₁₂₀ -Abschnitt, XAGE-1-cDNS	Ampicillin	C. Wehner
pGEM-CrossTAg-A120 ¹	T7-Promotor, polyA ₁₂₀ -Abschnitt, LAMP1-ER-Translokationssignal, DC-LAMP-Transmembran- und Zytoplasma-Domäne	Ampicillin	diese Arbeit
pGEM-3H10-IVSB (Epitope)-CrossTAg-A120 ¹	T7-Promotor, polyA ₁₂₀ -Abschnitt, LAMP1-ER-Translokationssignal, DC-LAMP-Transmembran- und Zytoplasma-Domäne, 3H10-Epitop (EBNA-3C, AS 628-641)-cDNS, IVSB-Epitop (Tyrosinase, AS 369-377)-cDNS	Ampicillin	diese Arbeit
pGEM-G11-3(Epitop)-CrossTAg-A120 ¹	T7-Promotor, polyA ₁₂₀ -Abschnitt, LAMP1-ER-Translokationssignal, DC-LAMP-Transmembran- und Zytoplasma-Domäne, G11-3-Epitop (BNRF1, AS 1238-1252)-cDNS	Ampicillin	diese Arbeit
pGEM-BNRF1(1kb)-CrossTAg-A120 ¹	T7-Promotor, polyA ₁₂₀ -Abschnitt, LAMP1-ER-Translokationssignal, DC-LAMP-Transmembran- und Zytoplasma-Domäne, BNRF1(1kb; AS 1021-1318)-cDNS	Ampicillin	diese Arbeit
pGEM-EBNA-3C(1kb)-CrossTAg-A120 ¹	T7-Promotor, polyA ₁₂₀ -Abschnitt, LAMP1-ER-Translokationssignal, DC-LAMP-Transmembran- und Zytoplasma-Domäne, EBNA-3C(1kb; AS 421-780)-cDNS	Ampicillin	diese Arbeit
pGEM-Tyrosinase-CrossTAg-A120 ¹	T7-Promotor, polyA ₁₂₀ -Abschnitt, LAMP1-ER-Translokationssignal, DC-LAMP-Transmembran- und Zytoplasma-Domäne, Tyrosinase(YMD-Variante)-cDNS	Ampicillin	diese Arbeit
pGEM-GAGE-1-CrossTAg-A120 ¹	T7-Promotor, polyA ₁₂₀ -Abschnitt, LAMP1-ER-Translokationssignal, DC-LAMP-Transmembran- und Zytoplasma-Domäne, GAGE-1-cDNS	Ampicillin	diese Arbeit
pGEM-MAGE-A4-CrossTAg-A120 ¹	T7-Promotor, polyA ₁₂₀ -Abschnitt, LAMP1-ER-Translokationssignal, DC-LAMP-Transmembran- und Zytoplasma-Domäne, MAGE-A4-cDNS	Ampicillin	diese Arbeit
pGEM-NY-ESO1-CrossTAg-A120 ¹	T7-Promotor, polyA ₁₂₀ -Abschnitt, LAMP1-ER-Translokationssignal, DC-LAMP-Transmembran- und Zytoplasma-Domäne, NY-ESO1-cDNS	Ampicillin	diese Arbeit
pGEM-SSX4-CrossTAg-A120 ¹	T7-Promotor, polyA ₁₂₀ -Abschnitt, LAMP1-ER-Translokationssignal, DC-LAMP-Transmembran- und Zytoplasma-Domäne, SSX4-cDNS	Ampicillin	diese Arbeit
pGEM-XAGE-1-CrossTAg-A120 ¹	T7-Promotor, polyA ₁₂₀ -Abschnitt, LAMP1-ER-Translokationssignal, DC-LAMP-Transmembran- und Zytoplasma-Domäne, XAGE-1-cDNS	Ampicillin	diese Arbeit

¹ Siehe Methoden, Abschnitt 3.2.9 (Abb. 3.1)

Tab. 2.11: Primer

Primer	Sequenz (5' → 3')
Antigenklonierung (pGEM-A120)	
BNRF1(1kb)	5' ATAGGATCC _{BamHI} ATGACAGGAAAGAATCTCAGCCCA 3' ATAGAATTC _{EcoRI} TTACTCGGAGGGGCGACCGT
EBNA-3C(1kb)	5' ATAAAGCTT _{HindI} ATGTGGCCCACGCCCAAGACG 3' ATAGAATTC _{EcoRI} TTACGGCGGCTCCTGGTATCC
LAMP1-EBNA-3C(1kb)	5' ATATCTAGA _{XbaI} CGCCACCATGGCC 3' ATAGAATTC _{EcoRI} TTACGGCGGCTCCTGGTATCC
EBNA-3C(1kb)-DC-LAMP	5' ATATCTAGA _{XbaI} ATGTGGCCCACGCCCAAGA 3' ATAGAATTC _{EcoRI} GTGGCGGCCGCTTT
Tyrosinase	5' ATAGGATCC _{BamHI} ATGCTCCTGGCTGTTTTGTACT 3' ATAGAATTC _{EcoRI} TTATAATGGCTCTGATACAAGT
Antigenklonierung (pGEM-CrossTAg-A120)	
BNRF1(1kb)	5' ATAGCTAGC _{NheI} ACAGGAAAGAATCTCAGCCCA 3' ATACTGCAG _{PstI} CTCGGAGGGGCGACCGTG
EBNA-3C(1kb)	5' ATAGCTAGC _{NheI} ATGTGGCCCACGCCCAAGACG 3' ATAGGTACC _{KpnI} CGGCGGCTCCTGGTATCC
Tyrosinase	5' ATAGCTAGC _{NheI} ATGCTCCTGGCTGTTTTGTACT 3' ATACTGCAG _{PstI} TAAATGGCTCTGATACAAGCTGT
GAGE-1	5' ATAGCTAGC _{NheI} ATGAGTTGGCGAGGAAGATCG 3' ATAGGTACC _{KpnI} AGGTTTCCGTGGGGAAAGATTT
MAGE-A4	5' ATAGCTAGC _{NheI} ATGGTGTCTTCTGAGCAGAAGA 3' ATACTGCAG _{PstI} GACTCCCTCTTCCTCCTCTAA
NY-ESO1	5' ATAGCTAGC _{NheI} ATGCAGGCCGAAGGCCGG 3' ATAGGTACC _{KpnI} GCGCCTCTGCCCTGAGGG
SSX4	5' ATAGCTAGC _{NheI} ATGAACGGAGACGACGCCTTT 3' ATAGGTACC _{KpnI} CTCGTCATCTTCCTCAGGGT
XAGE-1	5' ATAGCTAGC _{NheI} ATGCTCCTTTGGTGCCACC 3' ATAGGTACC _{KpnI} AACTTGTGGTTGCTCTTCACCT
Sequenzierung	
T7 (pGEM-Plasmide)	5' TAATACGACTCACTATAGGG
TZR-Vβ-Repertoire	
P-5'βST	5' AAGCAGAGATCTCCACAC
P-3'βST	3' GAGGTAAGCCACAGTTGCT
P-3'CBII	3' GATGGCTCAAACACAGCGACCTC
Vβ1	5' GCACAACAGTTCCCTGACTTGGCA C
Vβ2	5' TCATCAACCATGCAAGCCTGACCT
Vβ3	5' GTCTCTAGAGAGAAGAAGGAGCGC
Vβ4	5' ACATATGAGAGTGGATTTGTCATT
Vβ5.1	5' ATACTTCAGTGAGACACAGAGAAAC
Vβ5.2	5' TTCCCTAACTATAGCTCTGAGCTG
Vβ6.1	5' GCCCAGAGTTTCTGACTTACTTC
Vβ6.3	5' ACTCTGAAGATCCAGCGCACA
Vβ7	5' CCTGAATGCCCAACAGCTCTC
Vβ8	5' ATTTACTTTAACAACAACGTTCCG

Primer	Sequenz (5' → 3')
Vβ8S3	5' GCTTACTTCCGCAACCGGGCTCCT
Vβ9	5' CCTAAATCTCCAGACAAAGCT
Vβ10	5' CTCCAAAACTCATCCTGTACCTT
Vβ11	5' TCAACAGTCTCCAGAATAAGGACG
Vβ12	5' AAAGGAGAAGTCTCAGAT
Vβ12S3	5' GCAGCTGCTGATATTACAGAT
Vβ13	5' TCGACAAGACCCAGGCATGG
Vβ13.1	5' CAAGGAGAAGTCCCAAT
Vβ13.2	5' GGTGAGGGTACAAGTCC
Vβ13S5	5' AACTGCAGGTACCACTGGCA
Vβ14	5' GTCTCTCGAAAAGAGAAGAGGAAT
Vβ15	5' AGTGTCTCTCGACAGGCACAGGCT
Vβ16	5' AAAGAGTCTAAACAGGATGAGTCC
Vβ17	5' CAGATAGTAAATGACTTTCAG
Vβ18	5' GATGAGTCAGGAATGCCAAAGGAA
Vβ19	5' CAATGCCCAAGAACGCACCCTGC
Vβ20	5' AGCTCTGAGGTGCCCCAGAATCTC
Vβ21	5' AAAGGAGTAGACTCCACTCTC
Vβ22.1	5' CATCTCTAATCACTTATACT
Vβ22.2	5' AAGTGATCTTGCCTGTGTCCCA
Vβ22.3	5' CTCAGAGAAGTCTGAAATATTCG
Vβ23	5' GCAGGGTCCAGGTCAGGACCCCA
Vβ24	5' ATCCAGGAGGCCGAACACTTCT

Degenerierte Primer für TZR-Vβ-Gensegment Familien (Zhou *et al.*, 2006)

CP1	3' GCACCTCCTTCCCATTCAC
VP1	5' GCIITKTIYTGGTAYMGACA (I = Inosin, W = A/T, M = A/C, Y = C/T, K = G/T)
VP2	5' CTITKTWTTGGTAYCIKAG (I = Inosin, W = A/T, M = A/C, Y = C/T, K = G/T)

TZR-Vα-Repertoire

P-5'αST	5' CTGTGCTAGACATGAGGTCT	
P-3'αST	3' CTTGCCTCTGCCGTGAATGT	
3'T-Cα	3' GGTGAATAGGCAGACAGACTTGTCCTGGA	
PANVa1	5' AGAGCCCAGTCTGTGASCCAG	S=C/G
PANVa1.1	5' AGAGCCCAGTCRGTGACCCAG	R=A/G
Vα2	5' GTTTGGAGCCAACRGAAGGAG	
Vα3	5' GGTGAACAGTCAACAGGGAGA	
Vα4	5' TGATGCTAAGACCACMCAGC	
Vα5	5' GGCCCTGAACATTCAGGA	
Vα6	5' GGTACAGCTTCACTGTGGCTA	
Vα7	5' ATGTTTCCATGAAGATGGGAG	
Vα8	5' TGTGGCTGCAGGTGGACT	
Vα9	5' ATCTCAGTGCTTGTGATAATA	
Vα10	5' ACCCAGCTGCTGGAGCAGAGCCCT	
Vα11	5' AGAAAGCAAGGACCAAGTGT	
Vα12	5' CAGAAGGTAACCAAGCGCAGACT	

Primer	Sequenz (5' → 3')
Va13	5' GAGCCAATTCCACGCTGCG
Va14	5' CAGTCTCAACCAGAGATGTC
Va14.1	5' CAGTCCCAGCCAGAGATGTC
Va15	5' GATGTGGAGCAGAGTCTTTTC
Va16	5' TCAGCGGAAGATCAGGTCAAC
Va17	5' GCTTATGAGAACACTGCGT
Va18	5' GCAGCTTCCCTTCCAGCAAT
Va19	5' AGAACCTGACTGCCAGGAA
Va20	5' CATCTCCATGGACTCATATGA
Va21	5' GTGACTATACTAACAGCATGT
Va22	5' TACACAGCCACAGGATACCCCTTCC
Va23	5' TGACACAGATTCTGCAGCTC
Va24	5' GAACTGCACTCTTCAATGC
Va25	5' ATCAGAGTCCTCAATCTATGTTTA
Va26	5' AGAGGGAAAGAATCTCACCATAA
Va27	5' ACCCTCTGTTCCCTGAGCATG
Va28	5' CAAAGCCCTCTATCTCTGGTT
Va29	5' AGGGGAAGATGCTGTCACCA
Va30	5' GAGGGAGAGAGTAGCAGT
Va31	5' TCGGAGGGAGCATCTGTGACTA
Va32	5' CAAATTCCTCAGTACCAGCA

Angegeben sind Sequenz und Verwendungszweck der in dieser Arbeit verwendeten DNS-Primer. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Mit 5' sind alle Sinn-Primer gekennzeichnet, 3' bezieht sich auf den entsprechenden Gegensinn-Primer. Alle Primer sind selbst aus 5' Richtung angegeben. Die Nomenklatur der TZR-Va β -Gensegmentfamilien-spezifischen Primer (5') ist an die Arden-Nomenklatur (Arden *et al.*, 1995) angelehnt. **Fett** markierte Primer dienen als jeweilige interne PCR-Kontrolle. Die Sequenzen der Primer zur TZR-Va β -Ketten-Analyse beziehen sich auf Steinle *et al.* (Steinle *et al.*, 1995).

Tab. 2.12: Oligonukleotide für die Hybridisierung von Doppelstrang-DNS

DNS-Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
3H10-IVSB(Epitope)	5' ATAGCTAGC _{NheI} TTGCACATCTATATGGATGGAACAATGTCCCAGGTACAGG GAGTCGAC _{SalI} CCTCCCGTCGTACGTATGTTTATGAGGGAGCGACAGCTCCC CCAGTCCACCGGCCTGCAG _{PstI} CACGGTACC _{KpnI} TAT
	3' ATAGGTACC _{KpnI} GTGCTGCAG _{PstI} GCCGGTGGACTGGGGGAGCTGTGCTGCC TCATAAACATACGTACGACGGGAGGGTCGAC _{SalI} TCCCTGTACCTGGGACATT GTTCCATCCATATAGATGTGCAAGCTAGC _{NheI} TAT
G11-3(Epitop)	5' ATAGCTAGC _{NheI} AGCAATGGCACGGATGCCTGGCGCTTTGCTATGAATTATC CAAGAAACCCACGGAGCAGGGCGTCGAC _{SalI} CACCTGCAG _{PstI} CACGGTACC _{KpnI} TAT
	3' ATAGGTACC _{KpnI} GTGCTGCAG _{PstI} GTGGTTCGAC _{SalI} GCCCTGCTCCGTGGGGTT TCTTGGATAATTCATAGCAAAGCGCCAGGCATCCGTGCCATTGCTGCTAGC _{NheI} TAT

Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Mit 5' sind alle Sinn-DNS-Oligonukleotide gekennzeichnet, 3' bezieht sich auf das entsprechende Gegensinn-DNS-Oligonukleotid.

2.8 Peptide und Proteine

Tab. 2.13: Peptide und Proteine

Epitope	Sequenz	Quelle
Tyrosinase ₃₆₉₋₃₇₇ ¹	YMDGTMSQV (modifiziert)	Metabion
Proteine	Sequenz / Accession	Quelle
3H10-EGFP	VVRMFMRRERQLPQS ² + AFA52653	J. Mautner
BNRF1	NC_007605	S. Milošević
GAGE-1	AAA82744	diese Arbeit
MAGE-A4	NP_001011550	diese Arbeit
NY-ESO1	CAA05908	diese Arbeit
SSX4	AAC05820	diese Arbeit
XAGE-1	AAG01401	diese Arbeit

¹ IVSB-Epitop (siehe Abschnitt 4.1.2)

² 3H10-Epitop-Sequenz in Fusion mit EGFP-Protein (siehe Abschnitt 4.1.2)

2.9 Antikörper

Tab. 2.14: Antikörper

Spezifität	Kunjugation	Isotyp	Klon	Quelle
CCR7	PE-Cy7	Ratte IgG _{2a}	3D12	BD, Heidelberg
CD3	Pacific Blue	Maus IgG ₁	UCHT1	BD, Heidelberg
CD3	PerCP	Maus IgG ₁	SK7	BD, Heidelberg
CD4	H2450	Maus IgG ₁	RPA-T4	BD, Heidelberg
CD4	PE-Cy7	Maus IgG ₁	SK3	BD, Heidelberg
CD4	PerCP	Maus IgG ₁	VIT4	Miltenyi
CD8	H2500	Maus IgG ₁	RPA-T8	BD, Heidelberg
CD8	PE-Cy7	Maus IgG ₁	RPA-T8	BD, Heidelberg
CD14	FITC	Maus IgG _{2a}	M5E2	BD, Heidelberg
CD19	PE-Cy7	Maus IgG ₁	HIB19	eBioscience
CD40	PE	Maus IgG ₁	5C3	BD, Heidelberg
CD40 ¹	–	Maus IgG ₁		M.Frentsch
CD56	Alexa 700	Maus IgG ₁	B159	BD, Heidelberg
CD80	PE	Maus IgG ₁	L307.4	BD, Heidelberg
CD80	APC-H7	Maus IgG ₁	L307.4	BD, Heidelberg
CD83	FITC	Maus IgG ₁	HB15e	BD, Heidelberg
CD86	FITC	Maus IgG ₁	2331	BD, Heidelberg
CD154 (CD40L)	PE	Maus IgG ₁	TRAP1	BD, Heidelberg
CD209 (DC-SIGN)	FITC	Maus IgG _{2b}	DCN46	BD, Heidelberg
His6-Tag	–	Maus IgG _{2a}		E. Kremmer
HLA-DR	PE	Maus IgG _{2a}	G46-6	BD, Heidelberg
Isotypkontrolle, IgG ₁	PE, FITC	Maus IgG ₁	MOPC21	BD, Heidelberg

Spezifität	Kunjugation	Isotyp	Klon	Quelle
Isotypkontrolle, IgG _{2a}	PE	Maus IgG _{2a}	G155-178	BD, Heidelberg
Maus IgG	HRP ²		Ziege	Jackson ImmunoRes.

¹ CD40-Blockierungs-Antikörper

² Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase)

2.10 Personen

Folgenden Personen wird für die Bereitstellung verschiedener Materialien gedacht:

Mautner, J.	Klinische Kooperationsgruppe (KKG) Pädiatrische Tumorimmunologie, Helmholtz Zentrum München
Milošević, S.	Institut für Molekulare Immunologie (IMI), Helmholtz Zentrum München
Wehner, C.	Institut für Molekulare Immunologie (IMI), Helmholtz Zentrum München
Frentsch, M.	Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies (BCRT), Charité - Universitätsmedizin Berlin
Kremmer, E.	Institut für Molekulare Immunologie (IMI), Helmholtz Zentrum München
Nößner, E.	Institut für Molekulare Immunologie (IMI), Helmholtz Zentrum München
Moosmann, A.	Klinische Kooperationsgruppe (KKG) Immunonkologie, Helmholtz Zentrum München
Wölfel, T.	Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

Die Arbeiten zur Kultivierung eukaryotischer Zellen wurden mithilfe steriler Materialien, Lösungen und Medien unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um Kontaminationen mit Bakterien, Pilzen oder anderen Organismen zu vermeiden. Die Zellen wurden im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.1.1 Generierung von LCL/mLCL-Zelllinien

Der Epstein-Barr-Virus (EBV) besitzt die Fähigkeit humane B-Zellen *in vitro* zu infizieren und damit einhergehend zu immortalisieren. Die EBV-Infektion kann in B-Zellen demnach das Wachstum einer dauerhaften lymphoblastoiden Zelllinie (LCL, von engl. lymphoblastoid cell line) induzieren (Pope *et al.*, 1968). Im Laufe dieser Arbeit wurden PBMC unterschiedlicher Spender mithilfe des EBV-enthaltenden Überstands der Wirtszelllinie B95-8 (periphere Blutlymphozyten des Krallenaffen) transformiert (Farrell, 2001; Miller und Lipman, 1973). Der entsprechende Ansatz für die Vertiefung einer 96-Loch-Platte (Nunc) setzte sich wie folgt zusammen: 5·10⁵ PBMC in 100 µl LCL-Medium (Tab. 2.7), 100 µl EBV-Überstand und 1 µg/ml Cyclosporin A. Durch die Blockierung der Calcineurin-Aktivität, eines Schlüsselenzyms in der T-Zell-Aktivierung, inhibiert Cyclosporin A (CSA) die Genexpression verschiedener Zytokine sowie deren Rezeptoren und führt somit zum Absterben der zellulären Bestandteile des Immunsystems (Mascarell und Truffa-Bachi, 2003). Entgegen dieser Wirkung übt CSA aber einen direkt unterstützenden Effekt auf die EBV-Transformation humaner B-Lymphozyten und deren weiterer Entwicklung aus (Chen *et al.*, 2009; Walz *et al.*, 1990). Demnach ist es nur EBV-transformierten B-Zellen möglich trotz CSA-Selektion in der Zellkultur zu überleben.

Ein zur Generierung Mini-EBV-transformierter B-Zellen verwendeter, gentechnisch veränderter EBV-Stamm ist noch immer in der Lage, B-Lymphozyten zu infizieren und in sogenannte Mini-LCL (mLCL, engl. mini lymphoblastoid cell line) zu transformieren, ist aber durch Deletion der meisten lytischen Gene nicht mehr fähig, in den lytischen Zyklus überzugehen (Moosmann *et al.*, 2002; Kempkes *et al.*, 1995). Eine EBV-Pack-Zelllinie ermöglicht es, das Transformations-kompetente, Replikations-defiziente Mini-

EBV Genom in einer Virionform zu generieren, ohne Kontamination durch einen Helfer-Virus in Kauf nehmen zu müssen. Die so erhaltenen Zellen sind selbstständig dazu befähigt, B-Zellen zu infizieren und zu immortalisieren (Delecluse *et al.*, 1999). PBMC wurden analog der LCL-Prozedur unter Einsatz des Überstands der Pack-Zelllinie durch Mini-EBV transformiert und mittels CSA selektiert. Alle benötigten Überstände wurde durch Andreas Moosmann (Helmholtz Zentrum München) zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Kultivierung von LCL/mLCL-Zelllinien

LCL und Mini-LCL (mLCL) wurden in LCL-Medium (Tab. 2.7) in aufrecht gelagerten 25 cm² (10 ml Medieuminsatz) oder 75 cm² (40 ml Medieuminsatz) Zellkulturflaschen (BD) im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert und expandiert. Die Zellen wuchsen nicht-adhärenent. Das Wachstum wurde optisch verfolgt und soweit nötig Medium aus dem Überstand abgenommen und durch ein äquivalentes Volumen frischen Mediums ersetzt. Je nach Wachstum wurden die Zellen nach 4 bis 6 Tagen resuspendiert, der Inhalt einer Kulturflasche 1:2 verdünnt (LCL-Medium) und auf zwei sterile Zellkulturflaschen verteilt. Zum Ernten wurden LCL/mLCL-Zellen durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert, in einem Falcon-Sammelgefäß für fünf Minuten bei 470·g zentrifugiert und in einem geeigneten Volumen Medium oder Puffer aufgenommen.

3.1.3 Kultivierung etablierter T-Zellklone

Zellen etablierter T-Zell-Klone wurden anhand eines 14-tägigen Expansionsprotokolls zyklisch restimuliert. Am Ende eines jeden Stimulationszyklus wurden die entsprechenden T-Zellen geerntet und je nach Volumen in 15-ml- bzw. 50-ml-Reaktionsgefäßen (BD) durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 470·g sedimentiert. Der Kulturüberstand wurde restlos verworfen. Im Anschluss wurden je 1·10⁶ T-Zellen in 2 ml frischem T-Zell-Medium (Tab. 2.7) inklusive Restimulationsgemisch aufgenommen und in die Vertiefung einer 24-Loch-Flachboden-Kulturplatte (BD) überführt. Das Restimulationsgemisch enthielt 1·10⁶ Zellen einer Mischung dreier unterschiedlicher Spender-PBL (bestrahlt mit 55 Gy, Bestrahlungsanlage ¹³⁷Cs, HWM-D-2000 Gammacell), 1·10⁵ Antigenbeladene APZ, 250 ng/ml PHA und 20U IL-2/ml T-Zell-Medium. Für CD8⁺ T-Zellen des Klons IVSB (Tyrosinase-spezifisch, HLA-A*02:01-restringiert) dienten YMD-Peptid (Tyrosinase, AS 369-377, YMDGTMSQV)-beladene T2-Zellen (HLA-A*02:01-positiv, be-

strahlt mit 100 Gy) als Antigen-beladene APZ. Der CD4⁺ T-Zell-Klon 3H10 (EBNA-3C-spezifisch, HLA-DRB1*11:01-restringiert) wurde durch Zugabe von EBNA-3C-positiven LCL des autologen Spenders (bestrahlt mit 100 Gy) Antigen-spezifisch restimuliert. Zur Restimulation des CD4⁺ T-Zell-Klons G11-3 (BNRF1-spezifisch; HLA-DRB1*15:01-restringiert) dienten wiederum Protein-beladene mLCL eines HLA-DRB1*15:01-positiven Spenders (bestrahlt mit 100 Gy). Drei Tage nach Restimulation wurde der PHA-haltige Kulturüberstand möglichst rückstandslos entfernt und durch 2ml frisches T-Zell-Medium (inkl. 20U IL-2/ml Medium) ersetzt. Die proliferierenden T-Zellen einer 24-Loch-Vertiefung wurden nachfolgend je nach Wachstum auf mehrere Vertiefungen aufgeteilt und durch regelmäßige IL-2-Zugabe (alle 2 Tage) in Kultur gehalten.

3.1.4 Anreicherung von PBMC aus Frischblut

Die Anreicherung von mononukleären Zellen aus Frischblut erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation mithilfe des synthetischen Copolymers Ficoll (Biochrome). Heparinisiertes Spenderblut wurde hierzu im Verhältnis 1:2 mit sterilem PBS (low endotoxin, Biochrom AG) vermischt. Je 35 ml dieser Suspension wurden in einem 50-ml-Falcon-Reaktionsgefäß vorsichtig über 15 ml Ficoll geschichtet und für 30 Minuten bei 840·g ohne Bremse zentrifugiert. Im Anschluss wurden 15 ml der obersten Phase verworfen und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Nach Abschluss der Zentrifugation wurden jeweils zwei Interphaseringe gesammelt und mit sterilem PBS auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde für 10 Minuten bei 470·g zentrifugiert. Nachfolgend wurden je zwei Pellets vereinigt, wiederum mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 470·g für weitere 10 Minuten zentrifugiert. Nach erneuter Vereinigung zweier Pellets wurden diese in jeweils 40 ml Waschlösung (PBS + 0,5% Humanserum) resuspendiert. Im Anschluss an die Zentrifugation ohne Bremse für 15 Minuten bei 130·g wurde der Überstand restlos verworfen. Das so gewonnene Pellet wurde in 15 ml DZ-Medium oder T-Zell-Medium resuspendiert und die enthaltene Zellzahl bestimmt.

3.1.5 Generierung Dendritischer Zellen (DZ)

Zur Anreicherung von Monozyten mithilfe der Plastikadhärenz wurden in DZ-Medium resuspendierte PBMC aus Abschnitt 3.1.7 auf eine Zellzahl von $15 \cdot 10^6$ Zellen pro ml Medium eingestellt. In eine „80 cm²-Nunclon™ Δ Surface“-Zellkulturflasche (Thermo Scientific) wurden 10 ml DZ-Medium vorgelegt und in der Flasche durch leichtes Schwenken mit 5 ml PBMC-Suspension gemischt ($\sim 75 \cdot 10^6$ Zellen pro Flasche). Im An-

schluss wurde die Zellkulturflasche liegend für 25 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Flascheninhalt durch kurzes Schwenken erneut gemischt und für weitere 25 Minuten bei 37°C liegend inkubiert. Nach somit insgesamt 50 Minuten wurde der Überstand der Zellkultur gesammelt (enthält PBL) und die am Flaschenboden adhärenen Zellen durch Schwenken zweimal mit 10 ml frischem DZ-Medium gewaschen. Abschließend wurde das nahezu rückstandslos entnommene Medium durch 15 ml frisches DZ-Medium substituiert und die Monozyten-Differenzierung zu unreifen iDZ (von engl. immature) durch Zugabe von IL-4 (20 ng/ml) und GM-CSF (100 ng/ml) initiiert. Zur Ausreifung der iDZ zu reifen mDZ (von engl. mature) wurde abschließend ein Maturierungs-Cocktail ins Kulturmedium zugegeben (siehe Tab. 3.1). Nach Abschluss des Reifeprozesses wurden die somit erhaltenen mDZ aus den Flaschen geerntet und geeignet weiterverarbeitet.

Tab. 3.1: Zytokinzugabe und Maturierungs-Cocktails für die Generierung von mDZ

	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3		
3d-mDZ^a	20 ng/ml IL-4		20 ng/ml IL-4	ernten nach 24 h		
	100 ng/ml GM-CSF		100 ng/ml GM-CSF			
			10 ng/ml IL-1 β			
			10 ng/ml TNF- α			
			5000 U/ml IFN- γ			
			1 μ g/ml R848 ^c			
		250 ng/ml PGE2				
		20 ng/ml poly(I:C)				
	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 6	Tag 7
7d-mDZ^b		20 ng/ml IL-4		20 ng/ml IL-4	20 ng/ml IL-4	ernten nach 24 h
		100 ng/ml GM-CSF		100 ng/ml GM-CSF	100 ng/ml GM-CSF	
					15 ng/ml IL-6	
					10 ng/ml IL-1 β	
					10 ng/ml TNF- α	
				1 μ g/ml PGE2		

^a 3-Tage-mDZ generiert nach verkürztem Protokoll unter Verwendung des 5-Komponenten-Cocktails + R848 (Spranger *et al.*, 2010)

^b 7-Tage-mDZ generiert nach Jonuleit *et al.* (Jonuleit *et al.*, 1997)

^c TLR7/8-Ligand

3.1.6 *Ivt*-mRNS-Transfektion von DZ und LCL/mLCL

Die Elektroporation von DZ und LCL/mLCL mit *ivt*-mRNS wurde mithilfe des „Gene Pulser Xcell™“ (Biorad) in 0,4-cm-Elektroporations-Küvetten (Biorad) durchgeführt. Hierfür wurden die zu transfizierenden Zellen mit kaltem RPMI 1640 (very low endotoxin, Biochrom AG) gewaschen und durch Zentrifugation bei 470·g sedimentiert.

Das Pellet wurde in kaltem RPMI resuspendiert und auf eine Zellzahl von 2 bis $3 \cdot 10^6$ Zellen pro 200 μl RPMI eingestellt. Nach Zugabe der *ivt*-mRNS (15 – 30 μg / 200 μl) wurden 200 μl Zellsuspension in eine Elektroporations-Küvette transferiert und für etwa 2 Minuten auf Eis gekühlt. DZ wurden unter Verwendung des exponentiellen Protokolls mit entweder 300 V, 300 μF (3-Tage-mDZ) oder 250 V, 150 μF (7-Tage-mDZ) elektroporiert. LCL/mLCL wurden mit 300 V, 150 μF (exponentielles Protokoll) elektroporiert. Unmittelbar nach Abschluss des Elektroporationsprozesses wurden die jeweiligen Zellen in die Vertiefung einer 6-Loch-Flachboden-Kulturplatte (Nunc) mit 6 ml vorgewärmten DZ- oder LCL-Medium transferiert und im Brutschrank inkubiert.

3.1.7 Koinkubation von DZ oder LCL/mLCL mit Proteinen

Zur Antigen-Beladung von DZ und LCL/mLCL mithilfe rekombinant exprimierter Proteine wurden die jeweils benötigten Zellen durch Zentrifugation in einem 15-ml-Reaktionsgefäß (BD) sedimentiert und in frischem Medium resuspendiert ($1 \cdot 10^6$ Zellen/ml). Die erhaltene Zellsuspension wurde in die Vertiefung einer 24-Loch-Flachboden-Kulturplatte (2 ml Endvolumen) überführt und durch Zugabe ins Kulturmedium mit der jeweils gewünschten Menge an Protein versetzt. Bis zu ihrem Gebrauch wurden die Zellen umgehend nach Proteinzugabe in den Brutschrank transferiert.

3.1.8 *De-novo*-Induktion naiver CD4^+ T-Zellen

Zur *De-novo*-Induktion naiver CD4^+ T-Zellen wurden 3-Tage-mDZ wie in Abschnitt 3.1.8 aus Monozyten generiert und nach Ablauf der 24-stündigen Maturierungsphase, wie in Abschnitt 3.1.9 beschrieben, in Teilpopulationen mit 24 μg einzelner Antigen-CrossTag-*ivt*-mRNS-Spezies (GAGE-1, MAGE-A4, NY-ESO1, SSX4, XAGE-1) transfiziert. Zur Kontrolle der Elektroporationseffizienz wurde eine weitere mDZ-Teilpopulation mit GFP-*ivt*-mRNS transfiziert. Fünf Stunden nach Elektroporation wurden die Antigen-CrossTag-*ivt*-mRNS-transfizierten mDZ geerntet und zu gleichen Teilen gemischt. Im Anschluss daran wurden pro Vertiefung einer 24-Loch-Flachboden-Kulturplatte jeweils $0,5 \cdot 10^6$ Zellen der mDZ-Mischpopulation in die Kokultur mit $1 \cdot 10^6$ kryopräservierten PBL des autologen Spenders eingesetzt (2 ml T-Zell-Medium; 20 U IL-2/ml und 5 ng IL-7/ml). Überzählige mDZ-Aliquots wurden für die spätere Verwendung zur ersten bzw. zweiten Restimulation der *De-novo*-Induktionskultur kryopräserviert (Einfriermedium: 16,5% Humanserum-Albumin, 10% DMSO, 5% Glukose in RPMI

1640). Die mDZ-PBL-Population wurde nachfolgend unter regelmäßiger Zugabe von IL-2 und IL-7 in Kultur gehalten (alle zwei Tage 20 U IL-2/ml und 5 ng IL-7/ml) und zyklisch alle 14 Tage durch Kokultur mit kryopräservierten Zellen der mDZ-Mischpopulation (Verhältnis 2:1) restimuliert. Wann immer notwendig wurden Zellen einer Vertiefung im Verhältnis 1:2 aufgeteilt und fehlendes Medium auf 2 ml pro Vertiefung ergänzt. 6 Stunden nach Beginn des dritten Stimulationszyklus wurden CD154-positive CD4⁺ T-Zellen, wie in Abschnitt 3.4.4 beschrieben, am Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer (FACS Aria III, BD) sortiert und separat weiterkultiviert.

3.1.9 Kultivierung sortierter CD4⁺ T-Zellen

Die CD154-CD4-doppeltpositiven T-Zellen wurden zyklisch alle 14 Tage durch Kokultur mit 200 µl eines T-Zell-Stimulationsgemisches pro 96-Loch-Vertiefung restimuliert. Das Stimulationsgemisch enthielt $2 \cdot 10^3$ Zellen einer Mischung unterschiedlich Antigen-CrossTAG-*ivt*-mRNS-transfizierter mLCL des autologen Spenders (GAGE-1, MAGE-A4, NY-ESO1, SSX4, XAGE-1; bestrahlt mit 100 Gy, Bestrahlungsanlage ¹³⁷Cs, HWM-D-2000, Gammacell) und $3 \cdot 10^4$ Zellen einer Mischung dreier unterschiedlicher Spender-PBL (bestrahlt mit 55 Gy) pro 200 µl T-Zell-Medium sowie 250 ng/ml PHA und 20 U IL-2/ml. Drei Tage nach Klonierung wurde das PHA-haltige Kulturmedium möglichst vollständig abgenommen und durch frisches T-Zell-Medium (inklusive 20 U IL-2/ml) ersetzt. Wann immer notwendig wurden Zellen einer Vertiefung im Verhältnis 1:2 aufgeteilt und fehlendes Medium ergänzt. Waren zum Zeitpunkt der Restimulation zwei oder mehr 96-Loch-Vertiefungen mit Zellen eines T-Zell-Klons belegt, wurden diese nachfolgend zusammengelegt und in 48-Loch-Flachboden-Kulturplatten weiterkultiviert ($5 \cdot 10^4$ Zellen der APZ-Mischung, $5 \cdot 10^5$ Zellen der gemischten Spender-PBL pro 1 ml T-Zell-Medium, 250 ng/ml PHA und 20 U IL-2/ml). Wiederum zwei vollständig belegte Vertiefungen der 48-Loch-Kulturplatte wurden in der Vertiefung einer 24-Loch-Flachboden-Kulturplatte vereinigt (analog zu Abschnitt 3.1.6). Sobald die Antigen-spezifität der einzelnen T-Zell-Klone bekannt war, wurden diese unter Verwendung Einzel-*ivt*-mRNS-Spezies-transfizierter mLCL weiterkultiviert.

3.1.10 Koinkubation von T-Zellen und APZ

Für den Ansatz einer ELISA-Kokultur zur anschließenden Bestimmung der freigesetzten Zytokine mussten T-Zellen zur Vermeidung einer unspezifischen Zytokinsekretion mindestens über drei Tage vor Ansetzen der Kokultur ohne IL-2-Zugabe kultiviert

werden. Zudem sollten sich die eingesetzten T-Lymphozyten für eine optimale Reaktivierung in der Ruhephase gegen Ende des Proliferationszyklus befinden. Zur Koinkubation von T-Zellen und APZ wurden die benötigten Zellen durch Zentrifugation separat in 15ml-Reaktionsgefäßen (BD) sedimentiert und in der gewünschten Konzentration in frischem T-Zell-Kulturmedium resuspendiert. Die einzelnen Zellsuspensionen wurden nachfolgend im jeweils benötigten Verhältnis in den Vertiefungen einer 96-Loch-Rundbodenplatte gemischt. Alle belegten Vertiefungen wurden abschließend mit T-Zell-Kulturmedium auf ein Endvolumen von 200 µl aufgefüllt und die Kulturplatte umgehend in den Brutschrank transferiert. Nach 16 bis 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Kulturüberstände abgenommen und in eine sterile 96-Loch-Rundbodenplatte überführt. Zur langfristigen Aufbewahrung wurde die Platte im Anschluss auf -20°C transferiert.

3.1.11 Kultivierung adhärenter HEK-293T-Zellen

HEK-293T-Zellen wurden in 293T-Zell-Medium (Tab. 2.7) in 35-ml-Zellkulturplatten (Nunc) im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert und expandiert. Zur raschen Expansion wurden die Zellen vor Erreichen eines konfluenten Zustandes gesplittet. Zu diesem Zweck wurden die Zellen in der Regel alle 3 Tage geerntet, durch Zugabe entsprechenden Kulturmediums 1:20 (Plattenvolumen) verdünnt und erneut auf 35-ml-Kulturplatten verteilt. Zum Ernten wurde das Medium unter leichtem Kippen vorsichtig aus der Kulturplatte abgenommen. Im Anschluss wurden 10 ml 1x Trypsin/EDTA vom Rand der Platte her zugegeben und diese leicht geschwenkt, bis alle Zellen mit der Trypsin-Lösung benetzt waren. Die Zellen wurden für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert und daraufhin unter Auf- und Abpipettieren von der Platte gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon-Sammelgefäß (BD) überführt und abschließend 5 Minuten bei 470·g zentrifugiert und in einem geeigneten Medium oder Puffer aufgenommen.

3.1.12 Transfektion von HEK-293T-Zellen

Zum Polykation-(PEI)-vermittelten Plasmid-Transfer (PEI-Transfektion) in Zellen der Linie HEK-293T wurden diese einen Tag vor Transfektion auf eine durchschnittliche Zellzahl von $0,8 \cdot 10^7$ Zellen in 35 ml Kulturmedium pro 15x2-cm-Kulturschale (Nunc) eingestellt. Für den Transfektionsansatz wurden pro zu transfizierender Kulturschale 1 ml OptiMEM, 45 µg Plasmid-DNS und 67,5 µl PEI (1x, 1 mg/µl, pH 7,0) nacheinander

(Reihenfolge ist einzuhalten) in ein geeignetes Reaktionsgefäß pipettiert und 15 Minuten bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz sorgfältig mit 15 ml 293T-Zell-Medium pro Platte vermischt. Das alte Medium wurde hierauf unter leichtem Kippen der Kulturplatten von den Zellen abgenommen und das Transfektionsgemisch vorsichtig seitlich zugegeben. Nach leichtem Schwenken der Platten wurden die Zellen für 6 - 12 h im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden zusätzliche 20 bis 30 ml warmes (37°C) 293T-Zell-Medium vom Rand der Kulturschale her zugegeben und diese abschließend in den Brutschrank transferiert. Pro Protein-Expressionsansatz wurden auf diese Weise fünf Kulturschalen annähernd konfluenten HEK-293T-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden 24 - 48 h nach Transfektion geerntet und der Proteinaufreinigung zugeführt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Bakterienstamm und -kultur

In allen hier beschriebenen Experimenten wurden *Escherichia coli*-Bakterien des Stammes XL1-Blue MRF' (Stratagene) eingesetzt. Auf LB-Kulturplatten ausgestrichene Bakterien wurden in einem Bakterieninkubator kultiviert, flüssige Bakterienkulturen in einem Bakterienschüttler (jeweils 37°C). Für die langfristige Lagerung der Bakterien wurden dichte Bakteriensuspensionen mit Glycerin zu einer Endkonzentration von 20% vermischt und auf -80°C transferiert. Die Expression rekombinanter Proteine wurde, wann immer notwendig, durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG; Endkonzentration: 1 mM) induziert.

3.2.2 DNS-Amplifikation mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNS-Fragmente wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Mullis *et al.* und Sambrook *et al.* amplifiziert (Mullis *et al.*, 1986; Sambrook *et al.*, 2000). Zur Amplifikation der Fragmente wurde der PCR Master Mix der Firma Promega gemäß der Herstellerbeschreibung eingesetzt. Die Reaktionen wurden im Mastercycler (Eppendorf, Hamburg) bzw. im Thermocycler T1 (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die PCR-Standardbedingungen wurden gemäß Sambrook *et al.* gewählt und nach eingesetzten Primern und Länge des Amplifikationsproduktes modifiziert.

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese von DNS

DNS-Fragmente wurden mithilfe der Gelelektrophorese in 1%-igen Agarosegelen bei 5-10 V/cm aufgetrennt. Für die Separation kleiner Fragmente wurden höherprozentige Gele (1,5%) verwendet. Die Agarose wurde in einem entsprechenden Volumen 1x TAE-Puffer im Mikrowellengerät erhitzt und mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Zur Evaluierung der Fragmentgrößen wurde parallel entweder eine 1kb-plus DNS-Leiter (Fermentas) oder ein 100 bp plus DNS-Standard (Fermentas) in eine leere Sammeltasche des Agarosegels aufgetragen. Die Fragmentbanden wurden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und dokumentiert.

3.2.4 DNS-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die entsprechenden Fragmentbanden nach Abschluss der Elektrophorese auf dem UV-Transilluminator sichtbar gemacht, mit einem Skalpell möglichst knapp aus dem Gel ausgeschnitten und mithilfe des "QIAquick® Gel Extraction"-Kits (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.2.5 Sequenzierung

Die DNS-Sequenzanalysen wurden kommerziell von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt. Zur bioinformatischen Auswertung der erhaltenen Elektropherogramme wurde das Programm Chromas (Technelysium) herangezogen.

3.2.6 DNS-Restriktionsverdau

Zur Klonierung amplifizierter DNS-Fragmente in Expressionsvektoren wurden sowohl Fragmente als auch Vektoren einem Verdau durch Restriktionsenzyme unterzogen. Pro Ansatz wurden 20 µg DNS mit 10 µl Puffer (10x) und 30 Units je Restriktionsenzym auf ein Gesamtvolumen von 100 µl in H₂O dest. gebracht. Das Volumen der eingesetzten Enzyme sollte dabei nicht mehr als 6% des Gesamtansatzes einnehmen. Die Restriktionsansätze wurden sorgfältig durch Auf- und Abpipettieren gemischt und für 1,5 h auf 37°C im Heizblock inkubiert. Um die Religation der Vektoren zu verhindern wurde nach 30 Minuten Inkubation auf 37°C eine Unit Alkalische Phosphatase (CIP, von engl.

calf intestine phosphatase; NEB) pro 100 µl Ansatz zugegeben. Bei der Planung des Restriktionverdau wurde darauf geachtet, dass die jeweils benötigten Enzyme für einen Einsatz im Doppelverdau kompatibel waren, das heißt ein Angleichen der benötigten Pufferbedingungen erfolgen konnte. Falls dies nicht möglich war, wurde ein sequenzieller Verdau vorgenommen.

3.2.7 Oligo-Hybridisierung

Zur Herstellung künstlicher doppelsträngiger DNS-Fragmente wurden ausgewählte DNS-Nukleotidsequenzen (bis maximal 150 Basen) als einzelsträngige DNS-Oligonukleotide synthetisiert (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Die lyophilisierten DNS-Oligonukleotide wurden in reinem, destilliertem Wasser resuspendiert [100 nM]. Synthetisierte Strang- und Gegenstrang-Oligonukleotide wurden in einem 0,5-ml-Reaktionsgefäß zu gleichen Teilen gemischt und im Heizblock auf 99°C erhitzt. Nach Ablauf einer fünfminütigen Inkubationszeit wurde der Heizblock vom Stromnetz getrennt und kühlte ohne weitere Einflussnahme langsam auf Zimmertemperatur ab. Nach Erreichen der Zimmertemperatur wurden die Reaktionsgefäße aus dem Heizblock entnommen und die nun doppelsträngigen DNS-Fragmente mithilfe bereits vorliegender Überhänge in adäquat vorbereitete Plasmid-DNS ligiert.

3.2.8 Ligation von DNS-Fragmenten

Die Ligation passender DNS-Fragmente erfolgte mithilfe der T4-Ligase über Nacht auf 16°C [10 µl Ansatz in H₂O dest.; 1 µl T4-Ligase-Puffer (10x), 1 Unit T4-Ligase (200 Ligationen kohesiver Enden pro Unit/µl; NEB)]. Adäquat geschnittene Plasmid-DNS und DNS-Fragment wurden im Verhältnis 1:3 gemischt. Während der gesamten Prozedur wurde, wenn nicht anders angegeben, auf Eis gearbeitet.

3.2.9 Generierung der Vektorkonstrukte

Alle im Folgenden beschriebenen genetischen Konstrukte wurden auf der Basis eines Restriktionsschnittstellen-bereinigten pGEM-Vektors erstellt (pGEM-A120, S. Milosevic; siehe Anhang, Tab. 8.1). Dieses Plasmid enthält einen T7-Promotor 5'-strangaufwärts zum Klonierungsabschnitt (MCS, Multiple Cloning Site) und einen Poly-Adenin-Abschnitt (polyA-Abschnitt, 120·A) 3'-strangabwärts. Die sich am 3'-Ende des polyA-

Abschnitts befindende *SpeI*-Schnittstelle ermöglicht die Linearisierung des pGEM-A120-Plasmids für die Herstellung von *in vitro* transkribierter mRNA (*ivt*-mRNA). Das pGEM-Plasmid enthält zusätzlich ein Ampicillin-Resistenz-Gen zur Selektion erfolgreich Plasmid-DNS-transformierter Bakterien.

Die Plasmide pGEM-EBNA-3C(1kb)-A120, pGEM-Tyrosinase-A120 und pGEM-BNRF1(1kb)-A120 wurden durch das Einfügen der jeweiligen Antigen-cDNA in die MCS des pGEM-A120-Plasmids kloniert. EBNA-3C(1kb), Tyrosinase und BNRF1(1kb) wurden durch PCR aus bereits vorliegender Plasmid-DNS (S. Milosevic; Accession-Nummer: EBNA-3C, NC_009334; Tyrosinase, U01873; BNRF1, NC_007605) amplifiziert. EBNA-3C(1kb) wurde zu diesem Zweck mit folgenden Primern amplifiziert: EBNA-3C(1kb) sense, 5'- ATAAAGCTT_{HindI}ATGTGGCCCACGCCCAAGACG-3' (die enthaltene Restriktionsschnittstelle ist unterstrichen), EBNA-3C(1kb) antisense, 5'- ATAGAATTC_{EcoRI}TTACGCGGCTCCTGGTATCC-3'. Während der PCR wurden somit ein artifizielles Startcodon (ATG) am 5'-Ende und ein Stopcodon (TAA) am 3'-Ende der amplifizierten DNS-Sequenz angefügt. Die spezifischen Primer für Tyrosinase waren: Tyrosinase sense, 5'- ATAGGATCC_{BamHI}ATGCTCCTGGCTGTTTTGTACT-3', Tyrosinase antisense, 5'- ATAGAATTC_{EcoRI}TTATAAATGGCTCTGATACAAGCT-3'. BNRF1(1kb) wurde amplifiziert mit: BNRF1(1kb) sense, 5'- ATAGGATCC_{BamHI}ATGACAGGAAAGAATCTCAGCCCA-3', BNRF1(1kb) antisense, 5'- ATAGAATTC_{EcoRI}TTACTCGGAGGGGCGACCGT-3'. Während der PCR wurde somit auch hier ein artifizielles Stopcodon am 3'-Ende der amplifizierten DNS-Sequenz angefügt. Die erzeugten DNS-Fragmente wurden mithilfe der angegebenen Restriktionsenzyme geschnitten und in das jeweils adäquat vorbereitete pGEM-A120-Plasmid ligiert.

Das pGEM-CrossTAG-A120-Konstrukt wurde durch Einbringen einer synthetisch erzeugten DNS-Sequenz in die MCS des pGEM-A120-Plasmids erstellt. Die CrossTAG-Sequenz (siehe Anhang, Tab. 8.2) setzte sich zusammen aus dem humanen Homolog eines bereits beschriebenen murinen ER-Translokations-Signals (humanes LAMP-1, Accession-Numer: NP_005552, AS 1-28; murines Homolog beschrieben als „sig“; Wu et al., 1995) und der DC-LAMP-Transmembran- und Zytoplasma-Domäne (humanes DC-LAMP, Accession-Numer: NP_055213, AS 376-416; Bonehill *et al.*, 2005). Der LAMP-1-Abschnitt der CrossTAG-Sequenz beginnt mit einem ATG-Startcodon und ist fusioniert mit der 3'-strangabwärts gelegenen DC-LAMP-Teilsequenz, an deren 3'-Ende ein TAA-Stopcodon den offenen Leserahmen begrenzt. Eine zwischen die LAMP-1- und DC-LAMP-Teilabschnitte eingefügte, 18 Basenpaare umfassende Nukleotidsequenz (Leserahmen wird beibehalten) beinhaltet die Restriktionsschnittstellen der Enzyme *NheI*, *PstI* und *KpnI* (Reihenfolge von 5' nach 3'). Die CrossTAG-Sequenz wurde im Anschluss an die virtuelle Erstellung der DNS-Sequenz (Clone Manager 7, Sci-Ed Software) durch

die Firma GeneArt (Regensburg) in Codon-optimierter Form synthetisiert. Das vollständige Konstrukt wurde nachfolgend mithilfe der Restriktionsenzyme *Xba*I (Schnittstelle 5'-strangaufwärts) und *Eco*RI (Schnittstelle 3'-strangabwärts) aus Plasmid-DNS der Firma GeneArt ausgeschnitten und in die MCS des adäquat vorbereiteten pGEM-A120-Plasmids ligiert.

Das pGEM-IVSB-3H10(Epitope)-CrossTAg-A120- sowie das pGEM-G11-3(Epitop)-CrossTAg-A120-Konstrukt wurde durch das Einfügen hybridisierter DNS-Oligonukleotide (siehe Abschnitt 3.2.6) zwischen die LAMP-1- und DC-LAMP-Teilabschnitte des pGEM-CrossTAg-A120-Plasmids erzeugt. Nach Hybridisierung der entsprechenden Strang- und Gegenstrang-Oligonukleotide (siehe Tab. 2.12) wurden die doppelsträngigen DNS-Fragmente mithilfe bereits vorliegender Überhänge in die *Nhe*I- und *Kpn*I-geschnittene pGEM-CrossTAg-A120-Plasmid-DNS ligiert.

Die Plasmide pGEM-EBNA-3C(1kb)-CrossTAg-A120, pGEM-Tyrosinase-CrossTAg-A120 und pGEM-BNRF1(1kb)-CrossTAg-A120 wurden durch das Einbringen der jeweiligen Antigen-cDNA zwischen die LAMP-1- und DC-LAMP-Teilabschnitte des pGEM-CrossTAg-A120-Plasmids kloniert (Leserahmen von LAMP-1 wurde nicht unterbrochen). EBNA-3C(1kb), Tyrosinase und BNRF1(1kb) wurden wiederum durch PCR aus der bereits vorliegenden Plasmid-DNS (S. Milosevic) amplifiziert. EBNA-3C(1kb) wurde zu diesem Zweck mit folgenden Primern amplifiziert: EBNA-3C(1kb)-CrossTAg sense, 5'-ATAGCTAGC_{*Nhe*I}ATGTGGCCCACGCCCAAGACG-3' (die enthaltene Restriktionschnittstelle ist unterstrichen), EBNA-3C(1kb)-CrossTAg antisense, 5'-ATAGGTACC_{*Kpn*I}CGGCGGCTCCTGGTATCC-3'. Die spezifischen Primer für Tyrosinase waren: Tyrosinase-CrossTAg sense, 5'-ATAGCTAGC_{*Nhe*I}ATGCTCCTGGCTGTTTTGTACT-3', Tyrosinase-CrossTAg antisense, 5'-ATACTGCAG_{*Pst*I}TAAATGGCTCTGATACAAGCTGT-3'. BNRF1 (1kb) wurde amplifiziert mit: BNRF1(1kb)-CrossTAg sense, 5'-ATAGCTAGC_{*Nhe*I}ACAGGAAGAATCTCAGCCA-3', BNRF1(1kb)-CrossTAg antisense, 5'-ATACTGCAG_{*Pst*I}CTCGGAGGGCGACCGTG-3'. Die somit erzeugten DNS-Fragmente wurden mithilfe der angegebenen Restriktionsenzyme geschnitten und in das jeweils adäquat vorbereitete pGEM-CrossTAg-A120-Plasmid ligiert.

Zur Klonierung der Plasmide pGEM-LAMP-1-EBNA-3C(1kb)-A120 und pGEM-EBNA-3C(1kb)-DC-LAMP-A120 wurde das hier erzeugte pGEM-EBNA-3C(1kb)-CrossTAg-A120-Plasmid als PCR-Vorlage genutzt. Das LAMP-1-EBNA-3C(1kb)-Fragment wurde mit folgenden Primern amplifiziert: LAMP-1-EBNA-3C(1kb) sense, 5'-ATATCTAGA_{*Xba*I}C GCCACCATGGCC-3', LAMP-1-EBNA-3C(1kb) antisense, 5'-ATAGAATTC_{*Eco*RI}TTACGGCG GCTCCTGGTATCC-3'. Während der PCR wurden ein Stopcodon am 3'-Ende der amplifizierten DNS-Sequenz angefügt. Das EBNA-3C(1kb)-DC-LAMP-Fragment wurde amplifiziert mit: EBNA-3C(1kb)-DC-LAMP sense, 5'-ATATCTAGA_{*Xba*I}ATGTGGCCCACGC

CCAAGA-3', EBNA-3C(1kb)-DC-LAMP antisense, 5'-ATAGAATTC_{EcoRI}GTGGCGGCCGCTTT-3'. Während der PCR wurden hiermit ein Startcodon am 5'-Ende der amplifizierten DNS-Sequenz generiert. Die erzeugten DNS-Fragmente wurden mithilfe der angegebenen Restriktionsenzyme geschnitten und in das adäquat vorbereitete pGEM-A120-Plasmid ligiert.

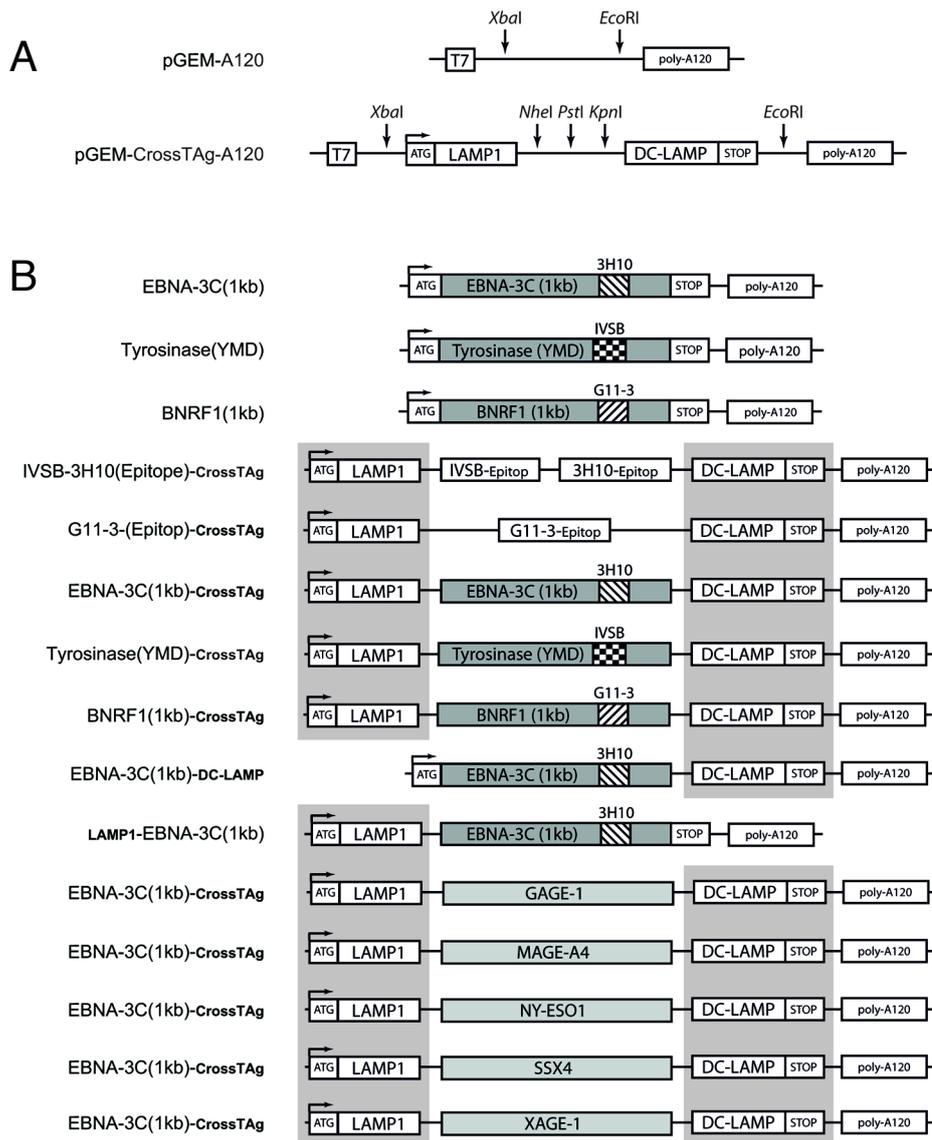


Abb. 3.1: **Schematische Darstellung der generierten Vektor-Konstrukte** (A) Die Plasmide pGEM-A120 und pGEM-CrossTAG-A120 sind ausschnittsweise von T7-Promotor bis Polyadenin-Abschnitt (polyA) abgebildet (vertikale Pfeile markieren einmalig vorhandene Restriktionsschnittstellen). (B) Die Antigen/Epitop-kodierenden offenen Leserahmen der auf Basis des pGEM-A120-Plasmids erstellten Vektor-Konstrukte sind schematisch dargestellt.

Die zur Antigen-CrossTag-*ivt*-mRNS-Herstellung eingesetzten Plasmide pGEM-GAGE-1-CrossTag-A120, pGEM-MAGE-A4-CrossTag-A120, pGEM-NY-ESO1-CrossTag-A120, pGEM-SSX4-CrossTag-A120 und pGEM-XAGE-1-CrossTag-A120 wurden durch Klonieren der jeweiligen Antigensequenz zwischen die LAMP-1- und DC-LAMP-Teilabschnitte des pGEM-CrossTag-A120-Plasmids generiert. Der offene Lese-rahmen des Plasmids wurde durch Amplifikation der Antigen-Sequenzen ohne 3'-terminales Stopcodon nicht unterbrochen. Alle Antigene wurden durch PCR aus bereits in der Arbeitsgruppe vorliegenden Plasmiden amplifiziert (S. Milosevic; Accession-Nummer: GAGE-1, U19142; MAGE-A4, NM_001011550; NY-ESO1, AJ003149; SSX4, U90841; XAGE-1, AF251237). Die Primersequenzen für die einzelnen PCR-Ansätze lauteten wie folgt: GAGE-1 sense, 5'-ATAGCTAGC_{NheI}ATGAGTTGGCGAGGAAGATCG-3', GAGE-1 antisense, 5'-ATAGGTACC_{KpnI}AGGTTTCCGTGGGGAAAGATTT-3'; MAGE-A4 sense, 5'-ATAGCTAGC_{NheI}ATGGTGTCTTCTGAGCAGAAGA-3', MAGE-A4 antisense, 5'-ATACTGCAG_{PstI}GACTCCCTCTTCTCCTCTAA-3'; NY-ESO1 sense, 5'-ATAGCTAGC_{NheI}ATGCAGGCCGAA GGCCGG-3', NY-ESO1 antisense, 5'-ATAGGTACC_{KpnI}GCGCCTCTGCCCTGAGGG-3'; SSX4 sense, 5'-ATAGCTAGC_{NheI}ATGAACGGAGACGACGCCTTT-3', SSX4 antisense, 5'-ATAGGTACC_{KpnI}CTCGTCATCTTCTCAGGGT-3'; XAGE-1 sense, 5'-ATAGCTAGC_{NheI}ATGCTCCTTTGGTGGCCACC-3', XAGE-1 antisense, 5'-ATAGGTACC_{KpnI}AACTTGTGGTTGCTCTTACC T-3'. Die erzeugten Antigen-DNS-Amplifikate wurden mithilfe der angegebenen Restriktionsenzyme geschnitten und in jeweils adäquat vorbereitete pGEM-CrossTag-A120-Plasmid-DNS ligiert.

Alle in diesem Abschnitt generierten pGEM-Plasmid-Konstrukte sind in Abbildung 3.1 schematisch zusammengefasst.

3.2.10 Herstellung elektrokompenter *E. coli* Bakterien

E. coli Bakterien des Stammes XL1-Blue MRF' (Stratagene) wurden auf Tetracyclin-haltigen LB-Agarplatten (LB-Medium, SELECT Agar®, 20 µg/ml Tetracyclin) ausplatziert und über Nacht auf 37°C inkubiert. Am Folgetag wurden 400 ml LB-Medium (20 µg/ml Tetracyclin) mit einer Kolonie der ÜN-Kultur angeimpft und wiederum über Nacht im Inkubator bei 37°C und 150 rpm bebrütet. Am gleichen Tag wurde eine 10%ige Glycerol-Lösung hergestellt und über Nacht auf 4°C transferiert. Am darauf folgenden Tag wurden 300 ml der Bakteriensuspension verworfen, die verbleibenden 100 ml Bakterienkultur mit frischem LB-Medium (enthält kein Antibiotikum) auf 400 ml aufgefüllt und weiter auf 37°C inkubiert. In Abständen von 30 Minuten wurde die Optische Dichte der Suspension am Spektralphotometer (UltraSpec 1100 pro, Amersham

Biosciences) bei 600 nm (OD_{600}) gemessen und die Bakterien bei Erreichen der gewünschten OD_{600} von 1 (Bakterien befinden sich in linearer Phase des exponentiellen Wachstums) in Spitzboden-Zentrifugenbecher überführt und zehn Minuten auf 4°C bei 5100·g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt, Überreste entfernt und 50 ml 10%-ige Glycerol-Lösung zugegeben. Das Zellpellet wurde unter Ausschluss von Blasenbildung resuspendiert, der Zentrifugenbecher wiederum auf den Stand vor Zentrifugation mit 10%-iger Glycerol-Lösung befüllt und erneut für 15 Minuten auf 4°C bei 5100·g zentrifugiert. Nachfolgend wurde der Überstand verworfen und die Prozedur wiederholt. Nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt (15 Minuten, 4°C, 5100·g) wurde der Überstand erneut abgenommen und die Gesamtheit aller Bakterien eines 400-ml-Ansatzes in 2 ml Glycerol vorsichtig resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in vorgekühlte 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und zügig auf -80°C überführt.

3.2.11 Transformation elektrokompenter Bakterien mit Plasmid-DNS

Zur Amplifizierung von Ligationsprodukten wurden elektrokompente Bakterien mit Plasmid-DNS aus Ligationsansätzen transformiert und expandiert. Hierzu wurde ein Aliquot der elektrokompenten Zellen auf Eis langsam von ursprünglich -80°C aufgetaut. 20 µl Bakteriensuspension wurden unter Ausschluss von Blasenbildung mit 1 µg ligierter Plasmid-DNS vermischt, in geeignete Küvetten (0,1-cm-GenePulser-Küvette) überführt und im Elektroporator (GenePulser) unter Einwirkung eines Elektropulses (1,8 kV) transformiert. Unmittelbar nach dem Elektropuls wurde der Inhalt der Elektroporations-Küvette in 1 ml warmem SOG-Medium resuspendiert. Im Anschluss wurde die Bakterienlösung vorsichtig 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 10 Minuten bei 950xg zentrifugiert, anschließend 800 µl des Überstands verworfen und die Bakterien in den verbleibenden 200 µl resuspendiert. Die Suspension der transformierten Bakterien wurde auf eine LB-Agarplatte (LB-Medium, SELECT Agar®, 100 µg/ml Ampicillin) ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.12 Selektion und Expansion der transformierten Bakterien

Ausschließlich Bakterienzellen, welche mit Antibiotikaresistenz-kodierender Plasmid-DNS transformiert worden waren, konnten sich auf Selektions-Platten (LB-Medium, SELECT Agar®, 100 µg/ml Ampicillin) trotz Anwesenheit des Antibiotikums vermehren

und Kolonien bilden. Nach Über-Nacht-Kultur im Brutschrank bei 37°C wurden Kolonien mit sterilen Pipettenspitzen gepickt und zur Vorkultivierung in je 5 ml LB-Medium (inklusive Selektions-Antibiotikum) überführt. Die Röhrchen wurden über Nacht bei 37°C und 150 rpm geschüttelt. Aus 1,5 ml einer jeden Vorkultur wurde Plasmid-DNS extrahiert und zur Sequenzüberprüfung zur Firma Sequiserve (Vaterstetten) übersandt. Die restlichen Vorkulturen wurden zur kurzfristigen Lagerung auf 4°C überführt. Bei zufriedenstellender Sequenzierungsanalyse wurden 400 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) in 2-Liter-Erlenmeyerkolben mit ausgewählten Vorkulturen angeimpft. Waren die zu expandierenden Bakterienzellen bereits schon zuvor selektiert und eingefroren worden, wurden die eingefrorenen Kryo-Reserven von -80°C auf Trockeneis überführt. Nachfolgend wurden circa 5 µl der teilweise angetauten Bakteriensuspension in 400 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) transferiert. Die Kolben wurden über Nacht bei 37°C und 150 rpm geschüttelt, um das effiziente Wachstum der transformierten Bakterienzellen sicherzustellen. Im Falle einer Erst-Selektionierung wurden 800 µl jeder Bakteriensuspension mit 200 µl Glycerol versetzt (Endkonzentration 20%) und als Kryo-Reserve auf -80°C transferiert. Die restliche Bakteriensuspension wurde der Plasmid-DNS-Extraktion zugeführt.

3.2.13 Plasmid-DNS-Extraktion aus transformierten Bakterien

Die jeweilige Bakteriensuspension wurde nach Über-Nacht-Kultur bei 5100·g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde restlos verworfen und die Plasmid-DNS je nach Anwendung mithilfe der JETstar Plasmid Purification MINI (analytische Aufreinigung) oder MAXI (präparative Extraktion) Kits (Genomed) nach Angaben des Herstellers aus dem Zellsediment aufgereinigt.

3.2.14 Herstellung von Einzel-Spezies-*ivt*-mRNS

Zur Herstellung von Einzel-Spezies-*ivt*-mRNS wurde das „mMessage mMachine T7 Kit“ (Ambion) eingesetzt. 20 µg einer geeigneten Plasmid-DNS wurden mithilfe des *SpeI*-Restriktionsverdau über Nacht auf 37°C linearisiert. Am Folgetag wurde die DNS-Linearisierung (100 µl Volumen) mit 5 µl EDTA [0,5 M], 10 µl Na-Acetat [3 M] und 200 µl Ethanol [100%] versetzt und sorgfältig gemischt. Die erhaltene Suspension wurde für 45 Minuten auf -20°C inkubiert und im Anschluss auf 4°C für 15 Minuten bei 10000·g zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde restlos verworfen und das sedimentierte Pellet in 40 µl Nuklease-freiem H₂O aufgenommen. Die Konzentration der li-

nearisierten Plasmid-DNS wurde durch OD-Messung am UV/Vis-Spektralphotometer (NanoDrop ND-1000, PEQLAB) bei 260 nm (OD_{260}) bestimmt. 2 μg linearisierte Plasmid-DNS wurden nach Angaben des Herstellers mit den zur *ivt*-mRNS-Herstellung benötigten Einzel-Lösungen versetzt. Nach sorgfältigem Mischen wurde die erhaltene Lösung in ein 0,5-ml-PCR-Reaktionsgefäß überführt und im Heizblock zwei Stunden auf 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Ansatz nach Angaben des Herstellers mit DNase versetzt und weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung der *ivt*-mRNS wurde über geeignete Säulen unter Verwendung des „RNeasy Mini Kit“ (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers vorgenommen. Die Säulen-gebundene *ivt*-mRNS wurde durch die Zugabe von 30 μl H₂O je Säule gelöst. Die Konzentration der erhaltenen *ivt*-mRNS wurde durch OD-Messung am UV/Vis-Spektralphotometer bestimmt. Zur langfristigen Aufbewahrung wurde die *ivt*-mRNS-Lösung abschließend auf -20°C überführt.

3.2.15 Agarose-Gelelektrophorese von *ivt*-mRNS-Produkten

Zur Längenkontrolle der unter Abschnitt 3.2.14 erhaltenen *ivt*-mRNS-Produkte wurden je 0,5 μg *ivt*-mRNS mit 5 μl Ladepuffer sowie 5 μl H₂O versetzt und in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf) zum Lösen eventueller Sekundärstrukturen für 10 Minuten auf 70°C im Heizblock inkubiert. Die Proben wurden neben einem RNS-Längensstandard (RiboRuler™ High Range RNA Ladder, Thermo Scientific) einzeln in Ladetaschen eines 1%igen Agarosegels (1% Ethidiumbromid; hergestellt mit DEPC-H₂O) aufgetragen und in einer entsprechenden Elektrophorese-Kammer bei 80V für 45 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Die einzelnen RNS-Banden wurden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und dokumentiert.

3.2.16 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde die optische Dichte (OD) der jeweiligen DNS- oder RNS-Lösungen am UV/Vis-Spektralphotometer (NanoDrop ND-1000, PEQLAB) bei 260 nm (OD_{260}) gemessen. Das Gerät ermöglicht die Absorptionsmessungen in nur 1 μl Probenvolumen ohne Küvetten. Durch die Oberflächenspannung entsteht eine Flüssigkeitssäule zwischen den optischen Fasern des Spektralphotometers, die den Messweg darstellt. Die zusätzlich gemessene OD_{280} (Absorptionsmaximum von Proteinen) dient im OD_{260}/OD_{280} -Quotient zur Bestimmung der Reinheit

der verschiedenen Nukleinsäurelösungen. Ideale Werte für reine DNS-Lösungen liegen bei 1,8. Für reine RNS-Lösungen sollte der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.2.17 Aufreinigung His-Tag-markierter Proteine aus HEK-293T-Zellen

Geerntete HEK-293T-Zellen aus einem 5-Platten-Transfektionsansatz wurden für 10 Minuten bei 5100·g zentrifugiert und der Überstand komplett verworfen. Das Zellpellet wurde durch Klopfen gelockert und die Zellen durch Invertieren in 22,5 ml Urea-Lysepuffer (Tab. 2.8) mit Protease Inhibitoren (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) lysiert. Das Lysat wurde 10 Minuten in der Ultrazentrifuge (Sorvall® RC-5B) bei 17.000·g zentrifugiert und der Überstand in ein neues 50-ml-Reaktionsgefäß überführt. Der dünnflüssige Überstand wurde mit 300 µl Nickelagarose-NTA Agarose (QIAGEN) versetzt und für vier Stunden im Rotator (Intelli Mixer, NeoLab) bei 25 rpm gewendet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Gemisch für 5 Minuten bei 5300·g abzentrifugiert und der Überstand restlos verworfen. Das Pellet wurde in Urea-Lysepuffer resuspendiert, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut für fünf Minuten bei 5300·g zentrifugiert. Der Lysepufferüberstand wurde komplett verworfen und das Pellet durch Schnipsen in 200 µl Elutionspuffer resuspendiert und sorgfältig gemischt. Die Suspension wurde für 5 Minuten bei 5300·g zentrifugiert und der Überstand in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt. Der Elutionsschritt wurde insgesamt dreimal wiederholt und das Sammelröhrchen im Anschluss zur Dialyse gegen PBS mit einer 7000 Da Dialysemembran verschlossen und in 500 ml PBS über Nacht langsam gerührt. Am nächsten Morgen wurde das Röhrchen in frische 500 ml PBS überführt und nach weiteren 10 Stunden zur Lagerung auf -20°C transferiert.

3.2.18 HLA-Typisierung

Zur Analyse des HLA-Genotyps einzelner Blutspender wurden Zellen (mLCL-Zellen; $1 \cdot 10^7$ Zellen) resuspendiert in 3 ml LCL-Kulturmedium in ein 15-ml-Reaktionsgefäß überführt und steril verschlossen an die Firma IMG (Martinsried) übersandt. Die Typisierungsdaten wurden mit hoher Allel-Auflösung erstellt.

3.3 Proteinbiochemische und analytische Methoden

3.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration rekombinant exprimierter Proteine wurde mithilfe des „Pierce® BCA Protein Assay Kits“ (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Alle Proben wurden jeweils in Duplikaten mithilfe der Microplatten-Methode (96-Loch-Platte) gemessen. Nach Ablauf der erforderlichen Inkubationszeit erfolgte die Detektion der Absorption bei 570 nm (OD_{570}) im Sunrise Plattenlesegerät (Tecan). Zur Probenauswertung wurde der Mittelwert (MW) der gemessenen OD_{570} errechnet und der somit bestimmte MW der Nullprobe vom MW einer jeden Protein-Probe subtrahiert. Im Folgenden wurde mit den Werten der Standardansätze eine Standardkurve erstellt und die entsprechende Proteinkonzentration der einzelnen Protein-Proben abgelesen.

3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970). Verwendet wurden „NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Mini Gel“ Fertiggele (1,5 mm, Invitrogen). Die Proteinproben wurden entsprechend der Proteinkonzentrationsmessung auf eine vergleichbare Konzentration verdünnt, mit „NuPAGE® LDS Sample Buffer“ (4x, Invitrogen) vermischt und für 5 Minuten im Heizblock auf 90°C erhitzt. Das Gel wurde in der „XCell SureLock™ Mini-Cell“ (Invitrogen) befestigt und 20 µl je Probe aufgetragen. Als Größenstandard wurde der „SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard“ (Invitrogen) eingesetzt. Die Elektrophorese wurde für die ersten 15 Minuten bei 100 V, in den sich anschließenden 50 Minuten bei konstant 200 V im NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (Invitrogen) auf 4°C im Kühlraum durchgeführt.

3.3.3 Immunologischer Proteinnachweis

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte anhand der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe Methoden 3.3.2). Zum Zweck eines immunologischen Nachweises der Zielproteine wurde im Anschluss eine Übertragung der Gel-gebundenen Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond ECL, Amersham Biosciences) entsprechend dem Nassblotverfahren nach Towbin *et al.* vorgenommen (Towbin *et al.*, 1979). Hierzu wurde der Gelträger vorsichtig geöffnet.

Das Gel wurde nach Entfernen der Ladetaschen sowie des unteren Gelüberstands in Transferpuffer (NuPAGE® Transfer Buffer, Invitrogen) überführt. Ein gelgroßes Stück Nitrocellulosemembran wurde für 10 Minuten in Transferpuffer equilibriert. Die Nitrocellulosemembran wurde daraufhin in einem „XCell II™ Blot Module“ (Invitrogen) über das SDS-Polyacrylamid-Gel geschichtet und mit Transferpuffer-getränkten Schwämmen fixiert. Der Proteinübertrag erfolgte für 1 h bei 4°C und 100 mA. Zur späteren Detektion der sechsfach Histidin-markierten Proteine mithilfe eines monoklonalen Antikörpers (Maus-anti His6, E. Kremmer) wurde die Membran im Anschluss an das Übertragungs-Verfahren für 1 h in einer Blockierlösung (5% Magermilchpulver in TBST) auf RT inkubiert. Nach dem Blocken wurde die Membran dreimal 5 Minuten in TBST gewaschen und über Nacht auf 4°C in einer Lösung des primären Antikörpers (1% Magermilchpulver in TBST) inkubiert. Es folgten erneut 3 Waschschrte für 5 Minuten in TBST und die einstündige Inkubation der Membran in einer Lösung des sekundären HRP-konjugierten Antikörpers (1% Magermilchpulver in TBST; Ziege-anti Maus IgG, Jackson Immuno Research) bei RT. Die Entwicklung der Nitrocellulosemembran erfolgte nach dreimaligem Waschen für 5 Minuten in TBST mithilfe des „Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent“ Kits (Perkin Elmar). Hierzu wurde die auf Whatman-Papier getrocknete Membran circa 1 Minute in der Entwicklerlösung (zu gleichen Teilen Reagenz A und B; 0,125 ml pro cm² Membran) geschwenkt. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte daraufhin an einem Chemilumineszenz- und Fluoreszenz-Imaging-System (Fusion-FX7, PEQLAB).

3.3.4 IFN- γ - und GM-CSF-ELISA

Zur Durchführung eines IFN- γ - oder GM-CSF-ELISA (engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay) wurden die „OptEIA™ Human ELISA Sets, IFN- γ - oder GM-CSF“ (BD) eingesetzt. Zur Beschichtung der Vertiefungen einer 96-Loch-ELISA-Platte (Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 Well; Nunc) wurden diese mit jeweils 50 μ l Lösung des Capture-Antikörpers (1:200-Verdünnung des IFN- γ -/GM-CSF-Capture-Antikörpers in ELISA-Beschichtungspuffer) belegt und versiegelt auf 4°C über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am Folgetag wurden alle beschichteten Vertiefungen dreimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und im Anschluss mit 300 μ l Blockierungslösung (1%ige Milchpulverlösung, in PBS) belegt. Nach einstündiger Inkubationszeit wurden alle genutzten Vertiefungen dreimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und nachfolgend neben einem in Dupletten angelegten Zytokinstandard mit Mediumüberständen aus T-Zell-APZ-Kokulturen (Abschnitt 3.1.13) belegt. Die Platten wurden daraufhin für 2 Stunden versiegelt inkubiert und nach Ablauf der Inkubationszeit fünfmal mit ELISA-

Waschpuffer gewaschen. Zur Detektion der gebundenen Zytokine wurden alle Vertiefungen mit 50 µl Lösung des Detektion-Antikörpers (1:200-Verdünnung des IFN- γ -/GM-CSF-Detektion-Antikörpers und Avidin-HRP-Konjugats in 1%iger Milchpulverlösung) belegt und für eine Stunde unter Lichtausschluss bei RT inkubiert. Alle genutzten Vertiefungen wurden im Anschluss an die Inkubationszeit siebenmal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und mit 100 µl Substratlösung (OptEIA™ TMB Substrate Reagent A und B zu gleichen Teilen; BD) belegt. Zum Abstoppen des Farbumschlags wurde allen belegten Vertiefungen 50 µl Phosphorsäure [1M] zugesetzt. Die Messung der Zytokinkonzentration erfolgte umgehend nach Beendigung der Reaktion durch Absorptionsmessung bei 450 nm am Spektralphotometer (ELSIA Reader Sunrise, Tecan; Wellenlängenkorrektur bei 570nm). Die Zytokinkonzentration unbekannter Einzel-Vertiefung wurde nachfolgend anhand der Standardwerte errechnet.

3.4 Durchflusszytometrie

3.4.1 Färbung von Oberflächenmolekülen

Die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle wurde mithilfe direkt Fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper nachgewiesen. Hierzu wurden Zellen durch Zentrifugation sedimentiert und in 50 µl pro $1 \cdot 10^6$ Zellen resuspendiert. Nach Zugabe geeigneter Fluoreszenz-markierter Antikörper wurden die Ansätze im Dunkeln bei 4°C für 20 Minuten inkubiert. Die einzelnen Färbe-Ansätze wurden nachfolgend mit ausreichend FACS-Puffer gewaschen und nach einem erneuten Zentrifugationsschritt in je 200 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Zell-Suspensionen wurden in adäquate FACS-Röhrchen überführt und mit Propidiumiodid (Lebend/tod-Färbung) in einer Endkonzentration von 1 µg/ml versetzt. Die so angefärbten Zellen wurden auf Eis gehalten und umgehend der Analyse am Durchflusszytometer zugeführt. Während der Messung wurden die aufzuzeichnenden Informationen mithilfe einer geeigneten Software-Applikation (CellQuest™, BD) verfolgt und optimiert. Alle am Durchflusszytometer gesammelten Daten wurden im Anschluss an die Aufzeichnung mithilfe der Flow-Jo-Software (Tree Star) nachbearbeitet und visualisiert. Zur Kompensationsfärbung wurde das sogenannte „BD™ CompBeads Anti-Mouse Ig, κ “-Set (BD) nach Anleitung des Herstellers eingesetzt.

3.4.2 Markierung von T-Zellen mittels Zellfarbstoff

Um Zellen einzelner T-Zell-Klone in einer Lymphozyten-Mischpopulation gezielt nachverfolgen zu können, wurden T-Zellen mithilfe des „CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit“ (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers markiert. Hierfür wurden T-Lymphozyten durch Zentrifugation sedimentiert und in PBS aufgenommen ($1 \cdot 10^6$ T-Zellen pro ml PBS). Im Anschluss wurde 1 μ l CellTrace™ Violet [5 mM] pro ml Zellsuspension zugegeben und diese unter Lichtausschluss für 20 Minuten auf 37°C inkubiert. Zum Entfernen ungebundener Farbstoffe wurde die Zellsuspension nach Abschluss der Inkubationszeit mit dem fünffachen Volumen an T-Zell-Medium gemischt und weitere 5 Minuten inkubiert. Abschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert und nach Verwerfen des Überstands in warmem T-Zell-Medium resuspendiert.

3.4.3 CD154-Färbung auf reaktivierten CD4⁺ T-Zellen

Zur Färbung der Antigen-spezifisch induzierten CD154-Expression auf reaktivierten T-Zellen wurden die entsprechenden T-Zellen geerntet und in einem 15-ml-Reaktionsgefäße (BD) durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 470·g sedimentiert. Der Kulturüberstand wurde restlos verworfen. Nach Aufnahme des Zellpellets in frischem T-Zell-Medium wurden $0,5 \cdot 10^6$ T-Zellen in der Vertiefung einer 24-Loch-Flachboden-Kulturplatte (Falcon, BD) in geeignetem Verhältnis (je nach Versuchsansatz zwischen 1:2 bis 1:20) mit Antigen-beladenen APZ gemischt. Zur Blockierung der CD40-CD154-Interaktion wurde die benötigte Menge Antigen-beladener APZ vor Mischen der Zellen nach Zentrifugation in 1 ml T-Zell-Medium resuspendiert und für 10 Minuten mit einem CD40-spezifischen Blockierungsantikörper (2 μ g Blockierungsantikörper pro ml T-Zell-Medium; Kollaboration mit Dr. Marco Frentsch, AG Thiel, Berlin) prä-inkubiert. Im Anschluss daran wurde jeweils 1 ml APZ-Suspension ohne Waschschrift in die Vertiefung mit den bereits vorgelegten T-Zellen (in 1 ml T-Zell-Medium) transferiert. Nach Ablauf der sechsständigen Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und, wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben, mit einem Fluoreszenz-gekoppelten CD154-spezifischen Antikörper („PE Mouse Anti-Human CD154“-Antikörper, BD) angefärbt und im Durchflusssystem analysiert.

3.4.4 Sortierung CD154-positiver CD4⁺ T-Zellen

T-Zellen des *De-novo*-Induktionsansatzes wurden, wie in Abschnitt 3.4.3 beschrieben, auf ihre CD154-Expression hin angefärbt. Neben dem PE-konjugierten CD154-Antikörper wurde parallel ein Anti-CD4-Antikörper („V450 Mouse Anti-Human CD4“-Antikörper, BD) in den Färbeansatz eingesetzt. Nach Abschluss der zwanzigminütigen Inkubationszeit auf 4°C wurden die Zellen in einem angemessenen Volumen kalten FACS-Puffers gewaschen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert und in 1 ml frischem FACS-Puffer resuspendiert. Für die nachfolgende Unterscheidung lebender und toter Zellen wurde der somit erhaltenen Zellsuspension eine DAPI-Arbeitslösung [60 ng/ml] im Verhältnis 1:10 zugefügt. Im Anschluss daran wurden lebende, CD4-CD154-doppeltpositive T-Lymphozyten am Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer (FACS, engl. fluorescence activated cell sorter; FACS-Aria III, BD) einzeln in die Vertiefungen steriler 96-Loch-Rundbodenplatten sortiert. Die Sortierung erfolgte unter Inkaufnahme von Zellverlusten im strikten Einzel-Zell-Modus (100-µm-Düse). Nach Abschluss der Plattenklonierung wurden alle verbleibenden lebenden CD4⁺ T-Zellen in eine CD154-positive sowie CD154-negative Fraktion sortiert. Die Zellen der Plattenklonierung wurden im Anschluss an die Sortierungsprozedur durch Zugabe von 200 µl Stimulationsgemisch pro Vertiefung versorgt (2·10³ Zellen einer Mischung einzeln Antigen-CrossTAG-*ivt*-mRNS-transfizierter mLCL des autologen Spenders, GAGE-1, MAGE-A4, NY-ESO1, SSX4, XAGE-1, bestrahlt mit 100 Gy, Bestrahlungsanlage ¹³⁷Cs, HWM-D-2000, Gammacell; 3·10⁴ Zellen einer Mischung dreier unterschiedlicher Spender-PBL, bestrahlt mit 55 Gy; 250 ng/ml PHA; 20 U IL-2/ml in T-Zell-Medium) und nach Umwickeln der Kulturplatten mit Aluminiumfolie in den Brutschrank transferiert. Drei Tage nach Klonierung wurde das PHA-haltige Kulturmedium möglichst vollständig abgenommen und durch frisches T-Zell-Medium (inklusive 20 U IL-2/ml und 5 ng IL-7/ml) ersetzt. Die Zellen der CD154-positiven und CD154-negativen Fraktion wurden gezählt und nach Transfer in 24-Loch-Kulturplatten durch Zugabe 5-Antigen-*ivt*-mRNS-transfizierter autologer DZ restimuliert (Verhältnis 4:1). Die 24-Loch-Kulturplatten wurden für die weitere Kultivierung ebenfalls in den Brutschrank transferiert und die enthaltenen CD4⁺ T-Zell-Populationen unter regelmäßiger Zugabe von IL-2 und IL-7 in Kultur gehalten (alle zwei Tage 20U IL-2/ml und 5 ng IL-7/ml).

3.5 Analyse des TZR- α/β -Repertoires

3.5.1 Isolierung zellulärer Gesamt-RNS

Zur Isolierung zellulärer Gesamt-RNS wurden Zellen durch Zentrifugation sedimentiert und in TRI-Reagent[®] aufgenommen (200 μ l / $1 \cdot 10^6$ Zellen). Die Suspension wurde durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert und 5 Minuten bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die erhaltene Lösung mit 1-Brom-3-Chlorpropan in einem Verhältnis von 5:1 versetzt und durch kräftiges Schütteln gemischt. Nach zehnminütiger Inkubationsphase bei RT wurde die Lösung auf 4°C für 15 Minuten bei 12000·g zentrifugiert. Durch die Zentrifugation trennte sich das Lysat in drei unterschiedliche Phasen. Nachfolgend wurde die oberste farblose Phase abgenommen und in ein gekühltes 1,5-ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt. Zur RNS-Präzipitation wurde die Lösung im Verhältnis von 1:1 mit Isopropanol versetzt, sorgfältig gemischt und nach einer zehnminütigen Inkubationszeit auf 4°C für 12 Minuten bei 12000·g zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde restlos verworfen und das sedimentierte Pellet 3 bis 5 Minuten an der Luft getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 20 μ l H₂O gelöst und die RNS-Konzentration durch OD-Messung am UV/Vis-Spektralphotometer (NanoDrop ND-1000, PEQLAB) bei 260 nm (OD₂₆₀) bestimmt.

3.5.2 Reverse Transkription von mRNS zu cDNS

Zur Synthese einzelsträngiger cDNS-Sequenzen aus zuvor isolierter zellulärer Gesamt-RNS wurde das „1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)“ (Roche) eingesetzt. Eine ausreichende Menge zellulärer Gesamt-RNS wurde zum Lösen eventueller Sekundärstrukturen für 10 Minuten auf 55°C inkubiert und im Anschluss nach Angaben des Herstellers mit den entsprechenden Einzel-Lösungen versetzt. Nach sorgfältigem Mischen wurde die erhaltene Lösung in ein 0,5-ml-PCR-Reaktionsgefäß überführt und im Heizblock nach Angaben des Herstellers inkubiert (10 Minuten auf 25°C; 60 Minuten auf 42°C; 5 Minuten auf 99°C und anschließendes Abkühlen auf 4°C). Zur längerfristigen Aufbewahrung wurde die cDNS-Lösung auf -20°C überführt.

3.5.3 TZR-PCR zur Analyse von TZR- α/β -Sequenzen

Zur Analyse der Segmentzusammensetzung sowie der CDR3-Sequenz einzelner TZR-Ketten wurde zelluläre Gesamt-RNS aus Zellen eines T-Zell-Klons isoliert (Abschnitt

3.5.2) und in die PCR-basierte Analyse der jeweils vorliegenden TZR V α - und V β -Kette eingesetzt (Steinle *et al.*, 1995). In Einzelreaktionen einer herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion wurde ein Panel verschiedener V α - und V β -Gensegment-spezifischer 5'-Primer (Tab. 2.11) in Verbindung mit immer gleichen 3'-Primern, spezifisch für die C-Region der TZR- α/β -Kette (C α -Region: 3'T-C α ; C β -Region: P-3'C β II) eingesetzt, um V(D)J-Gensegment-überspannende DNS-Amplifikate zu generieren. Im Falle der TZR α -Kette lag die zu erwartende Amplifikatgröße zwischen 370 und 500 Basenpaaren. Für die Amplifikate der TZR β -Kette lag die zu erwartende Amplifikatgröße im Bereich von 190 bis 290 Basenpaaren. Eine interne PCR-Kontrolle mithilfe eines Primerpaares, das in der konstanten C-Region der TZR- α/β -Kette hybridisierte (C α : 3'ST/5'ST; C β : P-5' β ST/P-3' β ST), gestattete eine Aussage über die Funktionalität der einzelnen PCR-Ansätze (Kontrolle C α : 550 bp; Kontrolle C β : 350 bp). Nach Abschluss der PCR-Amplifikation wurden die erhaltenen Amplifikate bei 125 V in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. Amplifikate auf Höhe von 370-500 bp (TZR α -Ketten) und 190-290 bp (TZR β -Ketten) wurden ausgeschnitten, aus dem Gel aufgereinigt und zur Sequenzierung an die Firma Sequiserve (Vaterstetten) übersandt.

Tab. 3.2: Ansatz der TZR- α/β -PCR und Reaktionsbedingungen

	Volumen	Reaktionsbedingungen
PCR Master Mix	20,0 μ l	Initiale Denaturierung bei 94°C für 2 Min., Amplifikation (35 Zyklen): 95°C für 30 Sek., 56°C für 30 Sek. und 72°C für 1 Min., Elongation bei 72°C für 10 Min., Kühlung bei 4°C.
5'ST oder 5' β ST Primer	2,8 μ l	
3'ST oder 3' β ST Primer	2,8 μ l	
5'V α x / 5'V β x Primer	4,0 μ l	
3'TC α / 3'C β II Primer	6,0 μ l	
cDNS	1,5 μ l	
H ₂ O (PCR-grade)	ad. 40 μ l	

Die Primer-Arbeitskonzentrationen betragen 2,5 pmol/ μ l für alle variablen 5' Primer als auch für die Primer der internen Kontrolle und 5 pmol/ μ l für die konstanten Primer 3'T-C α und P-3'C β II.

3.5.4 Analyse klonaler TZR- β -Sequenzen mithilfe degenerierter Primer

Um die Analyse der TZR- β -Ketten-Gensegmentumlagerung einzelner T-Zell-Klone zu vereinfachen, wurden zwei generische Primer-Paare eingesetzt (Zhou *et al.*, 2006), die 76% bzw. 20% der 55 V β -Gensegmente abdeckten (Tab. 2.11). Die Gensegmente TRBV14 und TRBV21-2 (IMGT-Nomenklatur, www.imgt.org) konnten mit diesen Primern nicht amplifiziert werden. Aus diesem Grund mussten zur völligen Abdeckung aller V β -Spezifitäten zwei zusätzliche Reaktionen mit TRBV14- und TRBV21-2-Gen-

segment-spezifischen Primern analog zu Abschnitt 3.5.3 durchgeführt werden. Nach Abschluss des PCR-Amplifikation wurden die erhaltenen PCR-Produkte bei 125 V in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. Erhaltene TZR-V β -Amplifikate wurden ausgeschnitten, aus dem Gel aufgereinigt und zur Sequenzierung an die Firma Sequiserve (Vaterstetten) übersandt.

Tab. 3.3: Ansatz der TZR- β -PCR mittels degenerierter Primer

	Volumen	Reaktionsbedingungen
PCR-Puffer (10x)	4,0 μ l	Initiale Denaturierung bei 94°C für 2 Min., Amplifikation (35 Zyklen): 94°C für 30 Sek., 50°C für 30 Sek. und 72°C für 30 Sek., Elongation bei 72°C für 10 Min., Kühlung bei 4°C.
5' VP1 oder VP2 Primer	4,0 μ l	
3' CP1 Primer	6,0 μ l	
cDNS	1,5 μ l	
H ₂ O (PCR-grade)	ad. 40 μ l	

Die Primer-Arbeitskonzentrationen betragen 2,5 pmol/ μ l für alle variablen 5' Primer als auch für die Primer der internen Kontrolle und 5 pmol/ μ l für die konstanten Primer 3'T-Ca und P-3'CBII.

3.6 Direkte Epitop-Identifizierung (DEPI)

Alle Arbeitsschritte zur Epitop-Identifizierung mithilfe der DEPI-Methode wurden wie von Milosevic und Kollegen beschrieben durchgeführt (Milosevic *et al.*, 2006).

3.6.1 Erstellen der C/T-Antigen-Expressions-Bibliothek

Zur Vorbereitung des Expressionsvektors für das spätere Einfügen von Antigen-DNS-Fragmenten wurden die Plasmide F315A, F315B und F315C (S. Milosevic) zu gleichen Teilen gemischt und mithilfe des Restriktionsenzym *StuI* linearisiert. Nachfolgend wurde die linearisierte Plasmid-DNS-Mischung in drei separaten Teil-Ansätzen mit den Enzymen *MscI*, *Eco47II* oder *SnaBI* (New England Biolabs) geschnitten und mit Alkalischer Phosphatase (CIP, engl. calf intestine phosphatase New England Biolabs) behandelt, um eine Religation der Vektoren zu vermeiden. Im Anschluss an die CIP-Behandlung wurde die Vektor-DNS in der Gelelektrophorese aufgetrennt und mithilfe des „QIAquick Gel Extraction“-Kits (QIAGEN) aus dem Gel aufgereinigt. Abschließend wurde die DNS-Konzentration bestimmt und die Teil-Ansätze wieder zu gleichen Teilen vereinigt.

Die C/T-Antigen-kodierenden offenen Leserahmen der fünf pGEM-Antigen-CrossTag-A120-Plasmide (GAGE-1, MAGE-A4, NY-ESO1, SSX4 und XAGE-1; jeweils inklusive LAMP1- und DC-LAMP-Teilsequenzen) wurden in Teil-Ansätzen mit häufig schneidenden Restriktionsenzymen (*Cvi*II, *Mnl*II und *Acl*I; New England Biolabs) verdaut und, wann immer nötig, mithilfe der T4-Polymerase (New England Biolabs) behandelt, um die Generierung von stumpfen Fragment-Enden (engl., blunt ends) sicherzustellen. Nach T4-Polymerase-Behandlung wurden die unterschiedlichen Restriktionsansätze mithilfe des „MinElute Reaction Cleanup“-Kits (QIAGEN) aufgereinigt und zu gleichen Teilen gemischt. Das somit erstellte DNS-Fragment-Gemisch wurde abschließend in das Expressionsvektor-Gemisch ligiert.

Zur Bestimmung der Ligations- und Transformationseffizienz wurden elektrokompetente *E. coli*-Bakterien (Stamm XL1-Blue MRF'; Stratagene) mit einem Aliquot des Ligationsgemisches transformiert und die entsprechend über Nacht auf LB-Agar-Kulturplatten (Tetracyclin [10 µg/ml], Ampicillin [100 µg/ml], Chloramphenicol [30 µg/ml], IPTG [1 mM]) gewachsenen Kolonien gezählt. Die Zahl nötiger Transformationen zur Erstellung einer mehrfach überlappenden Expressions-Bibliothek wurde anhand der zuvor bestimmten Transformationseffizienz errechnet. Die Gesamtheit der daraufhin transformierten Bakterien wurde auf eine adäquate Anzahl von Vertiefungen einer 96-Loch-Kulturplatte verteilt (200 µl LB-Medium pro Vertiefung; Tetracyclin [10 µg/ml], Ampicillin [100 µg/ml], Chloramphenicol [30 µg/ml], IPTG [1 mM]) und über Nacht im Bakterienrüttler inkubiert (Master-Platte). Im Anschluss daran wurden je 30 µl Bakterien suspension in die 1,5-ml-Vertiefungen eines 96-Tiefloch-Kulturblocks (Nunc) transferiert (1 ml LB-Medium pro Vertiefung; Tetracyclin [10 µg/ml], Ampicillin [100 µg/ml], Chloramphenicol [30 µg/ml], IPTG [1 mM]) und unter kräftigem Schütteln im Bakterienrüttler inkubiert. Sobald die Bakterien-Mischkolonien in den 1,5-ml-Vertiefungen die optische Dichte (OD_{600}) von 1 erreicht hatten, wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 1000·g sedimentiert und nach Verwerfen des Überstands in LB-Medium (Tetracyclin [10 µg/ml], Ampicillin [100 µg/ml]) auf eine OD_{600} von 5 resuspendiert (~ 300 µl).

Die verbliebenen Bakterien-Mischkolonien der ursprünglichen 96-Loch-Kulturplatte (Master-Platte) wurden nach Glycerin-Zugabe (Endkonzentration 20%) zur Aufbewahrung auf -80°C überführt.

3.6.2 DEPI Schritt 1 - Mischkolonien

Für die spätere Kokultur von T-Zellen mit Antigen-Fragment-beladenen APZ wurden 10 µl der einzelnen Bakterien-Mischkolonien (OD_{600} von 5) durch Zugabe ins Kulturmedium (LCL-Medium) mit jeweils $1 \cdot 10^5$ mLCL in den Vertiefungen einer 96-Loch-Kulturplatte über Nacht koinkubiert. Nach Aufnahme und Prozessierung der Bakterien durch mLCL wurden die Zellen durch Zentrifugation für 5 Minuten bei $470 \cdot g$ sedimentiert und nach Verwerfen des Überstands durch Zugabe von 200 µl einer T-Zell-Suspension ($1 \cdot 10^6$ T-Zellen/ml T-Zell-Medium) resuspendiert. Die APZ-T-Zell-Mischkulturen wurden nachfolgend im Brutschrank bei $37^\circ C$, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. 16 Stunden nach Ansatz der Kokultur wurden die Überstände auf IFN- γ -Sekretion hin getestet.

3.6.3 DEPI Schritt 2 - Einzelkolonien

Positiv getestete Bakterien-Mischkolonien wurden aus den verbliebenen Bakterien-Suspensionen des 96-Tiefloch-Kulturblocks heraus auf LB-Agar-Kulturplatten (Tetracyclin [10 µg/ml], Ampicillin [100 µg/ml], Chloramphenicol [30 µg/ml], IPTG [1 mM]) ausgestrichen. 16 Stunden nach Ansatz gewachsene Kolonien wurden einzeln auf Vertiefungen einer 96-Loch-Kulturplatte verteilt (200 µl LB-Medium pro Vertiefung; Tetracyclin [10 µg/ml], Ampicillin [100 µg/ml], Chloramphenicol [30 µg/ml], IPTG [1 mM]) und über Nacht im Bakterien-schüttler inkubiert (Einzelkolonie-Platte). Am nächsten Morgen wurden je 20 µl der Einzelkolonie-Suspensionen durch Zugabe ins Kulturmedium (LCL-Medium) mit jeweils $1 \cdot 10^5$ mLCL in den Vertiefungen einer 96-Loch-Kulturplatte gemischt und über Nacht inkubiert. Nach Aufnahme und Prozessierung der Bakterien durch mLCL wurden die Zellen durch Zentrifugation für 5 Minuten bei $470 \cdot g$ sedimentiert und nach Verwerfen des Überstands durch Zugabe von 200 µl einer T-Zell-Suspension ($1 \cdot 10^6$ T-Zellen/ml T-Zell-Medium) resuspendiert. 16 Stunden nach Ansatz der Kokultur wurden die Überstände auf IFN- γ -Sekretion getestet und positiv getestete Einzelkolonien aus der zuvor angesetzten Einzelkolonie-Platte heraus in einen Mini-Präparations-Ansatz eingesetzt. Die jeweils erhaltene Plasmid-DNS wurde sequenziert (Sequiserie, Vaterstetten) und das durch T-Zellen erkannte Antigen-DNS-Fragment analysiert.

4 Ergebnisse

Die Zielsetzung dieser Arbeit lag in der Etablierung einer effizienten Methode zur Isolierung Tumor-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten. In den folgenden Kapiteln wird die Entwicklung und Durchführung des *In-vitro*-Kulturansatzes beschrieben, mit dessen Hilfe es möglich war, entsprechende Zellen zu generieren und weiterführend molekular zu charakterisieren.

CD4⁺ T-Lymphozyten erkennen auf APZ präsentierte Epitope auf MHC-Klasse-II-Molekülen (pMHCII). Die Epitop-Beladung der MHC-Klasse-II-Moleküle erfolgt durch die Aufnahme und Prozessierung exogener Antigene (siehe Abb. 4.1, B). Durch Zugabe rekombinant exprimierter Proteine in die APZ-Kultur ist es möglich MHC-Klasse-II-Moleküle gezielt mit Epitopen ausgewählter Antigene zu beladen. Antigen-beladene APZ können daraufhin zur gezielten Aktivierung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen eingesetzt werden.

Um eine Alternative zur bisher geläufigen rekombinanten Expression einzelner Proteine in der Zellkultur heranzuziehen, sollte ein Antigen-Expressionssystem für die MHC-Klasse-II-Beladung basierend auf *in-vitro*-transkribierter mRNS (*ivot*-mRNS) entwickelt werden. Werden APZ mit Antigen-kodierender *ivot*-mRNS transfiziert, translatieren diese das entsprechende Protein selbst. Da zytosolische Proteine physiologisch auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden, ist eine Manipulation des Antigen-Prozessierungsweges notwendig, um die Präsentation der gewünschten Antigene auf MHC-Klasse-II-Molekülen zu ermöglichen (siehe Abb. 4.1, A und D). Durch Fusionierung der Antigensequenz mit einem geeigneten Sortierungssignal sollte der zellinterne vesikuläre Transport der neu-translatierten Proteine in das lysosomale / endosomale Kompartiment erzwungen werden. Die gezielt eingeschleusten Proteine sollten somit parallel zu allen endozytotisch aufgenommenen Antigenen prozessiert und auf MHC-Klasse-II-Molekülen an CD4⁺ T-Lymphozyten präsentiert werden.

Auf diese Weise Antigen-beladene APZ sollten im Rahmen dieser Arbeit zur *De-novo*-Induktion Tumor-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten eingesetzt werden. Erfolgreich induzierte T-Zellen sollten mithilfe einer Methode zur Sortierung lebender, Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen anhand eines Aktivierungs-induzierten Oberflächenmarkers kloniert und nachfolgend molekular charakterisiert werden.

Endosomen und Lysosomen beinhalten eine Vielzahl assoziierter löslicher und Membran-durchspannender Proteine. Während der Synthese werden diese aus dem Zytosol ins ER translatiert und mithilfe Sequenz-intrinsischer Sortierungssignale durch vesikulären Transport an die unterschiedlichen Organellen des endosomalen / lysosomalen Kompartiments übersandt (Braulke und Bonifacino, 2009). Durch den Einsatz experimentell identifizierter Sortierungssignale dieser Endosomen- oder Lysosomen-assoziierten Proteine ist es möglich, Antigene gezielt in das endosomale / lysosomale Kompartiment einzubringen und somit dem MHC-Klasse-II-Präsentationsweg zuzuführen (Arruda *et al.*, 2006).

4.1.1 Generierung des Vektorsystems

Auf Basis des pGEM-Vektor-Systems für die Herstellung von *in vitro* transkribierter mRNA wurde ein Vektor zur gezielten Kreuzpräsentation endogen exprimierter Antigene auf MHC-Klasse-II-Molekülen generiert (siehe Abb. 4.2).

Hierzu wurden Teilsequenzen der humanen lysosomal- / endosomal-assoziierten Proteine LAMP1 (Lysosomen-assoziiertes Membran-Protein-1) und DC-LAMP (LAMP3, Lysosomen-assoziiertes Membran-Glykoprotein-3) auf DNS-Ebene in einem offenen Leserahmen (ORF) des Vektors fusioniert (CrossTag). Restriktionsschnittstellen zwischen den beiden Teilsequenzen erlaubten das Einfügen einer frei wählbaren Antigensequenz in den ORF. 5'-strangaufwärts zur Antigensequenz befindet sich das LAMP1-ER-Translokations-Signal (AS 1-28 der LAMP1-Sequenz; Wu *et al.*, 1995), welches die Translation des *ivt*-mRNA-kodierten Proteins in das endoplasmatische Retikulum gewährleisten sollte. 3'-strangabwärts zur Antigensequenz schließt sich die DC-LAMP-Transmembran- und Zytoplasma-Domäne (AS 376-416; Bonehill *et al.*, 2004) an. Die C-terminal gelegene zytoplasmatische Domäne dieses Proteins beinhaltet ein Signal-Motiv (AS 413-416; Guarnieri *et al.*, 1993) für den zielgerichteten Transport vom ER in das endosomale / lysosomale Kompartiment. Die CrossTag-Teilsequenzen wurden in Codon-optimierter Form zusammenhängend synthetisiert (GeneArt, Regensburg), mittels Restriktionsverdau aus Plasmid-DNS ausgeschnitten und in den adäquat vorbereiteten pGEM-Vektor ligiert.

Werden APZ mit entsprechender *ivt*-mRNA transfiziert, sollte das kombinierte Sortierungssignal somit den zellinternen Transport der flankierten Antigene zum lysosomalen / endosomalen Kompartiment und demnach die Präsentation möglicher Epitope auf MHC-Klasse-II-Molekülen sicherstellen.

LAMP1 (Homo sapiens)

ER Translokations-Signal

MAAPGSARRPLLLLLLLLLLGLMHCASA AMFMVKNGNGTACIMANFSAAFSVNYDTKS
 GPKNMTFDLPDATVVLNRRSSCGKENTSDPSLVIAFGRGHTLTLNFRNATRYSVQLMSF
 VYNLSDTHLFPNASSKEIKTVESITDIRADIDKKYRCVSGTQVHMNNVTVLHDATIQAYLS
 NSSFSRGETRCEQDRPSPPTAPPAPSPSPSPVPSVSKYVNSGTNGTCLLASMGLQ
 LNLTYERKDNTTVTRLLNINPNKTSASGSGCAHLVLELHSEGTTVLLFQFGMNASSSRFF
 LQGIQLNTILPARDPAFKAANGSLRALQATVGNYSYKCAEEHVRVTKAFSVNIFKVVWQ
 AFKVEGGQFGSVEECLLDENSMLPIAVGGALAGLVLIIVLIAYLVGRKRSHAGYQTI*

DC-LAMP (Homo sapiens)

MPRQLSAAAALFASLAVILHDGSSQMRKAFPEPTRDYSQPTAAATVQDIKKPVQPAKQAP
 HQTAAARFMDGHITFQAATVKIPIPTTTPATTKNATTSPITYTLVTTQATPNNSHAPPVTEV
 TVGPSLAPYSLPPTITPPAHTTGTSSSTVSHHTGNTTQPSNQTTLPATLSIALHKSTTGKQP
 VQPTHAPGTAAAHNTRTAAPASTVPGPTLAPQPSSVKTGIVQVLNGSRLCIIKAEMGIQL
 IVQDKESVFSRRYFNIDPNATQASGNCGRKSNLLNFQGGFVNLFTKDEESYIYSEVG
 AYLTVSDPETIYQGIKHAVVMFQTAVGHSFKCVSEQLQLSAHLQVKTDDVQLQAFDFEDD
 HFGNVDEC **SSDYTIVLPVIGAIVVGLCLMGMGVYKIRLCQSSGYQRI***

Transmembran- und Zytoplasma-Domäne

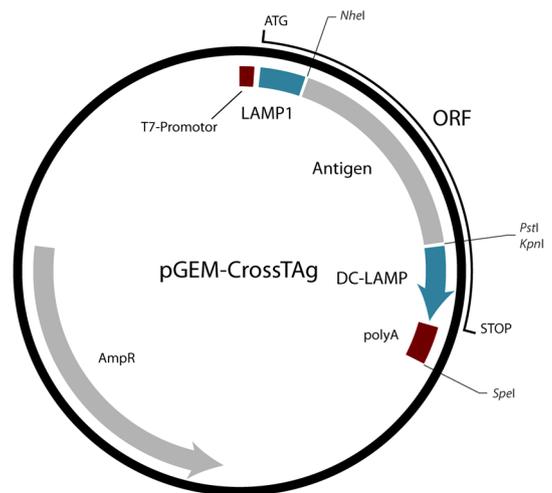
lysosomales/
endosomales
Signal

Abb. 4.2. DNS-Konstrukt zur zielgerichteten Kreuzpräsentation endogener Antigene auf MHC-Klasse-II-Molekülen (CrossTAag). Im pGEM-CrossTAag-Vektor zur Herstellung *in-vitro*-transkribierter mRNA (*ivt*-mRNA) liegt das Antigen in Fusion mit zwei Teilsequenzen endosomal- / lysosomal-assoziiierter Proteine vor. 5' strangaufwärts zur Antigensequenz befindet sich das ER-Translokations-Signal des humanen Lysosomen-assoziierten Membran-Proteins-1 (LAMP1; AS 1-28). 3' strangabwärts zur Antigensequenz schließt sich die Transmembran- und Zytoplasma-Domäne des humanen Lysosomen-assoziierten Membran-Glykoproteins-3 (DC-LAMP; AS 376-416) an. Die Teilsequenzen von LAMP1 und DC-LAMP bilden in Kombination mit dem eingefügten Antigen einen offenen Leserahmen (ATG → STOP). Zur Herstellung der *ivt*-mRNA wird Vektor-DNS mithilfe des Restriktionsenzym *SpeI* linearisiert und im Anschluss in einer *in-vitro*-Reaktion durch die T7-Polymerase (mMESSAGE mMACHINE-Kit, Ambion) transkribiert. Die Transkription beginnt am T7-Promotor und wird bis zum Ende der linearisierten DNS über den polyA-Fortsatz (120x Alanin) hinweg fortgesetzt. Zum Austausch der integrierten Antigene dienen die jeweils nur einmal in der Sequenz des Vektors vorhandenen Schnittstellen der Restriktionsenzyme *NheI*, *PstI* und *KpnI*. Zur Selektion in Bakterien trägt der Vektor das Ampicillin-Resistenz-Gen (AmpR).

4.1.2 Funktionelle Überprüfung des CrossTAag-Vektor-Systems

Um die Funktionalität des oben beschriebenen Antigen-Expressionssystems zu bestätigen, sollte in einem ersten Schritt die Kapazität Antigen-CrossTAag-*ivt*-mRNA-transfizierter APZ zur Aktivierung ausgewählter T-Zell-Klone getestet werden.

Durch das Einfügen einer geeigneten Antigensequenz zwischen die CrossTAag-Teilsequenzen im ORF des pGEM-CrossTAag-Vektors sollte der Erfolg der Kreuzpräsentation anhand eines etablierten, hinsichtlich seiner Spezifität charakterisierten CD4⁺ T-Zell-Klons (Klon 3H10, EBNA-3C-spezifisch, HLA-DRB1*11:01-restringiert) nachgewiesen werden. Zusätzlich dazu sollte mithilfe eines charakterisierten CD8⁺ T-Zell-Klons (Klon IVSB, Tyrosinase-spezifisch, HLA-A*02:01-restringiert) die Auswirkung des Sortierungssignals auf die MHC-Klasse-I-Präsentation überprüft werden.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene pGEM-Vektor-Konstrukte für die spätere Herstellung von *ivt*-mRNS erzeugt (siehe Abb. 4.3, A). Die Antigen-DNS-Sequenzen der zwei aufgeführten T-Zell-Klone wurden jeweils in den ORF des klassischen pGEM-Vektors sowie zwischen die Sortierungssignal-Teilsequenzen des neu-generierten pGEM-CrossTAg-Vektors eingebracht. Die gewünschten Antigensequenzen wurden mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus bereits in der Arbeitsgruppe vorliegender Plasmid-DNS amplifiziert. In der PCR eingefügte, randständige Restriktionsschnittstellen dienten der Ligation der Amplifikate in das jeweils adäquat vorbereitete Vektor-Plasmid. EBNA-3C wurde als 1kb-umfassende Teilsequenz (AS 421-780) des gesamten Gens kloniert und beinhaltet das Epitop für Klon 3H10. Das 1kb-Fragment ist repräsentativ für die durchschnittliche Länge humaner Gene und verhindert eventuelle negative Einflüsse des intakten Virus-Proteins. Für das Konstrukt IVSB-3H10(Epitope)-CrossTAg wurden die Epitope der T-Zell-Klone 3H10 (EBNA-3C, AS 628-641, VVRMF MRERQLPQS) und IVSB (Tyrosinase, AS 369-377, YMDGTMSQV) in Codon-optimierter Form gekoppelt als kurze DNS-Oligonukleotide synthetisiert (Sigma, Deisenhofen). Sinn- und Gegensinn-Stränge wurden durch Erhitzen und langsames Abkühlen hybridisiert und mittels passender Überhänge in den durch Restriktionsenzyme geschnittenen pGEM-CrossTAg-Vektor ligiert. Nach positiver Sequenzkontrolle durch einen DNS-Sequenzierservice (Sequiserie, Vaterstetten) wurden die einzelnen Konstrukte für die *ivt*-mRNS-Herstellung verwendet. Erhaltene *ivt*-mRNS-Produkte wurden in der Agarose-Gelelektrophorese auf Homogenität sowie Sequenzlänge kontrolliert und nachfolgend der Transfektion professionell Antigen-präsentierender Zellen zugeführt. Zur Überprüfung der T-Zell-Reaktivierung in der APZ-Kokultur sollten maturierte Dendritische Zellen (mDZ) eingesetzt werden. Hierzu wurden Monozyten eines HLA-A*02:01-, DRB1*11:01-positiven Spenders mittels Plastikadhärenz aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) angereichert. Die Monozyten-Kultur wurde mithilfe einer gestaffelten Zytokin-Zugabe sowie eines Maturierungs-Cocktails innerhalb von sieben Tagen zu mDZ ausgereift (Jonuleit *et al.*, 1997). So erhaltene mDZ wurden in Teilpopulation mit den oben beschriebenen *ivt*-mRNS-Spezies mittels Elektroporation transfiziert. Zusätzlich wurde rekombinant-exprimiertes 3H10-Epitop-GFP-Fusionsprotein oder YMD-Peptid (IVSB-Epitop) durch Zugabe ins Kulturmedium der Antigen-Prozessierung in mDZ zugeführt beziehungsweise exogen auf MHC-Klasse-I-Moleküle geladen (YMD-Peptid). Mature DZ, welche die Elektroporationsprozedur ausschließlich mit H₂O-Zugabe durchlaufen hatten, dienten als negative Elektroporationskontrolle. Wurden Zellen des CD4⁺ T-Zell-Klons 3H10 oder CD8⁺ T-Zell-Klons IVSB alleine kultiviert oder mit mDZ der negativen Elektroporationskontrolle kokultiviert, konnte keine

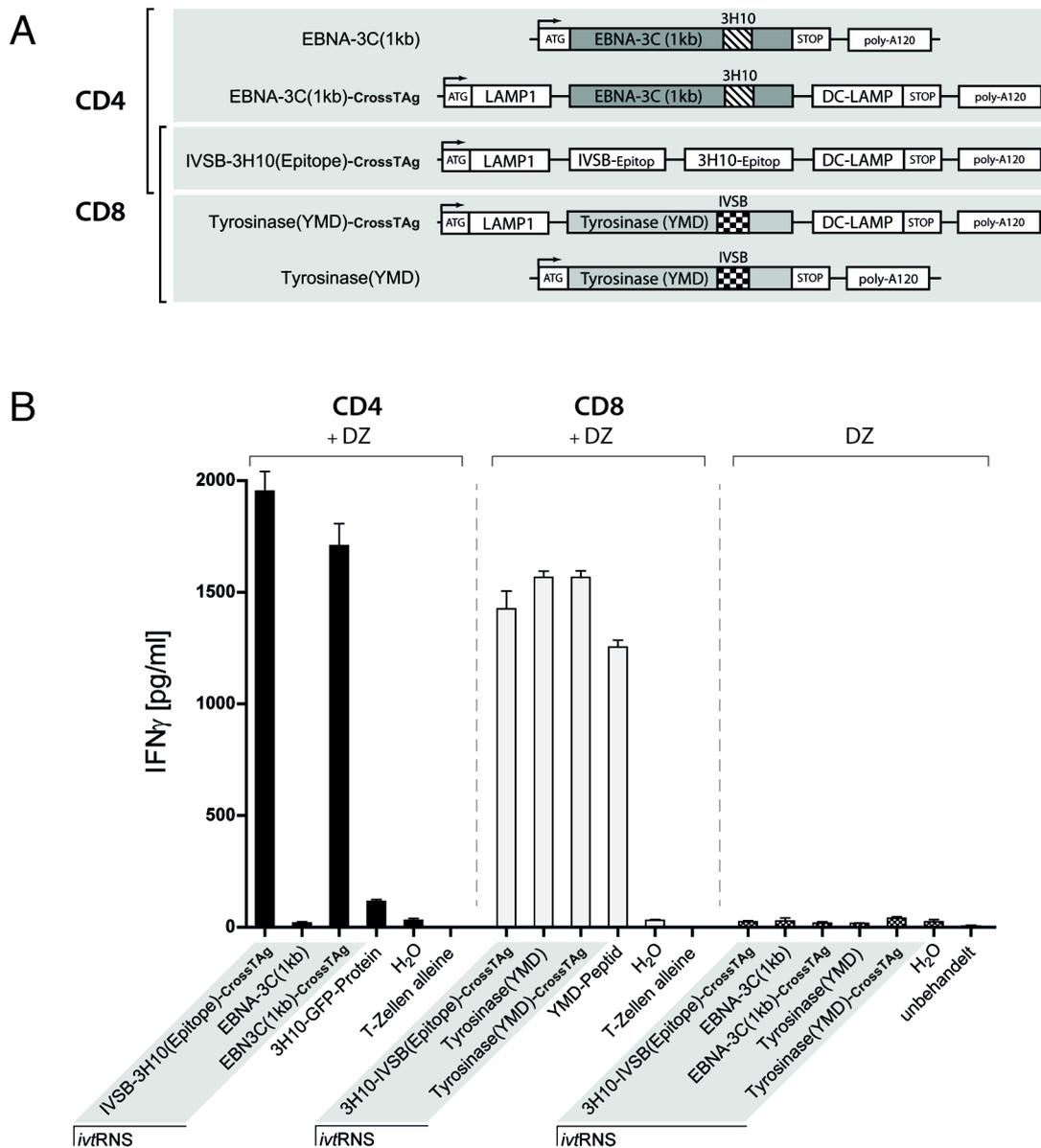


Abb. 4.3. **Funktionelle Überprüfung der zielgerichteten MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation mithilfe der Cross-TAg-Sequenz.** (A) Schematische Darstellung der zur *ivt*-mRNA-Herstellung genutzten Vektor-Konstrukte. Das Antigen eines definierten CD4⁺ T-Zell-Klons (Klon 3H10, EBNA-3C-spezifisch, HLA-DRB1*11:01-restringiert) sowie eines CD8⁺ T-Zell-Klons (Klon IVSB, Tyrosinase-spezifisch, HLA-A*02:01 restringiert) liegen jeweils mit, als auch ohne CrossTAG-Sequenz im pGEM-Vektor-System vor. EBNA-3C wurde als 1kb-umfassende Teilsequenz (AS 421-780) des gesamten Gens kloniert und beinhaltet das Epitop für Klon 3H10. Für das Konstrukt IVSB-3H10(Epitope)-CrossTAG wurden die kombinierten Epitope der T-Zell-Klone 3H10 (EBNA-3C, AS 628-641, VVRMFMRRERQLPQS) und IVSB (Tyrosinase, AS 369-377, YMDGTMSQV) an Stelle einer vollständigen Antigensequenz in den Vektor eingebracht. Alle Konstrukte für den CD8⁺ T-Zell-Klon IVSB tragen, im Gegensatz zum Wildtyp, einen Aminosäure-Austausch (Tyrosinase, N371D) im Bereich des Epitops. Zur Stabilisierung der *ivt*-mRNS tragen alle Konstrukte eine 120 Basenpaare-umfassende Poly-Adenin-Sequenz (poly-A120) 3' strangabwärts des ORFs. (B) Versuchsansatz zur Überprüfung der stimulatorischen Fähigkeit *ivt*-mRNS-transfizierter DZ. Mature DZ (7d) eines HLA-A*02:01-, DRB1 *11:01-positiven Spenders wurden einzeln mit 15 μ g aller, unter (A) aufgeführter, *ivt*-mRNS-Spezies transfiziert. Zusätzlich wurden DZ durch Zugabe von 20 μ g/ml rekombinanten 3H10-GFP-Proteins oder 10 μ g/ml YMD-Peptids (Tyrosinase, AS 369-377, YMDGTMSQV) ins Kulturmedium beladen. 7 h nach Elektroporation wurden jeweils $1 \cdot 10^5$ Zellen der unterschiedlichen DZ-Fractionen mit $1 \cdot 10^5$ CD4⁺ 3H10 oder $1 \cdot 10^5$ CD8⁺ IVSB - **Fortsetzung** S.66

Abb. 4.3 – **Fortsetzung:** T-Lymphozyten (Ratio 1:1) ko-kultiviert. Als Negativkontrolle wurden DZ in die T-Zell-Kokultur eingesetzt, welche zuvor die Elektroporationsprozedur ohne *ivt*-mRNS-Zugabe durchlaufen hatten (H₂O), sowie Ansätze ohne DZ oder T-Zellen mitgeführt. Im Balken-Diagramm dargestellt ist die IFN- γ -Konzentration in 200 μ l Kulturüberstand 16 h nach Ansatz der Kokultur (3H10, schwarze Balken; IVSB, weiße Balken). Die IFN- γ -Konzentration wurde mittels Standard-ELISA (Absorptionsmessung bei 450 nm, Wellenlängenkorrektur bei 570 nm) gemessen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus Messwert-Triplikaten ermittelt.

beziehungsweise eine nur sehr geringe IFN- γ -Sekretion gemessen werden (siehe Abb. 4.3, B). Wurden Zellen des CD4⁺ 3H10-Klons jedoch mit EBNA-3C(1kb)-CrossTA_g-*ivt*-mRNS-transfizierten mDZ kokultiviert, lag das Niveau der IFN- γ -Sekretion weit über dem der Kokultur mit 3H10-Epitop-GFP-Protein-beladenen DZ. Fehlte dagegen das CrossTA_g-Sortierungssignal in der Sequenz der *ivt*-mRNS, das heißt, wurden 3H10-T-Zellen mit EBNA-3C(1kb)-*ivt*-mRNS-transfizierten mDZ kokultiviert, konnte keine IFN- γ -Sekretion über dem Hintergrund der negativen Elektroporationskontrolle nachgewiesen werden. Im Falle des CD8⁺ IVSB-Klons lag die IFN- γ -Sekretion unabhängig von der Kokultur mit Tyrosinase- oder Tyrosinase-CrossTA_g-*ivt*-mRNS-transfizierten mDZ gleichauf, jedoch nur geringfügig über dem hohen Niveau der Sekretion in der Kokultur mit exogen YMD-Peptid-beladenen mDZ. Die IFN- γ -Sekretion des CD4⁺ 3H10-Klons sowie des CD8⁺ IVSB-Klons in Kokultur mit IVSB-3H10(Epitope)-CrossTA_g-*ivt*-mRNS-transfizierten mDZ lag in beiden Fällen annähernd auf dem gleichen hohen Niveau der jeweiligen Kokultur mit Antigen-CrossTA_g-*ivt*-mRNS-transfizierten mDZ. In Kulturen der einzelnen mDZ-Populationen ohne T-Zell-Zugabe konnten nur geringfügige unspezifische IFN- γ -Konzentrationen detektiert werden.

Wann immer APZ mit CrossTA_g-tragender Antigen-*ivt*-mRNS transfiziert wurden, kam es zur effizienten Präsentation der jeweils abgefragten Epitope auf MHC-Klasse-I- und Klasse-II-Molekülen. Eine gezielte Kreuzpräsentation endogen exprimierter Antigene auf MHC-Klasse-II-Molekülen ist somit möglich. Vektor-Konstrukte mit CrossTA_g-Sortierungssignal können somit Anwendung zur Antigen-spezifischen Reaktivierung oder *De-novo*-Induktion von CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Lymphozyten finden.

4.1.3 Synergistischer Mechanismus der zweigeteilten CrossTA_g-Sequenz

Zur genaueren Charakterisierung der CrossTA_g-Sequenz sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden, ob beide Teil-Sequenzen des kombinierten CrossTA_g-Sortierungssignals notwendig sind, um eine effiziente Kreuzpräsentation endogen exprimierter Antigene auf MHC-Klasse-II-Molekülen zu gewährleisten.

Zusätzlich zu bereits bestehenden pGEM-Vektor-Konstrukten aus Abschnitt 4.1.2 wurden hierzu zwei weitere Vektor-Varianten mit nur jeweils einem Teil der zweigeteilten CrossTAG-Sequenz erstellt. Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurden LAMP1-EBNA-3C(1kb)- als auch EBNA-3C(1kb)-DC-LAMP-Teilsequenzen aus pGEM-EBNA-3C(1kb)-CrossTAG-Plasmid-DNS amplifiziert und mittels eingefügter Restriktionsschnittstellen in entsprechend vorbereitete pGEM-Plasmid-DNS ligiert (siehe Abb. 4.4, A). Der Vektor pGEM-LAMP1-EBNA-3C(1kb)-A120 trägt im ORF somit eine Fusion des LAMP1-ER-Translokations-Signals mit der 3'-strangabwärts gelegenen Epitop-tragenden Antigen-Teilsequenz des CD4⁺ T-Zell-Klons 3H10. Im ORF des Vektors pGEM-EBNA-3C(1kb)-DC-LAMP-A120 liegt die 1kb-große EBNA-3C-Teilsequenz fusioniert mit der 3'-strangabwärts gelegenen DC-LAMP-Transmembran- und Zytoplasma-Domäne vor. Alle in Abb. 4.4, Abschnitt A, aufgeführten Vektor-Konstrukte wurden zur *inv*-mRNS-Herstellung herangezogen. Erhaltene *inv*-mRNS-Produkte wurden in der Agarose-Gelelektrophorese auf Homogenität sowie Sequenzlänge kontrolliert und der Transfektion Antigen-präsentierender Zellen zugeführt.

Zur Überprüfung des stimulatorischen Potentials verschieden transfizierter APZ-Populationen zur Reaktivierung des CD4⁺ T-Zell-Klons 3H10 wurden neben maturierten DZ (7-Tage-Protokoll) in diesem Abschnitt auch Mini-EBV-immortalisierte B-Zellen (mLCL; Moosmann *et al.*, 2002) eines HLA-DRB1*11:01-positiven Spenders in die T-Zell-Kokultur eingesetzt. Teilpopulationen von mDZ und mLCL wurden mit einzelnen der oben beschriebenen *inv*-mRNS-Spezies transfiziert und mit 3H10-T-Zellen kokultiviert. Als negative Elektroporationskontrolle dienten mDZ und mLCL, welche die Elektroporationsprozedur nur unter Zugabe von H₂O durchlaufen hatten.

Wurden Zellen des CD4⁺ T-Zell-Klons 3H10 alleine oder mit mDZ / mLCL der negativen Elektroporationskontrolle kokultiviert, konnte keine beziehungsweise nur eine geringe IFN- γ -Sekretion detektiert werden (siehe Abb. 4.4, B). Wurden 3H10-Zellen dagegen mit EBNA-3C(1kb)-CrossTAG-*inv*-mRNS-transfizierten mDZ / mLCL kokultiviert, konnte unabhängig von der Art der APZ eine effiziente IFN- γ -Sekretion nachgewiesen werden. Fehlte jedoch das CrossTAG-Signal vollständig oder war nur die DC-LAMP-Transmembran- und Zytoplasma-Domäne in die Sequenz der *inv*-mRNS integriert, kam es in der T-Zell-Kokultur weder mit mDZ noch mit mLCL zu einer IFN- γ -Sekretion über dem Hintergrund-Niveau der H₂O-Elektroporationskontrolle. Wurden mDZ / mLCL mit LAMP1-ER-Translokations-Signal-fusionierter EBNA-3C(1kb)-*inv*-mRNS transfiziert, konnte in beiden Fällen eine geringfügige IFN- γ -Sekretion festgestellt werden. Diese fällt im Vergleich zur Kokultur mit EBNA-3C(1kb)-CrossTAG-*inv*-mRNS-transfizierten mDZ / mLCL jedoch drastisch reduziert aus. In Kulturen der einzelnen

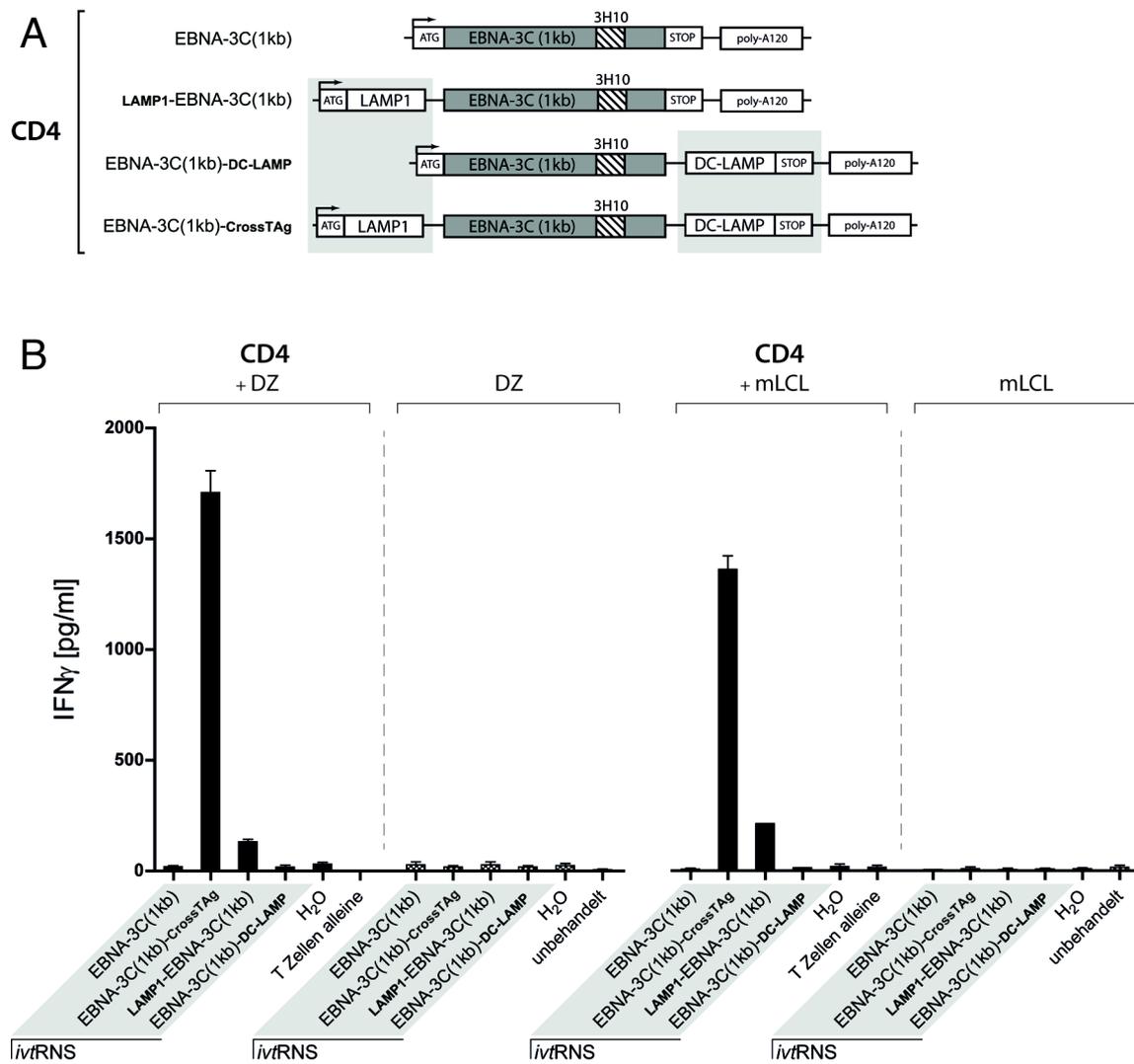


Abb. 4.4. Synergistischer Mechanismus der zweigeteilten CrossTAg-Sequenz zur gezielten MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation in unterschiedlichen APZ. (A) Schematische Darstellung der zur *ivt*-mRNA-Herstellung genutzten Vektor-Konstrukte. EBNA-3C wurde als 1kb-umfassende Teilsequenz (AS 421-780) des gesamten Gens kloniert und beinhaltet das Epitop des CD4⁺ Klon 3H10 (EBNA-3C-spezifisch; VVRMFMRRERQLPQS ; HLA-DRB1*11:01-restringiert). Diese EBNA-3C-Teilsequenz liegt mit, als auch ohne, CrossTAg-Sequenz im pGEM-Vektor-System vor. Zudem wurden Vektoren erstellt, in deren offenen Leserahmen die EBNA-3C-Sequenz mit jeweils nur einem Teil der zweigeteilten CrossTAg-Sequenz fusioniert vorliegt. (B) In zwei unabhängigen Experimenten wurden mature DZ (7d) als auch mini-EBV-immortalisierte B-Zellen (mLCL) eines DRB1*11:01-positiven Spenders einzeln mit 15 μ g allen, unter (A) aufgeführten, *ivt*-mRNS-Spezies transfiziert. 7 h nach Elektroporation wurden jeweils 1 \cdot 10⁵ Zellen der unterschiedlichen DZ / mLCL-Populationen mit 1 \cdot 10⁵ CD4⁺ 3H10 T-Lymphozyten (Ratio 1:1) kokultiviert. Als Negativkontrolle wurden DZ / mLCL in die T-Zell-Kokultur eingesetzt, welche zuvor die Elektroporationsprozedur ohne *ivt*-mRNS-Zugabe durchlaufen hatten (H₂O), sowie Ansätze ohne DZ / mLCL oder T-Zellen mitgeführt. Im Balkendiagramm dargestellt ist die IFN- γ -Konzentration in 200 μ l Kulturüberstand 16 h nach Ansatz der Kokultur. Die IFN- γ -Konzentration wurde mittels Standard-ELISA (Absorptionsmessung bei 450 nm, Wellenlängenkorrektur bei 570 nm) gemessen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus Messwert-Triplikaten ermittelt. (DZ-Kokulturdaten aus Abb. 4.3 und 4.4 wurden parallel in einem Experiment generiert).

mDZ- / mLCL-Populationen ohne T-Zell-Zugabe konnten nur geringfügige unspezifische IFN- γ -Konzentrationen nachgewiesen werden.

Aufgrund der offensichtlich synergistischen Wirkweise war eine effiziente Präsentation des 3H10-Epitops auf MHC-Klasse-II-Molekülen somit nur möglich, wenn beide Teil-Sequenzen des kombinierten CrossTA γ -Signals in die transfizierte *ivt*-mRNS integriert waren. Zudem zeigten Antigen-CrossTA γ -*ivt*-mRNS-transfizierte mLCL ein ähnlich ausgeprägtes Potential zur Reaktivierung des CD4⁺ T-Zell-Klons wie maturierte Dendritische Zellen.

4.1.4 Übertragbarkeit der gezielten MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation

Um die Übertragbarkeit der mittels Klon 3H10 generierten Daten zur Funktion der gezielten MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation zu bestätigen, sollte ein weiterer etablierter CD4⁺ T-Zell-Klon (Klon G11-3; B NRF1-spezifisch; HLA-DRB1*15:01-restringiert) auf Reaktivierung in Kokultur mit Antigen-CrossTA γ -*ivt*-mRNS-transfizierten APZ getestet werden.

Zu diesem Zweck wurden parallel zu Abschnitt 4.1.2 verschiedene pGEM-Vektor-Konstrukte für die Herstellung der zum Test benötigten *ivt*-mRNS generiert (siehe Abb. 4.5, A). Das EBV-Antigen B NRF1 wurde als 1kb-umfassende Teilsequenz (AS 1021-1318) des gesamten Gens kloniert und beinhaltet das Epitop für Klon G11-3. Für das Konstrukt G11-3(Epitop)-CrossTA γ wurde das Epitop des T-Zell-Klons G11-3 (B NRF1, AS 1238-1252, TDAWRFAMNYPRNPT) in Codon-optimierter Form als kurze Sinn- und Gegensinn-DNS-Oligonukleotide synthetisiert (Sigma, Deisenhofen) und nach Hybridisierung zwischen die CrossTA γ -Teilsequenzen in pGEM-CrossTA γ -Plasmid-DNS eingebracht. Alle in Abb. 4.5, Abschnitt A, aufgeführten Vektor-Konstrukte wurden der *ivt*-mRNS-Herstellung zugeführt und resultierende *ivt*-mRNS-Produkte in die Transfektion Antigen-präsentierender Zellen eingesetzt.

Um die Reaktivierung des T-Zell-Klons G11-3 in der APZ-Kokultur zu überprüfen, wurden mLCL eines HLA-DRB1*15:01-positiven Spenders in Teil-Populationen mit den in Abb. 4.5, Abschnitt A, aufgeführten *ivt*-mRNS-Spezies mittels Elektroporation transfiziert. Zusätzlich wurde rekombinant-exprimiertes B NRF1-Protein durch Zugabe ins Kulturmedium der Antigen-Prozessierung in mLCL zugeführt. Als negative Elektroporationskontrolle dienten mLCL, welche den Elektroporationsvorgang ausschließlich mit H₂O-Zugabe durchlaufen hatten.

Wurden Zellen des CD4⁺ T-Zell-Klons G11-3 alleine kultiviert oder mit mLCL der negativen Elektroporationskontrolle kokultiviert, konnte keine IFN- γ -Sekretion festgestellt

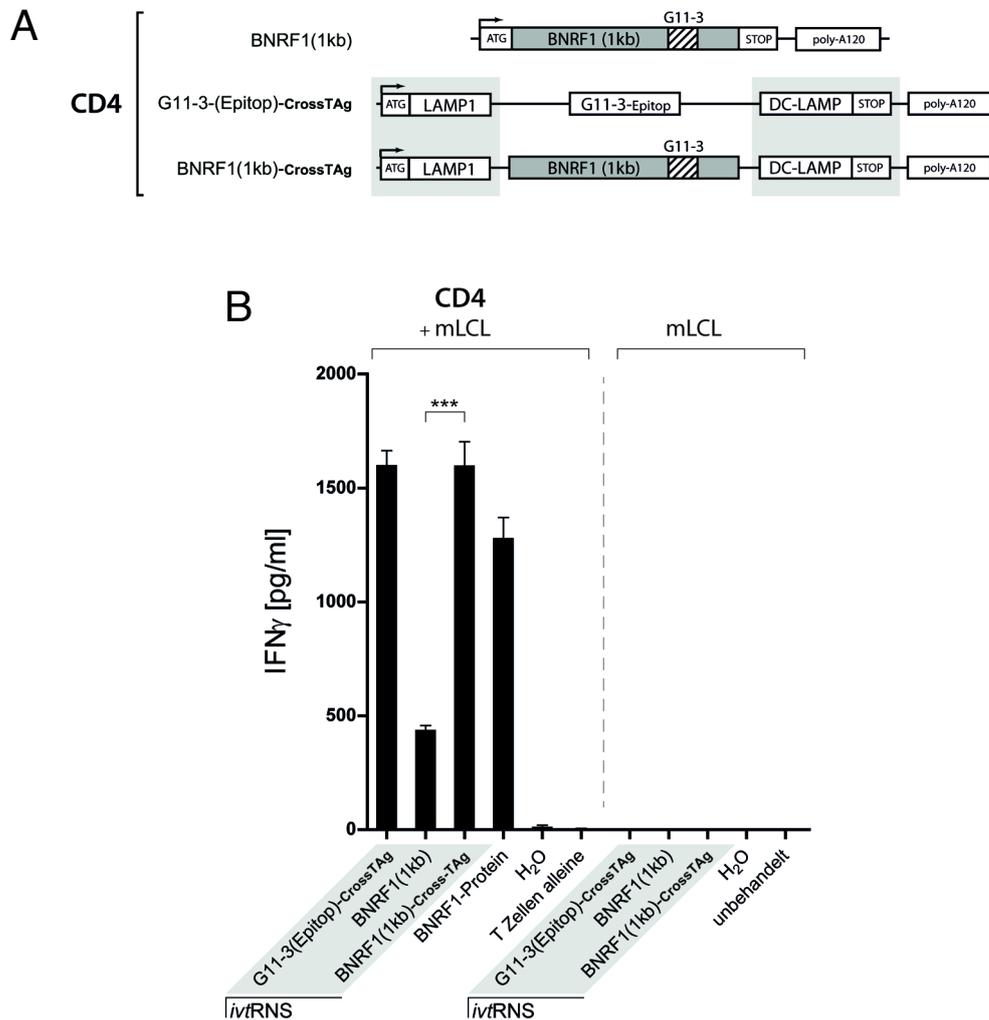


Abb. 4.5. Funktionelle Übertragbarkeit der gezielten MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation mittels CrossTAg-Sequenz. (A) Das Antigen des CD4⁺ T-Zell-Klons G11-3 (BNRF1-spezifisch; HLA-DRB1*15:01-restringiert) liegt mit, als auch ohne, CrossTAg-Sequenz im pGEM-Vektor-System vor. Das EBV-Tegument-Protein BNRF1 wurde als 1kb-umfassende Teilsequenz (AS 1021-1318) des gesamten Gens kloniert und beinhaltet das Epitop des CD4⁺ Klons G11-3 (BNRF1, AS 1238-1252, TDAWRFAMNYPRNPT). Für das Konstrukt G11-3(Epitop)-CrossTAg wurde das Epitop des T-Zell-Klons G11-3 an Stelle einer vollständigen Antigensequenz in den pGEM-CrossTAg-Vektor eingebracht. (B) mLCL eines DRB1*15:01-positiven Spenders wurden einzeln mit 15 μ g aller, unter (A) aufgeführter, *inv*-mRNS-Spezies transfiziert. Zusätzlich wurden mLCL, durch Zugabe von 20 μ g/ml rekombinanten BNRF1-Proteins ins Kulturmedium, mit Antigen beladen. 7 h nach Elektroporation wurden jeweils $1 \cdot 10^5$ Zellen der unterschiedlichen mLCL-Populationen mit $1 \cdot 10^5$ CD4⁺ G11-3 T-Lymphozyten (Ratio 1:1) kokultiviert. Als Negativkontrolle wurden mLCL in die T-Zell-Kokultur eingesetzt, welche zuvor die Elektroporationsprozedur ohne *inv*-mRNS-Zugabe durchlaufen hatten (H₂O), sowie Ansätze ohne mLCL oder T-Zellen mitgeführt. Im Balken-Diagramm dargestellt ist die IFN- γ -Konzentration in 200 μ l Kulturüberstand 16 h nach Ansatz der Kokultur. Die IFN- γ -Konzentration wurde mittels Standard-ELISA (Absorptionsmessung bei 450 nm, Wellenlängenkorrektur bei 570 nm) gemessen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus Messwert-Triplikaten ermittelt. (***, p-Wert < 0,001, Student-T-Test).

werden (siehe Abb. 4.5, B). Wurden G11-3-Zellen dagegen mit BNRF1(1kb)-CrossTAg- oder G11-3(Epitop)-CrossTAg-*ivt*-mRNS-transfizierten mLCL kokultiviert, lag das nachgewiesene Niveau der IFN- γ -Sekretion über dem der Kokultur mit BNRF1-Protein-beladenen mLCL. Fehlte dagegen das CrossTAg-Signal in der Antigen-*ivt*-mRNS-Sequenz fiel die IFN- γ -Freisetzung im Vergleich zu Antigen-CrossTAg-*ivt*-mRNS-transfizierten mLCL um über zwei Drittel reduziert aus. Für die jeweils alleine kultivierten mLCL-Populationen konnte keinerlei IFN- γ -Sekretion detektiert werden.

Die Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen der vorangegangenen Versuche und unterstreichen die funktionelle Effizienz des CrossTAg-Sortierungssignals zur gezielten Kreuzpräsentation exogener Antigene auf MHC-Klasse-II-Molekülen.

4.1.5 Weitere Charakterisierung der MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation

Im folgenden Abschnitt wurden Experimente durchgeführt, um ein unspezifisches Aktivierungsartefakt in Zusammenhang mit dem hier beschriebenen CrossTAg-Sortierungssignal auszuschließen und den Mechanismus der MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation weiter aufzuklären.

Zur Bestätigung der physiologischen Natur der CrossTAg-vermittelten Kreuzpräsentation in APZ sollte eine Verdünnungsreihe der Antigen-tragenden APZ als auch der zur Elektroporation eingesetzten Menge an Antigen-CrossTAg-*ivt*-mRNS in der T-Zell-Kokultur überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden mLCL eines HLA-DRB1*15:01-positiven Spenders mit zunehmender Menge an BNRF1(1kb)-CrossTAg-*ivt*-mRNS transfiziert (5 μ g, 10 μ g, 20 μ g und 30 μ g) und in abnehmender E:T-Ratio (1:1, 1:5, 1:10 und 1:20) mit Zellen des CD4⁺ T-Zell-Klons G11-3 kokultiviert (siehe Abb. 4.6). Die Zahl der eingesetzten Antigen-CrossTAg-*ivt*-mRNS-transfizierten mLCL wurde durch nicht-transfizierte mLCL ergänzt, so dass die Gesamtzahl der APZ in der jeweiligen Kokultur konstant gehalten wurde. Je weniger Antigen-CrossTAg-*ivt*-mRNS-transfizierte APZ in die Kokultur eingesetzt wurden, desto geringer war die nachgewiesene IFN- γ -Konzentration im Kulturüberstand. Parallel dazu fiel die IFN- γ -Freisetzung umso geringer aus, je weniger *ivt*-mRNS in die mLCL-Elektroporation eingesetzt wurde. Die IFN- γ -Sekretion des CD4⁺ T-Zell-Klons G11-3 unter den oben beschriebenen Kokultur-Bedingungen folgte somit einer eindeutigen Titrationskurve.

Um weiterführend auch den Antigen-Präsentationsweg der CrossTAg-induzierten Kreuzpräsentation zu untersuchen, sollte abschließend experimentell überprüft werden, ob Sortierungssignal-tragende Antigene in *ivt*-mRNS-transfizierten APZ direkt auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden, oder, ob die endogen exprimierten An-

tigene erst nach Sekretion und nachfolgender endozytotischer Wiederaufnahme dem klassischen MHC-Klasse-II-Präsentationsweg zugeführt werden können.

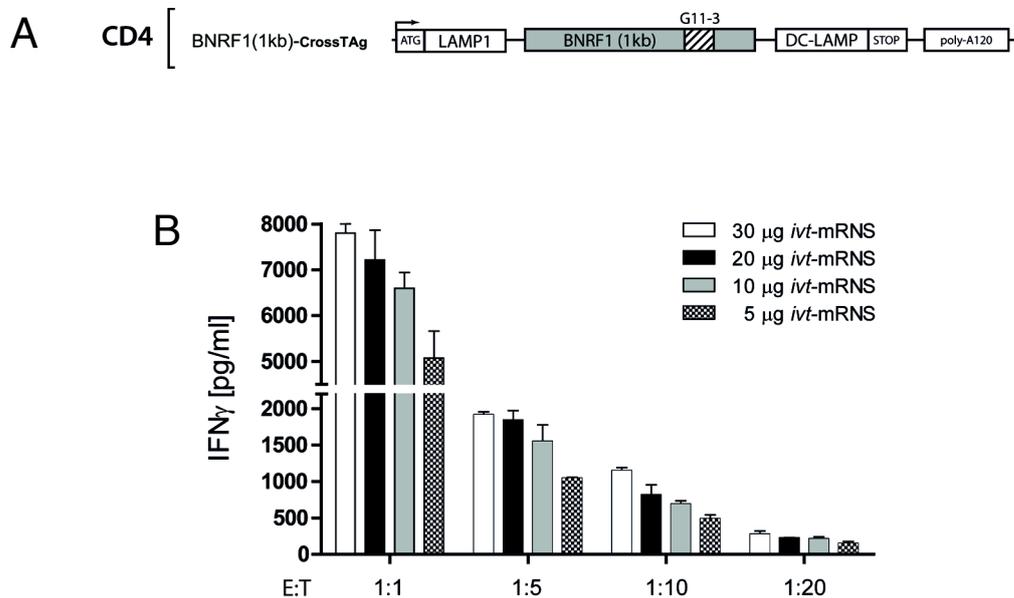


Abb. 4.6. **Stimulatorische Fähigkeit *ivt*-mRNS-transfizierter APZ nach Titration der eingesetzten *ivt*-mRNS-Menge.** (A) Schematische Darstellung des zur *ivt*-mRNA-Herstellung genutzten Vektor-Konstruktes. (B) mLCL eines DRB1*15:01-positiven Spenders wurden in gleichen Teilpopulation mit zunehmender Menge an BNRNF1(1kb)-CrossTAG-*ivt*-mRNS transfiziert (5 μ g, 10 μ g, 20 μ g und 30 μ g). 16 h nach Elektroporation wurden Zellen der unterschiedlichen mLCL-Populationen in abnehmender E:T-Ratio (1:1, 1:5, 1:10 und 1:20) mit $1 \cdot 10^5$ CD4⁺ G11-3 T-Lymphozyten kokultiviert. Die Zahl der eingesetzten mLCL wurde durch nicht-transfizierte mLCL auf $1 \cdot 10^5$ Zellen ergänzt. Die absolute Zahl der pro Einzelkultur eingesetzten mLCL wurde somit konstant gehalten, einzig die Zahl Antigen-präsentierender mLCL wurde titriert. Im Balken-Diagramm dargestellt ist die IFN- γ -Konzentration in 200 μ l Kulturüberstand 16 h nach Ansatz der Kokultur. Die IFN- γ -Konzentration wurde mittels Standard-ELISA (Absorptionsmessung bei 450 nm, Wellenlängenkorrektur bei 570 nm) gemessen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus Messwert-Triplikaten ermittelt.

Hierfür wurden DZ (3d-mDZ) / mLCL eines HLA-DRB1*11:01-positiven als auch eines HLA-DRB1*11:01-negativen Spenders mit EBNA-3C(1kb)-*ivt*-mRNS oder EBNA-3C(1kb)-CrossTAG-*ivt*-mRNS transfiziert und nach Elektroporation in verschiedenen Kombinationen kokultiviert (siehe Abb. 4.7). Wurden Zellen des CD4⁺ T-Zell-Klons 3H10 in die Kokultur mit oben genannten APZ-Kombinationen eingebracht, kam es nachfolgend ausschließlich bei Anwesenheit Antigen-CrossTAG-*ivt*-mRNS-transfizierter, HLA-DRB1*11:01-positiver DZ / mLCL zu einer nachweisbaren IFN- γ -Sekretion. Wurden 3H10-Zellen dagegen mit einer Mischung aus Antigen-CrossTAG-*ivt*-mRNS-transfizierten, HLA-DRB1*11:01-negativen und nicht-transfizierten, HLA-DRB1*11:01-

4.2 Methode zur Sortierung lebender Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten

Um die Charakterisierung Antigen-spezifischer T-Zellen zu gewährleisten, müssen diese vorerst klonal vereinzelt und expandiert werden. Nur so ist die eindeutige Definition der jeweiligen Antigen-spezifität möglich und die aussagekräftige Untersuchung der einzelnen TZR in Bezug auf TZR-Sequenz und Restriktion zielführend. Zudem ist es notwendig Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen vor der Klonierung gezielt anzureichern, da *de-novo*-induzierte Antigen-spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten auch nach mehrfachen Antigen-reaktivierten Proliferationszyklen nur einen sehr geringen Anteil an der PBL-*in-vitro*-Gesamtkultur stellen.

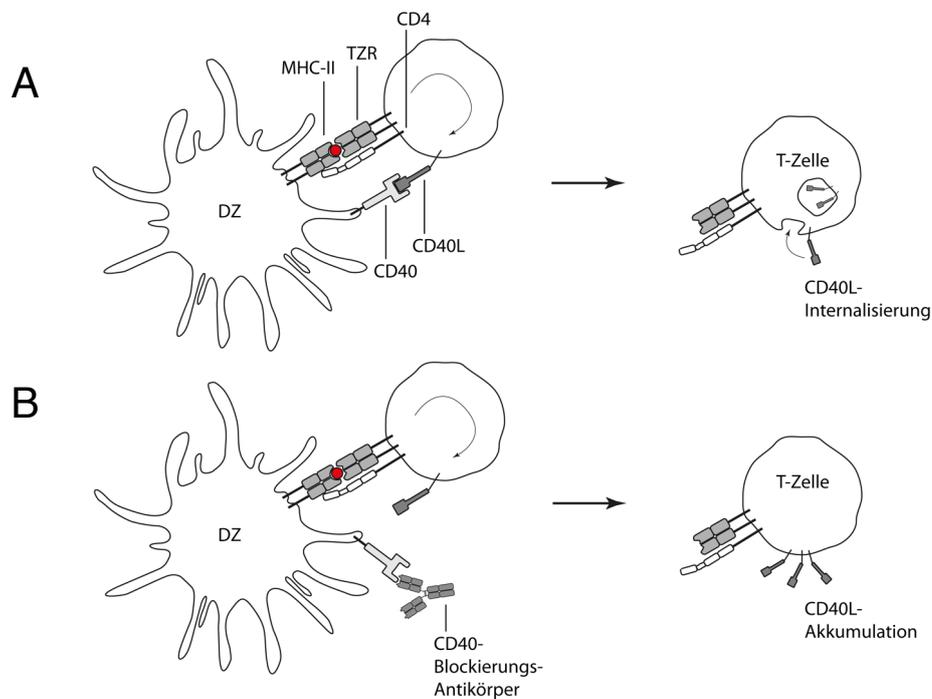


Abb. 4.8. **Methode zum Nachweis der CD154-Oberflächen-Expression auf lebenden CD4⁺ T-Lymphozyten.** (A) Internalisierung des Aktivierungs-induzierten CD40-Liganden (CD40L; alias CD154) nach Interaktion mit CD40 auf APZ. (B) Durch Antikörper-vermittelte Blockierung der CD40-CD154-Interaktion kommt es zur CD154-Akkumulation auf der T-Zell-Oberfläche. (Abbildung abgeändert nach Bevan, 2004).

Hierfür sollte eine Methode zur Sortierung lebender, Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten anhand des Aktivierungs-induzierten Oberflächenmarkers CD154 (CD40-Ligand; CD40L) zur Anwendung kommen (Chattopadhyay *et al.*, 2005; Frentsch *et al.*,

2005). Nach Aktivierung der CD4⁺ T-Lymphozyten durch spezifische Interaktion des TZR mit dem passenden MHC-Peptid-Komplex, wird CD40-Ligand *de-novo* auf der T-Zell-Oberfläche exprimiert (siehe Abb. 4.8). CD154 auf CD4⁺ T-Zellen dient während der Immunreaktion physiologisch als kostimulatorisches Signal zur Aktivierung von B-Zellen und APZ. Infolge der Interaktion des CD40-Liganden mit CD40 auf APZ kommt es zur raschen Internalisierung von CD154. Wird die CD40-CD154-Interaktion jedoch mithilfe eines CD40-Blockierungs-Antikörpers inhibiert, wird CD154 nicht internalisiert und akkumuliert somit auf der Oberfläche der CD4⁺ T-Zellen. In diesem Fall kann die CD154-Expression auf CD4⁺ T-Lymphozyten durch geeignete Fluoreszenz-markierte Antikörper im Durchflusszytometer nachgewiesen werden und zur Sortierung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen eingesetzt werden.

4.2.1 Etablierung der CD154-Oberflächen-Färbung

Bevor die Methode der CD154-Sortierung ihren Einsatz bei der Suche nach *de-novo*-induzierten Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten finden konnte, sollte die CD154-Oberflächen-Färbung in der *in-vitro*-Kokultur vorerst anhand definierter CD4⁺ T-Zell-Klone etabliert werden.

In einem ersten Schritt sollte die erfolgreiche Durchführbarkeit der oben beschriebenen Methode sowie die Kinetik der CD154-Expression nach Antigenkontakt auf zwei CD4⁺ T-Zell-Klonen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Zellen des Klons 3H10 (CD4⁺, EBNA-3C-spezifisch, HLA-DRB1*11:01-restringiert) als auch des Klons 234 (CD4⁺, Antigen unbekannt, HLA-A*24:01 allo-restringiert) mit oder ohne adäquaten spezifischen Antigenstimuli kokubiert (siehe Abb. 4.9). Eine effiziente CD154-Expression konnte in beiden Fällen nur dann nachgewiesen werden, wenn sowohl das spezifische Antigen auf APZ präsentiert wurde als auch der Antikörper zur Blockierung der CD40-CD154-Interaktion während der gesamten Kokultur-Phase anwesend war. Das CD154-Expressionsmaximum beider Klone wurde etwa sechs Stunden nach Beginn der APZ-Kokultur erreicht. Klon 234 zeigte jedoch eine rascher abfallende CD154-Expressionskinetik (Abb. 4.9, B) im Vergleich zu Klon 3H10 (Abb. 4.9, A). Im Fall des CD4⁺ T-Zell-Klons 3H10 war auch noch 24 Stunden nach APZ-Kokultur eine effiziente CD154-Oberflächen-Färbung nachzuweisen, wohingegen sich die CD154-Expression auf Klon 234 bereits nach 12 Stunden dem unspezifischen Hintergrund-Niveau anglich. Da für den gesamten Versuchsablauf der *De-novo*-Induktion Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen oft nur ein begrenztes Volumen an Spenderblut zur Generierung von mDZ zur

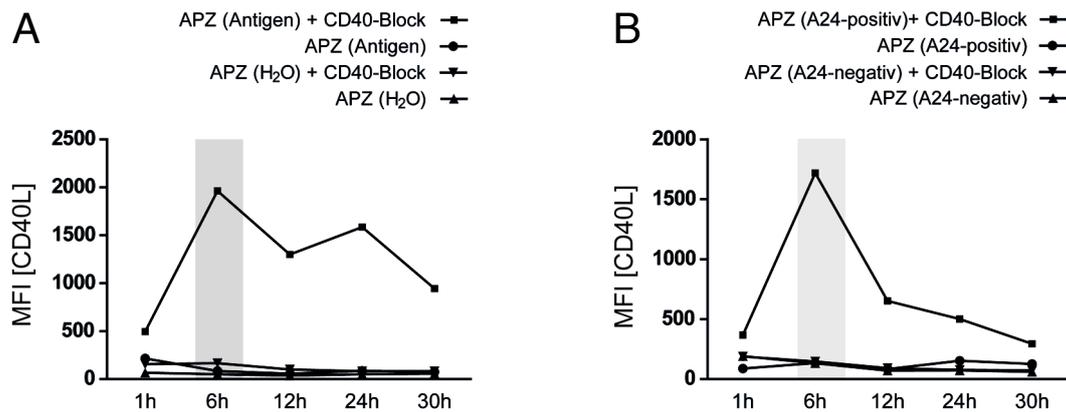


Abb. 4.9. **Zeitkinetik der Antigen-spezifischen CD154-Expression.** (A) Über die Zeit dargestellt ist die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) der CD154-Expression des EBNA-3C-spezifischen CD4⁺ T-Zell-Klons 3H10 (DRB1 *11:01-restringiert). mLCL eines DRB1*11:01-positiven Spenders wurden mit 20µg EBNA-3C(1kb)-CrossTag-*ivt*-mRNS transfiziert und 16 h nach Elektroporation mit CD4⁺ 3H10 T-Lymphozyten kokultiviert (Ratio 1:1). Die unterschiedlichen Kokultur-Varianten unterscheiden sich durch die An- bzw. Abwesenheit eines CD40-Blockierungs-Antikörpers. Als Negativkontrolle wurden mLCL in die T-Zell-Kokultur eingesetzt, welche zuvor die Elektroporationsprozedur ohne *ivt*-mRNS-Zugabe durchlaufen hatten (H₂O-Kontrolle). (B) Parallel zu A dargestellt ist die CD154-Expression des allo-reaktiven CD4⁺ T-Zell-Klons 234 (HLA-A*24:01 allo-restringiert). mLCL eines A*24:01-positiven sowie A*24:01-negativen Spenders wurden mit CD4⁺ 234 T-Lymphozyten kokultiviert (Ratio 1:1). Die unterschiedlichen Kokultur-Varianten ergeben sich wiederum durch die An- bzw. Abwesenheit des CD40-Blockierungs-Antikörpers. Alle Zellen wurden mittels monoklonaler Fluoreszenz-konjugierter Antikörper (αCD4-Hz450, αCD154-PE) angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Das CD154-Expressionsmaximum beider Versuchsansätze ist grau unterlegt.

Verfügung stand, war im Einzelfall ausschließlich eine T-Zellen:APZ-(E:T)-Ratio von 10:1 bis 20:1 in der CD154-Sortierungs-Kokultur möglich.

Nachfolgend sollte demzufolge die Anwendbarkeit der CD154-basierten Sortiermethode nach entsprechender Titration der E:T-Ratio in der *in-vitro*-Kokultur untersucht werden. Zellen des CD4⁺ T-Zell-Klons 3H10 wurden hierfür unter An- oder Abwesenheit des CD40-Blockierungs-Antikörpers in unterschiedlicher E:T-Ratio mit Antigen-beladenen APZ kokultiviert. Die Gesamtzahl der pro Kokultur eingesetzten APZ wurde jedoch durch die entsprechende Zugabe nicht-Antigen-transfizierter APZ konstant gehalten. Wie im Durchflusszytometer analysiert werden konnte, nahm der Anteil CD154-positiver Zellen, entgegen der Erwartung, mit steigender E:T-Ratio nachweisbar zu (siehe Abb. 4.10). Der Anteil CD154-positiver CD4⁺ T-Zellen stieg von 52,3% bei einer E:T-Ratio von 1:1 auf 66,9% bei einer Ratio von 20:1. Das entspricht einer maximal gemessenen Zunahme CD154-positiver Zellen um etwa 30% zum Niveau der 1:1-Ratio. Auch in Bezug auf die mittlere Fluoreszenz-Intensität konnte eine Verstärkung der CD154-Expression mit steigender E:T-Ratio beobachtet werden. Die Negativkontrolle der T-Zell-Kokultur mit nicht-Antigen-transfizierten APZ zeigte dagegen keine Anti-

gen-unspezifische CD154-Expression. In Kokulturen ohne CD40-Blockierungs-Antikörper konnten zudem keinerlei CD154-positive Zellen des Klon 3H10 nachgewiesen werden.

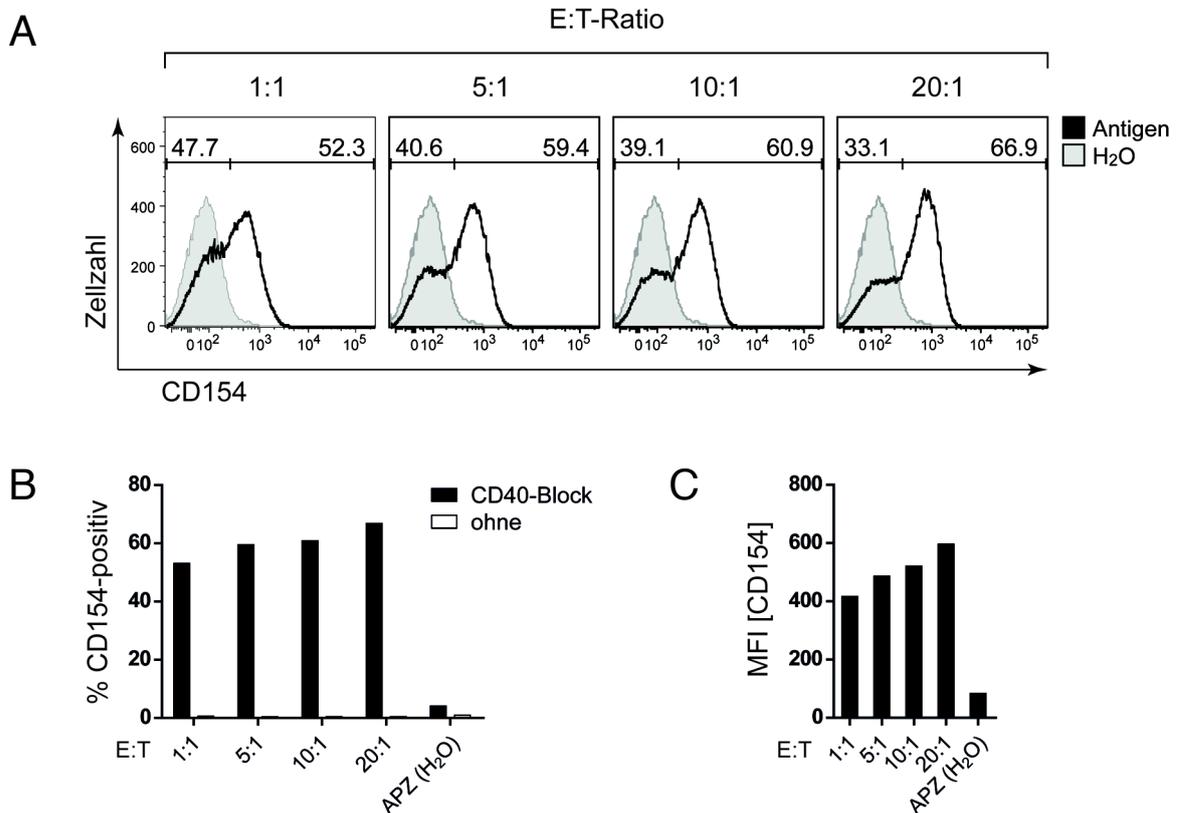


Abb. 4.10. **CD154-Oberflächen-Expression nach Titration Antigen-präsentierender APZ.** mLCL eines DRB1 *11:01-positiven Spenders wurden mit 20 μ g EBNA-3C(1kb)-CrossTag-*ivt*-mRNS transfiziert (APZ(Antigen)). 16 h nach Elektroporation wurden APZ(Antigen) mit 1·10⁶ CD4⁺ 3H10 T-Lymphozyten (EBNA-3C-spezifisch, DRB1*11:01-restringiert) mit zunehmender E:T-Ratio (1:1, 5:1, 10:1 und 20:1) kokultiviert. Die Zahl der pro Kokultur eingesetzten mLCL wurde durch APZ(H₂O) (mLCL, ohne *ivt*-mRNS-Zugabe elektroporiert) auf jeweils 1·10⁶ Zellen ergänzt. Als Negativkontrolle dienten APZ(H₂O) in einer separaten T-Zell-Kokultur. Die unterschiedlichen Kokultur-Varianten wurden sowohl mit, als auch ohne, CD40-Blockierungs-Antikörper kokultiviert. (A) In Histogrammen dargestellt ist die CD154-Oberflächen-Expression auf CD4⁺ 3H10 T-Lymphozyten 6h nach Beginn der Kokultur. Aufgeführt sind ausschließlich Kokulturen unter Einsatz des CD40-Blockierungs-Antikörpers. Die Daten der APZ(H₂O)-Kokultur (Negativkontrolle) sind hellgrau unterlegt. In Ziffern angegeben findet sich der prozentuale Anteil der im Vergleich zur Negativkontrolle positiven Zellen. (B) Im Balkendiagramm dargestellt sind die Prozent CD154-positiver CD4⁺ 3H10 Lymphozyten. Es wird unterschieden in Kokulturen mit und ohne CD40-Blockierungs-Antikörper. (C) Aufgeführt ist die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) der CD154-Oberflächen-Färbung auf CD4⁺ 3H10 Lymphozyten. Alle Zellen wurden mittels monoklonaler Fluoreszenz-konjugierter Antikörper (α CD4-Hz450, α CD154-PE) angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Nach Reaktivierung *de-novo*-induzierter T-Lymphozyten in der APZ-Kokultur mit einem E:T-Verhältnis zwischen 10:1 und 20:1 sollte es somit möglich sein, eine effektive CD154-Färbung aktivierter CD4⁺ T-Zellen durchzuführen.

4.2.2 Unspezifische CD154-Expression auf PBL nach *De-novo*-Induktion

Die oben gezeigten CD154-Expressionsdaten wurden in Zusammenhang mit APZ-Kokulturen etablierter CD4⁺ T-Zell-Klone generiert. Da jedoch eine PBL-Gesamtkultur als Ausgangspunkt für die *De-novo*-Induktion Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten dienen sollte, wurde in einem abschließenden Schritt die spontane CD154-Expression auf peripheren Blutlymphozyten nach Kokultur mit Antigen-beladenen mDZ untersucht. Die mDZ-induzierte CD154-Expression auf CD4⁺ Zellen der PBL-Population sollte in Relation zur CD154-Expression auf Antigen-spezifisch reaktivierten Zellen des CD4⁺ T-Zell-Klons 3H10 gesetzt werden.

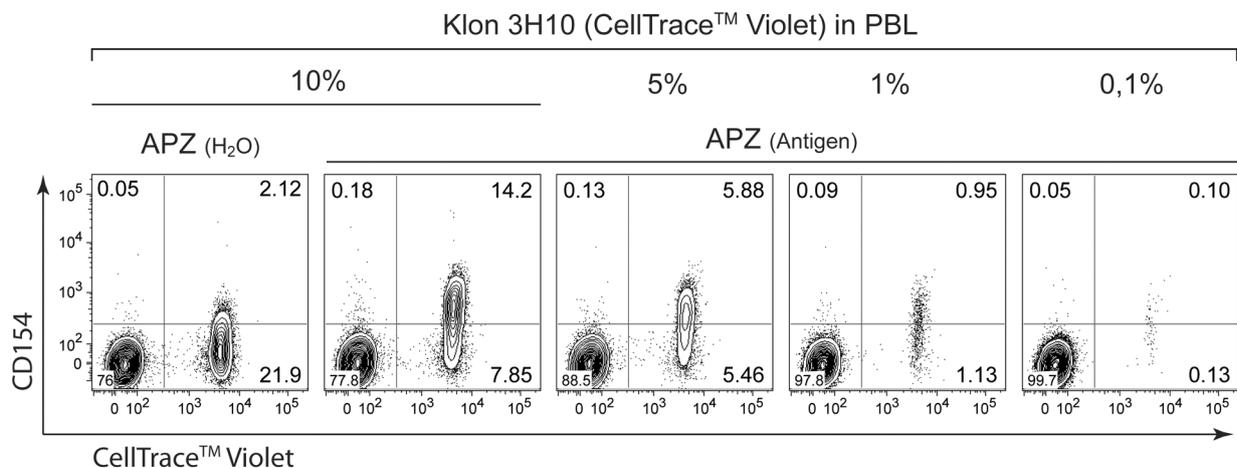


Abb. 4.11. **Untersuchung der spontanen CD154-Expression auf peripheren Blutlymphozyten nach *De-novo*-Induktion.** CD4⁺ 3H10 T-Lymphozyten (EBNA-3C-spezifisch) wurden mit fluoreszierendem Zellfarbstoff (CellTrace™ Violet) angefärbt und in periphere Blutlymphozyten (PBL) des autologen Spenders titriert (10%, 5%, 1% und 0,1%). In Anwesenheit eines CD40-Blockierungs-Antikörpers wurden die jeweiligen Lymphozyten-Populationen mit autologen EBNA-3C(1kb)-CrossTAG-*ivt*-mRNS-transfizierten DZ (3d-mDZ; APZ(Antigen)) kokultiert (E:T-Ratio 20:1). Als Negativkontrolle wurden DZ in die Lymphozyten-Kokultur eingesetzt, welche zuvor die Elektroporationsprozedur ohne *ivt*-mRNS-Zugabe durchlaufen hatten (APZ(H₂O)). In Kontur-Diagrammen dargestellt ist die CD154-Oberflächen-Expression auf CD4-vorselektierten T-Lymphozyten 6h nach Beginn der Kokultur. Alle Zellen wurden mittels monoklonaler Fluoreszenz-konjugierter Antikörper (α CD4-Hz450, α CD154-PE) angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. In Ziffern angegeben findet sich der prozentuale Anteil der, jeweils pro Selektionsabschnitt, positiven Zellen.

Zu diesem Zweck wurden EBNA-3C-spezifische 3H10-Zellen mit fluoreszierendem Zellfarbstoff markiert und in abnehmendem Anteil (10%, 5%, 1% und 0,1%) unter PBL des autologen Spenders gemischt. Die unterschiedlichen Lymphozyten-Populationen wurden nachfolgend in Anwesenheit eines CD40-Blockierungs-Antikörpers mit autologen EBNA-3C-beladenen mDZ in einer E:T-Ratio von 20:1 kokultiviert. Die in der durchflusszytometrischen Analyse detektierte, spontane CD154-Expression auf Zellen der CD4⁺ PBL-Fraktion überstieg nach Kokultur mit Antigen-beladenen mDZ in keinem Fall ein Hintergrundniveau von über 0,2% (siehe Abb. 4.11). Dahingegen konnten bezüglich der Antigen-spezifisch reaktivierten Zellen des T-Zell-Klons 3H10 je nach Titrationstufen zwischen 45 - 65% CD154-positive Zellen nachgewiesen werden. Selbst bei Untermischung von 0,1% 3H10-Zellen in die PBL-Gesamtpopulation konnten spezifisch reaktivierte Zellen des T-Zell-Klons 3H10 anhand der detektierten CD154-Expression in einem Verhältnis von 2:1 zu spontan CD154-exprimierenden CD4-positiven PBL nachgewiesen werden (0,1% zu 0,05%). Anzumerken ist, dass auch nach Kokultur mit nicht-Antigen-beladenen autologen mDZ ein geringer Anteil schwach CD154-positiver 3H10-Zellen nachzuweisen war. Die Zahl CD154-exprimierender Zellen der CD4⁺ PBL-Fraktion lag in diesem Fall nicht über dem zuvor genannten Hintergrundniveau von 0,2%.

Die Methode der Sortierung Antigen-spezifisch reaktiver CD4⁺ T-Lymphozyten anhand der CD154-Expression nach Antigen-Kontakt sollte somit erfolgreich für die Suche nach Tumor-Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in einer de-novo-induzierten PBL-Gesamtkultur anwendbar sein.

4.3 *De-novo*-Induktion Tumor-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen

Nach erfolgreicher Etablierung der Antigen-CrossTAg-*ivt*-mRNS-basierten MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation auf APZ sowie der CD154-vermittelten Sortierung lebender Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten sollten beide Methoden in einem Ansatz zur Generierung Tumor-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten zusammengeführt werden. TAA-spezifische CD4⁺ T-Zellen sollten aus peripheren Blutlymphozyten gesunder Spender isoliert werden, um die uneingeschränkte Anwendbarkeit der kombinierten Methode zu bestätigen.

Die direkte Isolierung reaktivierbarer TAA-spezifischer CD4⁺ Gedächtniszellen aus dem T-Zell-Repertoire gesunder Spender ist aufgrund einer meist fehlenden vorhergegangenen Immunantwort nur in Ausnahmefällen möglich. Da es sich bei Tumor-assoziierten Antigenen zudem um Selbst-Antigene handelt, ist aufgrund der negativen Selektion

tion im Thymus von einer nur sehr geringen Frequenz naiver TAA-spezifischer Vorläuferzellen auszugehen – soweit diese überhaupt vorhanden sind.

TAA-beladene maturierte DZ besitzen das Potential zur effizienten *De-novo*-Induktion naiver TAA-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten sowie zur Reaktivierung eventuell vorhandener TAA-spezifischer CD4⁺ Gedächtniszellen. In Kombination mit der sensitiven CD154-basierten Methode zur Identifikation Antigen-spezifisch reaktivierter CD4⁺ T-Zellen sollte es somit nach mehrfachen *in-vitro*-Proliferationszyklen möglich sein, TAA-spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten am Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer gezielt anzureichern und im Anschluss klonal zu vereinzeln.

T-Zell-*de-novo*-Induktionsansätze stellen sich in der Regel kostenintensiv und zeitaufwendig dar. Klassische Induktionsansätze beschränken sich in der Regel auf den Einsatz einzelner Stimulations-Antigene und sind somit anfällig für unvorhersehbare Spender-abhängige Unterschiede in der Immunantwort und die ungeklärte Immunität der jeweils eingesetzten Antigene.

Um nun das Risiko eines erfolglosen Versuchsansatzes zu minimieren, wurde in dieser Arbeit die Möglichkeit eines zeitgleichen Einsatzes verschiedener Tumor-Antigene in einer einzigen T-Zell-Kultur untersucht. Um das Konzept des multiplen Antigeneinsatzes in der *De-novo*-Induktion zu überprüfen, wurden folgende fünf C/T-(Cancer/Testis)-Antigene ausgewählt: GAGE-1, MAGE-A4, NY-ESO1, SSX4, XAGE-1. Die aufgeführten Antigene lagen als Plasmid-DNS in der Arbeitsgruppe vor (S. Milošević). Die Antigensequenzen wurden mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und mittels eingefügter Restriktionsschnittstellen zwischen die CrossTAg-Teilsequenzen in pGEM-CrossTAg-Plasmid-DNS eingebracht. Nach positiver Sequenzkontrolle wurden die einzelnen Vektor-Konstrukte der *ivt*-mRNS-Herstellung zugeführt.

4.3.1 Protokoll für die T-Zell-*De-novo*-Induktion

Das in Abschnitt 3.1.11 beschriebene Protokoll wurde zur gezielten *De-novo*-Induktion Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen entwickelt (siehe Abb. 4.12). Entgegen der gängigen Praxis wurde keine Anreicherung einer CD4- oder CD8-T-Zell-Subpopulation mithilfe der Antikörper-vermittelten negativen Separation im Magnetfeld (MACS) durchgeführt. Spender-PBMC wurden dementsprechend nach Plastikadhärenz der enthaltenen Monozyten als Gesamt-PBL für die *De-novo*-Induktion verwendet.

Reife DZ wurden in Teilpopulationen mit jeweils einer der fünf Antigen-CrossTAg-*ivt*-mRNS-Spezies transfiziert. Nach dem Mischen der Einzelansätze wurde die so erhaltene DZ-Mischpopulation in einer E:T-Ratio von 4:1 in die T-Zell-*de-novo*-Induktion ein-

gebracht, was einem effektiven Verhältnis von 20:1 in Bezug auf die einzelnen Antigene entsprach. Überzählige DZ der Mischpopulation wurden für die spätere Restimulation des T-Zell-Kulturansatzes kryopräserviert.

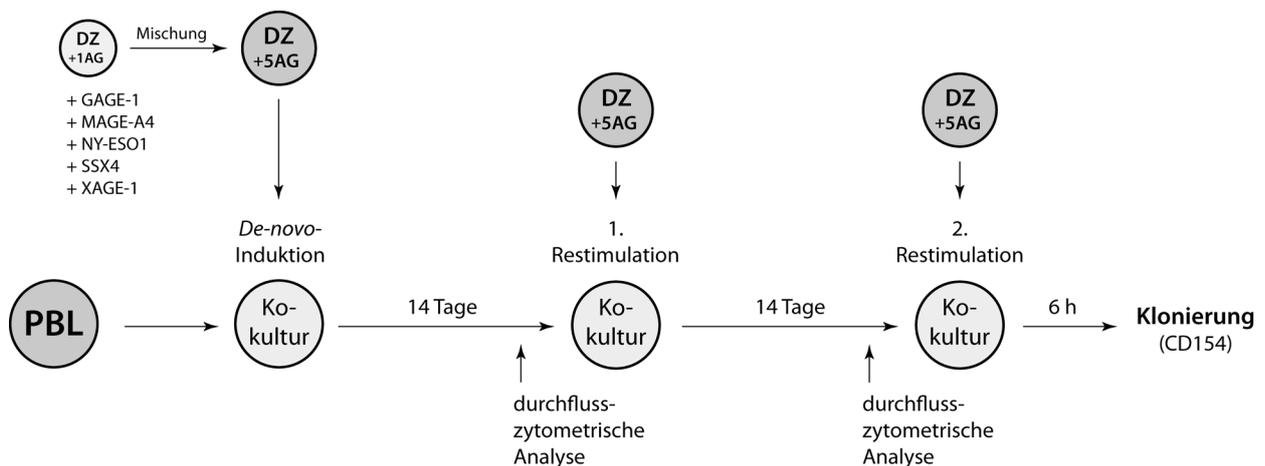


Abb. 4.12. **Protokoll für die *De-novo*-Induktion Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen mit *ivt*-mRNS-beladenen DZ.** Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der T-Zell-*De-novo*-Induktion. Reife DZ (3d-mDZ) wurden an Tag 0 in Teilpopulationen mit unterschiedlichen Antigen-CrossTag-*ivt*-mRNS-Spezies transfiziert (Antigene: GAGE-1, MAGE-A4, NY-ESO1, SSX4, XAGE-1) und 6h nach Elektroporation zu gleichen Teilen gemischt. Die Mischung Antigen-beladener DZ wurde im Verhältnis 1:4 in die Kokultur mit nicht-angereicherten PBL aus dem Überstand der, im Laufe der DZ-Maturierung vorhergegangenen, Monozyten-Plattenadhärenz eingebracht. Die zweite und dritte Stimulation (1. und 2. Restimulation) erfolgte 14 und 28 Tage nach der *De-novo*-Induktion. Einen Tag vor Ablauf des jeweiligen Stimulationszyklus (Tag 13 und 27) wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen der proliferierenden Kokultur mit *ivt*-mRNS-beladenen DZ restimuliert und durchflusszytometrisch analysiert. Sechs Stunden nach Beginn des dritten Stimulationszyklus wurden CD4⁺ T-Lymphozyten anhand ihrer CD154-Expression am Durchflusszytometer direkt in 96-Loch-Kulturplatten sortiert (1 Zelle/Loch; 3 Zellen/Loch und 6 Zellen/Loch) und weiterkultiviert. Über die Dauer der Kokultur wurden die Zellen in einem nahezu konfluenten Zustand gehalten und alle drei Tage frisches Kulturmedium mit 20 IU/ml IL-2 und 5 ng/ml IL-7 zugesetzt.

Jeweils 14 und 28 Tage nach Ansatz der *De-novo*-Induktion wurden kryopräservierte Zellen der DZ-Mischpopulation aufgetaut und zur ersten und zweiten Restimulation der T-Lymphozyten in die Kokultur eingebracht. Sechs Stunden nach Beginn der zweiten Restimulation wurden spezifisch reaktivierte CD4⁺ T-Lymphozyten am Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer anhand der induzierten CD154-Expression kloniert.

4.3.2 Durchflusszytometrische Analyse der Ausgangskultur

Über Plastikadhärenz angereicherte Monozyten wurden mithilfe des 3-Tage-Protokolls zu mDZ ausdifferenziert. Nach Abschluss des Maturierungsprozesses wurden die nun reifen DZ geerntet und im Durchflusszytometer auf die Expression charakteristischer Oberflächenmarker *in-vitro*-generierter DZ hin untersucht (siehe Abb. 4.13). Diese Oberflächenmarker dienen zur Bestimmung der stimulatorischen Kapazität der mDZ sowie zur eindeutigen Abgrenzung der ausdifferenzierten DZ von Monozyten und Makrophagen.

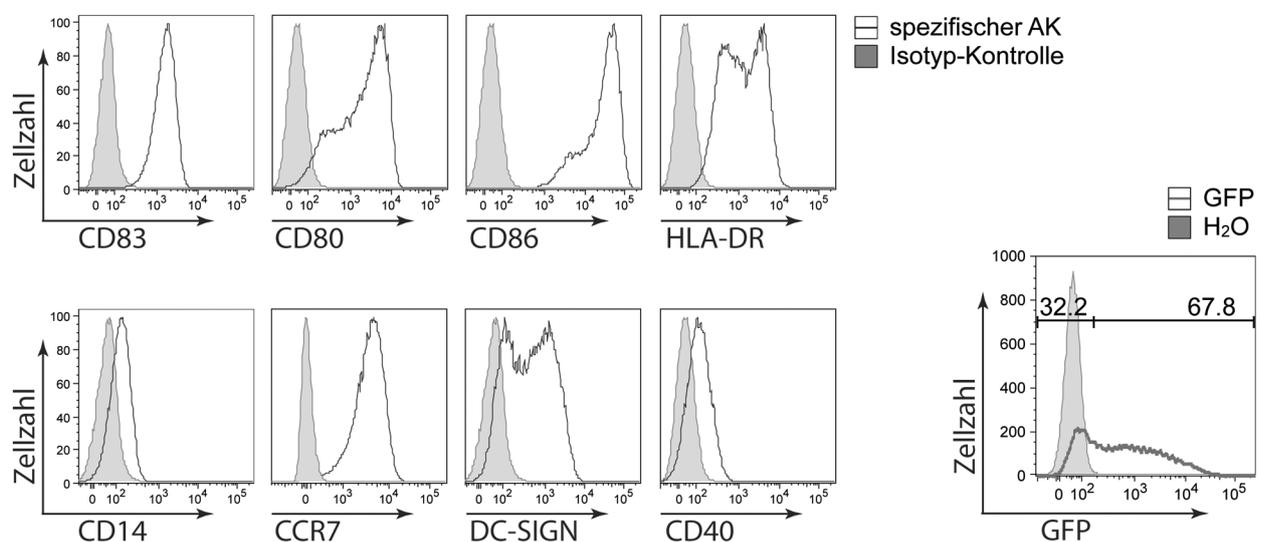


Abb. 4.13. **Phänotyp der ausgereiften DZ für die *De-novo*-Induktion und Transfektionskontrolle.** Die Histogramme zeigen die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse ausgewählter Maturierungsmarker auf 3d-mDZ mithilfe spezifischer Antikörper (graue, nicht ausgefüllte Kurven) sowie der jeweils zugehörigen Isotyp-Kontrolle (graue, ausgefüllte Kurven) nach Ablauf der dreitägigen Ausreifungsphase. Als Transfektionskontrolle gezeigt ist die durchflusszytometrische Analyse der GFP-Expression in mDZ 6h nach GFP-*in-vitro*-mRNS-Elektroporation (graue, nicht gefüllte Kurve). Als Negativkontrolle dienten DZ, welche die Elektroporationsprozedur ohne *in-vitro*-mRNS-Zugabe durchlaufen hatten (H₂O; graue, ausgefüllte Kurve). In Ziffern angegeben findet sich der Anteil GFP-negativer und -positiver Zellen in Prozent in Bezug auf die Isotyp-Kontrolle.

Die zur T-Zell-*De-novo*-Induktion generierten DZ zeigten eine starke Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) und CD40. CD83 als Marker für den Reifegrad der DZ wurde erwartungsgemäß hoch exprimiert. HLA-DR als Referenz für die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen auf APZ war auf allen DZ in großer Zahl nachweisbar. Zudem konnte eine hohe Oberflächen-Expression des Chemokinre-

zeptors CCR7 detektiert werden. Das an der immunologischen Synapse beteiligte Zelladhäsions-Molekül DC-SIGN (CD209) war auf einem Großteil der analysierten Zellen intermediär bis hoch exprimiert. Der Monozyten-Marker CD14 zur Abgrenzung der maturierten DZ von unreifen DZ (iDZ) war trotz Einhaltung der 24-Stunden-Maturierungsphase ungewöhnlich hoch exprimiert. Die hier eingesetzten DZ zeigten demnach, mit Ausnahme der erhöhten CD14-Expression, den Phänotyp vollständig ausgereifter *in-vitro*-mDZ. Zur Kontrolle des Transfektionserfolges wurden mDZ parallel zu den Transfektionsansätzen mit einzelnen Antigenen ebenfalls mit GFP-*ivt*-mRNS elektroporiert. In Folge der Transfektion exprimierten über 65% der analysierten DZ das GFP-Protein hoch bis sehr hoch und bestätigten damit die Effizienz der gewählten Elektroporationsbedingungen (siehe Abb. 4.13).

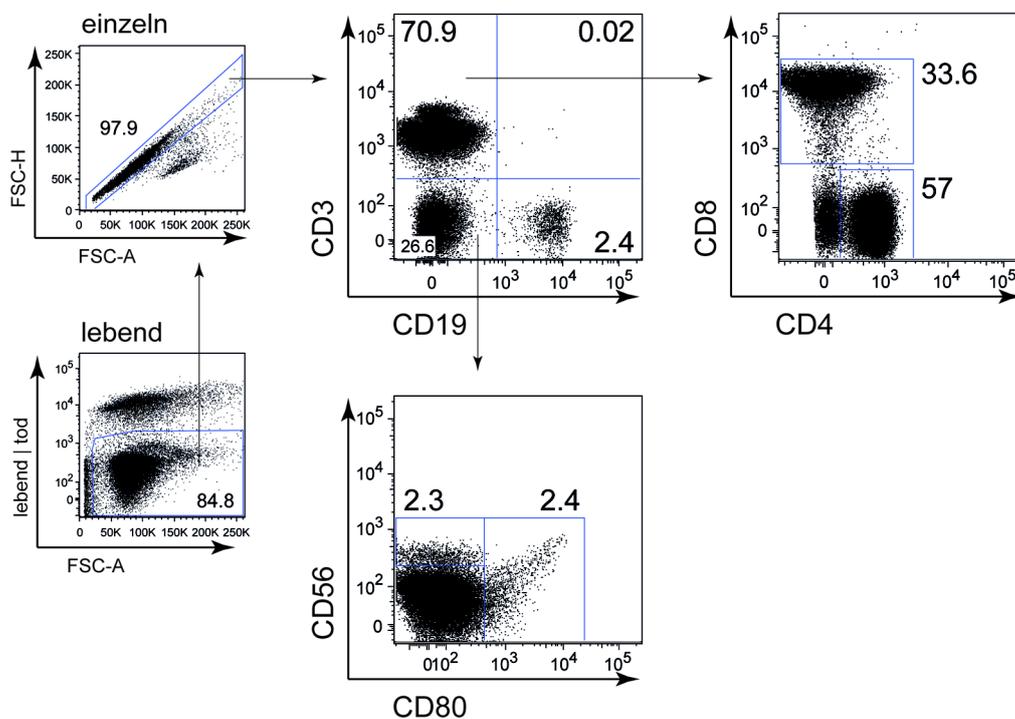


Abb. 4.14. Durchflusszytometrische Analyse der peripheren Blutlymphozyten vor Ansatz der *De-novo*-Induktion.

In Streudiagrammen dargestellt ist die differentielle Analyse der Subpopulationen der eingesetzten peripheren Blutlymphozyten (PBL). Die Populations-Oberflächenmarker (CD3, CD4, CD8, CD19, CD56 und CD80) wurden mithilfe von Fluoreszenz-konjugierten Antikörpern spezifisch angefärbt und im Durchflusszytometer analysiert (α CD3-Pacific Blue, α CD4-PerCP, α CD8-PE, α CD19-PE-Cy7, α CD56-Alexa700, α CD80-APC-Cy7). Zu unterscheiden sind CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten (CD3-positiv), B-Zellen (CD19-positiv, CD3-negativ), NK-Zellen (CD56-positiv, CD3-negativ) und aktivierte Monozyten (CD80-positiv, CD19-negativ). Die zu untersuchende Probe wurde auf lebende Zellen vorselektiert. In Ziffern angegeben findet sich der prozentuale Anteil der, jeweils pro Selektionsfenster, positiven Zellen.

Die in der Plastikadhärenz nicht-adhärenzten Zellen der PBL-Fraktion wurden zuerst durchflusszytometrisch auf ihre Zusammensetzung hin charakterisiert und nachfolgend zur TAA-spezifischen *De-novo*-Induktion in die Kokultur mit der Mischpopulation Antigen-beladener mDZ eingebracht (siehe Abb. 4.14).

Die hier eingesetzte PBL-Population enthielt neben den gewünschten CD4⁺ T-Lymphozyten zudem noch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und Überreste aktivierter Monozyten als physiologische Bestandteile des peripheren Blutes. Der Anteil CD3-positiver T-Lymphozyten an der PBL-Population lag bei etwa 71%. Die aus dem direkten Verhältnis von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der CD3-positiven Lymphozyten-Fraktion ermittelte CD4/CD8-Ratio lag bei 1,69. Knapp 10% der CD3-positiven T-Lymphozyten exprimierten weder CD4 noch CD8. B-Zellen (CD19-positiv, 2,4%) und Monozyten (CD80-positiv, 0,6% der lebenden Zellen) waren nach vorhergegangener Plastikadhärenz nur noch in geringer Zahl vorhanden. Die Fraktion der CD56-positiven NK-Zellen stellte einen Anteil von 0,6% an der Gesamtpopulation lebender PBL. In etwa 25% der Zellen ließen sich in keine der untersuchten Leukozyten-Subpopulationen einordnen.

4.3.3 Klonierung CD154-positiver CD4⁺ T-Lymphozyten

Jeweils einen Tag vor DZ-Restimulation (Tag 13 und 27) wurde die PBL-Kultur hinsichtlich der Zahl CD154-positiver CD4⁺ T-Zellen nach Antigen-spezifischer Reaktivierung untersucht. Hierzu wurde jeweils eine kleine PBL-Teilpopulation in Anwesenheit des CD40-Blockierungs-Antikörpers mit 5-Antigen-CrossTAg-*ivt*-mRNS-transfizierten mDZ kokultiviert und nach Ablauf der sechsständigen Inkubationsphase im Durchflusszytometer mithilfe Fluoreszenz-konjugierter Antikörper analysiert (siehe Abb. 4.15). Der Anteil CD154-positiver CD4⁺ T-Zellen stieg von 4,6% an Tag 13 auf über 30% an Tag 27. Das bedeutete eine annähernde Versiebenfachung der durch Antigen-beladene DZ reaktivierbaren CD4⁺ T-Lymphozyten innerhalb des ersten Restimulationszyklus.

Zeitgleich zur Analyse der CD154-Expression konnte die Proliferations-dynamische Veränderung des CD4/CD8-T-Lymphozyten-Verhältnisses untersucht werden. Die CD4/CD8-Ratio invertierte innerhalb der ersten 13 Kokultur-Tage von 1,69 an Tag 0 (siehe oben) zu 0,74 an Tag 13. Der Trend hin zu einer überwiegenden CD8⁺ T-Zell-Proliferation wurde durch die an Tag 27 gemessene CD4/CD8-Ratio von 0,67 bestätigt.

Im Anschluss an die zweite Restimulation der gesamten PBL-Kultur mit mDZ an Tag 28 sollten nun Antigen-spezifisch reaktivierte CD4⁺ T-Lymphozyten, parallel zu den

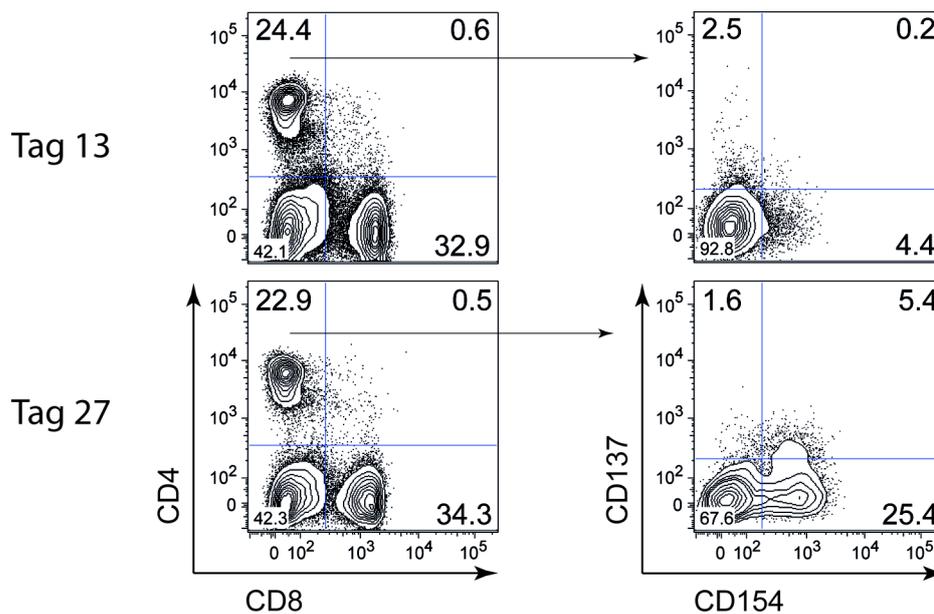


Abb. 4.15. **Probefärbung der CD154-Expression auf CD4⁺ T-Lymphozyten nach Antigen-spezifischer Restimulation.** In Kontur-Diagrammen dargestellt ist die Expression ausgewählter Oberflächen-Moleküle auf T-Zellen des *De-novo*-Induktionsansatzes (Tag 13 und 27) jeweils 6h nach Restimulation mittels Antigen-CrossTAG-*ivt*-mRNS-transfizierter DZ. Die Oberflächenmarker (CD4, CD8, CD137 und CD154) wurden mithilfe von Fluoreszenz-konjugierten Antikörpern spezifisch angefärbt und im Durchflusszytometer analysiert (α CD4-Hz450, α CD8-Hz500, α CD137-APC, α CD154-PE). Die zu untersuchende Probe wurde auf lebende, einzelne Lymphozyten vorselektiert. In Ziffern angegeben findet sich der prozentuale Anteil der, jeweils pro Selektionsabschnitt, positiven Zellen.

oben gezeigten Ergebnissen, mithilfe der CD154-Expression am Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer angereichert und kloniert werden. Die Selektionsstrategie der gewünschten Lymphozyten-Fraktion ist im Detail in Abbildung 4.16 dargestellt. Zur Unterscheidung toter und lebendiger Zellen wurde in diesem speziellen Fall der Fluoreszenz-Farbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), anstelle des herkömmlich genutzten Propidiumiodid, herangezogen. In Übereinstimmung mit den Tags zuvor generierten CD154-Expressionsdaten wurde ein Anteil von über 30% CD154-positiver Zellen an der Gesamtpopulation der CD4⁺ T-Lymphozyten detektiert. Die Klonierung CD154-positiver CD4⁺ T-Zellen wurde am Zellsortierer (FACS-Aria, BD) mittels direkter Sortierung in 96-Loch-Kulturplatten durchgeführt. Es wurden Kulturplatten mit jeweils einer, drei oder sechs Zellen pro Loch angelegt. Nach Abschluss der Plattenklonierung wurden alle verbliebenen CD4⁺ T-Lymphozyten in eine CD154-negative sowie eine CD154-positiv Fraktion sortiert und unter Zugabe Antigen-transfizierter DZ in der Zellkultur als T-Zell-Linien etabliert. Die Zellen der Plattenklonierung wurden direkt im Anschluss an die Sortierungsprozedur mithilfe von PHA und einer Mischung 5-Antigen-Cross

TAg-*ivt*-mRNS-transfizierter mLCL des autologen Spenders erneut restimuliert und nach IL-2-Zugabe für 14 Tage weiterkultiviert.

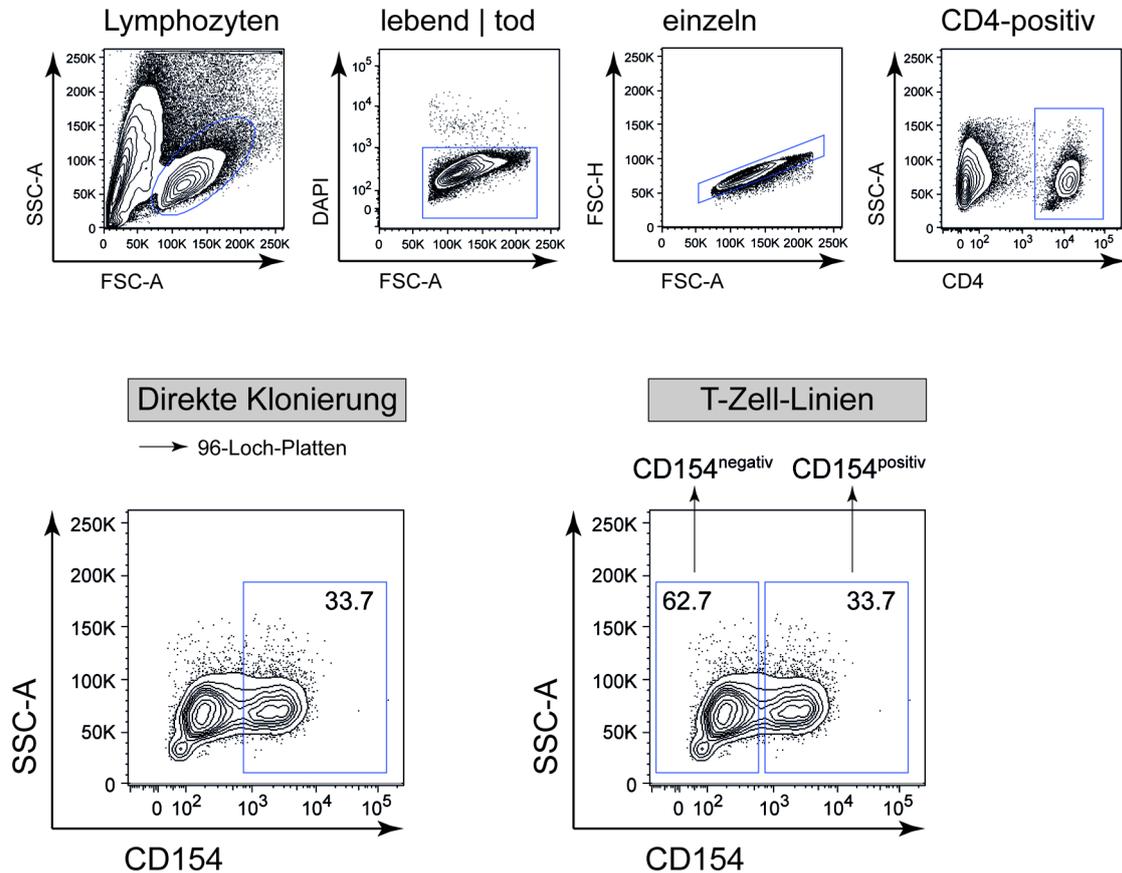


Abb. 4.16. **Sortierung CD154-positiver CD4⁺ T-Lymphozyten nach wiederholter spezifischer Restimulation.** In Kontur-Diagrammen dargestellt ist die Strategie zur durchflusszytometrischen Sortierung CD154-positiver CD4⁺ T-Lymphozyten der *De-novo*-Induktion 28 Tage nach Beginn der ursprünglichen Kokultur. Sechs Stunden nach Beginn des dritten spezifischen Stimulationszyklus durch Einsatz Antigen-CrossTAg-*ivt*-mRNS-transfizierte DZ (5 Antigene) wurden CD4⁺ T-Lymphozyten anhand ihrer CD154-Expression am Durchflusszytometer direkt in 96-Loch-Kulturplatten sortiert (1 Zelle/Loch; 3 Zellen/Loch und 6 Zellen/Loch) und weiterkultiviert. Nach Abschluss der Plattenklonierung wurden alle verbliebenen CD4⁺ Lymphozyten in Fraktionen zur Etablierung einer CD154^{negativ} sowie CD154^{positiv} Linie sortiert. Die Färbung erfolgte mithilfe monoklonaler Fluoreszenz-konjugierter Antikörper (α CD4-Hz450, α CD154-PE). In Ziffern angegeben findet sich der prozentuale Anteil an Zellen je Selektionsfenster.

4.3.4 Suche nach Tumor-Antigen-reaktiven CD4⁺ T-Zell-Klonen

Auf die CD154-Sortierung folgend sollte anhand der CD4⁺ T-Zell-Linien eine Einschätzung der Sortierungseffizienz gewonnen werden und einzelne T-Zell-Klone der Plattenklonierung auf ihre Tumor-Antigen-Reaktivität hin untersucht werden.

Um die Proliferation der CD154-positiv- und CD154-negativ-sortierten CD4⁺ T-Zell-Linien zu vergleichen, wurde die Zellzahl der unterschiedlichen T-Zell-Linien am Tag der Sortierung sowie an Tag 14 nach DZ-Kokultur bestimmt (siehe Abb. 4.17, A). Hierbei konnte eine knapp 3,5-fach erhöhte Proliferation der CD154-positiv-sortierten Linie im Vergleich zu den CD4⁺ T-Zellen der CD154-negativen Linie beobachtet werden. Zur Überprüfung der IFN- γ -Sekretionskapazität nach Antigen-spezifischer Reaktivierung wurden zudem Zellen der einzeln etablierten T-Zell-Linien an Tag 13 nach Sortierung in die Kokultur mit Tumor-Antigen-beladenen DZ eingebracht (siehe Abb. 4.17, B). Im Vergleich zur CD154-negativ-sortierten Linie kam es durch CD4⁺ T-Zellen der CD154-positiven Linie zu einer über zweifach erhöhten IFN- γ -Sekretion. Die Kultivierung der einzelnen T-Zell-Linien ohne Zugabe von Antigen-beladenen APZ führte jedoch zu keiner unspezifischen IFN- γ -Freisetzung.

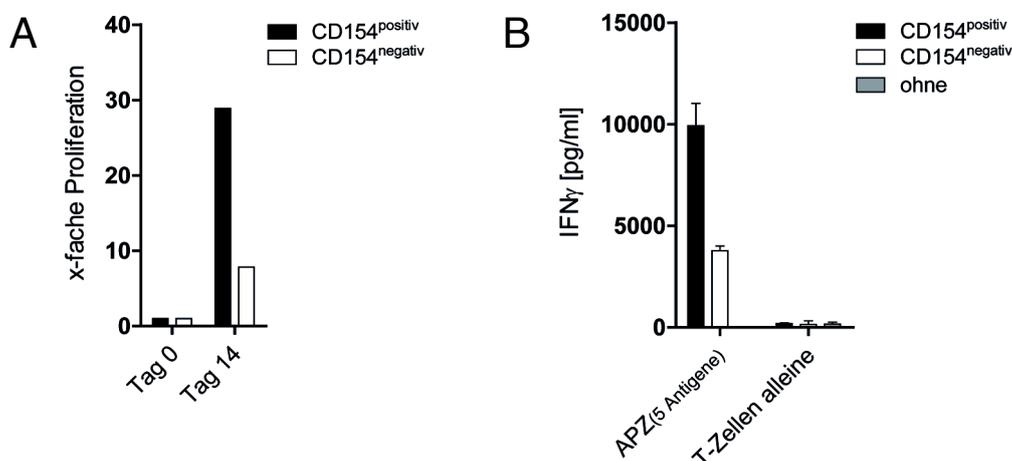


Abb. 4.17. **Proliferation und IFN- γ -Freisetzung sortierter T-Zell-Linien.** (A) Im Balken-Diagramm dargestellt ist die x-fache Proliferation der sortierten CD4⁺ T-Zell-Linien (CD154^{positiv} und CD154^{negativ}) innerhalb der ersten 14 Tagen nach Sortierung am Durchflusszytometer. Die Referenz-Zellzahl der einzelnen Populationen an Tag 0 der Proliferationsmessung wurde jeweils auf den Wert „1“ gesetzt. (B) CD4⁺ T-Lymphozyten der jeweiligen sortierten Zelllinie wurden mit Antigen-CrossTag-*ivt*-mRNS-transfizierten DZ (APZ(5 Antigene); GAGE-1, MAGE-A4, NY-ESO1, SSX4 und XAGE-1) des autologen Donors kokultiviert (E:T-Ratio 1:4). Im Balken-Diagramm dargestellt ist die IFN- γ -Konzentration im Kulturüberstand 16 h nach Ansatz der Kokultur (CD154^{positiv}, schwarze Balken; CD154^{negativ}, weiße Balken; Kulturmedium alleine, graue Balken). Die IFN- γ -Konzentration wurde mittels Standard-ELISA (Absorptionsmessung bei 450 nm, Wellenlängenkorrektur bei 570 nm) gemessen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus Messwert-Duplikaten ermittelt.

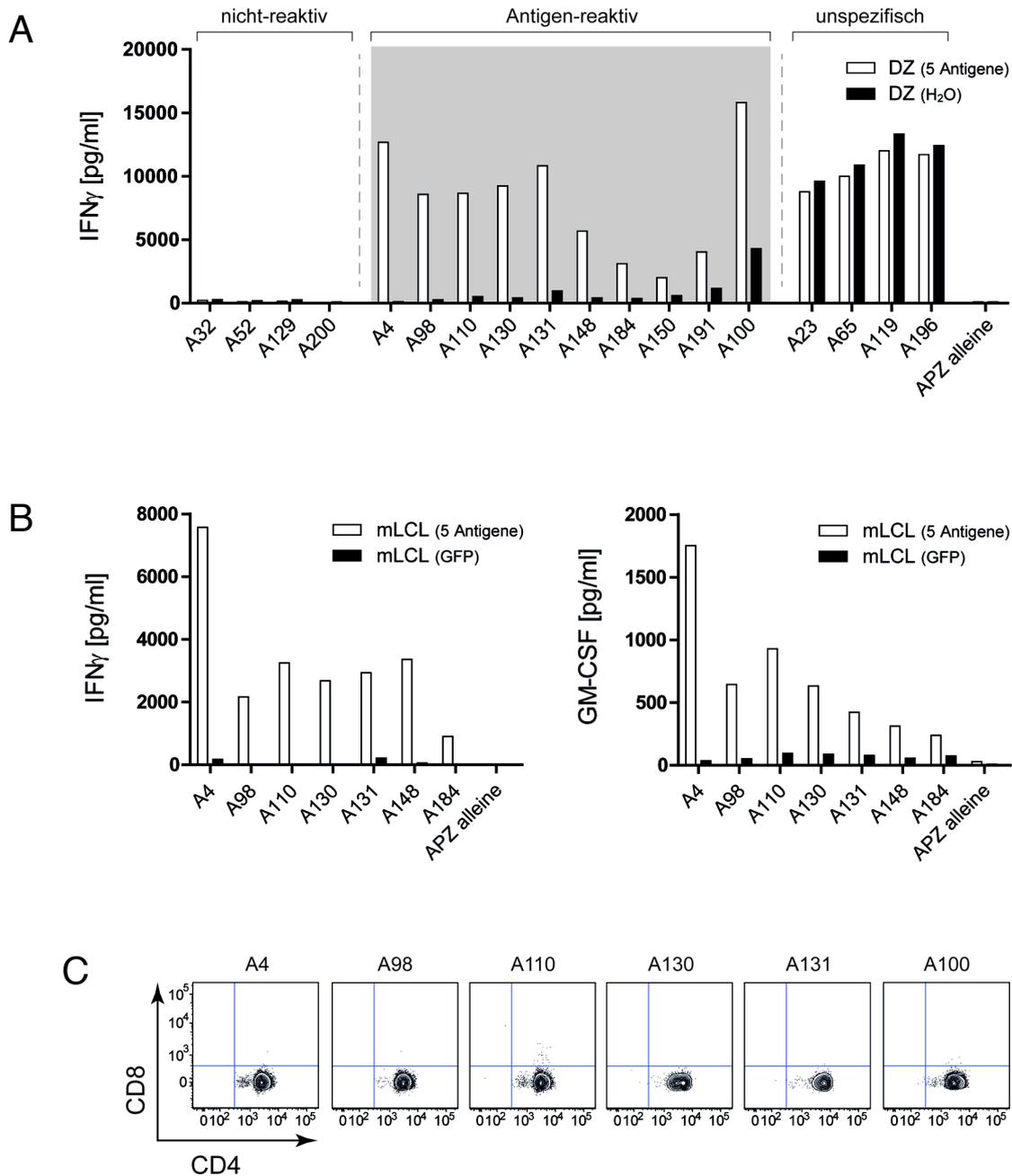


Abb. 4.18. Suche nach Antigen-reaktiven CD4⁺ T-Lymphozyten in der Plattenklonierung. (A) Alle in der Plattenklonierung über die ersten 14 Tage ausreichend expandierten T-Zell-Klone wurden mit Antigen-CrossTAG-*ivt*-mRNS-transfizierten DZ (DZ(5 Antigene); GAGE-1, MAGE-A4, NY-ESO1, SSX4 und XAGE-1) kokultiviert (E:T-Ratio annäherungsweise 1:4). Als Negativkontrolle dienten DZ, welche die Elektroporationsprozedur ohne *ivt*-mRNS-Zugabe durchlaufen hatten (DZ(H₂O)). (B) Einen Tag nach DZ-Kokultur wurden Zellen ausgewählter T-Zell-Klone mit zuvor Antigen-reaktivem IFN- γ -Sekretionsmuster in eine Kokultur mit autologen Antigen-CrossTAG-*ivt*-mRNS-transfizierten mLCL (mLCL(5 Antigene)) eingebracht (E:T-Ratio annäherungsweise 1:1). Als Spezifitätskontrolle dienten GFP-*ivt*-mRNS-transfizierte, autologe mLCL (mLCL(GFP)). In Balken-Diagrammen dargestellt ist die IFN- γ -sowie GM-CSF-Konzentration im Kulturüberstand 16 h nach Ansatz der jeweiligen Kokultur (DZ / mLCL(5 Antigene), weiße Balken; DZ(H₂O) / mLCL(GFP), schwarze Balken; jeweils Einzelwerte). Die IFN- γ -Konzentration wurde mittels Standard-ELISA (Absorptionsmessung bei 450 nm, Wellenlängenkorrektur bei 570 nm) gemessen. (C) In Kontur-Diagrammen dargestellt ist die Expression ausgewählter Oberflächen-Moleküle auf T-Zell-Klonen der Plattenklonierung. Die Differenzierungsmarker CD4 und CD8 wurden mithilfe von Fluoreszenz-konjugierten Antikörpern (α CD4-Hz450 und α CD8-Hz500) spezifisch angefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die zu untersuchenden Proben wurden auf lebende Lymphozyten vorselektiert.

In einem weiteren Schritt sollten die oben gezeigten Ergebnisse durch die Identifizierung eindeutig Antigen-reaktiver CD4⁺ T-Zell-Klone bestätigt werden. In einem ersten Ansatz wurden hierzu an Tag 12 nach Sortierung ausreichend expandierte Zellen der Plattenklonierung in die Kokultur mit 5-Antigen-CrossTAg-*ivt*-mRNS-transfizierten DZ eingesetzt. Wie in Abbildung 4.18, Abschnitt A, dargestellt, konnten T-Zellen mit unterschiedlichen Reaktionsmustern identifiziert werden. Neben nicht-reaktiven sowie Antigen-unspezifisch reaktivierten T-Zellen konnten hiermit auch eindeutig Tumor-Antigen-reaktive T-Lymphozyten erfolgreich nachgewiesen werden. Der Hintergrund der unspezifischen IFN- γ -Freisetzung nach Kokultur mit leer-transfizierten DZ war im Fall der Antigen-reaktiv-getesteten T-Zellen, mit Ausnahme des Klons A100, gering bis nicht detektierbar.

Um die in Einzelwerten gemessene Spezifität der Antigen-reaktiven T-Zell-Klone mithilfe anderer, nicht zur *De-novo*-Induktion genutzter APZ zu validieren, wurden Zellen ausgewählter Klone an Tag 13 nach Sortierung erneut in eine APZ-Kokultur eingebracht (siehe Abb. 4.18, B). Zu diesem Zweck wurden mLCL des autologen Spenders in Teilpopulationen mit allen zur *De-novo*-Induktion eingesetzten Antigen-CrossTAg-*ivt*-mRNS-Spezies transfiziert und die Mischung dieser APZ nachfolgend mit Zellen der verschiedenen T-Zell-Klone kokultiviert. Als Negativkontrolle wurden GFP-*ivt*-mRNS-transfizierte mLCL in die Kokultur eingebracht. Alle getesteten T-Zell-Klone zeigten ein Antigen-reaktives IFN- γ - als auch GM-CSF-Sekretionsmuster und bestätigten damit die Daten der DZ-Kokultur. Zusätzlich dazu wurden Zellen verschiedener ausgewählter T-Zell-Klone im Durchflusszytometer auf CD4- und CD8-Expression hin untersucht (Abb. 4.18, C). Alle analysierten Klone exprimierten ausschließlich den CD4-Corezeptor und waren somit CD4⁺ T-Lymphozyten.

Im Verlauf mehrfacher Restimulationszyklen wurden auf diese Weise insgesamt 600 T-Zell-Klone bezüglich ihrer Tumor-Antigen-Reaktivität überprüft (Daten nicht gezeigt). Nachfolgend konnten über 70 T-Zell-Klone mit TAA-reaktivem IFN- γ -Sekretionsmuster identifiziert werden. Dies entsprach einer Erfolgsquote von über 12%. Das bedeutet, dass im Schnitt jeder achte getestete T-Zell-Klon die gewünschte Antigen-Reaktivität zeigte.

Alle Tumor-Antigen-reaktiven T-Zell-Klone wurden unter regelmäßiger IL-2-Zugabe in Kultur gehalten, zyklisch mithilfe des T-Zell-Expansionsprotokolls restimuliert und somit erfolgreich expandiert.

4.4 Molekulare Charakterisierung TAA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen

Eine T-Zelle erkennt ihr spezifisches Epitop ausschließlich im Kontext eines passenden MHC-Klasse-I/II-Moleküls – dem sogenannten Restriktionselement. Die Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit dem auf APZ präsentierten Epitop funktioniert nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ und schließt die Struktur des präsentierenden MHC-Moleküls teilweise mit ein. Um die Spezifität einer T-Zelle unabhängig vom ursprünglichen Klon sowie zugehöriger autologer APZ einsetzbar zu machen, müssen alle Teilaspekte der TZR-Epitop:MHC-Interaktion bekannt sein. Notwendige Parameter für die vollständige molekulare Charakterisierung der Spezifität eines T-Zell-Klons sind somit die DNS-Sequenz des spezifisch erkannten Antigens oder Antigenfragments (antigene Determinante), die exakte Nukleotid-Sequenz des rekombinierten T-Zell-Rezeptors sowie die Information über das zugehörige HLA-Restriktionselement.

4.4.1 Antigenpezifität isolierter CD4⁺ T-Zell-Klone

Aufgrund der anfänglich begrenzten Zellzahlen konnten T-Zell-Klone im ersten Schritt ausschließlich gegen eine Mischung der zur *De-novo*-Induktion eingesetzten Tumor-Antigene getestet werden (vgl. Kapitel 4.3.4). CD4⁺ T-Zell-Klone wurden somit auf eine vorerst undefinierte Antigen-Reaktivität hin selektiert. Um jedoch eine Aussage zur exakten Antigenpezifität der isolierten CD4⁺ T-Zell-Klone treffen zu können, wurden Zellen der einzelnen T-Zell-Klone nachfolgend einer Untersuchung der jeweils spezifisch erkannten Antigene zugeführt.

Zu diesem Zweck wurden mLCL des autologen Spenders in Teilpopulationen mit einzelnen Antigen-CrossTAg-*ivt*-mRNS-Spezies transfiziert (GAGE-1, MAGE-A4, NY-ESO1, SSX4, XAGE-1) und separat in die Kokultur mit TAA-reaktiv-getesteten CD4⁺ T-Zell-Klonen eingebracht. Als Negativkontrolle dienten GFP-*ivt*-mRNS-transfizierte mLCL. Wie in Abbildung 4.19 anhand ausgewählter T-Zell-Klone dargestellt, konnten CD4⁺ T-Zellen mit eindeutig Antigen-spezifischem Reaktionsmuster identifiziert werden. Für alle hier gezeigten T-Zell-Klone konnte eine Antigen-induzierte IFN- γ -Sekretion ausschließlich in einer der möglichen fünf Kokulturansätze mit einzeln Tumor-Antigen-transfizierten mLCL-Teilpopulationen detektiert werden. Allein drei der vier getesteten MAGE-A4-spezifischen T-Zell-Klone (A100, A236 und A458) zeigten eine geringe Nebenreaktivität gegen NY-ESO1-CrossTAg-*ivt*-mRNS-transfizierte mLCL. Die Höhe der Nebenreaktivität des jeweiligen T-Zell-Klons folgte jedoch dem IFN- γ -Sekretionsniveau in Kokultur mit MAGE-A4-beladenen APZ. Ein unspezifischer Hinter-

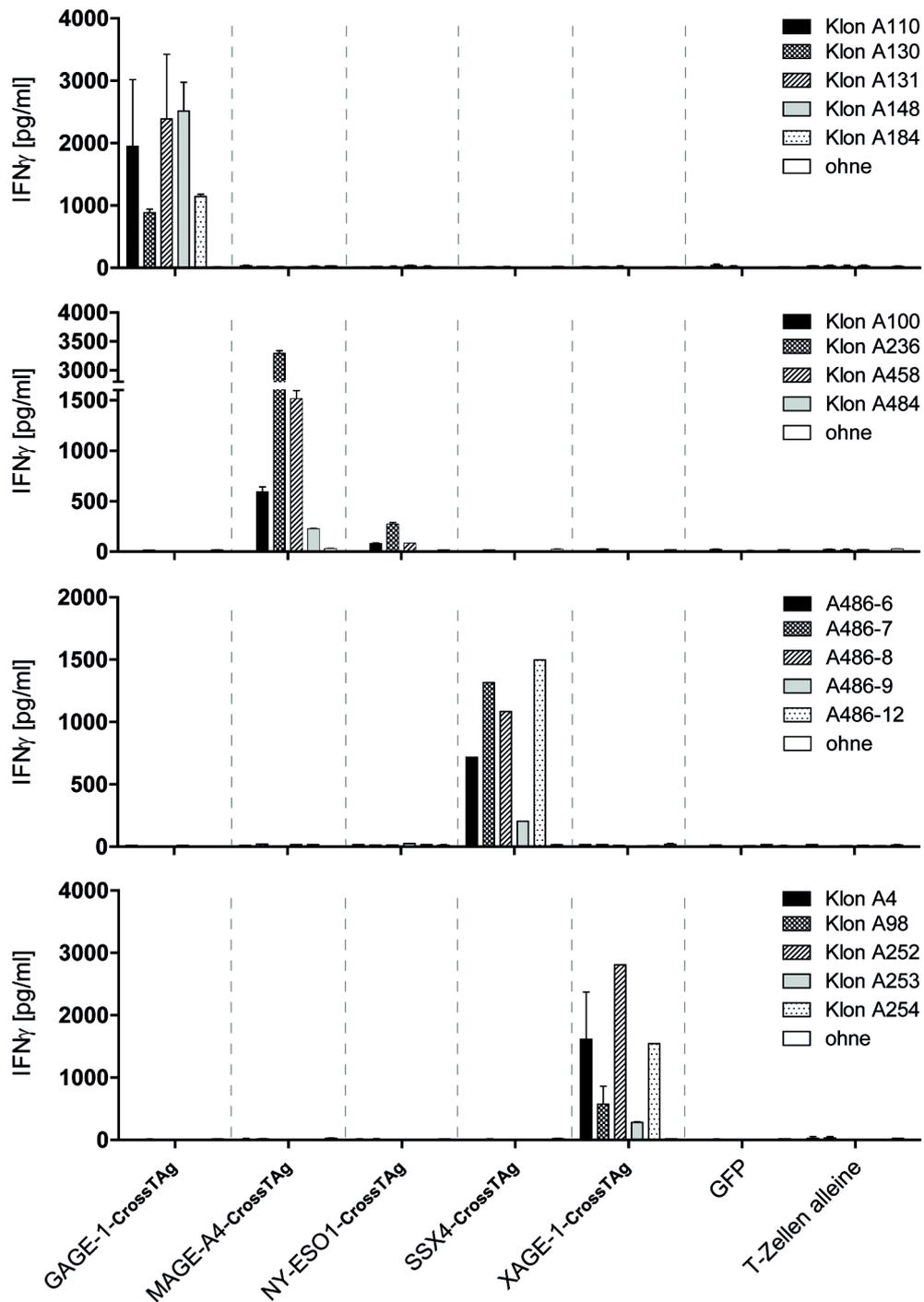


Abb. 4.19. Nachweis der Antigen-spezifität ausgewählter CD4⁺ T-Zell-Klone. Darstellung der IFN- γ -Sekretion ausgewählter Antigen-reaktiv-getesteter CD4⁺ T-Zell-Klone nach Kokultur mit autologen, Antigen-CrossTAG-*ivt*-mRNS-transfizierten mLCL (GAGE-1, MAGE-A4, NY-ESO1, SSX4 und XAGE-1). Die entsprechenden *ivt*-mRNS-Spezies wurden einzeln transfiziert und die somit Einzel-Antigen-positiven APZ separat in die Kokultur eingebracht (E:T-Ratio 1:1). Als Spezifitätskontrolle dienten GFP-*ivt*-mRNS-transfizierte, autologe mLCL. In Balken-Diagrammen dargestellt ist die IFN- γ -Konzentration im Kulturüberstand 16 h nach Ansatz der jeweiligen Kokultur (T-Zell-Klone sind beispielhaft nach jeweiliger Antigen-spezifität sortiert; Messung in Doppelwerten). Die IFN- γ -Konzentration wurde mittels Standard-ELISA (Absorptionsmessung bei 450 nm, Wellenlängenkorrektur bei 570 nm) gemessen.

grund in Kokultur mit GFP-beladenen mLCL war in keinem Ansatz zu detektieren. Auf diese Weise konnten T-Zell-Klone mit Einzel-Spezifitäten gegen GAGE-1, MAGE-A4, SSX4 und XAGE-1 identifiziert werden. Einzig NY-ESO1-spezifische T-Zellen waren in der Vielzahl der unterschiedlichen getesteten T-Zell-Klone nicht nachzuweisen.

T-Zell-Kulturen aus der Plattenklonierung mit drei und sechs CD154-positiv-sortierten Zellen pro Loch zeigten vereinzelt kombinierte Antigen-spezifitäten (Daten nicht gezeigt). Da es sich in diesen Fällen nicht um T-Zell-Klone sondern T-Zell-Mischkulturen handelte, wurden alle Ansätze mit mehr als einer Antigen-spezifität entweder subkloniert (SSX4-spezifischer Klon A486) oder aus der weiterführenden Analyse ausgeschlossen.

Mithilfe der in Kapitel 4.3 beschriebenen Methode zur *De-novo*-Induktion und Sortierung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen konnten somit zeitgleich TAA-spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten gegen vier der ursprünglich fünf eingesetzten Tumor-assoziierten Antigene isoliert werden.

4.4.2 T-Zell-Rezeptor-Sequenzanalyse

T-Zell-Rezeptoren bestehen auf molekularer Ebene aus der Kombination einer α - und einer β -Untereinheit. Sie werden in der Entwicklung einer jeden T-Zelle zufällig aus einer Vielzahl möglicher Teilstücke zusammengelagert. Während der V(D)J-Rekombination werden für die TZR- α -Kette ein variables (V) und ein verbindendes (J, von engl. joining) Segment mit einem konstanten Teil (C, von engl. constant) kombiniert. Der rekombinierte Teil der fertigen TZR- β -Kette besteht aus einem V- und einem J-Segment in Kombination mit einem eingeschobenen diversifizierenden (D) Segment. Die im Bereich der V(D)J-Segment-Schnittstelle entstehenden hypervariablen Regionen (CDR3-Regionen) der TZR- α/β -Ketten dienen nachfolgend der Epitoperkennung auf MHC-Molekülen. Die Sequenzen aller in der humanen Keimbahn vorkommenden V-, D- und J-Segmente liegen in Datenbanken abrufbar vor (siehe www.IMGT.org). Somit ist für die vollständige Charakterisierung eines T-Zell-Rezeptors ausschließlich die Information über die Segmentzusammensetzung der beiden TZR-Ketten sowie die exakte Sequenz der jeweiligen CDR3-Region notwendig.

Die TZR-Sequenzen der isolierten TAA-spezifischen T-Zell-Klone sollten demnach mithilfe einer PCR-basierten Methode zur Amplifizierung der TZR- α/β -Ketten analysiert werden. Hierfür wurde mRNA aus Zellen aller TAA-spezifischen T-Zell-Klone isoliert und revers in cDNA transkribiert. Die so erhaltene cDNA einzelner T-Zell-Klone wurde im Anschluss via TZR-PCR mit spezifischen Primern zur Analyse rekombinierter TZR-

α/β -Teilsequenzen herangezogen. In der TZR-Repertoire-Analyse erhaltene Amplifikate wurden zur Sequenzierung an einen externen Sequenzierungs-Dienstleister übersandt (Sequiserie, Vaterstetten).

Auf diese Weise konnten aus der Vielzahl Tumor-Antigen-spezifischer T-Zell-Klone sieben einzigartige T-Zell-Rezeptoren identifiziert werden (siehe Tab. 4.1). Im Detail konnten drei unterschiedliche TZR-Sequenzen aus GAGE-1-spezifischen T-Zell-Klonen (GAGE-1-TZR-1, -2 und -3), eine TZR-Sequenz aus MAGE-A4-spezifischen T-Zellen (MAGE-A4-TZR-1), wiederum eine TZR-Sequenz aus SSX4-spezifischen T-Zell-Klonen (SSX4-TZR-1) sowie zwei einzigartige TZR-Sequenzen aus der Gesamtheit aller XAGE-1-spezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten (XAGE-1-TZR-1 und -2) in Bezug auf ihre V(D)J-Segmentzusammensetzung und die Sequenz der jeweiligen CDR3-Region bestimmt werden.

Tab. 4.1: Ergebnisse der T-Zell-Rezeptor-Analyse

Antigen	TZR # ^a	Restriktion	T-Zell-Rezeptor			
			TZR- α -Kette ^b	CDR3-Region	TZR- β -Kette ^b	CDR3-Region
GAGE-1	TZR-1	DRB1*13:01	TRAV13-1*02AJ43*01	CAAKINNDMRF	TRBV9*01BD2*02BJ2-7*01	CASSAEYWSGEQYF
	TZR-2	DRB1*13:01	TRAV35*02AJ32*02	CAGPDYGGATNKLLIF	TRBV11-2*01BD1*01BJ1-1*01	CASSPGRANTEAFF
	TZR-3	DRB1*15:01 / DQB1*06:	TRAV36/DV7*01AJ57*01	CAERTQGGSEKLVF	TRBV10-3*01BD1*01BJ1-1*01	CATQRNTEAFF
MAGE-A4	TZR-1	DRB3*03:01	TRAV6*02AJ9*01	CALDGGGGFKTIF	TRBV7-8*01BD2*01BJ2-5*01	CASSRAGVQQETQYF
SSX4	TZR-1	DPB1*14:01	TRAV9-2*01AJ50*01	CALRQTSYDKVIF	TRBV11-2*01BD1*01BJ1-4*01	CASSLADRGSEKLVF
XAGE-1	TZR-1	DRB1*15:01 / DRB5*01:01	TRAV1-2*01AJ29*01	CAVRDNSGNTPLVF	TRBV19*01BD1*01BJ1-2*01	CASSIIQGSAGYTF
	TZR-2	DRB1*13:01	TRAV8-4*01AJ53*01	CAALRGGSNYKLTIF	TRBV5-1*01BD1*01BJ2-1*01	CASSLARGVNEQFF

^a Einzigartige TZR-Sequenzen Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten

^b TZR-Kettenzusammensetzung angegeben nach IMGT-Nomenklatur (www.imgt.org)

4.4.3 Phänotypisierung einzelner CD4⁺ T-Zell-Klone

Im Anschluss an die T-Zell-Rezeptor-Analyse sollten repräsentative CD4⁺ T-Zell-Klone mit unterschiedlichen Antigen-Spezifitäten und T-Zell-Rezeptoren phänotypisch analysiert werden. Es sollte untersucht werden, ob sich die isolierten C/T-Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten des *De-novo*-Induktionsansatzes einer spezifischen CD4-T-Zell-Subpopulation zuordnen ließen. Zu diesem Zweck wurden T-Zellen aus der jewei-

ligen *In-vitro*-Kultur abgenommen und die Oberflächen-Expression ausgewählter T-Zell-Differenzierungsmarker im Durchflusszytometer mithilfe Fluoreszenz-gekoppelter monoklonaler Antikörper nachgewiesen (siehe Abb. 20). Im Speziellen wurden folgende Oberflächen-Moleküle angefärbt: CD45RO, CCR7, CD62L und CD25. Alle untersuchten CD4⁺ T-Lymphozyten zeigten eine hohe CD45RO- und CCR7-Expression, variierten jedoch stark in ihrer CD62L- und CD25-Expression. So exprimierten T-Zell-Klone mit MAGE-A4-TZR-1 sowie XAGE-1-TZR-1 und -2 CD62L überdurchschnittlich hoch im Vergleich zu den verbleibenden GAGE-1-spezifischen CD4⁺ T-Zellen. Eine hohe CD25-Oberflächen-Expression konnte jedoch wiederum ausschließlich für T-Zell-Klone mit GAGE-1-TZR-2 und -3 detektiert werden. Für CD4⁺ T-Lymphozyten mit SSX4-TZR-1 konnte die Analyse aufgrund sehr geringer verfügbarer Zellzahlen nicht durchgeführt werden.

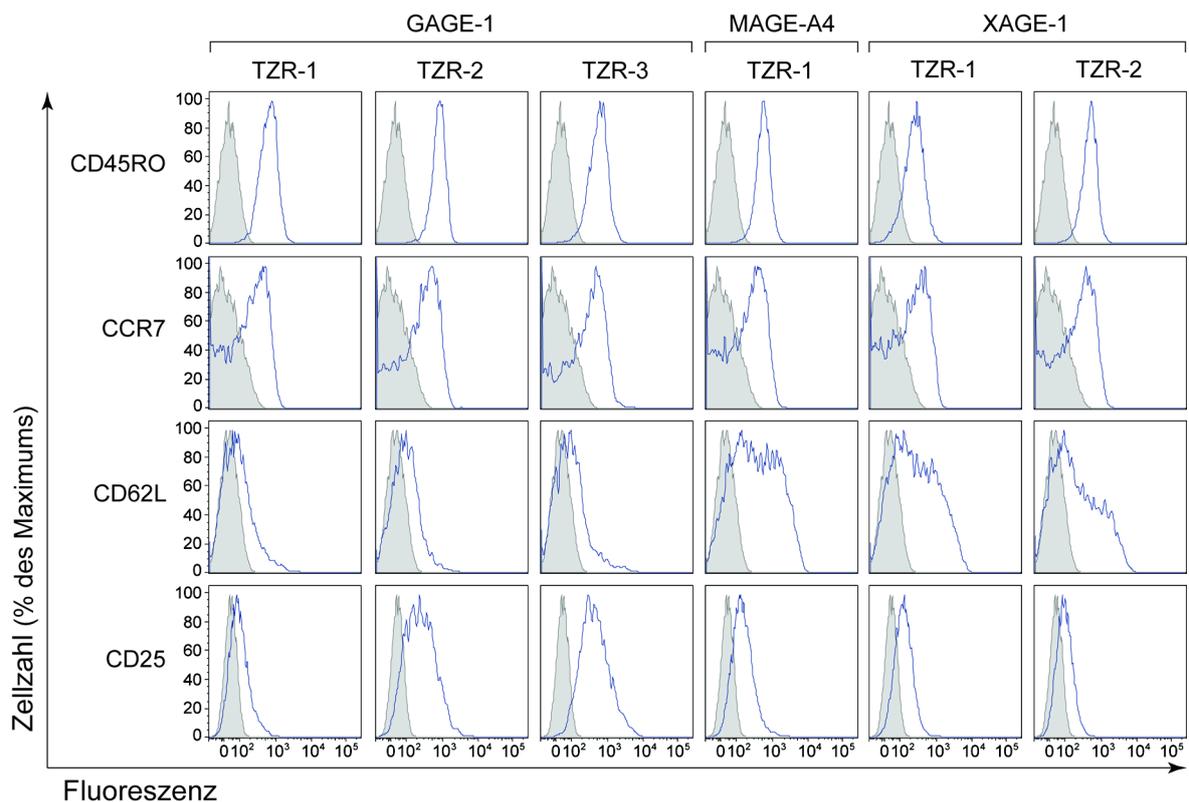


Abb. 4.20. **Oberflächen-Expression ausgewählter T-Zell-Differenzierungsmarker.** Die aufgeführten Histogramme zeigen die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse ausgewählter Differenzierungsmarker auf einzelnen T-Zell-Klonen mit unterschiedlichem T-Zell-Rezeptor (GAGE-1-TZR-1, TZR-2, TZR-3; MAGE-A4-TZR-1; XAGE-1-TZR-1, TZR-2). Die Oberflächenfärbung wurde mithilfe spezifischer Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper (graue, nicht ausgefüllte Kurven) sowie der jeweils zugehörigen Isotyp-Kontrolle (graue, ausgefüllte Kurven) durchgeführt. Klone mit SSX4-TZR-1 wurden nicht untersucht.

4.4.4 HLA-Restriktionsanalyse

MHC-Klasse-II-Moleküle auf APZ dienen zur Präsentation von Antigenfragmenten an CD4⁺ T-Lymphozyten. MHC-Klasse-II-Moleküle sind Heterodimere und werden aus einer α - und einer β -Kette zusammengesetzt. Im Genom liegen im Normalfall drei Gen-Paare vor, welche jeweils für MHC-Klasse-II- α und - β -Ketten kodieren. Sie heißen HLA-DR, -DP und -DQ. In vielen Fällen besitzt die HLA-DR-Gengruppe jedoch ein zusätzliches Gen für eine zweite β -Kette. Diese paart auch mit der funktionell monomorphen DR- α -Kette. Mit der Ausnahme des DR- α -Lokus sind alle MHC-Moleküle hoch polymorph und werden als Vielzahl meist funktionell unterschiedlicher Allele vererbt. Parallel zur DR- α -Kette sind jedoch für die polymorphen DP- α -Ketten keine funktionellen Unterschiede bekannt. Alle im Erbgut eines Individuums vorliegenden MHC-Klasse-II-Allele werden kodominant exprimiert. Nimmt man somit die von Mutter und Vater vererbten Allele zusammen, besitzt der Mensch zwischen sechs und acht unterschiedliche MHC-Klasse-II-Heterodimere. Sollten funktionell unterschiedliche DQ- α -Ketten jedoch in der Lage sein, variabel mit beiden vererbten DQ- β -Ketten zu paaren, könnte sich die Zahl der exprimierten Heterodimere jedoch weiter erhöhen.

Um die Restriktionselemente der isolierten TAA-spezifischen T-Zell-Klone zu identifizieren war es somit notwendig die MHC-Klasse-II-Allel-Zusammensetzung des autologen Spenders aufzuklären. Hierfür wurde mLCL-Zellmaterial an einen externen HLA-Typisierungs-Dienstleister (IMGM, Martinsried) übersandt (siehe Tabl. 4.2).

Tab. 4.2: Ergebnisse der HLA-Typisierung des autologen Spenders

HLA-DRB1	HLA-DRB3	HLA-DRB4	HLA-DRB5	HLA-DQA1	HLA-DQB1	HLA-DPB1
DRB1*13:02	DRB3*03:01	negativ	DRB5*01:01	DQA1*01:02	DQB1*06:02	DPB1*03:01
DRB1*15:01					DQB1*06:04	DPB1*14:01

Anhand der Typisierungsinformation sollte nachfolgend eine Restriktionsanalyse der sieben identifizierten T-Zell-Rezeptoren durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurde die spezifische Reaktivierung verschiedener isolierter T-Zell-Klone in einer APZ-Kokultur gegen eine Palette Antigen-CrossTag-*ivt*-mRNS-transfizierter allogener LCL-Linien getestet. Wählt man allogene LCL-Linien gezielt aus, so dass sich die vorliegenden HLA-Allele nur teilweise mit den Allelen des autologen Spenders überschneiden,

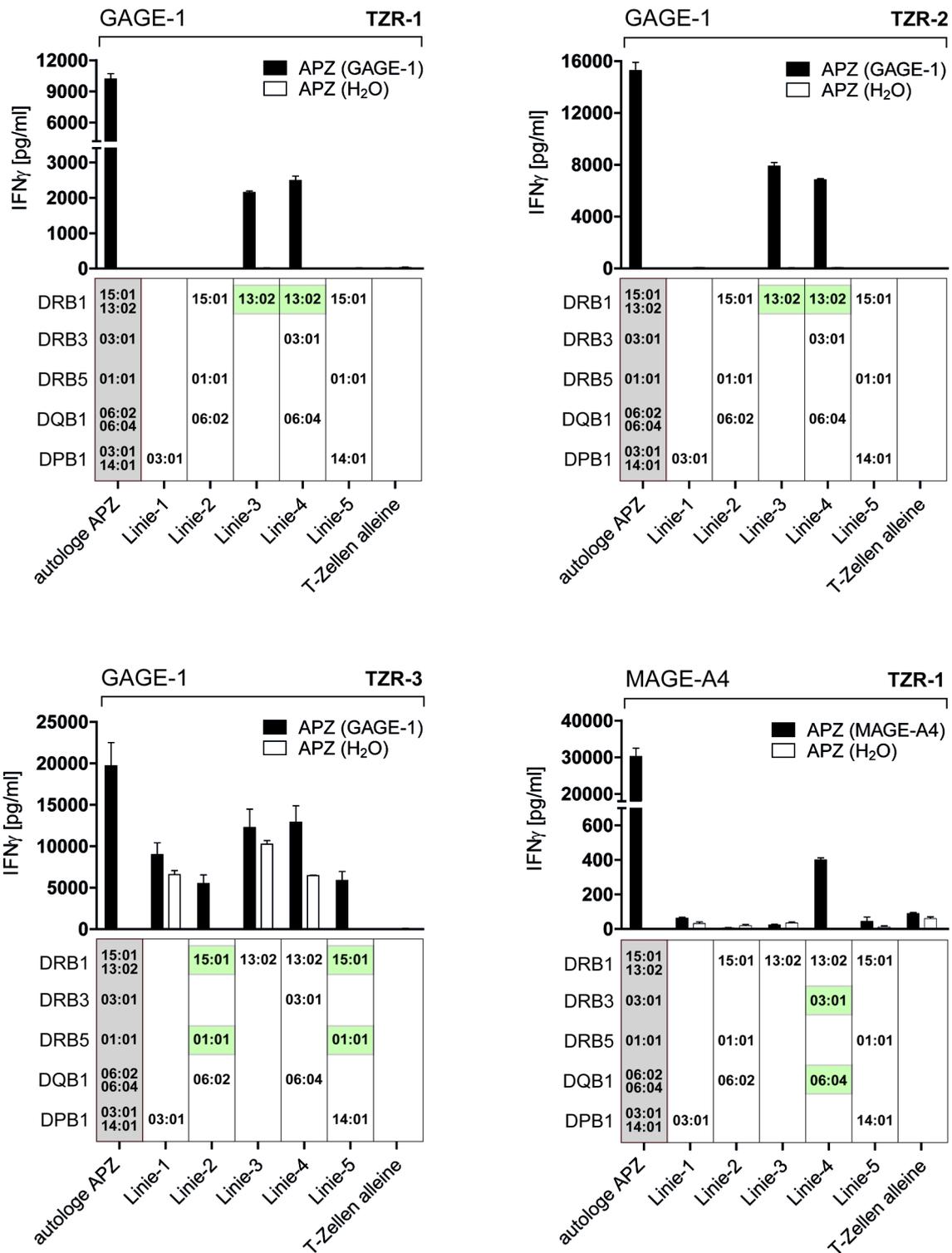


Abb. 4.21. **Bestimmung der HLA-Restriktion Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zell-Klone.** Verschiedene CD4⁺ T-Zell-Klone mit einzigartigen T-Zell-Rezeptoren wurden mit Antigen-CrossTag-*ivt*-mRNS-transfizierten autologen mLCL oder LCL allogener LCL-Linien (APZ_(Antigen); GAGE-1, MAGE-A4, SSX4 und XAGE-1) kokultiviert (E:T-Ratio 1:1). Da sich die HLA-Allele der ausgewählten LCL-Linien nur teilweise mit den Allelen der autologen mLCL-Linie überschneiden, kann anhand der einzelnen T-Zell-Reaktionsmuster ein Rückschluss auf das jeweils erkannte Restriktionselement gezogen werden. Alle LCL-Linien wurden in Teilpopulationen mit einzelnen *ivt*-mRNS-Spezies transfiziert. APZ der so erzeugten LCL-Antigen-Paletten wurden daraufhin in Einzelreaktionen mit den jeweils korrespondierenden spezifischen CD4⁺ T-Zell-Klonen kokultiviert - **Fortsetzung** S.97

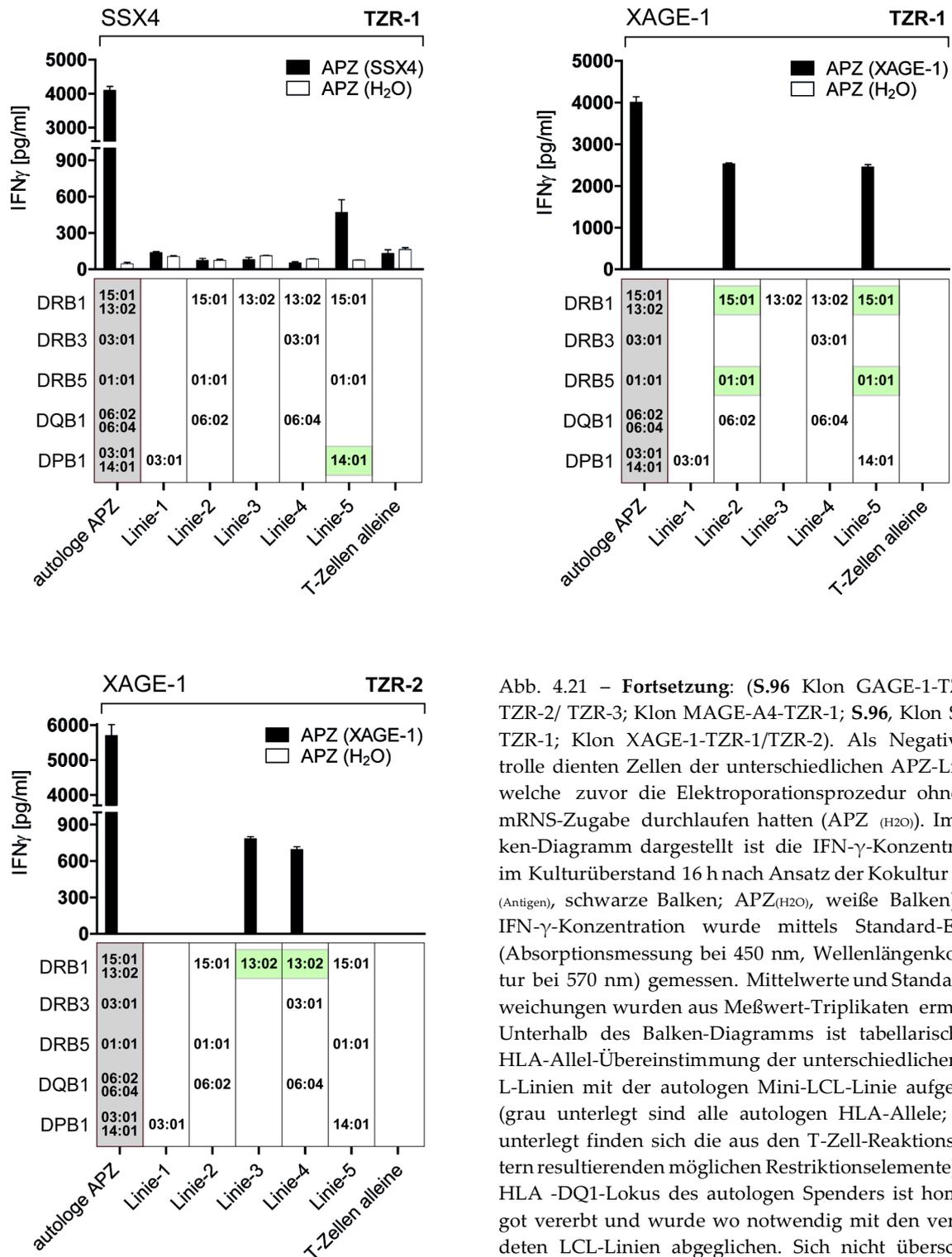


Abb. 4.21 – Fortsetzung: (S.96 Klon GAGE-1-TZR-1/ TZR-2/ TZR-3; Klon MAGE-A4-TZR-1; S.96, Klon SSX4-TZR-1; Klon XAGE-1-TZR-1/TZR-2). Als Negativkontrolle dienten Zellen der unterschiedlichen APZ-Linien, welche zuvor die Elektroporationsprozedur ohne *wt*-mRNS-Zugabe durchlaufen hatten (APZ (H₂O)). Im Balken-Diagramm dargestellt ist die IFN- γ -Konzentration im Kulturüberstand 16 h nach Ansatz der Kokultur (APZ (Antigen), schwarze Balken; APZ (H₂O), weiße Balken). Die IFN- γ -Konzentration wurde mittels Standard-ELISA (Absorptionsmessung bei 450 nm, Wellenlängenkorrektur bei 570 nm) gemessen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus Meßwert-Triplikaten ermittelt. Unterhalb des Balken-Diagramms ist tabellarisch die HLA-Allel-Übereinstimmung der unterschiedlichen LC-Linien mit der autologen Mini-LCL-Linie aufgeführt (grau unterlegt sind alle autologen HLA-Allele; grün unterlegt finden sich die aus den T-Zell-Reaktionsmustern resultierenden möglichen Restriktionselemente). Der HLA -DQ1-Lokus des autologen Spenders ist homozygot vererbt und wurde wo notwendig mit den verwendeten LCL-Linien abgeglichen. Sich nicht überschneidende HLA-Allele sind nicht aufgeführt.

lassen sich anhand der Klon-spezifischen Reaktionsmuster Rückschlüsse auf das jeweilige Restriktionselement ziehen.

Insgesamt wurden fünf allogene Antigen-beladene LCL-Linien in separaten Ansätzen mit Zellen unterschiedlicher TAA-spezifischer CD4⁺ T-Zell-Klone kokultiviert (siehe Abb. 4.21). Als Referenz für die Antigen-induzierte IFN- γ -Sekretion dienten T-Zell-Kokulturen mit Antigen-transfizierten mLCL des autologen Spenders. Zur Überprüfung der Antigen-Spezifität der T-Zell-Reaktivierung wurden parallel zu Antigen-beladenen LCL/mLCL jeweils auch leer-transfizierte LCL/mLCL in eine gesonderte Kokultur eingebracht.

Mithilfe dieser LCL-Paletten konnten in der Folge vier der sieben T-Zell-Rezeptoren direkt einem eindeutigen Restriktionselement zugeordnet werden. Für CD4⁺ T-Zell-Klone mit GAGE-1-TZR-1 und -2 (Abb. 4.21, S.96) und XAGE-1-TZR-2 (Abb. 4.21, S.97) konnte eine IFN- γ -Freisetzung zusätzlich zur Positivkontrolle nur in Kokultur mit Antigen-beladenen LCL-Zellen der Linie-3 und Linie-4 detektiert werden. Die MHC-Klasse-II-Allele der LCL-Linien 3 und 4 überschneiden sich mit den Allelen der autologen mLCL-Linie ausschließlich in HLA-DRB1*13:02. Im Fall der T-Zellen mit SSX4-TZR-1 (Abb. 4.21, S.97) kam es nur nach Kokultur mit Antigen-beladenen LCL der Linie 5 zu einer nachweisbaren IFN- γ -Sekretion. Aufgrund der ausbleibenden Erkennung anderer Antigen-beladener LCL-Linien konnten alle Allele außer HLA-DPB1*14:01 ausgeschlossen werden.

Auch für den T-Zell-Klon mit Rezeptor MAGE-A4-TZR-1 (Abb. 4.21, S.96) kam es in nur einer der fünf LCL-Kokulturen – der LCL-Linie 4 – zu einer spezifischen IFN- γ -Freisetzung. Hier konnte im Gegensatz zu SSX4-TZR-1 jedoch die Zahl der möglichen erkannten MHC-Klasse-II-Allele nur eingeschränkt werden. Nach Ausschluss aller auf LCL-Linien 1, 2, 3 und 5 exprimierter Allele wurden einzig HLA-DRB3*03:01 und HLA-DQB1*06:04 als potentielle Kandidaten identifiziert. Desgleichen kann im Falle der T-Zellen mit XAGE-1-TZR-1 (Abb. 4.21, S.97) die Zahl der möglichen Restriktionselemente auf zwei Allele eingegrenzt werden. Hier konnten nach Analyse der sich überschneidenden MHC-Klasse-II-Allele weder HLA-DRB1*15:01 noch HLA-DRB5*01:01 eindeutig ausgeschlossen werden.

Für CD4⁺ T-Zellen mit Rezeptor GAGE-1-TZR-3 (Abb. 4.21, S.96) wurde nach Kokultur mit den unterschiedlichen Zellen der LCL-Palette ein komplexes IFN- γ -Sekretionsmuster detektiert. Im Fall der Linien 1, 3 und 4 kam es zu einer IFN- γ -Freisetzung in Kokultur mit Antigen-beladenen als auch leer-transfizierten LCL-Zellen. Ausschließlich die LCL-Linien 2 und 4 wurden Antigen-spezifisch erkannt. Da in diesen zwei LCL-Linien unabhängig von den unspezifisch erkannten Linien 1, 3 und 4 jedoch das passende Restriktionselement vorliegen musste, konnten nach Ausschluss aller sich nicht überschneidenden MHC-Klasse-II-Allele HLA-DRB1*15:01 und HLA-DRB5*01:01 als einzig mögliche Kandidaten identifiziert werden.

4.4.5 Weiterführende Untersuchung der Antigenerkennung

Nachdem die isolierten TAA-spezifischen CD4⁺ T-Zell-Klone hinsichtlich der spezifisch erkannten Antigene, der T-Zell-Rezeptorsequenzen als auch der jeweils zugehörigen HLA-Restriktionselemente charakterisiert werden konnten, sollte im folgenden Schritt die Notwendigkeit der CrossTA_g-Signalsequenz zur Reaktivierung der unterschiedlichen CD4⁺ T-Zell-Klone untersucht werden.

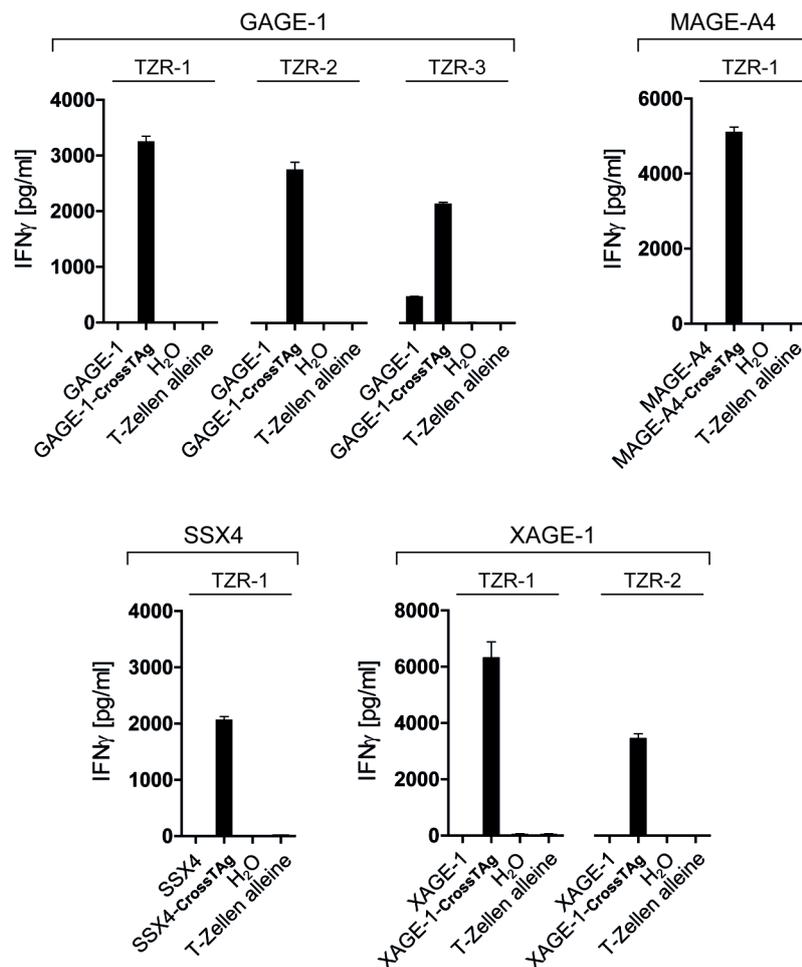


Abb. 4.22. Das CrossTA_g-Signal ist notwendig für die Aktivierung der generierten Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zell-Klone. Autologe mLCL wurden in Teilpopulationen mit Antigen-CrossTA_g-*ivt*-mRNS oder Antigen-*ivt*-mRNS ohne CrossTA_g-Signal transfiziert (Antigene: GAGE-1, MAGE-A4, SSX4, XAGE-1) und in Einzelansätzen mit Zellen der Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zell-Klone kokultiviert (E:T-Ratio 1:1). Als Negativkontrolle dienten autologe mLCL, welche zuvor die Elektroporationsprozedur ohne *ivt*-mRNS-Zugabe durchlaufen hatten (H₂O). Im Balkendiagramm dargestellt ist die IFN-γ-Konzentration im Kulturüberstand 16 h nach Ansatz der Kokultur. Die IFN-γ-Konzentration wurde mittels Standard-ELISA (Absorptionsmessung bei 450 nm, Wellenlängenkorrektur bei 570 nm) gemessen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus Messwert-Triplikaten ermittelt.

Zu diesem Zweck wurden autologe mLCL in Teilpopulationen mit Antigen-CrossTAg-*ivt*-mRNS oder Antigen-*ivt*-mRNS ohne CrossTAg-Signal transfiziert und in Einzelsätzen mit den jeweils korrespondierenden Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zell-Klonen kokultiviert (siehe Abb. 4.22). In allen Fällen war nur nach T-Zell-Kokultur mit Antigen-CrossTAg-*ivt*-mRNS-transfizierten APZ eine effiziente IFN- γ -Sekretion nachweisbar. Einzig in Kokultur GAGE-1-TZR-3-positiver T-Zellen mit GAGE-1-*ivt*-mRNS-transfizierten APZ war ohne Anwesenheit der CrossTAg-Signalsequenz eine leicht erhöhte IFN- γ -Konzentration im Kulturüberstand zu detektieren. Die Antigen-unspezifische IFN- γ -Freisetzung nach Kokultur mit leer-transfizierten autologen mLCL lag für alle getesteten T-Zell-Klone unterhalb des ELISA-Sensitivitätsniveaus.

Aufgrund der unphysiologischen Fusionsstellen im Sequenzbereich der Antigen-CrossTAg-Konstrukte zwischen LAMP1-ER-Translokationssignal und Antigen sowie Antigen und DC-LAMP-Transmembran- und Zytoplasma-Domäne (siehe Abb. 4.2) besteht die Gefahr der Entstehung immunogener Antigenartefakte (Neo-Epitope). Um auszuschließen, dass die in dieser Arbeit isolierten T-Zell-Klone ausschließlich aufgrund möglicher generierter Neo-Epitope in der Lage sind, Antigen-CrossTAg-*ivt*-mRNS-transfizierte APZ zu erkennen, sollte in einem abschließenden Schritt die tatsächliche Erkennung des physiologischen Antigens untersucht werden.

Hierfür wurden autologe mLCL in Teilpopulationen einerseits mit den einzelnen Antigen-CrossTAg-*ivt*-mRNS-Spezies transfiziert als auch durch Zugabe rekombinant exprimierter Proteine mit Antigen beladen. Die Antigene werden in diesem Fall endozytotisch aufgenommen und endosomal / lysosomal prozessiert auf MHC-Klasse-II-Moleküle geladen. Die hier eingesetzten rekombinanten Proteine GAGE-1, MAGE-A4, SSX4 und XAGE-1 wurden zuvor *in vitro* in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-293T) exprimiert und mithilfe eines 6xHistidin-Markers über Nickel-Agarose-Kügelchen aufgereinigt. Zu diesem Zweck wurden die oben aufgeführten Antigene mittels PCR amplifiziert und mithilfe eingefügter Restriktionsschnittstellen in den offenen Leserahmen eines zur Proteinexpression geeigneten pCMV-DNS-Vektorplasmids eingefügt. Die Sequenzen der erzeugten rekombinanten Proteine enthielten kein CrossTAg-Sortierungssignal.

Antigen-CrossTAg-*ivt*-mRNS-transfizierte und Protein-beladene APZ wurden nachfolgend mit Zellen der verschiedenen CD4⁺ T-Zell-Klone kokultiviert (siehe Abb. 4.23). Nach Kokultur der Zellen einzelner T-Zell-Klone mit Antigen-CrossTAg-*ivt*-mRNS-transfizierten APZ kam es in allen Fällen zu einer starken IFN- γ -Sekretion. Für vier der sieben unterschiedlichen T-Zell-Klone konnte neben der Antigen-CrossTAg-Reaktivität zudem eine erhöhte IFN- γ -Freisetzung nach Kokultur mit Protein-beladenen APZ detektiert werden. Für T-Zellen mit den Rezeptoren GAGE-1-TZR-1 und -2 sowie MAGE-

A4-TZR-1 war dies nicht möglich. Hierbei lag das IFN- γ -Sekretionsniveau zusammen mit den T-Zell-Kokulturen leer-transfizierter mLCL unterhalb des ELISA-Sensitivitätslevels. Wurden T-Zellen ohne APZ-Zugabe kultiviert kam es zu keiner detektierbaren IFN- γ -Freisetzung.

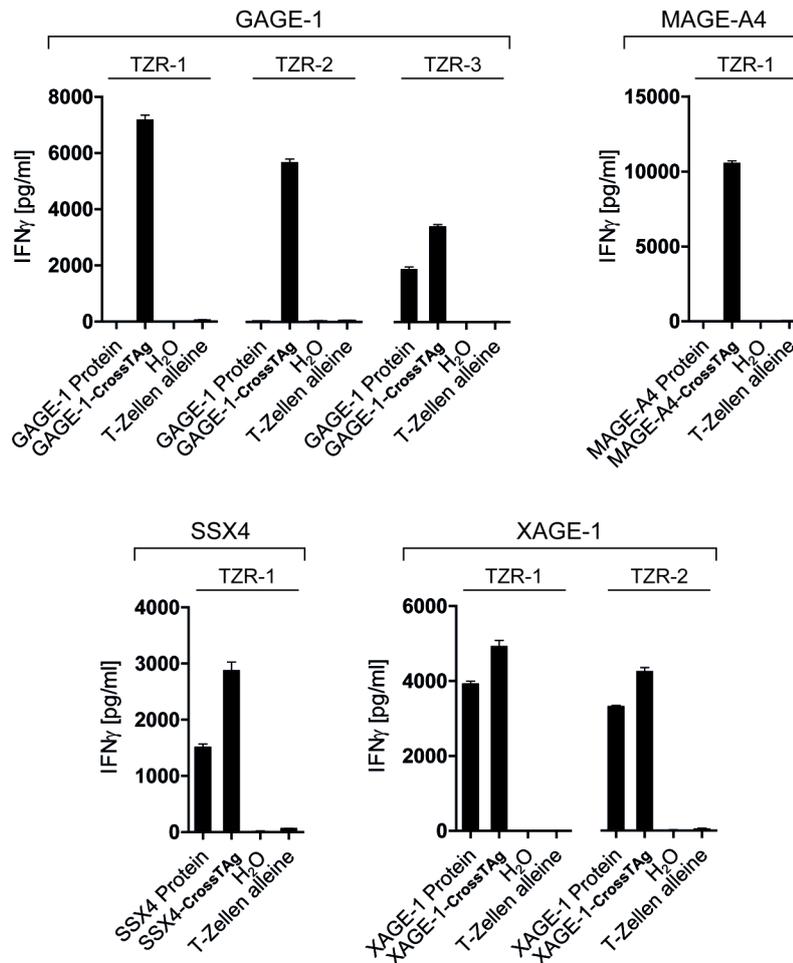


Abb. 4.23. **Aktivierung von CD4⁺ T-Zell-Klonen mithilfe Protein-beladener APZ.** Autologe mLCL wurden in Teilpopulationen mit Antigen-CrossTAG-*ivt*-mRNS transfiziert (Antigene: GAGE-1, MAGE-A4, SSX4, XAGE-1) oder, durch Zugabe rekombinant exprimierten Proteins in das Kulturmedium (Proteine: GAGE-1, MAGE-A4, SSX4, XAGE-1; ohne CrossTAG-Signal; exprimiert in humanen HEK-293T-Zellen), 16 h mit Protein kokultiviert. APZ der unterschiedlichen Antigen-Beladungsstrategien wurden in Einzelansätzen mit den jeweils korrespondierenden Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zell-Klonen kokultiviert (E:T-Ratio 1:1). Als Negativkontrolle dienten autologe mLCL, welche zuvor die Elektroporationsprozedur ohne *ivt*-mRNS-Zugabe durchlaufen hatten (H₂O). Im Balken-Diagramm dargestellt ist die IFN- γ -Konzentration im Kulturüberstand 16 h nach Ansatz der Kokultur. Die IFN- γ -Konzentration wurde mittels Standard-ELISA (Absorptionsmessung bei 450 nm, Wellenlängenkorrektur bei 570 nm) gemessen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus Messwert-Triplikaten ermittelt.

4.5 Identifizierung erkannter CD4⁺ T-Zell-Epitope

MHC-Klasse-II-Epitope variieren im Gegensatz zu MHC-Klasse-I-Epitopen stärker in Bezug auf die Länge der HLA-Allel-gebundenen Peptidfragmente. Die Peptid-Bindegrube der MHC-Klasse-II-Moleküle ist zu beiden Seiten hin geöffnet und bindet Peptide mit durchschnittlicher Länge von 12 bis 28 Aminosäuren. Die somit bereits ausgeprägte Heterogenität der MHC-Klasse-II-Epitope wird zusätzlich durch ein breiteres Spektrum an Bindemotiven zur Verankerung der Peptidfragmente in der MHC-Klasse-II-Bindegrube erhöht (Rammensee, 1995). Aus diesem Grund ist eine Computer-Modell-gestützte Vorhersage der MHC-Klasse-II-gebundenen Epitope innerhalb eines bekannten Antigens selten zielführend und setzt das Wissen über das jeweils Epitop-präsentierende MHC-Klasse-II-Allel voraus (Bian *et al.*, 2003). Die hohe Heterogenität der MHC-Klasse-II-Epitope erschwert dementsprechend auch die massenspektrometrische Analyse eluierter MHC-Klasse-II-gebundener Peptide (Lemmel und Stevanovic, 2003). Die hier genannten Methoden können ausschließlich zur Einengung der erkannten Peptidsequenzen herangezogen werden. Sie bedürfen nichtsdestotrotz jedoch einer experimentellen Bestätigung aller vorhergesagten oder eluierten Kandidatenpeptide.

4.5.1 Methode zur direkten Epitopidentifizierung

Um eine effiziente Identifizierung der Epitope der hier isolierten C/T-Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zell-Klone zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit eine intelligente Methode zur MHC-Klasse-II-Epitop-Identifizierung unter Einbezug einer bakteriellen Expressionsbibliothek herangezogen (Milosevic *et al.*, 2005). Im Gegensatz zum Test finanziell unerschwinglicher Pools überlappender synthetischer Peptide (Sospedra *et al.*, 2003) oder zur arbeitsaufwendigen Expression von Antigen-Deletionsvarianten sollte es mithilfe der sogenannten DEPI-Methode (von engl. Direct Epitope Identification) nachfolgend möglich sein, die jeweils erkannten Epitope in nur wenigen Arbeitsschritten auf eine Minimalsequenz von etwa 80 Nukleotiden einzuschränken.

Zum Erstellen einer DEPI-Expressionsbibliothek nach Milosevic *et al.* wird Antigen-DNS mithilfe häufig schneidender Restriktionsenzyme in kleine DNS-Fragmente geschnitten (siehe Abb. 4.24). Die erzeugten Schnittstellen besitzen nach Einsatz geeigneter Restriktionsenzyme keine überhängenden Enden. Somit können die erhaltenen DNS-Fragmente unabhängig von ihrer Nukleotid-Sequenz direkt in einen adäquat vorbereiteten Expressions-Vektor ligiert werden. Durch den Einsatz unterschiedlicher Restriktionsenzyme zum Verdau der Antigen-DNS entstehen Sequenz-überlappende

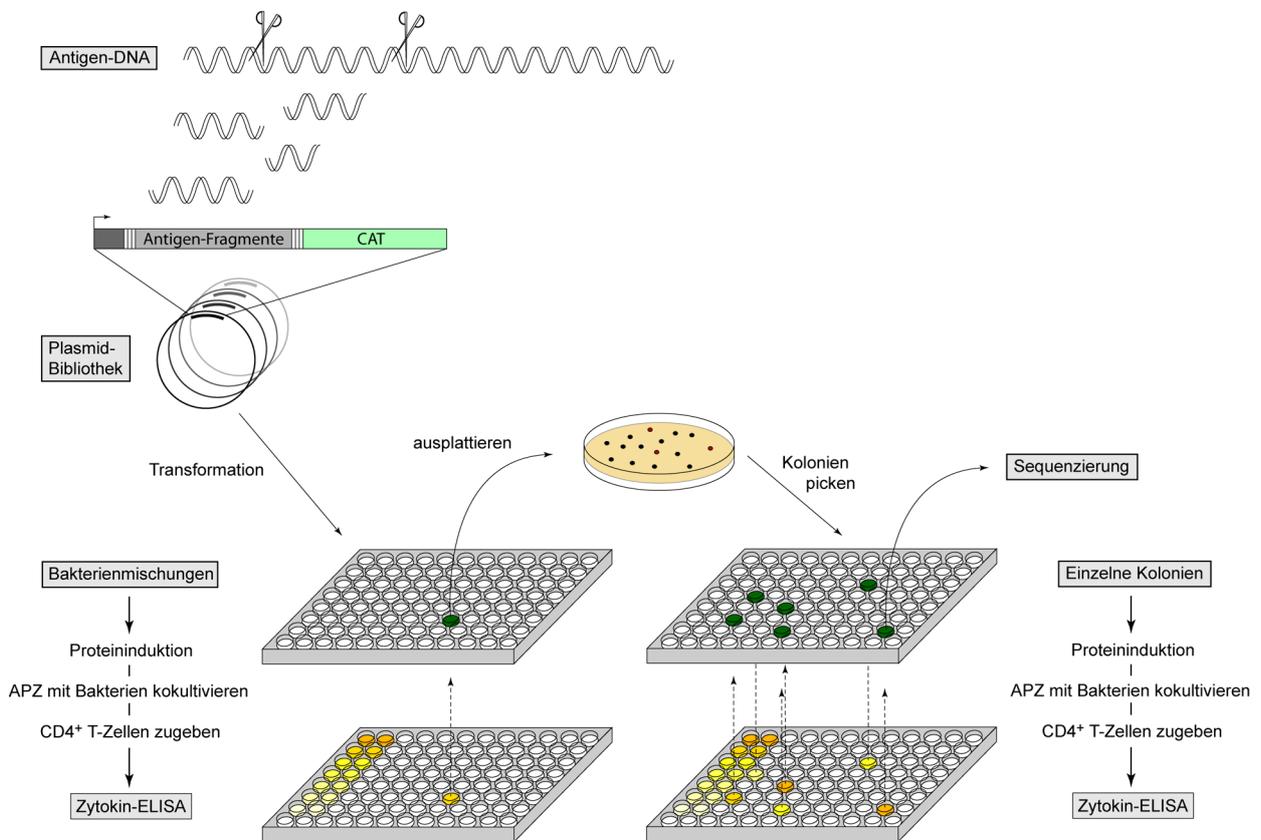


Abb. 4.24. **Schematische Darstellung der Methode zur direkten Identifizierung von CD4-T-Zell-Epitopen.** Antigen-kodierende DNA wird mittels häufig schneidender Restriktionsenzyme verdaut. Daraus resultierende DNA-Fragmente (Länge ~60-120 Basenpaare) werden in einen, für Bakterien geeigneten Expressionsvektor ligiert. In einer 96-Loch-Kulturplatte wird aus Vektorgemisch-transformierten *E.coli*-Bakterien eine Bibliothek, bestehend aus zufälligen Bakterien-Pools, erstellt. Durch IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)-Zugabe wird die bakterielle Protein-Expression induziert. Bakterien, die nach Transformation die Fähigkeit zur Produktion eines Antigen-Fragment-CAT (Chloramphenicol-Acetyltransferase)-Fusionsproteins besitzen, werden mithilfe von Chloramphenicol selektiert. Eine Suspension dieser Bakterien-Pools wird nachfolgend direkt mit APZ kokultiviert. 24 h nach Beginn der Kokultur werden CD4⁺ T-Lymphozyten zugesetzt. Nach weiterer 16-stündiger Kulturphase wird die IFN- γ -Konzentration mittels Standard-ELISA gemessen. Positiv-getestete Bakterien-Pools werden aus der Bibliothek heraus auf Kultur-Agar-Platten ausplattiert. Einzelkolonien dieser Bakterien-Pools werden daraufhin erneut, wie oben beschrieben, in der T-Zell-Kokultur getestet. Erkannte Antigen-Fragment-Sequenzen können abschließend durch DNA-Sequenz-Analyse identifiziert werden. (Abbildung abgeändert nach Milosevic *et al.*, 2006).

DNS-Fragmente mit variabler Sequenzlänge. Im Idealfall decken diese DNS-Fragmente die Sequenz der ursprünglich eingesetzte Antigen-DNS mehrfach ab. Durch nachfolgende Ligation in den Expressionsvektor werden die DNS-Fragmente mit der 3' strand-abwärts gelegenen Sequenz der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) fusioniert. Nach späterer Transformation der Ligationsprodukte ermöglicht dies die Selektion erfolgreich eingefügter DNS-Fragmente. Transformierte Bakterien exprimieren die Fusi-

onsproteine und überleben demnach unter Einsatz geeigneter Antibiotika nur solange es zu einer Expression der gesamten Antigenfragment-CAT-Sequenz kommt. Liegen die Antigenfragmente nicht im Leserahmen der ursprünglichen Antigensequenz entsteht statistisch gesehen alle 64 Basen ein Stop-Codon. Bei ausreichender Länge der eingefügten DNS-Fragmente reduziert dies automatisch die Zahl unbrauchbarer Ligationsprodukte. Erfolgreich transformierte Bakterien werden als Bakterien-Mischungen (Pools) mit zufälliger Fragment-Zusammensetzung kultiviert und nachfolgend mit geeigneten APZ kokultiviert. Die eingesetzten APZ nehmen die Bakterien selbständig aus dem Kulturmedium auf und präsentieren die beinhalteten Peptidfragmente physiologisch im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen. Die Komplexität der einzelnen Pools sollte so gewählt werden, dass die Länge der ursprünglichen Antigensequenz durch die in der Gesamtheit der Pools vorliegenden DNS-Fragmente mehrfach abgedeckt wird. Somit sollte es nach Kokultivierung Bakterien-beladener APZ mit Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten zur Erkennung einer oder mehrerer Bakterien-Mischungen kommen. Erkannte Bakterien-Pools können aus der Ursprungskultur heraus ausplattiert werden und im Folgenden als Einzelkolonien auf APZ geladen werden. Nach erneuter APZ-T-Zell-Kokultur können wiederum erkannte Bakterienkolonien der Plasmid-Präparation zugeführt werden und die Nukleotidsequenz der vorliegenden DNS-Fragmente sequenziert werden.

Die DEPI-Methode stellt somit einen einfachen und schnell durchzuführenden Arbeitsablauf zur Identifizierung von MHC-Klasse-II-Epitopen dar.

4.5.2 Test isolierter TAA-spezifischer CD4⁺ T-Zell-Klone

Wie in Abschnitt 3.6 beschrieben wurde eine DEPI-Expressionsbibliothek unter Einbezug der fünf zur *De-novo*-Induktion TAA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen genutzten C/T-Antigene erstellt. Um auch die Erkennung möglicher generierter Neo-Epitope abzudecken beinhalteten die in die Restriktion eingesetzten DNS-Sequenzen jeweils das flankierende CrossTag-Sortierungssignal. Die durchschnittliche Länge der eingefügten DNS-Fragmente betrug 82 Nukleotide. Nach Transformation konnte anhand des Probeausstrichs eine Gesamtzahl von 180 Kolonie-formenden Bakterien errechnet werden. Die somit in Bakterien vorliegenden DNS-Fragmente deckten die Gesamtlänge aller eingesetzten Antigensequenzen von 4,2 Kilobasen in etwa dreifach ab. Die Gesamtzahl von 180 Kolonien wurde nachfolgend auf insgesamt 40 Loch einer 96-Loch-Kulturplatte verteilt. Die Komplexität einer Plattenvertiefung belief sich demnach auf vier bis fünf unterschiedliche DNS-Fragment-tragende Bakterienkolonien. Zur Untersuchung der

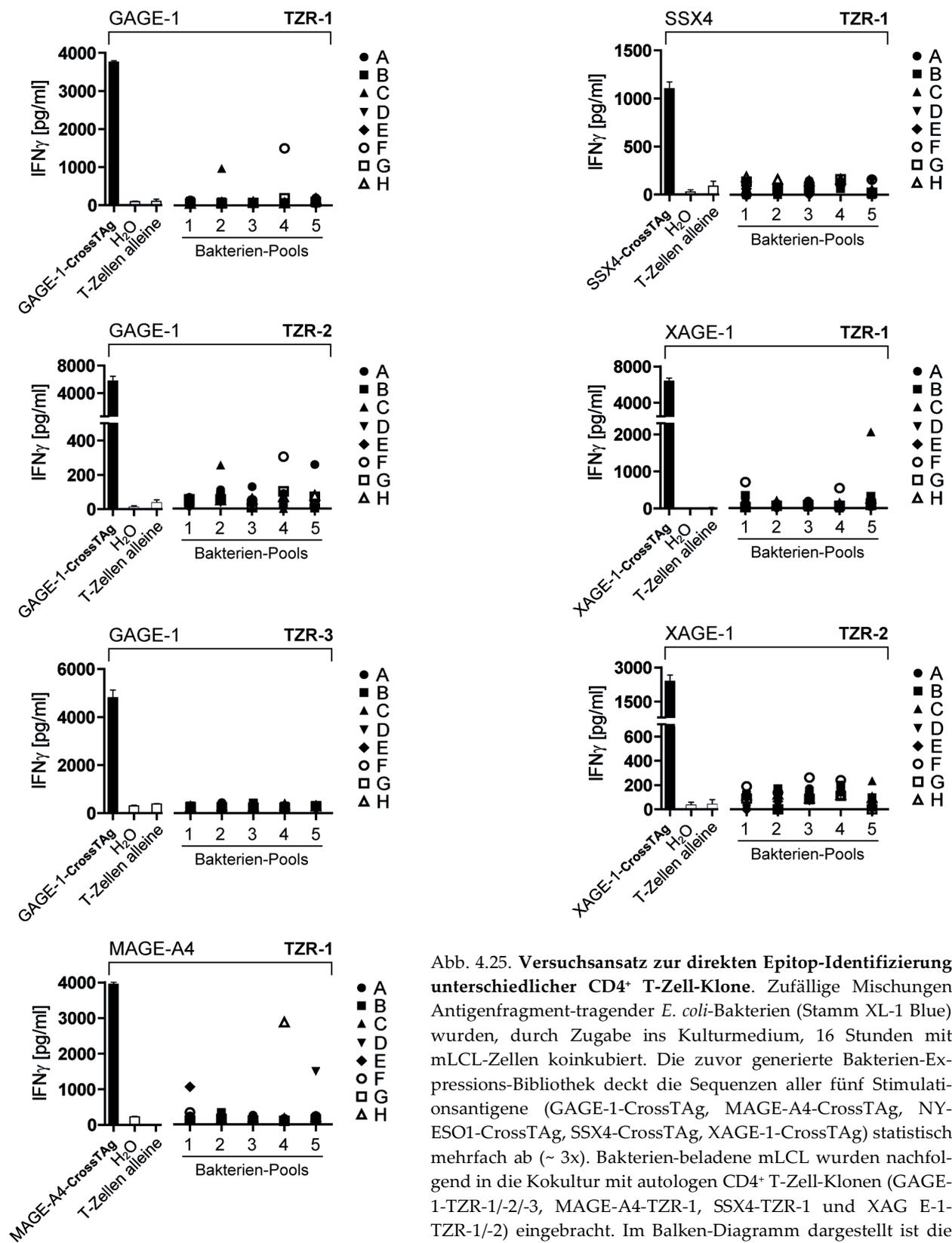


Abb. 4.25. **Versuchsansatz zur direkten Epitop-Identifizierung unterschiedlicher CD4⁺ T-Zell-Klone.** Zufällige Mischungen Antigenfragment-tragender *E. coli*-Bakterien (Stamm XL-1 Blue) wurden, durch Zugabe ins Kulturmedium, 16 Stunden mit mLCL-Zellen koinkubiert. Die zuvor generierte Bakterien-Expressions-Bibliothek deckt die Sequenzen aller fünf Stimulationsantigene (GAGE-1-CrossTAG, MAGE-A4-CrossTAG, NY-ESO1-CrossTAG, SSX4-CrossTAG, XAGE-1-CrossTAG) statistisch mehrfach ab (~ 3x). Bakterien-beladene mLCL wurden nachfolgend in die Kokultur mit autologen CD4⁺ T-Zell-Klonen (GAGE-1-TZR-1/-2/-3, MAGE-A4-TZR-1, SSX4-TZR-1 und XAGE-1-TZR-1/-2) eingebracht. Im Balken-Diagramm dargestellt ist die IFN- γ -Konzentration im Kulturüberstand 16 h nach Ansatz der Kokultur (Einzelwerte). Die IFN- γ -Konzentration wurde mittels Standard-ELISA (Absorptionsmessung bei 450 nm, Wellenlängenkorrektur bei 570 nm) gemessen.

CD4⁺ T-Zell-Erkennung wurden die Kulturen des DEPI-Ansatzes über zwei Inkubationsrunden im Brutschrank expandiert und durch Zugabe ins Kulturmedium über Nacht mit mLCL des autologen Blutspenders kokultiviert. Nach erfolgter Epitop-Beladung der APZ wurden diese in die Kokultur mit Referenzklonen aller isolierter C/T-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten eingesetzt (siehe Abb. 4.25).

In Bezug auf ihre IFN- γ -Sekretion zeigten alle T-Zell-Klone mit unterschiedlicher Antigen-spezifität ein jeweils einmaliges Reaktionsmuster. CD4⁺ T-Zell-Klone mit gleicher Antigen-spezifität bestätigten jedoch das Reaktionsmuster des jeweils anderen Klons. So konnte übereinstimmend für T-Zell-Klone mit Rezeptor GAGE-1-TZR-1 und -2 eine spezifische IFN- γ -Freisetzung nach Kokultur mit Bakterien-beladenen APZ der Pools 2-C und 4-F detektiert werden. GAGE-1-TZR-2-Zellen erkannten zudem Bakterien-beladene APZ des Pools 5-A. Für CD4⁺ T-Lymphozyten mit MAGE-A4-TZR-1 hingegen konnte eine IFN- γ -Sekretion ausschließlich in Kokultur mit APZ der Pools 1-E, 4-H und 5-D nachgewiesen werden. In Kokultur mit C/T-Antigen-spezifischen T-Zellen mit Rezeptor XAGE-1-TZR-1 führten indes nur Bakterien-beladene APZ der Pools 1-F, 4-F und 5-C zu einer spezifischen Erkennung. XAGE-1-TZR-2-Zellen zeigten im Gegensatz zu den oben beschriebenen T-Zell-Klonen kein deutlich abgesetztes Reaktionsmuster, bestätigten jedoch mit geringfügig erhöhter IFN- γ -Sekretion nach Kokultur mit APZ der Pools 1-F, 4-F und 5-C das Reaktionsmuster der XAGE-1-TZR-1-Zellen. CD4⁺ T-Zellen mit XAGE-1-TZR-2 zeigten zudem eine schwache Erkennung des Pools 3-F.

Alle spezifisch erkannten Bakterien-Pools müssten im nächsten Schritt demnach auf geeigneten Agarplatten ausgestrichen werden und somit erhaltene Einzelkolonien erneut in die APZ Kokultur eingesetzt werden. Nach wiederholter T-Zell-APZ-Kokultur sollte die Sequenzierung isolierter Plasmid-DNS Aufschluss über die jeweils erkannten Epitope geben. Diese nachfolgenden Schritte konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt werden.

Die Versuchsansätze für T-Zell-Klone mit Rezeptor GAGE-1-TZR-3 und SSX4-TZR-1 müssten zudem wiederholt werden, da in diesen Fällen keine spezifische IFN- γ -Freisetzung detektiert werden konnte. Dies könnte auf eine fehlerhafte Beladung der APZ zurückzuführen sein. Da jedoch für alle getesteten CD4⁺ T-Zell-Klone eine effiziente IFN- γ -Sekretion in Kokultur mit Antigen-CrossTAg-*ivt*-mRNS-transfizierten APZ nachzuweisen war, kann weiterhin nicht ausgeschlossen werden, dass die hier erstellte Expressionsbibliothek die benötigten DNS-Fragmente wider Erwarten nicht beinhaltet. In diesem Fall müsste für die erfolgreiche Epitop-Identifizierung eine neue bakterielle Expressionsbibliothek erstellt werden.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine effiziente und schnelle Methode entwickelt, mit deren Hilfe es möglich war, Antigen-spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten unabhängig von Restriktion und spezifisch erkannten Epitopen zu isolieren.

Zu diesem Zweck wurde ein Vektorsystem zur *ivot*-mRNS-basierten MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation beliebiger Antigensequenzen auf professionell Antigen-präsentierenden Zellen erstellt. Des Weiteren wurde eine Methode zur gezielten Anreicherung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen mithilfe eines Aktivierungs-induzierten Oberflächenmarkers etabliert. In Kombination wurden diese beiden Ansätze in einer *In-vitro*-Kultur erfolgreich zur *De-novo*-Induktion und Isolierung Tumor-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten eingesetzt. Nach Abschluss der Klonierungsprozedur konnten die resultierenden CD4⁺ T-Zell-Klone umfassend molekular und funktionell charakterisiert werden.

Im Folgenden sollen nun die Ergebnisse der einzelnen Teilbereiche zusammengefasst und im Kontext der aktuellen Forschung diskutiert werden.

5.1 *Ivt*-mRNS für die gezielte MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation

Wie bereits besprochen, erkennen CD4⁺ T-Lymphozyten ihre spezifischen Epitope im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen. Der physiologische MHC-Klasse-II-Präsentationsweg in APZ beinhaltet die endozytotische Aufnahme exogener Antigene und deren proteolytische Prozessierung auf ihrem Weg durch das endosomomale / lysosomale Kompartiment hin zum MIIC (Geuze, 1998). Sollen nun Epitope ausgewählter Antigene physiologisch auf MHC-Klasse-II-Moleküle geladen werden, ist der Einsatz rekombinant exprimierter Proteine oder synthetisierter Peptide notwendig. Allerdings sind Bibliotheken überlappender Peptide aufwendig in der Produktion und für den breiten Einsatz zur Generierung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen finanziell unerschwinglich. Andererseits werden kommerziell erhältliche rekombinante Proteine meist in Bakterien oder Insektenzellen exprimiert und enthalten xenogene Kontaminationen. Diese Xenoproteine sind hoch immunogen und minimieren den Erfolg bei der Isolierung Antigen-spezifischer T-Lymphozyten. Im speziellen Fall der *De-novo*-Induktion TAA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen sind selbst in humanen Zelllinien exprimierte Antigene ungeeig-

net. Da es sich bei Tumor-assoziierten Antigenen meist um Selbstantigene handelt, fällt die Zahl naiver, hochavidier TAA-spezifischer T-Zellen – soweit diese überhaupt vorhanden sind – für gewöhnlich sehr gering aus. Aus diesem Grund stellen auch geringe Mengen, bei der Aufreinigung rekombinant exprimierter Antigene unspezifisch angereicherter Proteine einen potentiell störenden immunogenen Hintergrund dar. Für eine effiziente Methode zur Isolierung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten ist somit eine alternative Antigenquelle ohne das Risiko immunogener Kontaminationen von großem Interesse.

Der Einsatz von *in-vitro*-transkribierter mRNA ist eine elegante Möglichkeit zur Beladung von MHC-Klasse-I-Molekülen auf APZ (Van Tendeloo *et al.*, 2001) und wurde auch in unserer Arbeitsgruppe bereits zur erfolgreichen *De-novo*-Induktion Antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen genutzt (Wilde *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu rekombinanten Proteinen kann *ivt*-mRNA rasch in großen Mengen produziert werden und beinhaltet keine immunogenen Kontaminationen. Die Qualität der *ivt*-mRNA in Bezug auf Konzentration, Reinheit und Homogenität kann am Spektralphotometer sowie anhand einer gelelektrophoretischen Längenauftrennung zuverlässig kontrolliert werden und ermöglicht somit einen gleichbleibend hohen Standard. Mithilfe der *In-vitro*-Transkription kann zudem jede beliebige cDNA-Sequenz als Ausgangspunkt für die Herstellung von *ivt*-mRNA herangezogen werden. Kodierte Proteine werden nach *ivt*-mRNA-Transfektion in APZ selbständig im Zytoplasma translatiert und weiterführend für die Präsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen prozessiert.

Um *ivt*-mRNA für die *De-novo*-Induktion Antigen-spezifischer CD4⁺ Lymphozyten nutzbar zu machen, bedarf es einer Möglichkeit zur gezielten Kreuzpräsentation der neu-translatierten Antigene auf MHC-Klasse-II-Molekülen. Werden Antigene auf DNA-Ebene mit Signalsequenzen für den gezielten Transport der Proteine in das endosomale / lysosomale Kompartiment fusioniert, können diese in APZ auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden. Ausführlich in diesem Zusammenhang beschriebene Fusionskandidaten sind die invariante Kette (Ii) und das Lysosomen-assoziierte Membranprotein-1 (Bonini *et al.*, 2001; Sanderson *et al.*, 1995). LAMP1-Fusionsproteine zeigen jedoch im direkten Vergleich mit Fusionsproteinen der invarianten Kette eine vielfach erhöhte Effizienz in der MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation (Bonehill *et al.*, 2004). Bonehill und Kollegen beschreiben in Ergänzung zu LAMP1 zudem DC-LAMP, ein ausschließlich in reifen DZ vorkommendes Lysosomen-assoziiertes Membranprotein (de Saint-Vis *et al.*, 1998), als neuen potentiellen Fusionskandidaten. Dessen zytoplasmatische Domäne enthält ein Sortierungssignal auf Basis des Tyr-X-X-hydrophobe-AS-Motivs für den gezielten zellinternen Transport in das endosomale / lysosomale Kompartiment (Guarnieri *et al.*, 1993; Williams und Fukuda, 1990).

Da im angestrebten *In-vitro*-Kulturansatz das Potential maturer dendritischer Zellen zur *De-novo*-Induktion naiver Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten zunutze gemacht werden sollte (Banchereau und Palucka, 2005), erschien das DC-LAMP-Sortierungssignal als besonders geeignet zum zellinternen Transport von Proteinen vom ER in das MHC-Klasse-II-Kompartiment. Aus diesem Grund wurde unter Einbezug des DC-LAMP-Sortierungssignals ein Vektorkonstrukt zur gezielten *ivt*-mRNS-vermittelten MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation generiert. Basierend auf dem pGEM-Vektorsystem zur Herstellung *in-vitro*-transkribierter mRNS wurde durch Kombination des N-terminalen LAMP1-ER-Translokationssignals (Wu *et al.*, 1995) sowie der C-terminalen DC-LAMP-Transmembran- und Zytoplasma-Domäne (Bonehill *et al.*, 2004) ein zweigeteiltes Rahmenkonstrukt für das Einfügen von Antigensequenzen generiert (Abb. 4.2; Tab. 8.2). Im Gegensatz zum murinen LAMP1-ER-Translokationssignal, das von Wu und Kollegen beschrieben wurde, kommt in dieser Arbeit die homologe Sequenz des humanen LAMP1 zum Einsatz. Das hier erstellte CrossTA_g-Vektorkonstrukt enthält somit ausschließlich humane Sequenzen.

Um die Eignung des *ivt*-mRNS-Systems zur Anwendung in der *De-novo*-Induktion Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten zu überprüfen, sollte die Effizienz der Kreuzpräsentation CrossTA_g-gekoppelter Antigene untersucht werden. In T-Zell-Kokulterversuchen konnte die MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation verschiedener Antigene auf APZ mithilfe der kombinierten CrossTA_g-Signalsequenz wiederholt funktionell bestätigt werden. So erkannten EBNA-3C-spezifische CD4⁺ 3H10-Zellen ihr auf MHC-Klasse-II präsentierte Epitop ausschließlich in Anwesenheit der CrossTA_g-Signalsequenz. Die Effizienz der Kreuzpräsentation war in diesem Zusammenhang unabhängig von der Länge der integrierten Antigensequenz (Abb. 4.3). Demzufolge führten Epitop- oder Antigen-CrossTA_g-*ivt*-mRNS-transfizierte APZ zu einer vergleichbar starken spezifischen Reaktivierung der CD4⁺ T-Lymphozyten. Die CrossTA_g-induzierte MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation war zudem unabhängig von der Art der Antigen-präsentierenden Zellen. So konnte unter Einsatz Antigen-CrossTA_g-*ivt*-mRNS-transfizierter maturierter DZ oder EBV-immortalisierter B-Zellen in beiden Fällen eine annähernd gleich starke Aktivierung der CD4⁺ 3H10-Zellen beobachtet werden (Abb. 4.4). Fehlte jedoch das CrossTA_g-Signal in der *ivt*-mRNS-Sequenz konnte für Zellen des CD4⁺ T-Zell-Klons 3H10 in mehrfachen Versuchen keine spezifische Erkennung Antigen-*ivt*-mRNS-transfizierter APZ nachgewiesen werden.

Dementgegen hatte die An- oder Abwesenheit des CrossTA_g-Signals keinerlei negative Auswirkung auf die effiziente MHC-Klasse-I-Präsentation (Abb. 4.3). Die Kapazität *ivt*-mRNS-transfizierter APZ zur Reaktivierung Tyrosinase-spezifischer CD8⁺ T-Lymphozyten lag unabhängig von der Länge der eingefügten Antigensequenz oder den ange-

fügten Sortierungssignalen immer über der starken Reaktivierung der Tyrosinase-spezifischen CD8⁺ IVSB-T-Zellen nach Kokultivierung mit Peptid-beladenen APZ. Antigen-CrossTAg-*ivt*-mRNS-transfizierte APZ dienten demzufolge zur simultanen Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten. Einfach *ivt*-mRNS-transfizierte DZ können somit wirkungsvoll zur *De-novo*-Induktion Antigen-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen eingesetzt werden. Das bedeutet eine drastische Reduktion von Aufwand und Ressourcen und vereinfacht den Ansatz komplexer Stimulationsansätze.

Neben der allgemeinen Funktionalität der CrossTAg-Sequenz wurde zudem die Notwendigkeit der einzelnen Teilabschnitte des zweigeteilten Sortierungssignals untersucht (Abb. 4.4). Es konnte gezeigt werden, dass eine effiziente Präsentation des 3H10-Epitops auf MHC-Klasse-II-Molekülen ausschließlich dann möglich war, wenn sowohl das LAMP1-ER-Translokationssignal als auch die DC-LAMP-Transmembran- und Zytoplasma-Domäne in die Sequenz der transfizierten *ivt*-mRNS integriert vorlagen. Die Kombination der Antigen-umspannenden CrossTAg-Teilsequenzen wirkt somit synergistisch und ist essentiell für die effiziente MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation.

Die Inkubationszeit zwischen dem Beginn der Antigenbeladung der als APZ eingesetzten mDZ und dem Ansatz der T-Zell-Kokultur konnte in den hier durchgeführten Versuchen unter Verwendung von *ivt*-mRNS sehr kurz gehalten werden. Die Proteinexpression in APZ nach *ivt*-mRNS-Transfektion war entgegen der Proteinaufnahme aus dem Kulturmedium nicht auf die Phase der Protein-Koinkubation beschränkt und konnte somit auch nach diversen Zentrifugationsschritten und nach Aufnahme der Zellen in frisches Kulturmedium fortgesetzt werden.

Aufgrund des abgeschlossenen Reifeprozesses zeigen mature DZ eine im Vergleich zu unreifen iDZ physiologisch stark verminderte Antigenaufnahme (Platt *et al.*, 2010; Tarte *et al.*, 2000). Damit einhergehend führt die geringere MHC-Klasse-II-Präsentation der aufgenommenen Proteine zu einer verminderten CD4⁺ T-Zell-Reaktivierung. So konnten mDZ in der siebenstündigen Inkubationszeit nur sehr geringe Mengen rekombinantes Protein aufnehmen und prozessiert im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentieren. Extern Protein-beladene mDZ zeigten nach paralleler Behandlung zu Antigen-*ivt*-mRNS-transfizierten mDZ eine drastisch verringerte Kapazität zur Reaktivierung des CD4⁺ T-Zell-Klons 3H10 (Abb. 4.3). Diese konnte durch Verlängerung der APZ-Protein-Inkubationszeit verbessert werden, erreichte aber niemals das hohe Maß der *ivt*-mRNS-Transfektion (Daten nicht gezeigt). Somit steht die hohe Effizienz der CrossTAg-*ivt*-mRNS-induzierten Kreuzpräsentation des Antigens in starkem Kontrast zur ineffizienten Präsentation exogener Proteine durch die eingesetzten reifen DZ. Im Gegensatz zu iDZ weisen maturierte DZ jedoch hinsichtlich wichtiger aktivierender Oberflächenmarker einen deutlich ausgeprägten stimulatorischen Phänotyp auf und

sind für die *De-novo*-Induktion Antigen-spezifischer T-Zellen von Vorteil (Burdek *et al.*, 2010).

Wurden jedoch EBV-immortalisierte B-Zellen über 16 Stunden langfristig mit rekombinantem Protein koinkubiert näherte sich der Umfang der MHC-Klasse-II-Präsentation dem Niveau der Kreuzpräsentation nach *ivt*-mRNS-Transfektion (Abb. 4.5). Dies bestätigt, dass sich die konstant hohe Kapazität Antigen-CrossTag-*ivt*-mRNS-transfizierter APZ zur Reaktivierung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten in einem physiologischen Rahmen bewegt. Die Titrierbarkeit der reaktivierungsbedingten IFN- γ -Sekretion spezifischer CD4⁺ T-Zellen deutet zudem auf einen physiologischen Prozessierungs- und Aktivierungsmechanismus der CrossTag-induzierten MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation hin (Abb. 4.6).

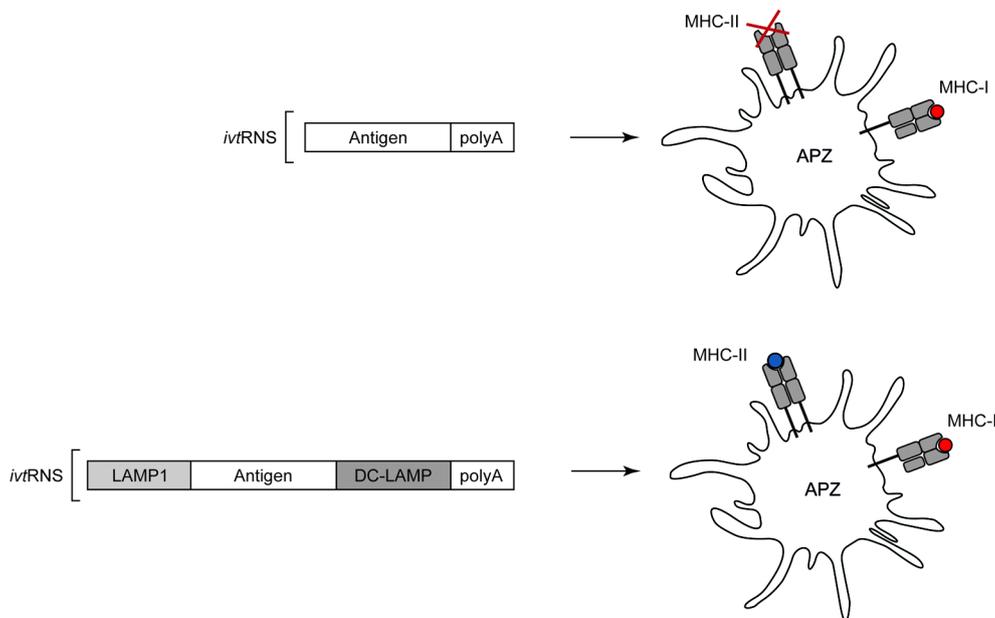


Abb. 5.1. **MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation mithilfe der CrossTag-Sequenz.** Vereinfachte schematische Zusammenfassung der Unterschiede in der MHC-Klasse-I/II-Beladung in APZ unter Verwendung herkömmlicher Antigen-*ivt*-mRNS sowie Antigen-CrossTag-*ivt*-mRNS.

Für das EBV-Antigen BNRF1 scheinen interessanter Weise intrinsische Mechanismen für ein geringes Grundniveau einer CrossTag-unabhängigen Kreuzpräsentation vorzuliegen (Nedjic *et al.*, 2009). BNRF1-spezifische CD4⁺ G11-3-Zellen erkannten Antigen-beladene APZ unabhängig von der Anwesenheit der MHC-Klasse-II-Signalsequenzen (Abb. 4.5). Die Kapazität der Antigen-CrossTag-*ivt*-mRNS-transfizierten APZ zur Reaktivierung spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten lag jedoch fast 3,5-fach über dem Niveau der IFN- γ -Sekretion nach Einsatz der Antigen-*ivt*-mRNS ohne CrossTag-Sequenz.

Auch hier war die Effizienz der Kreuzpräsentation unabhängig von der Länge der zwischen die CrossTA_g-Teilabschnitte eingefügten Antigensequenz.

Zusammengefasst unterstreichen die hier aufgeführten Ergebnisse die funktionelle Effizienz des CrossTA_g-Sortierungssignals zur gezielten Kreuzpräsentation *ivot*-mRNS-kodierter Antigene auf MHC-Klasse-II-Molekülen. Aufgrund der außerordentlich stark ausgeprägten Antigen-MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation sollten Antigen-CrossTA_g-*ivot*-mRNS-transfizierte mDZ somit ideale APZ für die erfolgreiche *De-novo*-Induktion TAA-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten darstellen.

5.2 CD154 für die Sortierung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen

In dieser Arbeit sollten TAA-spezifische CD4⁺ T-Zell-Klone isoliert sowie molekular und funktionell charakterisiert werden. Eine effiziente Methode zur *De-novo*-Induktion Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten ist demnach wenig sinnvoll, solange Antigen-spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten nicht gezielt aus der *de-novo*-induzierten Gesamtkultur angereichert und vereinzelt werden können. Fehlte eine Strategie zur Anreicherung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen, wäre die erwartete Frequenz der gesuchten T-Zell-Klone zu gering, um sie nach Klonierung in praktisch umsetzbaren Screening-Ansätzen identifizieren zu können.

Bis zuletzt stellte es eine große Herausforderung dar, eine kleine Population Einzelantigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten gezielt anzureichern. Intrazelluläre Antikörperfärbungen können hier keine Anwendung finden, da angereicherte T-Zell-Klone nach Vereinzeln expandiert und weiterführend charakterisiert werden sollten (Munier *et al.*, 2009; Gauduin, 2006). Aus diesem Grund war es essentiell, lebende vitale CD4⁺ T-Zellen zu isolieren. Speziell hierfür beschriebene MHC-II-Multimer-basierte Sortierungsstrategien sind wiederum ungeeignet, da sie die Kenntnis über immunodominante Epitope sowie zugehörige MHC-Allele voraussetzen (Hackett und Sharma, 2002; Altman *et al.*, 1996). Da zudem verfügbare Ansätze zur Sortierung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten anhand ausführlich beschriebener Aktivierungs-induzierter Oberflächenmarker, wie zum Beispiel CD25 oder CD69 (Bonvalet *et al.*, 2011; Maino *et al.*, 1995), aufgrund mangelnder Spezifität ausscheiden, erfüllen einzig Verfahren zur Detektion der Antigen-induzierten Zytokin-Freisetzung die nötigen Voraussetzungen in Bezug auf Antigen-spezifität der Isolierung und Epitop-Unabhängigkeit (Campbell, 2003; Manz *et al.*, 1995). Doch auch diese technisch versierte Isolierungsstrategie besitzt schlussendlich unerwünschte Einschränkungen. So sind Antikörper-basierte Versuchs-

ansätze zur gezielten Detektion der Zytokin-Sekretion arbeitsaufwendig, auf die Evaluierung einzelner Zytokine beschränkt und vernachlässigen Zellen, welche nach spezifischem Antigenkontakt keine Zytokine produzieren.

Erst mit Bekanntwerden der Methode zur Isolierung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen unter Verwendung der ausschließlich nach MHC-II:Epitop-TZR-Kontakt induzierten CD154-Oberflächenexpression war es nunmehr möglich, direkt und hoch selektiv auf die Population der *de-novo*-induzierten CD4⁺ T-Lymphozyten zuzugreifen (Chattopadhyay *et al.*, 2005; Frentsch *et al.*, 2005). Mithilfe der in Kapitel 4.2 dargestellten Methode der CD154-basierten T-Zell-Sortierung ist es demnach theoretisch möglich, spezifische CD4⁺ T-Zellen gegen alle Epitope zu isolieren, welche physiologisch aus der Antigensequenz prozessiert und auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden können.

Die hier gezeigten Ergebnisse verdeutlichen die Anwendbarkeit der CD154-basierten Sortierung zur Anreicherung lebender, Antigen-spezifisch reaktiver CD4⁺ T-Lymphozyten aus einer T-Zell-Mischkultur. Die rasche Internalisierung des Antigen-induzierten CD154 auf CD4⁺ T-Zellen nach CD154-CD40-Interaktion konnte mithilfe des CD40-Blockierungs-Antikörpers erfolgreich inhibiert werden. Es war unter Verwendung Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper nachfolgend möglich, die Antigen-spezifische CD154-Expression auf CD4⁺ T-Lymphozyten im Durchflusszytometer sichtbar zu machen. Das in der Zeitkinetik gemessene CD154-Expressionsmaximum wurde etwa sechs Stunden nach Beginn der Kokultur erreicht (Abb. 4.9). Es konnte zudem gezeigt werden, dass selbst eine geringe Zahl Antigen-transfizierter APZ ausreichten, um eine effiziente CD154-Oberflächen-Färbung auf Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten zu ermöglichen. Entgegen der Erwartung nahm die Zahl CD154-exprimierender Zellen sowie das durchschnittliche CD154-Expressions-Niveau mit steigender E:T-Ratio stetig zu (Abb. 4.10). Da die absolute Zahl der eingesetzten APZ jedoch mittels Substitution der abnehmenden Zahl Antigen-beladener APZ durch leer-transfizierte APZ in allen Kokulturen des Versuchsansatzes konstant gehalten wurde, kann der Effekt überschüssiger CD40-Blockierungs-Antikörper in Bezug auf eine abnehmende CD40-Oberflächen-Expression auf APZ ausgeschlossen werden. Das programmierte Absterben zu stark oder chronisch Antigen-reaktiver CD4⁺ T-Zellen (AICD, engl. activation-induced cell death) ist denkbar, erklärt jedoch nicht die Zunahme der Mittleren Fluoreszenz-Intensität (MFI) der CD154-Färbung bei abnehmender Zahl Antigen-beladener APZ (Green *et al.*, 2003). Die Überaktivierung der untersuchten CD4⁺ T-Zellen durch die erhöhte Verfügbarkeit passender Epitop:MHC-II-Komplexe scheint somit nicht den AICD zu induzieren sondern einen regulierenden Einfluss auf die CD154-Expression der aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten auszuüben. Bei einem realistischen Arbeitsver-

hältnis von T-Zellen zu Antigen-beladenen APZ zwischen 10:1 und 20:1 in der *De-novo*-Induktions-Kultur war die Anwendbarkeit der CD154-Sortierung demnach in vollem Umfang gegeben.

Die Ergebnisse aus der Untersuchung der spontanen CD154-Expression auf peripheren Blutlymphozyten nach *De-novo*-Induktion mit Antigen-CrossTAg-*ivt*-mRNS-transfizierten mDZ verdeutlichen zudem die hohe Spezifität und Effizienz der oben beschriebenen CD154-Sortierungsmethode (Abb. 4.11). Der unspezifische Hintergrund CD154-positiver CD4⁺ T-Zellen nach Kokultur mit Antigen-transfizierten APZ war vernachlässigbar. Selbst bei einem Anteil des T-Zell-Klons 3H10 von 0,1% an der Gesamtpopulation der autologen PBL wäre es mithilfe der CD154-Färbung möglich gewesen Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen in einem Verhältnis von 2:1 zu unspezifischen Zellen zu sortieren. Es ist jedoch in diesem Fall nicht auszuschließen, dass es sich selbst bei den 0,18% bis 0,05% CD154-positiver CD4⁺ T-Zellen in der PBL-Fraktion um reaktivierte EBNA-3C-spezifische Gedächtniszellen des autologen Spenders handelt.

Zusammengenommen eröffnet die Sortierung mittels CD154 die Möglichkeit einer gezielten Anreicherung Antigen-spezifisch reaktiver CD4⁺ T-Zellen am Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer ausgehend von einer *de-novo*-induzierten PBL-*in-vitro*-Kultur.

5.3 *De-novo*-Induktion TAA-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten

Nachdem sowohl die *ivt*-mRNS-basierte MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation erfolgreich etabliert wurde als auch die Anwendbarkeit der CD154-Sortierung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen eindeutig demonstriert werden konnte, wurden die zwei eigenständigen Methoden in einem Ansatz zur Isolierung *de-novo*-induzierter Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten zusammengeführt.

5.3.1 Antigenauswahl für die T-Zell-*De-novo*-Induktion

Wie in Kapitel 1.8 ausgeführt, war es Ziel dieser Arbeit, einen Beitrag zur Optimierung der adoptiven T-Zell-Therapie für die Behandlung von Patienten mit Tumorerkrankungen zu leisten. Neuere Forschungsergebnisse liefern zunehmend Indizien für die Notwendigkeit von CD4⁺ T-Lymphozyten zur Etablierung einer effizienten T-Zell-Tumortherapie (Perez-Diez *et al.*, 2007; Knutson und Disis, 2005). Bisher gibt es jedoch wenig Erfahrung in der klinischen Anwendung *ex vivo* expandierter oder TZR-modifizierter Tumor-spezifischer CD4⁺ T-Zellen im Rahmen des adoptiven T-Zell-

Transfers. Dies ist gleichsam zurückzuführen auf technische Schwierigkeiten bei der Identifizierung und Generierung Tumor-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten und zugehöriger T-Zell-Rezeptoren als auch auf den bis dato existierenden Mangel an geeigneten Tumor-assoziierten Zielantigenen (Muranski und Restifo, 2009).

Um nun eine vereinfachte und effiziente Isolierung Tumor-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen zu ermöglichen, wurden die oben etablierten Methoden innovativ in einen *De-novo*-Induktionsansatz zur Generierung TAA-spezifischer CD4⁺ T-Zell-Klone integriert. Die Frequenz Tumor-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten und somit die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Isolierung der gesuchten Zellen war jedoch vor Durchführung der Versuchsreihe nicht abzuschätzen. Tumor-assoziierte Antigene sind Selbst-Antigene und induzieren eine schützende Anti-Tumor-Immunantwort meist nur infolge ihrer Gewebe-untypischen Neu-Expression oder einer Tumor-spezifischen unphysiologischen Überexpression (Neller *et al.*, 2008; Coulie *et al.*, 2001). Aufgrund der negativen Selektion im Thymus sollten in gesunden Spendern vor allem hochavide TAA-spezifische T-Zellen nicht beziehungsweise mit nur sehr geringer Frequenz im Repertoire zirkulierender naiver T-Lymphozyten vorliegen (Starr *et al.*, 2003). Für die stark heterogene Population der CD4⁺ T-Lymphozyten ist dieses Paradigma jedoch wohl nicht vollständig anwendbar. So wird zum Beispiel beschrieben, dass CD4⁺ regulatorische T-Zellen (Treg) – neben weiteren Ausnahmen – Rezeptoren mit erhöhter Selbst-Affinität exprimieren (Stritesky *et al.*, 2012). Die anscheinend für CD4⁺ T-Zellen partiell durchlässigen Mechanismen der negativen Selektion ermöglichen somit die Existenz autologer TAA-spezifischer CD4⁺ T-Zell-Klone im peripheren Immunsystem und deren gezielte Isolierung. Die aufgeführten Treg-Zellen erscheinen jedoch hinsichtlich ihrer immun-suppressiven Funktion ungeeignet für eine Anwendung in der Tumorthherapie und sind aufgrund ihrer schlechten proliferativen Kapazitäten in *In-vitro*-Ansätzen meist nicht zugänglich (Nishikawa und Sakaguchi, 2010). Auch ein potentieller transgener Einsatz von Treg-TZR in geeigneten CD4⁺ Effektor-T-Zell-Subpopulationen scheint aufgrund ungeklärter, eventuell Rezeptor-intrinsischer Differenzierungsmechanismen nicht absehbar (Ohkura und Sakaguchi, 2010). Um dementsprechend eine Anwendbarkeit der isolierten T-Zellen und TZR für klinische Zwecke zu gewährleisten, beschränkten sich die Bemühungen zur Induktion oder Reaktivierung TAA-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten in dieser Arbeit auf Th1-polarisierte CD4⁺ Effektor-T-Zellen (Nishimura *et al.*, 2000).

Für den Einsatz in der T-Zell-*De-novo*-Induktion wurden fünf sogenannte Cancer/Testis-Antigene (C/T-Antigene) ausgewählt. Die heterogene Gruppe der C/T-Antigene umfasst eine Vielzahl verschiedener Tumor-assoziierten Antigene. Charakteristisch für C/T-Antigene ist ihr im Normalfall stark restringiertes Expressionsmuster (Scanlan *et*

al., 2004). Neben der meist exklusiven Expression in Gameten und Trophoblasten werden C/T-Antigene der Definition nach zudem jedoch aberrant von einer Vielzahl humaner Tumoren exprimiert. Zur Zeit sind 44 unterschiedliche C/T-Antigen-Familien mit meist mehreren zugehörigen Genen bekannt (Scanlan *et al.*, 2004). C/T-Antigene sind nachgewiesener Weise immunogen und dementsprechend von großem Interesse für potentielle Tumorthherapie-Ansätze (Chen *et al.*, 1997; van der Bruggen *et al.*, 1991). Ein Großteil der bekannten C/T-Antigene wurde mithilfe der SEREX-Methode (serologische Identifikation von Antigenen durch rekombinantes Expressionsklonieren) identifiziert (Old und Chen, 1998; Sahin *et al.*, 1995). Anhand der SEREX-Technologie war es möglich, natürlich vorkommende Serum-Antikörper gegen eine Vielzahl zuvor unbekannter Tumor-assoziiertes Antigene nachzuweisen (Jager *et al.*, 2004). Da Selbst-Antigene höchst wahrscheinlich mehrheitlich in die Kategorie der Thymus-abhängigen Antigene einzuordnen sind, benötigen TAA-spezifische B-Zellen adäquate T-Zell-Hilfe für ihre effiziente Aktivierung. Das Vorliegen einer Antikörperantwort legt somit die Existenz C/T-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen nahe (Zeng *et al.*, 2001; Parker, 1993). SEREX-Daten ermöglichten demnach die Auswahl geeigneter Tumor-assoziiertes Antigene für die *De-novo*-Induktion spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten. Die fünf in dieser Arbeit eingesetzten C/T-Antigene GAGE-1 (CT4.1), MAGE-A4 (CT1.4), NY-ESO1 (CT6), SSX4 (CT5.4) und XAGE-1 (CT12.1) wurden unabhängig von ihrer Funktion ausgewählt, da aussagekräftige funktionelle Daten zur Fülle der verschiedenen C/T-Antigene bis heute nur in Einzelfällen vorliegen. So interagiert MAGE-A4 etwa mit dem Onkogen Gankyrin und unterdrückt dessen Tumor-induzierende Wirkung (Nagao *et al.*, 2003). SSX4 wird dahingegen funktionell der Familie der Transkriptionsrepressoren zugeordnet (Thaete *et al.*, 1999). Interessanterweise werden C/T-Antigene häufig ko-exprimiert. So kann in Tumoren meist die simultane Expression unterschiedlicher C/T-Antigene detektiert werden (Sahin *et al.*, 1998). Generell scheint sich ein Mechanismus abzuzeichnen, demnach einzelne Mutationen in der Tumorgenese zur Reaktivierung umfassender Keimbahn-Expressionsprogramme führen können. Diese sind im Normalgewebe jedoch stillgelegt und spielen nach Reaktivierung möglicherweise eine zentrale Rolle in der fortschreitenden Entwicklung des Tumors (Old, 2001).

5.3.2 Aufbau des *In-vitro*-Kokulturansatzes

Wie bereits in Kapitel 4.3 beschrieben, wurden die fünf ausgewählten C/T-Antigene simultan in einer APZ-Kokultur zur erfolgreichen *De-novo*-Induktion Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten eingesetzt. Die Gründe hierfür waren die mögliche Reduk-

tion erfolgloser Versuchsansätze unter Verwendung von Einzelantigenen mit ungeklärter Immunogenität sowie die Optimierung der geläufigen Isolierungsmethoden auf dem Weg hin zu einem Hochdurchsatzverfahren. Zudem bestand die Hypothese, dass sich unterschiedlich aktivierte CD4⁺ T-Zell-Klone gegenseitig unterstützen und symbiotisch zu einem aktivierenden Kulturmilieu beitragen (den Haan und Bevan, 2000; Gerloni *et al.*, 2000).

In diesem Zusammenhang erweiterte der Einsatz einer nicht-CD4-angereicherten PBL-Gesamtkultur den *De-novo*-Induktionsansatz zusätzlich um die Möglichkeit einer synergistischen Aktivierung unterschiedlicher Effektorzellpopulationen. Nach Zugabe Antigen-beladener APZ lagen demnach für *In-vitro*-Verhältnisse näherungsweise physiologische Immunreaktionsbedingungen vor. Im Gegensatz zu einer gezielt CD4-angereicherten T-Zell-Fraktion konnte in der heterogenen Kultur peripherer Blutlymphozyten folglich ein potentiell hilfreiches Zusammenspiel Antigen-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten ungehindert stattfinden (Bevan, 2004). So gibt es Anzeichen für die CD4-Abhängigkeit effizienter CD8⁺ T-Zell-Antworten in Abwesenheit übermäßiger inflammatorischer Reize (Bennett *et al.*, 1997). Antigen-spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten aktivieren Antigen-beladene APZ durch CD154-CD40-Interaktion und unterstützen die Immunantwort durch Zytokin-Sekretion (Schoenberger *et al.*, 1998). Unabhängig von der weiterhin umstrittenen Rolle zur initialen Aktivierung von CD8⁺ T-Lymphozyten werden CD4⁺ T-Zellen zur Aufrechterhaltung Antigen-spezifischer ZTL sowie zur erfolgreichen Etablierung eines lang anhaltenden T-Zell-Gedächtnis benötigt (Janssen *et al.*, 2003; Shedlock und Shen, 2003; Sun und Bevan, 2003). Neben Zytokin-Freisetzung und APZ-Aktivierung wurde zusätzlich eine induzierbare CD40-Expression auf CD8⁺ T-Lymphozyten als potentieller Mechanismen für die direkte Interaktion Antigen-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen beschrieben (Tanchot und Rocha, 2003). Beachtet man zudem die Möglichkeit einer unterstützenden Aktivierung in der rekonstituierten PBMC-Gesamtkultur vorliegender NK-Zellen und Makrophagen ist der Populations-dynamische Prozess einer positiven Aktivierungsspirale denkbar, der somit auch die Proliferation und das Überleben Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen nachhaltig beeinflussen sollte.

Die Zusammensetzung der hier eingesetzten PBL-Kultur zeigte eine für das Alter des Spenders normale Verteilung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten (Abb. 4.14). Die ermittelte CD4/CD8-Ratio lag mit 1,69 innerhalb des Referenzbereichs eines gesunden Erwachsenen (Jentsch-Ullrich *et al.*, 2005). Dementgegen lag die Zahl der NK-Zellen mit einem Anteil von 0,6% an der Gesamtpopulation lebender PBL jedoch deutlich unterhalb der Erwartungen (4-27%). Wie zu erwarten stellten B-Zellen und Monozyten infolge der vorangegangenen Plastikadhärenz nur noch einen geringen Anteil an der PBL-

Mischpopulation. Die zuvor adhärierte Zellfraktion wurde nachfolgend zur Generierung professionell Antigen-präsentierender Zellen herangezogen. Nach erfolgter Antigenbeladung wurden die somit erhaltenen APZ für den Ansatz der *De-novo*-Induktionskultur wieder mit der verbliebenen PBL-Fraktion vereint.

Aus Monozyten ausgereifte DZ können bereits vorhandene Gedächtniszellen reaktivieren und besitzen das Potential, Tumor-Antigen-spezifische T-Zellen *de novo* zu induzieren (Palucka und Banchereau, 2012; Banchereau und Palucka, 2005). *In vitro* generierte DZ wurden nach Ausreifung in Einzelpopulationen mit Antigen-CrossTag-*ivt*-mRNS transfiziert, da diese im Vergleich zu unreifen DZ eine nachweislich bessere Proteinexpression aufweisen (Schaff *et al.*, 2005). Durch die Elektroporation einzelner *ivt*-mRNS-Spezies wurde zudem das Risiko einer negativen Interferenz verschiedener mRNS-Spezies innerhalb einer komplexen RNS-Mischung ausgeschlossen (Javorovic *et al.*, 2008). Die hier zur *De-novo*-Induktion TAA-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten eingesetzten muren DZ (mDZ) wurden anhand eines verkürzten 3-Tage-Protokolls ausgereift (Burdek *et al.*, 2010; Dauer *et al.*, 2005). 3-Tage-mDZ besitzen gegenüber konventionellen 7-Tage-mDZ ein größeres Potential zur Aktivierung naiver T-Zellen, sie zeigen eine höhere Überlebensrate nach Elektroporation und sind kostengünstiger in der Herstellung. Werden diese 3-Tage-mDZ neben dem durch Jonuleit und Kollegen beschriebenen Maturierungs-Cocktail unter Zugabe geeigneter TLR-Liganden ausgereift, erhöht sich das stimulatorische Potential weiterhin durch starke IL-12(p70)-Sekretion und einen verbesserten aktivierenden Phänotyp (Spranger *et al.*, 2010; Gautier *et al.*, 2005; Napolitani *et al.*, 2005). Biologisch aktives IL-12(p70) ist notwendig für die optimale Polarisierung einer IFN- γ -gestützten Th1-Antwort und birgt damit Vorteile für eine erfolgreiche Aktivierung Tumor-Antigen-spezifischer Effektor-T-Zellen (Zobywalski *et al.*, 2007; Mailliard *et al.*, 2004).

Die für den *De-novo*-Induktionsansatz maturierten DZ zeigten einen ausgeprägt aktivierenden Phänotyp (Abb. 4.13). Speziell für die kostimulatorischen Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 konnte eine überdurchschnittlich hohe Expression nachgewiesen werden. Die einzige Abweichung vom idealen Phänotyp vollständig ausgereifter *in-vitro*-mDZ stellte die untypisch erhöhte Expression des Monozytenmarkers CD14 dar. Diese stand jedoch in starkem Kontrast zum hohen Niveau der CD83-Expression als Marker für eine erfolgreiche mDZ-Ausreifung und hatte nachfolgend keinen ersichtlichen Einfluss auf die erfolgreiche Generierung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen.

5.3.3 Ablauf der *De-novo*-Induktion und CD154-Sortierung

Der zeitliche Ablauf der *De-novo*-Induktion orientierte sich an bereits zuvor etablierten Protokollen zur Generierung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen (S. Milosevic). Das in dieser Arbeit verwendete Protokoll wurde jedoch weitgehend innovativ abgeändert. So wurde die PBL-Gesamtpopulation nach Ansatz der *De-novo*-Induktion unter regelmäßiger IL-2- und IL-7-Zugabe in Kultur gehalten und zyklisch im Abstand von 14 Tagen mithilfe Antigen-beladener mDZ restimuliert (Caserta *et al.*, 2010). Das Verhältnis von PBL zu Antigen-transfizierten APZ wurde auf 4:1 festgesetzt. Da in die T-Zell-Kokultur jedoch eine anteilig gleiche Mischung der fünf Einzelantigen-elektroporierten mDZ-Populationen eingesetzt wurde, ergab sich in der Konsequenz eine PBL:APZ-Ratio von 20:1 für die jeweiligen Einzel-Antigene. Dies entsprach dem Rahmen der in Kapitel 4.2 erfolgreich getesteten Kulturbedingungen für die effiziente CD154-Sortierung Antigen-spezifisch aktivierter CD4⁺ T-Lymphozyten und wurde auch für die zwei folgenden Restimulationsschritte so beibehalten.

An Tag 13 und 27 nach Ansatz der *de-novo*-induzierten PBL-Kokultur – jeweils einen Tag vor Restimulation durch Antigen-beladene mDZ – wurden Zwischenanalysen zur Antigen-induzierten CD137- und CD154-Expression auf CD4⁺ T-Lymphozyten durchgeführt. Das Aktivierungs-induzierte Oberflächenmolekül CD137 (4-1BB; Nekrose-Faktor-Rezeptor-Molekül) ist als geeigneter Marker für die gezielte Anreicherung Antigen-spezifischer CD8⁺ T-Effektor-Zellen beschrieben (Wehler *et al.*, 2008; Wolfl *et al.*, 2007). Dementgegen scheinen nach Antigen-spezifischer Restimulation CD137-einzelpositive CD4⁺ T-Lymphozyten jedoch der Subpopulation der regulatorischen CD4⁺ T-Zellen anzugehören (Schoenbrunn *et al.*, 2012). Ungeachtet dessen werden CD154-einzelpositive und CD154-CD137-doppeltpositive CD4⁺ T-Zellen der für den adoptiven T-Zell-Transfer interessanten CD4⁺ Effektor-T-Zellfraktion zugeschrieben. Die CD137- und CD154-Expression auf kürzlich reaktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten wurde demnach herangezogen um die Verteilung und Dynamik innerhalb dieser T-Zell-Subpopulationen nachzuvollziehen und den kontraproduktiven Effekt einer übermäßigen Proliferation regulatorischer CD4⁺ T-Zellen auszuschließen.

Der Anteil potentiell regulatorischer, CD137-einzelpositiver CD4⁺ T-Lymphozyten an der PBL-Gesamtkultur war sehr gering und sank zudem im Verlauf des zweiten Restimulationszyklus von 2,5 auf 1,6 Prozent (Abb. 4.15). Im Gegensatz dazu hatten CD4⁺ T-Zellen der CD154-positiven Fraktion einen weitreichenden Überlebensvorteil und proliferierten stark. So stieg der Anteil CD154-positiver CD4⁺ T-Lymphozyten im Verlauf des zweiten Stimulationszyklus von etwa fünf Prozent an Tag 13 auf über 30 Prozent an Tag 27. Dies geschah bei nahezu gleichbleibendem CD4:CD8-Verhältnis und

sprach aufgrund der zeitgleichen starken Expansion der *de-novo*-induzierten PBL-Gesamtpopulation gegen ein rein selektives Überleben der CD154-positiven T-Zellen. Hinsichtlich der CD8⁺ T-Zell-Fraktion nahm die Zahl CD137-positiver CD8⁺ T-Lymphozyten parallel zur Expansion der CD154-positiven CD4⁺ T-Zellen stark zu (Daten nicht gezeigt). Insgesamt betrachtet expandierten CD8⁺ T-Zellen jedoch weitaus schneller in der PBL-Gesamtpopulation als CD4⁺ T-Lymphozyten. So invertierte die CD4:CD8-Ratio im Verlauf der 27-tägigen Kulturphase von anfänglich 1,69 zu 0,67 am Tag der letzten Messung. Zusammengenommen gaben die Experimente somit Hinweise für den erfolgreichen Ablauf der T-Zell-*de-novo*-Induktion in der nicht-angereicherten PBL-Mischpopulation. Da jedoch kein paralleler *De-novo*-Induktionsansatz unter Ausschluss der CD4-negativen PBL-Fraktion durchgeführt wurde, konnte anhand der hier genutzten *In-vitro*-Kultur leider kein zusätzlicher Nachweis für einen tatsächlich existierenden Synergismus der gemeinsam aktivierten PBL-Zellpopulationen erbracht werden.

Sechs Stunden nach Beginn des dritten Restimulationszyklus unter Einsatz Antigen-CrossTag-*ivt*-mRNS-transfizierter mDZ – an Tag 28 nach Beginn der Kokultur – konnte in Übereinstimmung mit der durchflusszytometrischen Zwischenanalyse auf 34 Prozent aller CD4⁺ T-Zellen eine Antigen-induzierte CD154-Expression detektiert werden. Die Fraktion der CD154-positiven CD4⁺ T-Zellen bildete anhand der gemessenen Fluoreszenzintensität zwar keine vollständig abgesetzte Population, konnte aber aufgrund ihrer Verteilungsdichte klar von der Negativpopulation abgetrennt werden (Abb. 4.16). Durch Sortierung der unterschiedlich CD154-exprimierenden CD4⁺ T-Zell-Fraktionen am Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer konnte eine CD154-positive sowie eine CD154-negative CD4⁺ T-Zell-Linie etabliert werden. Die Zellen der CD154-positiv sortierten T-Zell-Linie proliferierten innerhalb des folgenden 14-tägigen Restimulationszyklus in etwa vierfach stärker als Zellen der CD154-negativen Linie und zeigten eine über zweifach erhöhte IFN- γ -Freisetzung in der Kokultur mit Antigen-beladenen mDZ (Abb. 4.17). Die Zellen der etablierten T-Zell-Linien lieferten damit weitere Indizien für den Erfolg des *De-novo*-Induktionsansatzes als auch für die positive Selektion TAA-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten in der CD154-Sortierung.

Um den Erfolg der *De-novo*-Induktion neben den Ergebnissen der Linien auch auf klonaler Ebene evaluieren zu können, mussten CD154-positive CD4⁺ T-Zellen vereinzelt werden. T-Zellen können aufgrund der Diversität der einzelnen T-Zell-Rezeptoren nur dann molekular charakterisiert werden, wenn alle Zellen einer Population den gleichen Ursprung haben, d.h. alle aus einer einzelnen Zelle hervorgegangen sind (Murphy *et al.*, 2011). Zu diesem Zweck wurden CD154-positive CD4⁺ T-Zellen parallel zu den oben beschriebenen T-Zell-Linien in 96-Loch-Kulturplatten sortiert. Da die Frequenz tatsächlich TAA-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten sowie deren Überlebensrate in diesem Ex-

periment nicht abzuschätzen waren, wurden 96-Loch-Kulturplatten unterschiedlich mit jeweils einer, drei oder sechs Zellen pro Loch belegt.

5.3.4 Identifizierung C/T-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zell-Klone

In Folge mehrfacher Restimulationszyklen kam es in über der Hälfte der belegten Vertiefungen der insgesamt zwanzig 96-Loch-Kulturplatten zu einer detektierbaren T-Zell-Proliferation. Dies spricht für eine hohe Effizienz der Anreicherung lebender Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen und eine zellschonende Sortierprozedur. Das Vorliegen von T-Zell-Mischkulturen in mehrfach belegten Kultureinheiten konnte bei dieser hohen Überlebensrate jedoch nicht ausgeschlossen werden. Insgesamt 600 der expandierten T-Zell-Populationen wurden auf Antigen-spezifische Reaktivität hin getestet. Nach APZ-Kokultur zeigten 76 T-Zell-Kulturen ein Antigen-spezifisches Reaktionsmuster mit meist sehr geringem unspezifischem Hintergrund (Abb. 4. 18). In den weiterführenden Untersuchungen konnte die Klonalität der selektierten T-Zell-Kulturen mit nur wenigen Ausnahmen anhand der Identifikation einer einzigen produktiven T-Zell-Rezeptorsequenz und einer eindeutigen zugehörigen Antigen-spezifität bestätigt werden. Die Klonalität der einzelnen Populationen war unabhängig von der anfänglichen Mehrfachbelegung auch für T-Zellen mit Ursprung in drei- und sechsfach belegten Kultureinheiten nachzuweisen. Nach Ausschluss später identifizierter Mischkulturen lag die Erfolgsquote der gewählten Klonierungsstrategie zur Vereinzelung und Expansion Tumor-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zell-Klone somit bei über 10 Prozent.

Der Großteil der nicht-spezifischen T-Zell-Klone zeigte ein stark unspezifisches Reaktionsmuster. So kam es in der APZ-Kokultur sowohl mit Antigen-beladenen als auch mit leer-transfizierten Kontroll-mDZ zu einer äquivalent hohen IFN- γ -Ausschüttung. Ob es sich hierbei um die Erkennung *in vitro* maturierter DZ oder Transfektions-bedingter Elektroporationsartefakte handelte, wurde in dieser Arbeit nicht weiterführend untersucht. Für die hohe Effizienz der CD154-basierten Sortierungsstrategie zur Isolierung spezifisch aktivierter CD4⁺ T-Lymphozyten sprach wiederum, dass nur für eine sehr geringe Zahl der getesteten T-Zell-Klone keinerlei Reaktivität in der APZ-Kokultur nachzuweisen war.

Die aufgrund ihrer Antigen-Reaktivität selektierten CD4⁺ T-Zell-Klone hinterließen bei mikroskopischer Betrachtung einen vitalen Eindruck und proliferierten stark nach zyklischer Antigen-spezifischer Restimulation unter den angesetzten *In-vitro*-Kulturbedingungen. So konnten erste T-Zell-Klone bereits 14 Tage nach Ansatz der Plattenklonierung in die APZ-Kokultur zur Bestimmung eines Antigen-reaktiven IFN- γ -Sekre-

tionsmusters eingebracht werden. Weitere 14 Tage später – an Tag 28 nach Sortierung – konnten zuvor positiv-getestete CD4⁺ T-Zell-Klone bereits erfolgreich auf Einzelantigen-Spezifität hin untersucht werden.

Da in diesem Stadium keine Gefahr einer unspezifischen Reaktivierung EBV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen bestand, konnten von nun an mLCL als Antigen-präsentierende Zellen eingesetzt werden. Mini-EBV-immortalisierte B-Zellen proliferieren unter einfachsten Kulturbedingungen und müssen nicht wie mDZ unter Zytokinzugabe wiederholt aus Monozyten maturiert werden (Moosmann *et al.*, 2002). Die hier verwendeten mLCL exprimieren trotz weitreichender genetischer Reduktion des transformierenden Mini-EBV-Erbguts einige wenige latente EBV-Antigene und eignen sich aus diesem Grund nicht zur TAA-spezifischen Restimulation von PBL-Mischkulturen oder T-Zell-Linien (Adhikary *et al.*, 2006). Antigen-CrossTAg-*ivt*-mRNS-transfizierte mLCL des autologen Spenders konnten jedoch äquivalent zu mDZ für die Überprüfung der Antigen-spezifität isolierter CD4⁺ T-Zell-Klone eingesetzt werden (Abb. 4.18).

In der Folge war es somit möglich, Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zell-Klone gegen vier der anfänglich fünf zur *De-novo*-Induktion eingesetzten C/T-Antigene zu identifizieren. Einzig NY-ESO1-spezifische Klone konnten nicht in der Vielzahl der isolierten C/T-Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten identifiziert werden. Da NY-ESO1-spezifische CD4⁺ T-Zellen ungeachtet dessen bereits in der Literatur beschrieben sind, lassen sich hieraus jedoch keine Rückschlüsse bezüglich einer prinzipiell fehlenden Immunogenität des NY-ESO1-Proteins ableiten (Zeng *et al.*, 2001). Die Antigen-präsentierenden Zellen des hier verwendeten Spenders exprimierten keines der bisher identifizierten NY-ESO1-Epitop-präsentierenden MHC-Klasse-II-Allele. So waren die von Zeng und Kollegen isolierten CD4⁺ T-Lymphozyten ausschließlich HLA-DP4 restringiert. Für die wiederholt beschriebene Isolierung NY-ESO1-spezifischer CD4⁺ T-Zell-Linien mithilfe der MHC-Klasse-II-Tetramer-Technologie ist ausschließlich der erfolgreiche Einsatz von DRB1*0101- und DR52b-(DRB3*0202)-Tetrameren in Kombination mit dem immunodominanten ESO119-143-Peptid dokumentiert (Poli *et al.*, 2012; Ayyoub *et al.*, 2010). Auch die verschiedenen Allele der HLA-DR4-, -DR7-, -DR11- und DR53-Loci, in deren Kontext bereits die Aktivierung ESO119-143-spezifischer CD4⁺ T-Zellen beobachtet werden konnte, waren im Fall des hier eingesetzten Spenders nicht vorhanden (Zarour *et al.*, 2002). Dies wiederum unterstreicht die Relevanz des simultanen Antigeneinsatzes, da die Immunogenität einzelner Antigene stark abhängig von HLA-Genotyp und Spender-spezifischem TZR-Repertoire erscheint.

Interessanterweise wurden im Laufe der *De-novo*-Induktion – im Gegensatz zu C/T-Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten – keine CD4⁺ T-Zellen mit Spezifität für die ebenso vorhandenen CrossTAg-Teilsequenzen induziert. So erkannte keiner der ge-

wählten CD4⁺ T-Zell-Klone die unterschiedlich Antigen-CrossTAg-*ivt*-mRNS-transfizierten APZ unabhängig von der eingesetzten Antigensequenz.

5.3.5 Molekulare Charakterisierung isolierter T-Zell-Klone

Abgesehen von NY-ESO1 wurden die in dieser Arbeit spezifisch erkannten C/T-Antigene durch eine Vielzahl unabhängig isolierter T-Zell-Klone abgedeckt (Abb. 4.19). Für einen Großteil der Klone mit identischer Antigen-spezifität konnten in der nachfolgenden PCR-basierten T-Zell-Rezeptor-Sequenzanalyse die gleichen T-Zell-Rezeptor- α/β -Ketten nachgewiesen werden (Arden *et al.*, 1995; Steinle *et al.*, 1995). Nach Abschluss der Analyse konnten für die Gesamtheit aller isolierten TAA-spezifischen CD4⁺ T-Zell-Klone insgesamt sieben einzigartige T-Zell-Rezeptorsequenzen identifiziert werden (Tab. 4.1). Am häufigsten vertreten waren T-Zell-Klone mit den Rezeptorsequenzen GAGE-1-TZR-1 und XAGE-1-TZR-1. Zudem konnten aber mit GAGE-1-TZR-3 und XAGE-1-TZR-2 auch TAA-spezifische TZR identifiziert werden, deren Rezeptorsequenz nur jeweils ein einziges Mal innerhalb aller analysierten T-Zell-Klone nachgewiesen werden konnte. Die Isolierung der entsprechenden CD4⁺ T-Zell-Klone aus jeweils 6 Zellen/Loch-belegten 96-Loch-Kulturplatten deutete auf eine sehr geringe Frequenz dieser Antigen-spezifischen T-Zellen – zum Zeitpunkt der Sortierung – in der PBL-Gesamtpopulation hin. Dies verdeutlicht jedoch, dass es mithilfe der hier etablierten Methode neben der Isolierung häufig vertretener spezifischer CD4⁺ T-Zell-Klone ebenfalls möglich war, sehr seltene TAA-spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten erfolgreich zu identifizieren.

Die phänotypisch untersuchten T-Zell-Klone ließen sich in Bezug auf die vergleichbar hohe Expression des Differenzierungsmarkers CD45RO (aktivierte T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen) sowie des Chemokinrezeptors CCR7 (nicht auf Effektor-Gedächtnis-T-Zellen) am ehesten der Population der zentralen Gedächtnis-T-Zellen zuordnen (Sallusto *et al.*, 2004), soweit eine klare Zuordnungen der CD4⁺ T-Zellen nach zyklischer Restimulation in einer artifiziellen *In-vitro*-Kultur überhaupt zulässig ist (Abb. 4.20). Alle untersuchten CD4⁺ Referenzklone variierten stark in ihrer CD62L- und CD25-(IL-2-Rezeptor α -Kette)-Oberflächenexpression, ließen jedoch kein eindeutig mit der Isolierungsfrequenz der unterschiedlichen TZR-Klone korreliertes Muster erkennen. Bezüglich ihrer proliferativen Vorteile in der *In-vitro*-Kultur zeigten einzig die zwei stark proliferierenden T-Zell-Klone mit Rezeptor MAGE-A4-TZR-1 und XAGE-1-TZR-1 ein vergleichbares Muster aus hoher CD62L-Expression und geringer CD25-Expression. Ob es sich bei den CD25 hoch-exprimierenden CD4⁺ T-Zell-Klonen um regulatorische T-

Zellen handelte, konnte mit dieser Untersuchung nicht abschließend geklärt werden, da eine CD25-Expression auch für einen Großteil ruhender T-Gedächtniszellen nachweisbar ist (Triplett *et al.*, 2012). Zudem sprachen die detektierte CD154-Expression nach spezifischem Antigenkontakt sowie die wiederholt gemessene IFN- γ - und GM-CSF-Sekretion nach APZ-Kokultur gegen das Vorliegen regulatorischer T-Lymphozyten (Schoenbrunn *et al.*, 2012; Hall *et al.*, 2011).

In wie weit die Isolierungsfrequenz oder die Qualität der *In-vitro*-Proliferation der unterschiedlichen Klone in Verbindung mit einer eventuell höheren bzw. niedrigeren TZR-Affinität stehen, kann erst nach Epitopidentifizierung in Peptid-Titrations-Versuchen getestet werden (Wilde *et al.*, 2012).

Zur vollständigen Charakterisierung der erfolgreich isolierten T-Zell-Rezeptoren musste neben der Antigenspezifität und der T-Zell-Rezeptorsequenz abschließend auch das an der jeweiligen TZR-Epitop-Interaktion beteiligte MHC-Restriktionselement definiert werden (Zinkernagel und Doherty, 1974). Mithilfe der teilweise Allel-überlappenden LCL-Palette konnte nachfolgend das entsprechende Epitop-präsentierende MHC-Klasse-II-Molekül für vier der insgesamt sieben unterschiedlichen T-Zell-Rezeptoren direkt identifiziert werden (Abb. 4.21). Für die drei verbliebenen Rezeptoren konnte die Zahl der potentiell erkannten Restriktionselemente auf jeweils zwei Allele begrenzt werden. Auch im speziellen Fall des komplexen Reaktivitätsmusters der getesteten CD4⁺ T-Zellen mit GAGE-1-TZR-3 war eine Eingrenzung des zugehörigen MHC-Klasse-II-Moleküls möglich. Die spezifische IFN- γ -Sekretion in Kokultur mit APZ der Linien 2 und 5 setzten das Vorliegen des benötigten Restriktionselements voraus. Somit konnte die Zahl der folglich infrage stehenden MHC-Klasse-II-Moleküle auf die allelische Überschneidung der zwei Antigen-spezifisch erkannten LCL-Linien reduziert werden. Die weiterführende Restriktionsanalyse wurde jedoch erschwert, da die jeweils nicht weiter auszuschließenden Kandidaten-Allele eine hohe genetische Kopplung aufwiesen (Knipper *et al.*, 2000). Um die Restriktion der verbliebenen T-Zell-Rezeptoren final aufzuschlüsseln, könnten demnach einzelne MHC-Klasse-II-Moleküle transgen in geeigneten APZ exprimiert werden (Wilde *et al.*, 2009). Alternativ wäre auch eine Analyse anhand MHC-Klasse-II-spezifischer monoklonaler Antikörper denkbar (Huck *et al.*, 2001; Endl *et al.*, 1997). Die Aufklärung der benötigten Restriktionselemente könnte somit über die gezielte Antikörper-vermittelte Blockierung der Antigen-Präsentation im Kontext einzelner MHC-Klasse-II-Moleküle erfolgen.

Unabhängig von der Restriktion konnte in Experimenten zur weiteren Charakterisierung der Antigenspezifität der zuvor isolierten CD4⁺ T-Zell-Klone gezeigt werden, dass das in dieser Arbeit verwendete CrossTag-Sortierungssignal zur MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation der eingesetzten Tumor-assoziierten Antigene unerlässlich für die

erfolgreiche Isolierung C/T-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten war. So konnten *ivot*-mRNS-transfizierte APZ nur dann effizient durch Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen erkannt werden, wenn die jeweils zugehörigen Antigene in Fusion mit der zweigeteilten CrossTA_g-Signalsequenz vorlagen (Abb. 4.22). Einzige Ausnahme in diesem Zusammenhang bildete die geringfügige IFN- γ -Sekretion des T-Zell-Klons GAGE-1-TZR-3 in Kokultur mit GAGE-1-*ivot*-mRNS-transfizierten APZ. Da das CrossTA_g-Signal in diesem Fall fehlte, muss hier parallel zum EBV-Antigen BNRF1 (vergleiche Abb. 4.5) ein intrinsischer Mechanismus zur CrossTA_g-unabhängigen Kreuzpräsentation vorliegen. Die hier gezeigten Ergebnisse stehen in Einklang mit der bereits beschriebenen funktionellen Erkennung einiger zellinterner Proteine im Rahmen der MHC-Klasse-II-Epitoppräsentation (Malnati *et al.*, 1992; Nuchtern *et al.*, 1990). Die zugrunde liegenden Mechanismen waren unabhängig von einer Sekretion und nachfolgenden Re-Internalisierung der betreffenden Antigene. Ein möglicher Prozessierungsweg für die endogene Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen ist einerseits die Proteasom- und TAP-abhängige Präsentation überschüssiger Peptidfragmente aus dem klassischen MHC-Klasse-I-Präsentationsweg (Tewari *et al.*, 2005). Andererseits sind zudem autophagozytotische Prozesse denkbar, mit deren Hilfe zytoplasmatische Bestandteile zum Abbau an das lysosomale / endosomale Kompartiment übersandt werden (Klionsky und Ohsumi, 1999). Welche der potentiellen Mechanismen verantwortlich für die hier beschriebenen endogen MHC-Klasse-II-präsentierten Antigene zeichnen, konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter verfolgt werden.

Interessanter Weise zeigten die Klone GAGE-1-TZR-1 und -2 keine Erkennung der GAGE-1-*ivot*-mRNA-transfizierten APZ, obwohl wie oben beschrieben eine geringfügige CrossTA_g-unabhängige Präsentation des endogenen Proteins detektiert werden konnte. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte für die CD4⁺ T-Zell-Klone mit Rezeptor GAGE-1-TZR-1 und -2 zudem keine Erkennung Protein-beladener APZ detektiert werden (Abb. 4.23). Die eingesetzten rekombinanten Proteine wurden ohne CrossTA_g-Signalsequenz in humanen HEK-293T-Zellen exprimiert und dienten zum Ausschluss der Erkennung vermutlich im Bereich der CrossTA_g-Antigen-Fusionsstellen generierter Neo-Epitope (Bonehill *et al.*, 2004). So konnte mithilfe der rekombinanten Proteine für vier der eingangs sieben identifizierten CD4⁺ T-Zell-Klone eine Erkennung der ursprünglichen Antigensequenzen nachgewiesen werden. Klone mit GAGE-1-TZR-1 und -2 sowie MAGE-A4-TZR-1 erkannten ihr zugehöriges Epitop dementsgegen ausschließlich in Anwesenheit des CrossTA_g-Sortierungssignals. Die hier anscheinend vorliegende Generierung Neo-Epitop-spezifischer CD4⁺ T-Zellen ist ein unerwünschtes Nebenprodukt der *ivot*-mRNS-basierten MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation. Sie unterstreicht jedoch wiederum die hohe Kapazität der hier eingesetzten maturierten

DZ zur *De-novo*-Induktion von CD4⁺ T-Lymphozyten aus dem naiven T-Zell-Repertoire. Die Bestätigung der mutmaßlichen Neo-Epitop-Spezifitäten wird jedoch erst nach Aufklärung der exakt erkannten Proteinsequenzen in einem Verfahren zur gezielten Epitopidentifizierung erfolgen können (Milosevic *et al.*, 2005). So besteht zunächst die Möglichkeit, dass die Proteinerkennung in den oben genannten Fällen ausschließlich aufgrund einer unvollständigen oder fehlerhaften rekombinanten Expression der getesteten Antigene nicht zu detektieren war.

Wie zusammenfassend demonstriert werden konnte, stellt die im Rahmen dieser Arbeit beschriebene Kombination aus *ivt*-mRNS-basierter MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation und Aktivierungs-induzierter CD154-Sortierung folglich eine innovative und zielführende Methode zur Isolierung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen dar. Unabhängig von der potentiellen Generierung vereinzelter Neo-Epitop-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten konnten durch den simultanen Einsatz verschiedener Tumor-assoziiertes Antigene einzigartige CD4⁺ T-Zellen mit einem Spektrum unterschiedlicher C/T-Antigen-Spezifitäten generiert werden. Obwohl es bereits schon vereinzelt Bemühungen zur Identifizierung MHC-Klasse-II-gebundener Epitope gab (Ohkuri *et al.*, 2009), sind mit Ausnahme von NY-ESO1- und kürzlich beschriebenen Peptid-induzierten MAGE-A4-spezifischen T-Zell-Klonen (Cesson *et al.*, 2011) bisher keine Hinweise für etablierte CD4⁺ T-Zell-Klone gegen die hier eingesetzten C/T-Antigene in der Literatur beschrieben. Der schlussendlich umfassende Erfolg bei der Generierung einer Vielzahl C/T-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zell-Klone in nur einem *De-novo*-Induktionsansatz dient somit als eindeutiges Maß für die hohe Effizienz der hier etablierten Methode. In Anbetracht des flexiblen Einsatzes unterschiedlicher Antigensequenzen und der HLA-Restriktions-unabhängigen CD154-Sortierung existiert keine vergleichbare Methode zur schnellen, zuverlässigen Generierung und Charakterisierung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen.

5.4 Ausblick

Die erfolgreiche Isolierung unterschiedlicher TAA-spezifischer CD4⁺ T-Zell-Klone aus einer einzigen PBL-*in-vitro*-Kultur ermöglicht die konsequente Etablierung komplexer Screening-Verfahren. Unter Verwendung geeigneter Vektoren zur Erstellung umfassender *ivt*-mRNS-Bibliotheken sollte es dementsprechend möglich sein, gleichzeitig eine große Anzahl interessanter Zielantigene zur Generierung spezifischer CD4⁺ T-Lym-

phozyten einzusetzen. Das Spektrum der relevanten Antigene ist dabei zweifellos nicht auf die Gruppe der Tumor-assoziierten Antigene begrenzt.

Die Anwendungsbereiche Tumor-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen sowie MHC-Klasse-II-präsentierter Tumor-Antigene sind vielfältig. Epitope Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten könnten einen Einsatz zur Etablierung effizienter Peptid-Vakzinierungs-Strategien finden (Dudek *et al.*, 2010; Perez *et al.*, 2010). Anhand der in Abschnitt 4.5 behandelten Methode zur Identifizierung MHC-Klasse-II-restringierter Epitope unter Zuhilfenahme einer bakteriellen Expressionsbibliothek (DEPI) können isolierte CD4⁺ T-Lymphozyten umgehend auf ihre spezifisch erkannten Epitope untersucht werden (Milosevic *et al.*, 2006). Das Design der DEPI-Methode ermöglicht die Identifizierung der einzelnen Epitope demnach auch unter Einsatz komplexer Antigen-Gemische. So konnten in dieser Arbeit bereits erfolgreich erste Schritte auf dem Weg zur Identifizierung der durch C/T-Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen erkannten Peptidsequenzen abgeschlossen werden (Abb. 4.25). In APZ-Kokulturen zur Überprüfung verschiedener C/T-Antigenfragment-Pools zeigten einzelne Klone ein eindeutig klon-spezifisches Reaktionsmuster. Die Aufklärung der erkannten Epitope ist in diesen Fällen nur eine logische Konsequenz der zweistufigen DEPI-Methode, sie konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht vollständig abgeschlossen werden.

Auch der erfolgreiche Einsatz des CrossTA_g-Sortierungssignals zur *ivot*-mRNS-basierten MHC-Klasse-II-Kreuzpräsentation im Rahmen moderner DZ-Vakzine ist denkbar (Frankenberger und Schendel, 2012). Aufgrund der parallelen MHC-Klasse-I- und Klasse-II-Präsentation wären Antigen-CrossTA_g-*ivot*-mRNS-transduzierte DZ somit in der Lage die gesamte Bandbreite der existierenden Antigen-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten zu induzieren. Die möglichen CD8-unterstützenden Wirkweisen Tumor-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen sind vielfältig und reichen von APZ-Aktivierung bis hin zur direkten Hilfe für zytotoxische CD8⁺ T-Lymphozyten (siehe Abb. 5.2). Das in diesem Zusammenhang erstellte CrossTA_g-Vektorkonstrukt enthält – im Gegensatz zum murinen LAMP1-ER-Translokationssignal von Bonehill und Kollegen – ausschließlich humane Sequenzen und wäre somit auch als klinische Anwendung denkbar (Bonehill *et al.*, 2004).

Durch den effizienten Zugang zur Fraktion der Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen eröffnen sich viele neue Möglichkeiten. Charakterisierte T-Zell-Rezeptoren neu-isolierter Tumor-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten könnten transgen in Ansätze zur adoptiven Immuntherapie verschiedenster Tumorerkrankungen integriert werden (Turtle *et al.*, 2012; Muranski und Restifo, 2009). Da CD4⁺ T-Zellen im Gegensatz zu zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten eine zentrale Rolle zur Aktivierung und Aufrechter-

haltung von Immunantworten einnehmen, ist die MHC-Klasse-II-Präsentation der spezifisch erkannten Antigene auf Tumorzellen nicht zwingend notwendig für einen erfolgreichen Einsatz Tumor-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten (siehe Abb. 5.2). Speziell im Fall solider Tumoren sollte nekrotisches Tumorgewebe durch APZ effizient auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden und zur Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen führen. Generell sollte jedoch eine kombinierte Anwendung Tumor-Antigen-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten in Verbindung mit MHC-Klasse-I- und Klasse-II-beladenen DZ in den Fokus der Therapie-Ansätze rücken. Diese „3-Zell“-Therapie vereint die Möglichkeiten des adoptiven Zell-Transfers und spiegelt alle Facetten der TZR-basierten adaptiven Immunantwort wieder. Da die kombinierte Zell-Therapie möglicherweise nicht auf die Funktion eines bestehenden Immunsystems angewiesen wäre, ist somit die effiziente Anwendung des 3-Zell-Ansatzes in zuvor Lymphozyten-depletierten Patienten denkbar ohne eine erfolgreiche Rekonstitution des Immunsystems erforderlich zu machen.

Durch den Einsatz geeigneter TZR könnte zudem die postulierte synergistische Wirkweise Tumor-Antigen-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten näher überprüft werden. In humanisierten Mausmodellen könnten geeignete Pärchen TAA-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gemeinsam auf die potentielle Optimierung der Tumorabstoßung getestet werden. Erweiterte *In-vivo*-Studien könnten dementsprechend auch Aufschluss über die Mechanismen und die Effizienz der CD8-unabhängigen und direkten Anti-Tumor-Wirkweisen Tumor-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten geben.

Darüber hinaus könnten durch den Einsatz eines breiteren Spektrums von Selbst-Antigenen in *De-novo*-Induktions-Ansätzen aufschlussreiche Daten im Hinblick auf die negative Selektion autoreaktiver CD4⁺ T-Lymphozyten generiert werden. In Kombination mit Informationen zur Affinität einzelner identifizierter T-Zell-Rezeptoren könnten Einblicke in die Mechanismen und das Maß der negativen CD4-T-Zell-Selektion eröffnet werden. Die hier beschriebene Methode ist in diesem Zusammenhang auch als effizienter Ansatz zur Isolierung regulatorischer CD4⁺ T-Zellen denkbar. Durch Anpassung der Kulturbedingungen und den Einsatz einer adäquaten Sortierungsstrategie könnten Treg gezielt induziert und isoliert werden. Die Anwendbarkeit der Treg-Zellen in der adoptiven Therapie von Autoimmunerkrankungen und Allergien ist vielfach beschrieben (Baranyi *et al.*, 2011; Wright *et al.*, 2011). Auch der vielversprechende Einsatz regulatorischer T-Zellen in der Transplantationsmedizin ist bereits anerkannt (Safinia *et al.*, 2010).

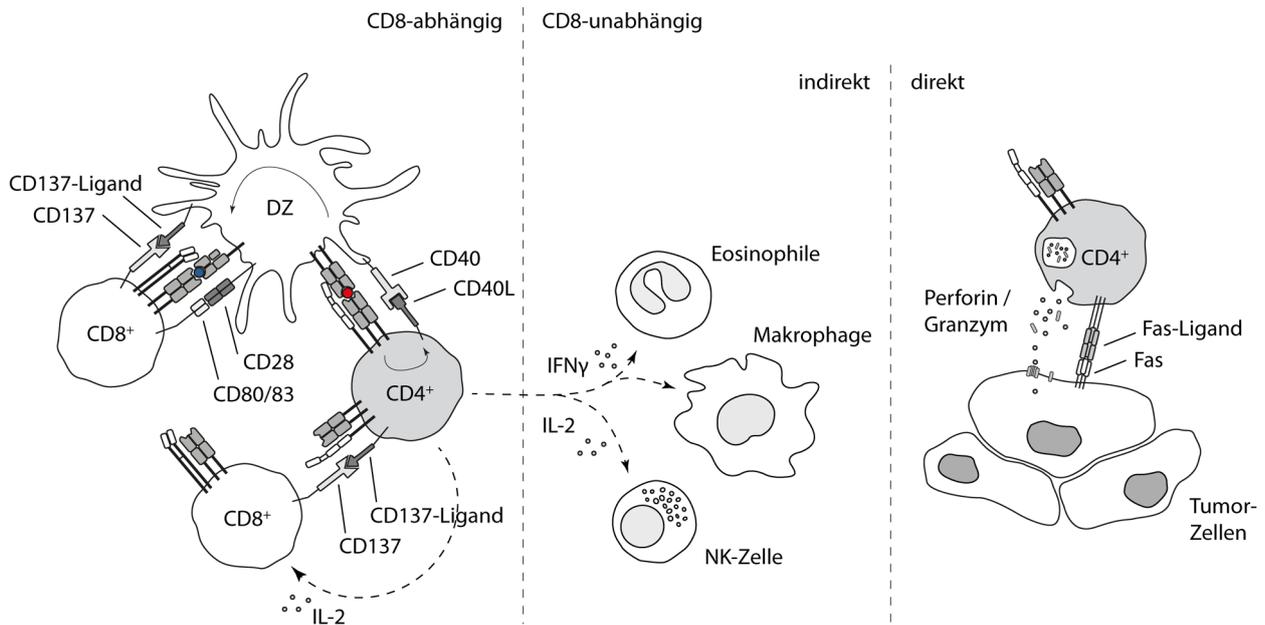


Abb. 5.2. **Mechanismen der Anti-Tumor-Aktivität Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten.** Das Spektrum der potentiellen Wirkweisen Tumor-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen setzt sich zusammen aus CD8-abhängigen und -unabhängigen Mechanismen. CD8-abhängige Anti-Tumor-Mechanismen umfassen die Aktivierung Tumor-Antigen-präsentierender APZ anhand der CD40-CD40-Ligand-Interaktion (Bennett, 1998) und die nachfolgend effiziente Aktivierung Tumor-spezifischer CD8⁺ T-Zellen durch optimal kostimulierende APZ. Zudem besteht die Möglichkeit der direkten Aktivierung zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen über CD137 oder ähnliche aktivierende Oberflächen-Moleküle (Giuntoli, 2002) sowie durch gezielte Zytokinfreisetzung (Ostrand-Rosenberg, 2005). Die Antigen-spezifische Zytokinsekretion der CD4⁺ T-Lymphozyten bildet in diesem Zusammenhang auch die Schnittstelle zu CD8-unabhängigen Anti-Tumor-Mechanismen. Diese lassen sich wiederum unterteilen in direkte und indirekte Wirkweisen. Aktivierte CD4-Effektor-Zellen tragen zu einem unterstützenden immunologischen Milieu bei und aktivieren Aspekte der angeborenen Immunität, wie zum Beispiel Makrophagen, Eosinophile und NK-Zellen, für eine orchestrierte Tumor-Abwehr. Neben CD8-abhängigen und indirekten Mechanismen sind zudem auch direkte Effektorfunktionen Tumor-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten durch Fas-Fas-Ligand-Interaktion, Granzym/Perforin-vermittelte Lyse oder ähnliche Mechanismen beschrieben (Schattner, 1996; Echchakir, 2000). Diese scheinen im Einzelfall auch unabhängig von einer bestehenden MHC-Klasse-II-Expression auf Tumorzellen von Relevanz zu sein (Quezada, 2010).

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Methode zur effizienten Generierung Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten eröffnet dementsprechend vielfältige Möglichkeiten zur Entschlüsselung immunologischer Grundlagen und kann im Idealfall zur Verbesserung verschiedener immuntherapeutischer Ansätze beitragen.

6 Literaturverzeichnis

- Adhikary, D.**, Behrends, U., Moosmann, A., Witter, K., Bornkamm, G. W. and Mautner, J. (2006) Control of Epstein-Barr virus infection in vitro by T helper cells specific for virion glycoproteins. *J Exp Med* **203**(4): 995-1006.
- Altman, J. D.**, Moss, P. A., Goulder, P. J., Barouch, D. H., McHeyzer-Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J. and Davis, M. M. (1996) Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* **274**(5284): 94-96.
- Altomonte, M.**, Fonsatti, E., Visintin, A. and Maio, M. (2003) Targeted therapy of solid malignancies via HLA class II antigens: a new biotherapeutic approach? *Oncogene* **22**(42): 6564-6569.
- Antony, P. A.**, Piccirillo, C. A., Akpinarli, A., Finkelstein, S. E., Speiss, P. J., Surman, D. R., Palmer, D. C., Chan, C. C., Klebanoff, C. A., Overwijk, W. W., Rosenberg, S. A. and Restifo, N. P. (2005) CD8⁺ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4⁺ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol* **174**(5): 2591-2601.
- Arden, B.**, Clark, S. P., Kabelitz, D. and Mak, T. W. (1995) Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* **42**(6): 455-500.
- Arruda, L. B.**, Sim, D., Chikhlikar, P. R., Maciel, M., Jr., Akasaki, K., August, J. T. and Marques, E. T. (2006) Dendritic cell-lysosomal-associated membrane protein (LAMP) and LAMP-1-HIV-1 gag chimeras have distinct cellular trafficking pathways and prime T and B cell responses to a diverse repertoire of epitopes. *J Immunol* **177**(4): 2265-2275.
- Ayyoub, M.**, Pignon, P., Dojcinovic, D., Raimbaud, I., Old, L. J., Luescher, I. and Valmori, D. (2010) Assessment of vaccine-induced CD4 T cell responses to the 119-143 immunodominant region of the tumor-specific antigen NY-ESO-1 using DRB1*0101 tetramers. *Clin Cancer Res* **16**(18): 4607-4615.
- Banchereau, J. and Palucka, A. K.** (2005) Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* **5**(4): 296-306.
- Baranyi, U.**, Gattringer, M., Valenta, R. and Wekerle, T. (2011) Cell-based therapy in allergy. *Curr Top Microbiol Immunol* **352**: 161-179.
- Battegay, M.**, Moskophidis, D., Rahemtulla, A., Hengartner, H., Mak, T. W. and Zinkernagel, R. M. (1994) Enhanced establishment of a virus carrier state in adult CD4⁺ T-cell-deficient mice. *J Virol* **68**(7): 4700-4704.
- Bennett, S. R.**, Carbone, F. R., Karamalis, F., Flavell, R. A., Miller, J. F. and Heath, W. R. (1998) Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* **393**(6684): 478-480.

- Bennett, S. R.**, Carbone, F. R., Karamalis, F., Miller, J. F. and Heath, W. R. (1997) Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *J Exp Med* **186**(1): 65-70.
- Berger, C.**, Jensen, M. C., Lansdorp, P. M., Gough, M., Elliott, C. and Riddell, S. R. (2008) Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J Clin Invest* **118**(1): 294-305.
- Bevan, M. J.** (2004) Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat Rev Immunol* **4**(8): 595-602.
- Bian, H.**, Reidhaar-Olson, J. F. and Hammer, J. (2003) The use of bioinformatics for identifying class II-restricted T-cell epitopes. *Methods* **29**(3): 299-309.
- Bogen, B.**, Munthe, L., Sollien, A., Hofgaard, P., Omholt, H., Dagnaes, F., Dembic, Z. and Lauritzsen, G. F. (1995) Naive CD4+ T cells confer idotype-specific tumor resistance in the absence of antibodies. *Eur J Immunol* **25**(11): 3079-3086.
- Bonehill, A.**, Heirman, C., Tuyaeerts, S., Michiels, A., Breckpot, K., Bresseur, F., Zhang, Y., Van Der Bruggen, P. and Thielemans, K. (2004) Messenger RNA-electroporated dendritic cells presenting MAGE-A3 simultaneously in HLA class I and class II molecules. *J Immunol* **172**(11): 6649-6657.
- Bonini, C.**, Lee, S. P., Riddell, S. R. and Greenberg, P. D. (2001) Targeting antigen in mature dendritic cells for simultaneous stimulation of CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* **166**(8): 5250-5257.
- Bonvalet, M.**, Wambre, E., Moussu, H., Horiot, S., Kwok, W. W., Louise, A., Ebo, D., Hoarau, C., Van Overtvelt, L., Baron-Bodo, V. and Moingeon, P. (2011) Comparison between major histocompatibility complex class II tetramer staining and surface expression of activation markers for the detection of allergen-specific CD4(+) T cells. *Clin Exp Allergy* **41**(6): 821-829.
- Bouneaud, C.**, Kourilsky, P. and Bousso, P. (2000) Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* **13**(6): 829-840.
- Braulke, T. and Bonifacino, J. S.** (2009) Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta* **1793**(4): 605-614.
- Breckpot, K.**, Dullaers, M., Bonehill, A., van Meirvenne, S., Heirman, C., de Greef, C., van der Bruggen, P. and Thielemans, K. (2003) Lentivirally transduced dendritic cells as a tool for cancer immunotherapy. *J Gene Med* **5**(8): 654-667.
- Burdek, M.**, Spranger, S., Wilde, S., Frankenberger, B., Schendel, D. J. and Geiger, C. (2010) Three-day dendritic cells for vaccine development: antigen uptake, processing and presentation. *J Transl Med* **8**: 90.
- Burnet, M.** (1957) Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* **1**(5022): 779-786.

- Butel, J. S.** (2000) Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis* **21**(3): 405-426.
- Cabrera, T., Ruiz-Cabello, F. and Garrido, F.** (1995) Biological implications of HLA-DR expression in tumours. *Scand J Immunol* **41**(4): 398-406.
- Campbell, J. D.** (2003) Detection and enrichment of antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells based on cytokine secretion. *Methods* **31**(2): 150-159.
- Caserta, S., Alessi, P., Basso, V. and Mondino, A.** (2010) IL-7 is superior to IL-2 for ex vivo expansion of tumour-specific CD4(+) T cells. *Eur J Immunol* **40**(2): 470-479.
- Cesson, V., Rivals, J. P., Escher, A., Piotet, E., Thielemans, K., Posevitz, V., Dojcinovic, D., Monnier, P., Speiser, D., Bron, L. and Romero, P.** (2011) MAGE-A3 and MAGE-A4 specific CD4(+) T cells in head and neck cancer patients: detection of naturally acquired responses and identification of new epitopes. *Cancer Immunol Immunother* **60**(1): 23-35.
- Chattopadhyay, P. K., Yu, J. and Roederer, M.** (2005) A live-cell assay to detect antigen-specific CD4+ T cells with diverse cytokine profiles. *Nat Med* **11**(10): 1113-1117.
- Cheever, M. A. and Chen, W.** (1997) Therapy with cultured T cells: principles revisited. *Immunol Rev* **157**: 177-194.
- Chen, C., Johnston, T. D., Jeon, H., Gedaly, R., McHugh, P. and Ranjan, D.** (2009) Cyclosporine promotes epstein-barr virus-infected human B-cell transformation assayed by three correlated assay methods. *Transplant Proc* **41**(1): 366-370.
- Chen, Y. T., Scanlan, M. J., Sahin, U., Tureci, O., Gure, A. O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M. and Old, L. J.** (1997) A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(5): 1914-1918.
- Cormier, J. N., Panelli, M. C., Hackett, J. A., Bettinotti, M. P., Mixon, A., Wunderlich, J., Parker, L. L., Restifo, N. P., Ferrone, S. and Marincola, F. M.** (1999) Natural variation of the expression of HLA and endogenous antigen modulates CTL recognition in an in vitro melanoma model. *Int J Cancer* **80**(5): 781-790.
- Corthay, A., Skovseth, D. K., Lundin, K. U., Rosjo, E., Omholt, H., Hofgaard, P. O., Haraldsen, G. and Bogen, B.** (2005) Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells. *Immunity* **22**(3): 371-383.
- Coulie, P. G., Hanagiri, T. and Takenoyama, M.** (2001) From tumor antigens to immunotherapy. *Int J Clin Oncol* **6**(4): 163-170.
- Dauer, M., Schad, K., Herten, J., Junkmann, J., Bauer, C., Kiefl, R., Endres, S. and Eigler, A.** (2005) FastDC derived from human monocytes within 48 h effectively prime tumor antigen-specific cytotoxic T cells. *J Immunol Methods* **302**(1-2): 145-155.
- Davis, M. M. and Bjorkman, P. J.** (1988) T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* **334**(6181): 395-402.

- de Saint-Vis, B.**, Vincent, J., Vandenabeele, S., Vanbervliet, B., Pin, J. J., Ait-Yahia, S., Patel, S., Mattei, M. G., Banchereau, J., Zurawski, S., Davoust, J., Caux, C. and Lebecque, S. (1998) A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity* **9**(3): 325-336.
- Delecluse, H. J.**, Pich, D., Hilsendegen, T., Baum, C. and Hammerschmidt, W. (1999) A first-generation packaging cell line for Epstein-Barr virus-derived vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(9): 5188-5193.
- Dembic, Z.**, Haas, W., Weiss, S., McCubrey, J., Kiefer, H., von Boehmer, H. and Steinmetz, M. (1986) Transfer of specificity by murine alpha and beta T-cell receptor genes. *Nature* **320**(6059): 232-238.
- Dembic, Z.**, Schenck, K. and Bogen, B. (2000) Dendritic cells purified from myeloma are primed with tumor-specific antigen (idiotype) and activate CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(6): 2697-2702.
- den Haan, J. M. and Bevan, M. J.** (2000) A novel helper role for CD4 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(24): 12950-12952.
- Dudek, N. L.**, Perlmutter, P., Aguilar, M. I., Croft, N. P. and Purcell, A. W. (2010) Epitope discovery and their use in peptide based vaccines. *Curr Pharm Des* **16**(28): 3149-3157.
- Dudley, M. E.**, Wunderlich, J. R., Robbins, P. F., Yang, J. C., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Sherry, R., Restifo, N. P., Hubicki, A. M., Robinson, M. R., Raffeld, M., Duray, P., Seipp, C. A., Rogers-Freezer, L., Morton, K. E., Mavroukakis, S. A., White, D. E. and Rosenberg, S. A. (2002) Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* **298**(5594): 850-854.
- Dunn, G. P.**, Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. and Schreiber, R. D. (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**(11): 991-998.
- Echchakir, H.**, Bagot, M., Dorothee, G., Martinvalet, D., Le Gouvello, S., Bousmell, L., Chouaib, S., Bensussan, A. and Mami-Chouaib, F. (2000) Cutaneous T cell lymphoma reactive CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones display a Th1 cytokine profile and use a fas-independent pathway for specific tumor cell lysis. *J Invest Dermatol* **115**(1): 74-80.
- Endl, J.**, Otto, H., Jung, G., Dreisbusch, B., Donie, F., Stahl, P., Elbracht, R., Schmitz, G., Meinl, E., Hummel, M., Ziegler, A. G., Wank, R. and Schendel, D. J. (1997) Identification of naturally processed T cell epitopes from glutamic acid decarboxylase presented in the context of HLA-DR alleles by T lymphocytes of recent onset IDDM patients. *J Clin Invest* **99**(10): 2405-2415.

- Fallarino, F.,** Grohmann, U., Bianchi, R., Vacca, C., Fioretti, M. C. and Puccetti, P. (2000) Th1 and Th2 cell clones to a poorly immunogenic tumor antigen initiate CD8+ T cell-dependent tumor eradication in vivo. *J Immunol* **165**(10): 5495-5501.
- Farrell, P. J.** (2001) Epstein-Barr virus. The B95-8 strain map. *Methods Mol Biol* **174**: 3-12.
- Fernandes, D. M.,** Vidard, L. and Rock, K. L. (2000) Characterization of MHC class II-presented peptides generated from an antigen targeted to different endocytic compartments. *Eur J Immunol* **30**(8): 2333-2343.
- Foulds, K. E.,** Zenewicz, L. A., Shedlock, D. J., Jiang, J., Troy, A. E. and Shen, H. (2002) Cutting edge: CD4 and CD8 T cells are intrinsically different in their proliferative responses. *J Immunol* **168**(4): 1528-1532.
- Frankenberger, B. and Schendel, D. J.** (2012) Third generation dendritic cell vaccines for tumor immunotherapy. *Eur J Cell Biol* **91**(1): 53-58.
- Frentsch, M.,** Arbach, O., Kirchhoff, D., Moewes, B., Worm, M., Rothe, M., Scheffold, A. and Thiel, A. (2005) Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat Med* **11**(10): 1118-1124.
- Gascoigne, N. R. and Palmer, E.** (2011) Signaling in thymic selection. *Curr Opin Immunol* **23**(2): 207-212.
- Gattinoni, L.,** Klebanoff, C. A., Palmer, D. C., Wrzesinski, C., Kerstann, K., Yu, Z., Finkelstein, S. E., Theoret, M. R., Rosenberg, S. A. and Restifo, N. P. (2005) Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. *J Clin Invest* **115**(6): 1616-1626.
- Gattinoni, L.,** Klebanoff, C. A. and Restifo, N. P. (2012) Paths to stemness: building the ultimate antitumor T cell. *Nat Rev Cancer* **12**(10): 671-684.
- Gauduin, M. C.** (2006) Intracellular cytokine staining for the characterization and quantitation of antigen-specific T lymphocyte responses. *Methods* **38**(4): 263-273.
- Gautier, G.,** Humbert, M., Deauvieau, F., Scullier, M., Hiscott, J., Bates, E. E., Trinchieri, G., Caux, C. and Garrone, P. (2005) A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J Exp Med* **201**(9): 1435-1446.
- Gerloni, M.,** Xiong, S., Mukerjee, S., Schoenberger, S. P., Croft, M. and Zanetti, M. (2000) Functional cooperation between T helper cell determinants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(24): 13269-13274.
- Gerloni, M. and Zanetti, M.** (2005) CD4 T cells in tumor immunity. *Springer Semin Immunopathol* **27**(1): 37-48.
- Germain, R. N.** (1994) MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* **76**(2): 287-299.

- Geuze, H. J.** (1998) The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol Today* **19**(6): 282-287.
- Giuntoli, R. L.**, 2nd, Lu, J., Kobayashi, H., Kennedy, R. and Celis, E. (2002) Direct costimulation of tumor-reactive CTL by helper T cells potentiate their proliferation, survival, and effector function. *Clin Cancer Res* **8**(3): 922-931.
- Gorsch, S. M.**, Memoli, V. A., Stukel, T. A., Gold, L. I. and Arrick, B. A. (1992) Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res* **52**(24): 6949-6952.
- Graham, F. L.**, Smiley, J., Russell, W. C. and Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**(1): 59-74.
- Green, D. R.**, Droin, N. and Pinkoski, M. (2003) Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* **193**: 70-81.
- Greenberg, P. D.**, Kern, D. E. and Cheever, M. A. (1985) Therapy of disseminated murine leukemia with cyclophosphamide and immune Lyt-1+,2- T cells. Tumor eradication does not require participation of cytotoxic T cells. *J Exp Med* **161**(5): 1122-1134.
- Guarnieri, F. G.**, Arterburn, L. M., Penno, M. B., Cha, Y. and August, J. T. (1993) The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1. *J Biol Chem* **268**(3): 1941-1946.
- Hackett, C. J. and Sharma, O. K.** (2002) Frontiers in peptide-MHC class II multimer technology. *Nat Immunol* **3**(10): 887-889.
- Hahne, M.**, Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L. E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J. and Tschopp, J. (1996) Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* **274**(5291): 1363-1366.
- Hall, B. M.**, Verma, N. D., Tran, G. T. and Hodgkinson, S. J. (2011) Distinct regulatory CD4+T cell subsets; differences between naive and antigen specific T regulatory cells. *Curr Opin Immunol* **23**(5): 641-647.
- Heath, W. R.**, Belz, G. T., Behrens, G. M., Smith, C. M., Forehan, S. P., Parish, I. A., Davey, G. M., Wilson, N. S., Carbone, F. R. and Villadangos, J. A. (2004) Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* **199**: 9-26.
- Heath, W. R. and Carbone, F. R.** (2001) Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* **1**(2): 126-134.
- Hogquist, K. A.**, Baldwin, T. A. and Jameson, S. C. (2005) Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol* **5**(10): 772-782.

- Huber, C. H. and Wolfel, T.** (2004) Immunotherapy of cancer: from vision to standard clinical practice. *J Cancer Res Clin Oncol* **130**(7): 367-374.
- Huck, C., Endl, J., Walk, T., Noessner, E., Jung, G., Wank, R. and Schendel, D. J.** (2001) HLA-DR53 molecules restrict glutamic acid decarboxylase peptide presentation to T cells of a Type I diabetes patient: specification of the trimolecular HLA-peptide/T-cell receptor complex. *Diabetologia* **44**(1): 70-80.
- Hunder, N. N., Wallen, H., Cao, J., Hendricks, D. W., Reilly, J. Z., Rodmyre, R., Jungbluth, A., Gnjjatic, S., Thompson, J. A. and Yee, C.** (2008) Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med* **358**(25): 2698-2703.
- Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D. and Levitsky, H.** (1998) The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med* **188**(12): 2357-2368.
- Ignatowicz, L., Winslow, G., Bill, J., Kappler, J. and Marrack, P.** (1995) Cell surface expression of class II MHC proteins bound by a single peptide. *J Immunol* **154**(8): 3852-3862.
- Jager, D., Taverna, C., Zippelius, A. and Knuth, A.** (2004) Identification of tumor antigens as potential target antigens for immunotherapy by serological expression cloning. *Cancer Immunol Immunother* **53**(3): 144-147.
- Jager, E., Jager, D., Karbach, J., Chen, Y. T., Ritter, G., Nagata, Y., Gnjjatic, S., Stockert, E., Arand, M., Old, L. J. and Knuth, A.** (2000) Identification of NY-ESO-1 epitopes presented by human histocompatibility antigen (HLA)-DRB4*0101-0103 and recognized by CD4(+) T lymphocytes of patients with NY-ESO-1-expressing melanoma. *J Exp Med* **191**(4): 625-630.
- Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M. G. and Schoenberger, S. P.** (2003) CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* **421**(6925): 852-856.
- Javorovic, M., Wilde, S., Zobywalski, A., Noessner, E., Lennerz, V., Wolfel, T. and Schendel, D. J.** (2008) Inhibitory effect of RNA pool complexity on stimulatory capacity of RNA-pulsed dendritic cells. *J Immunother* **31**(1): 52-62.
- Jentsch-Ullrich, K., Koenigsmann, M., Mohren, M. and Franke, A.** (2005) Lymphocyte subsets' reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults--a monocentric German study. *Clin Immunol* **116**(2): 192-197.
- Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J. and Enk, A. H.** (1997) Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* **27**(12): 3135-3142.
- June, C. H.** (2007) Principles of adoptive T cell cancer therapy. *J Clin Invest* **117**(5): 1204-1212.

- Keene, J. A. and Forman, J.** (1982) Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **155**(3): 768-782.
- Kempkes, B., Pich, D., Zeidler, R., Sugden, B. and Hammerschmidt, W.** (1995) Immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase pairs of Epstein-Barr virus DNA. *J Virol* **69**(1): 231-238.
- Kerkar, S. P., Sanchez-Perez, L., Yang, S., Borman, Z. A., Muranski, P., Ji, Y., Chinnasamy, D., Kaiser, A. D., Hinrichs, C. S., Klebanoff, C. A., Scott, C. D., Gattinoni, L., Morgan, R. A., Rosenberg, S. A. and Restifo, N. P.** (2011) Genetic engineering of murine CD8+ and CD4+ T cells for preclinical adoptive immunotherapy studies. *J Immunother* **34**(4): 343-352.
- Khong, H. T. and Restifo, N. P.** (2002) Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* **3**(11): 999-1005.
- Klebanoff, C. A., Gattinoni, L. and Restifo, N. P.** (2012) Sorting through subsets: which T-cell populations mediate highly effective adoptive immunotherapy? *J Immunother* **35**(9): 651-660.
- Klebanoff, C. A., Gattinoni, L., Torabi-Parizi, P., Kerstann, K., Cardones, A. R., Finkelstein, S. E., Palmer, D. C., Antony, P. A., Hwang, S. T., Rosenberg, S. A., Waldmann, T. A. and Restifo, N. P.** (2005) Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(27): 9571-9576.
- Klebanoff, C. A., Khong, H. T., Antony, P. A., Palmer, D. C. and Restifo, N. P.** (2005) Sinks, suppressors and antigen presenters: how lymphodepletion enhances T cell-mediated tumor immunotherapy. *Trends Immunol* **26**(2): 111-117.
- Klein, L. and Jovanovic, K.** (2011) Regulatory T cell lineage commitment in the thymus. *Semin Immunol* **23**(6): 401-409.
- Klionsky, D. J. and Ohsumi, Y.** (1999) Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 1-32.
- Knipper, A. J., Hakenberg, P., Enczmann, J., Kuhrober, A., Kiesel, U., Kogler, G. and Wernet, P.** (2000) HLA-DRB1,3,4,5 and -DQB1 allele frequencies and HLA-DR/DQ linkage disequilibrium of 231 German caucasoid patients and their corresponding 821 potential unrelated stem cell transplants. *Hum Immunol* **61**(6): 605-614.
- Knutson, K. L. and Disis, M. L.** (2005) Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* **54**(8): 721-728.
- Koeffler, H. P., Ranyard, J., Yelton, L., Billing, R. and Bohman, R.** (1984) Gamma-interferon induces expression of the HLA-D antigens on normal and leukemic human myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(13): 4080-4084.
- Korn, T., Oukka, M., Kuchroo, V. and Bettelli, E.** (2007) Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* **19**(6): 362-371.

- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lee, Y. K.,** Turner, H., Maynard, C. L., Oliver, J. R., Chen, D., Elson, C. O. and Weaver, C. T. (2009) Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* **30**(1): 92-107.
- Lemmel, C. and Stevanovic, S.** (2003) The use of HPLC-MS in T-cell epitope identification. *Methods* **29**(3): 248-259.
- Levitsky, H. I.,** Lazenby, A., Hayashi, R. J. and Pardoll, D. M. (1994) In vivo priming of two distinct antitumor effector populations: the role of MHC class I expression. *J Exp Med* **179**(4): 1215-1224.
- Lin, X.,** Dashti, A., Schinazi, R. F. and Tang, J. (1993) Intracellular diversion of glycoprotein GP160 of human immunodeficiency virus to lysosomes as a strategy of AIDS gene therapy. *FASEB J* **7**(11): 1070-1080.
- Mailliard, R. B.,** Wankowicz-Kalinska, A., Cai, Q., Wesa, A., Hilkens, C. M., Kapsenberg, M. L., Kirkwood, J. M., Storkus, W. J. and Kalinski, P. (2004) alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res* **64**(17): 5934-5937.
- Maino, V. C.,** Suni, M. A. and Ruitenber, J. J. (1995) Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation. *Cytometry* **20**(2): 127-133.
- Malcherek, G.,** Wirblich, C., Willcox, N., Rammensee, H. G., Trowsdale, J. and Melms, A. (1998) MHC class II-associated invariant chain peptide replacement by T cell epitopes: engineered invariant chain as a vehicle for directed and enhanced MHC class II antigen processing and presentation. *Eur J Immunol* **28**(5): 1524-1533.
- Malnati, M. S.,** Marti, M., LaVaute, T., Jaraquemada, D., Biddison, W., DeMars, R. and Long, E. O. (1992) Processing pathways for presentation of cytosolic antigen to MHC class II-restricted T cells. *Nature* **357**(6380): 702-704.
- Manz, R.,** Assenmacher, M., Pfluger, E., Miltenyi, S. and Radbruch, A. (1995) Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(6): 1921-1925.
- Marzo, A. L.,** Kinnear, B. F., Lake, R. A., Frelinger, J. J., Collins, E. J., Robinson, B. W. and Scott, B. (2000) Tumor-specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity. *J Immunol* **165**(11): 6047-6055.
- Mascarell, L. and Truffa-Bachi, P.** (2003) New aspects of cyclosporin a mode of action: from gene silencing to gene up-regulation. *Mini Rev Med Chem* **3**(3): 205-214.
- Miller, G. and Lipman, M.** (1973) Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**(1): 190-194.
- Milosevic, S.,** Behrends, U., Adhikary, D. and Mautner, J. (2006) Identification of major histocompatibility complex class II-restricted antigens and epitopes of the Epstein-

- Barr virus by a novel bacterial expression cloning approach. *J Virol* **80**(21): 10357-10364.
- Milosevic, S.**, Behrends, U., Christoph, H. and Mautner, J. (2005) Direct mapping of MHC class II epitopes. *J Immunol Methods* **306**(1-2): 28-39.
- Mitchison, N. A. and O'Malley, C.** (1987) Three-cell-type clusters of T cells with antigen-presenting cells best explain the epitope linkage and noncognate requirements of the in vivo cytolytic response. *Eur J Immunol* **17**(11): 1579-1583.
- Moosmann, A.**, Khan, N., Cobbold, M., Zentz, C., Delecluse, H. J., Hollweck, G., Hislop, A. D., Blake, N. W., Croom-Carter, D., Wollenberg, B., Moss, P. A., Zeidler, R., Rickinson, A. B. and Hammerschmidt, W. (2002) B cells immortalized by a mini-Epstein-Barr virus encoding a foreign antigen efficiently reactivate specific cytotoxic T cells. *Blood* **100**(5): 1755-1764.
- Morgan, R. A.**, Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Hughes, M. S., Yang, J. C., Sherry, R. M., Royal, R. E., Topalian, S. L., Kammula, U. S., Restifo, N. P., Zheng, Z., Nahvi, A., de Vries, C. R., Rogers-Freezer, L. J., Mavroukakis, S. A. and Rosenberg, S. A. (2006) Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* **314**(5796): 126-129.
- Mullis, K.**, Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273.
- Mumberg, D.**, Monach, P. A., Wanderling, S., Philip, M., Toledano, A. Y., Schreiber, R. D. and Schreiber, H. (1999) CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(15): 8633-8638.
- Munier, C. M.**, Zaunders, J. J., Ip, S., Cooper, D. A. and Kelleher, A. D. (2009) A culture amplified multi-parametric intracellular cytokine assay (CAMP-ICC) for enhanced detection of antigen specific T-cell responses. *J Immunol Methods* **345**(1-2): 1-16.
- Muranski, P.**, Boni, A., Antony, P. A., Cassard, L., Irvine, K. R., Kaiser, A., Paulos, C. M., Palmer, D. C., Touloukian, C. E., Ptak, K., Gattinoni, L., Wrzesinski, C., Hinrichs, C. S., Kerstann, K. W., Feigenbaum, L., Chan, C. C. and Restifo, N. P. (2008) Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* **112**(2): 362-373.
- Muranski, P. and Restifo, N. P.** (2009) Adoptive immunotherapy of cancer using CD4(+) T cells. *Curr Opin Immunol* **21**(2): 200-208.
- Murphy, K.** (2011) *Janeway's Immunobiology*. Taylor & Francis; Auflage: 8th edition.
- Nagao, T.**, Higashitsuji, H., Nonoguchi, K., Sakurai, T., Dawson, S., Mayer, R. J., Itoh, K. and Fujita, J. (2003) MAGE-A4 interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumorigenic activity. *J Biol Chem* **278**(12): 10668-10674.

- Nakano, N.,** Rooke, R., Benoist, C. and Mathis, D. (1997) Positive selection of T cells induced by viral delivery of neopeptides to the thymus. *Science* **275**(5300): 678-683.
- Napolitani, G.,** Rinaldi, A., Bertoni, F., Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (2005) Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* **6**(8): 769-776.
- Nedjic, J.,** Aichinger, M., Mizushima, N. and Klein, L. (2009) Macroautophagy, endogenous MHC II loading and T cell selection: the benefits of breaking the rules. *Curr Opin Immunol* **21**(1): 92-97.
- Neller, M. A.,** Lopez, J. A. and Schmidt, C. W. (2008) Antigen for cancer immunotherapy. *Semin Immunol* **20**(5): 286-295.
- Nishikawa, H. and Sakaguchi, S.** (2010) Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer* **127**(4): 759-767.
- Nishimura, T.,** Nakui, M., Sato, M., Iwakabe, K., Kitamura, H., Sekimoto, M., Ohta, A., Koda, T. and Nishimura, S. (2000) The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology. *Cancer Chemother Pharmacol* **46 Suppl**: S52-61.
- Nistico, P.,** Tecce, R., Giacomini, P., Cavallari, A., D'Agnano, I., Fisher, P. B. and Natali, P. G. (1990) Effect of recombinant human leukocyte, fibroblast, and immune interferons on expression of class I and II major histocompatibility complex and invariant chain in early passage human melanoma cells. *Cancer Res* **50**(23): 7422-7429.
- Nuchtern, J. G.,** Biddison, W. E. and Klausner, R. D. (1990) Class II MHC molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation. *Nature* **343**(6253): 74-76.
- Ohkura, N. and Sakaguchi, S.** (2010) Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin Immunopathol* **32**(2): 95-106.
- Ohkuri, T.,** Wakita, D., Chamoto, K., Togashi, Y., Kitamura, H. and Nishimura, T. (2009) Identification of novel helper epitopes of MAGE-A4 tumour antigen: useful tool for the propagation of Th1 cells. *Br J Cancer* **100**(7): 1135-1143.
- Old, L. J.** (2001) Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer Immun* **1**: 1.
- Old, L. J. and Chen, Y. T.** (1998) New paths in human cancer serology. *J Exp Med* **187**(8): 1163-1167.
- Ossendorp, F.,** Mengede, E., Camps, M., Filius, R. and Melief, C. J. (1998) Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors. *J Exp Med* **187**(5): 693-702.
- Ostrand-Rosenberg, S.** (2005) CD4+ T lymphocytes: a critical component of antitumor immunity. *Cancer Invest* **23**(5): 413-419.

- Pagano, J. S., Blaser, M., Buendia, M. A., Damania, B., Khalili, K., Raab-Traub, N. and Roizman, B.** (2004) Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. *Semin Cancer Biol* **14**(6): 453-471.
- Palucka, K. and Banchereau, J.** (2012) Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer* **12**(4): 265-277.
- Pardoll, D. M. and Topalian, S. L.** (1998) The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol* **10**(5): 588-594.
- Parish, I. A. and Heath, W. R.** (2008) Too dangerous to ignore: self-tolerance and the control of ignorant autoreactive T cells. *Immunol Cell Biol* **86**(2): 146-152.
- Park, T. S., Rosenberg, S. A. and Morgan, R. A.** (2011) Treating cancer with genetically engineered T cells. *Trends Biotechnol* **29**(11): 550-557.
- Parker, D. C.** (1993) T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* **11**: 331-360.
- Perez, S. A., von Hofe, E., Kallinteris, N. L., Gritzapis, A. D., Peoples, G. E., Papamichail, M. and Baxevanis, C. N.** (2010) A new era in anticancer peptide vaccines. *Cancer* **116**(9): 2071-2080.
- Perez-Diez, A., Joncker, N. T., Choi, K., Chan, W. F., Anderson, C. C., Lantz, O. and Matzinger, P.** (2007) CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood* **109**(12): 5346-5354.
- Platt, C. D., Ma, J. K., Chalouni, C., Ebersold, M., Bou-Reslan, H., Carano, R. A., Mellman, I. and Delamarre, L.** (2010) Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(9): 4287-4292.
- Poli, C., Raffin, C., Dojcinovic, D., Luescher, I., Ayyoub, M. and Valmori, D.** (2012) MHC class II/ESO tetramer-based generation of in vitro primed anti-tumor T helper lines for adoptive cell therapy of cancer. *Haematologica*.
- Pope, J. H., Horne, M. K. and Scott, W.** (1968) Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *Int J Cancer* **3**(6): 857-866.
- Qin, Z. and Blankenstein, T.** (2000) CD4+ T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity* **12**(6): 677-686.
- Quezada, S. A., Simpson, T. R., Peggs, K. S., Merghoub, T., Vider, J., Fan, X., Blasberg, R., Yagita, H., Muranski, P., Antony, P. A., Restifo, N. P. and Allison, J. P.** (2010) Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J Exp Med* **207**(3): 637-650.
- Rammensee, H. G.** (1995) Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol* **7**(1): 85-96.

- Restifo, N. P.**, Dudley, M. E. and Rosenberg, S. A. (2012) Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol* **12**(4): 269-281.
- Restifo, N. P.**, Marincola, F. M., Kawakami, Y., Taubenberger, J., Yannelli, J. R. and Rosenberg, S. A. (1996) Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. *J Natl Cancer Inst* **88**(2): 100-108.
- Rosenberg, E. S.**, Billingsley, J. M., Caliendo, A. M., Boswell, S. L., Sax, P. E., Kalams, S. A. and Walker, B. D. (1997) Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* **278**(5342): 1447-1450.
- Rosenberg, S. A.** (2001) Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* **411**(6835): 380-384.
- Rosenberg, S. A.**, Yang, J. C. and Restifo, N. P. (2004) Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* **10**(9): 909-915.
- Rudensky, A.**, Preston-Hurlburt, P., Hong, S. C., Barlow, A. and Janeway, C. A., Jr. (1991) Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* **353**(6345): 622-627.
- Safinia, N.**, Sagoo, P., Lechler, R. and Lombardi, G. (2010) Adoptive regulatory T cell therapy: challenges in clinical transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* **15**(4): 427-434.
- Sahin, U.**, Tureci, O., Chen, Y. T., Seitz, G., Villena-Heinsen, C., Old, L. J. and Pfreundschuh, M. (1998) Expression of multiple cancer/testis (CT) antigens in breast cancer and melanoma: basis for polyvalent CT vaccine strategies. *Int J Cancer* **78**(3): 387-389.
- Sahin, U.**, Tureci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I. and Pfreundschuh, M. (1995) Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(25): 11810-11813.
- Sakaguchi, S.** (2005) Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* **6**(4): 345-352.
- Sallusto, F.**, Cella, M., Danieli, C. and Lanzavecchia, A. (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* **182**(2): 389-400.
- Sallusto, F.**, Geginat, J. and Lanzavecchia, A. (2004) Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* **22**: 745-763.
- Salter, R. D.**, Howell, D. N. and Cresswell, P. (1985) Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics* **21**(3): 235-246.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (2000) *Molecular cloning, a laboratory manual*. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanderson, S., Frauwirth, K. and Shastri, N.** (1995) Expression of endogenous peptide-major histocompatibility complex class II complexes derived from invariant chain-antigen fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(16): 7217-7221.
- Scanlan, M. J., Simpson, A. J. and Old, L. J.** (2004) The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun* **4**: 1.
- Schaft, N., Dorrie, J., Thumann, P., Beck, V. E., Muller, I., Schultz, E. S., Kampgen, E., Dieckmann, D. and Schuler, G.** (2005) Generation of an optimized polyvalent monocyte-derived dendritic cell vaccine by transfecting defined RNAs after rather than before maturation. *J Immunol* **174**(5): 3087-3097.
- Schattner, E. J., Mascarenhas, J., Bishop, J., Yoo, D. H., Chadburn, A., Crow, M. K. and Friedman, S. M.** (1996) CD4+ T-cell induction of Fas-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma B cells. *Blood* **88**(4): 1375-1382.
- Schietinger, A., Philip, M. and Schreiber, H.** (2008) Specificity in cancer immunotherapy. *Semin Immunol* **20**(5): 276-285.
- Schlom, J.** (2012) Therapeutic cancer vaccines: current status and moving forward. *J Natl Cancer Inst* **104**(8): 599-613.
- Schmitt, T. M., Ragnarsson, G. B. and Greenberg, P. D.** (2009) T cell receptor gene therapy for cancer. *Hum Gene Ther* **20**(11): 1240-1248.
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R. and Melief, C. J.** (1998) T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* **393**(6684): 480-483.
- Schoenbrunn, A., Frentsch, M., Kohler, S., Keye, J., Dooms, H., Moewes, B., Dong, J., Loddenkemper, C., Sieper, J., Wu, P., Romagnani, C., Matzmohr, N. and Thiel, A.** (2012) A Converse 4-1BB and CD40 Ligand Expression Pattern Delineates Activated Regulatory T Cells (Treg) and Conventional T Cells Enabling Direct Isolation of Alloantigen-Reactive Natural Foxp3+ Treg. *J Immunol*.
- Shedlock, D. J. and Shen, H.** (2003) Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* **300**(5617): 337-339.
- Simpson, A. J., Caballero, O. L., Jungbluth, A., Chen, Y. T. and Old, L. J.** (2005) Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* **5**(8): 615-625.
- Sospedra, M., Pinilla, C. and Martin, R.** (2003) Use of combinatorial peptide libraries for T-cell epitope mapping. *Methods* **29**(3): 236-247.
- Sponaas, A., Carstens, C. and Koch, N.** (1999) C-terminal extension of the MHC class II-associated invariant chain by an antigenic sequence triggers activation of naive T cells. *Gene Ther* **6**(11): 1826-1834.

- Spranger, S.**, Javorovic, M., Burdek, M., Wilde, S., Mosetter, B., Tippmer, S., Bigalke, I., Geiger, C., Schendel, D. J. and Frankenberger, B. (2010) Generation of Th1-polarizing dendritic cells using the TLR7/8 agonist CL075. *J Immunol* **185**(1): 738-747.
- Starr, T. K.**, Jameson, S. C. and Hogquist, K. A. (2003) Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* **21**: 139-176.
- Steinle, A.**, Reinhardt, C., Jantzer, P. and Schendel, D. J. (1995) In vivo expansion of HLA-B35 alloreactive T cells sharing homologous T cell receptors: evidence for maintenance of an oligoclonally dominated allospecificity by persistent stimulation with an autologous MHC/peptide complex. *J Exp Med* **181**(2): 503-513.
- Stritesky, G. L.**, Jameson, S. C. and Hogquist, K. A. (2012) Selection of self-reactive T cells in the thymus. *Annu Rev Immunol* **30**: 95-114.
- Su, Z.**, Vieweg, J., Weizer, A. Z., Dahm, P., Yancey, D., Turaga, V., Higgins, J., Boczkowski, D., Gilboa, E. and Dannull, J. (2002) Enhanced induction of telomerase-specific CD4(+) T cells using dendritic cells transfected with RNA encoding a chimeric gene product. *Cancer Res* **62**(17): 5041-5048.
- Sun, J. C. and Bevan, M. J.** (2003) Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* **300**(5617): 339-342.
- Swain, S. L.**, McKinstry, K. K. and Strutt, T. M. (2012) Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol* **12**(2): 136-148.
- Tanchot, C. and Rocha, B.** (2003) CD8 and B cell memory: same strategy, same signals. *Nat Immunol* **4**(5): 431-432.
- Tarte, K.**, Fiol, G., Rossi, J. F. and Klein, B. (2000) Extensive characterization of dendritic cells generated in serum-free conditions: regulation of soluble antigen uptake, apoptotic tumor cell phagocytosis, chemotaxis and T cell activation during maturation in vitro. *Leukemia* **14**(12): 2182-2192.
- Tewari, M. K.**, Sinnathamby, G., Rajagopal, D. and Eisenlohr, L. C. (2005) A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent. *Nat Immunol* **6**(3): 287-294.
- Thaete, C.**, Brett, D., Monaghan, P., Whitehouse, S., Rennie, G., Rayner, E., Cooper, C. S. and Goodwin, G. (1999) Functional domains of the SYT and SYT-SSX synovial sarcoma translocation proteins and co-localization with the SNF protein BRM in the nucleus. *Hum Mol Genet* **8**(4): 585-591.
- Thomas, W. D. and Hersey, P.** (1998) TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells. *J Immunol* **161**(5): 2195-2200.
- Towbin, H.**, Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9): 4350-4354.

- Triplet, T. A., Curti, B. D., Bonafede, P. R., Miller, W. L., Walker, E. B. and Weinberg, A. D.** (2012) Defining a functionally distinct subset of human memory CD4+ T cells that are CD25POS and FOXP3NEG. *Eur J Immunol* **42**(7): 1893-1905.
- Trombetta, E. S. and Mellman, I.** (2005) Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* **23**: 975-1028.
- Turtle, C. J., Hudecek, M., Jensen, M. C. and Riddell, S. R.** (2012) Engineered T cells for anti-cancer therapy. *Curr Opin Immunol* **24**(5): 633-639.
- Utenthal, B. J., Chua, I., Morris, E. C. and Stauss, H. J.** (2012) Challenges in T cell receptor gene therapy. *J Gene Med* **14**(6): 386-399.
- van Bergen, J., Camps, M., Offringa, R., Melief, C. J., Ossendorp, F. and Koning, F.** (2000) Superior tumor protection induced by a cellular vaccine carrying a tumor-specific T helper epitope by genetic exchange of the class II-associated invariant chain peptide. *Cancer Res* **60**(22): 6427-6433.
- van Bergen, J., Ossendorp, F., Jordens, R., Mommaas, A. M., Drijfhout, J. W. and Koning, F.** (1999) Get into the groove! Targeting antigens to MHC class II. *Immunol Rev* **172**: 87-96.
- van Bergen, J., Schoenberger, S. P., Verreck, F., Amons, R., Offringa, R. and Koning, F.** (1997) Efficient loading of HLA-DR with a T helper epitope by genetic exchange of CLIP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(14): 7499-7502.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A. and Boon, T.** (1991) A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254**(5038): 1643-1647.
- Van Tendeloo, V. F., Ponsaerts, P., Lardon, F., Nijs, G., Lenjou, M., Van Broeckhoven, C., Van Bockstaele, D. R. and Berneman, Z. N.** (2001) Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood* **98**(1): 49-56.
- Walz, G., Zanker, B., Melton, L. B., Suthanthiran, M. and Strom, T. B.** (1990) Possible association of the immunosuppressive and B cell lymphoma-promoting properties of cyclosporine. *Transplantation* **49**(1): 191-194.
- Wang, J. C. and Livingstone, A. M.** (2003) Cutting edge: CD4+ T cell help can be essential for primary CD8+ T cell responses in vivo. *J Immunol* **171**(12): 6339-6343.
- Wehler, T. C., Karg, M., Distler, E., Konur, A., Nonn, M., Meyer, R. G., Huber, C., Hartwig, U. F. and Herr, W.** (2008) Rapid identification and sorting of viable virus-reactive CD4(+) and CD8(+) T cells based on antigen-triggered CD137 expression. *J Immunol Methods* **339**(1): 23-37.
- Wilde, S., Sommermeyer, D., Frankenberger, B., Schiemann, M., Milosevic, S., Spranger, S., Pohla, H., Uckert, W., Busch, D. H. and Schendel, D. J.** (2009) Dendritic cells

- pulsed with RNA encoding allogeneic MHC and antigen induce T cells with superior antitumor activity and higher TCR functional avidity. *Blood* **114**(10): 2131-2139.
- Wilde, S., Sommermeyer, D., Leisegang, M., Frankenberger, B., Mosetter, B., Uckert, W. and Schendel, D. J.** (2012) Human antitumor CD8⁺ T cells producing Th1 polycytokines show superior antigen sensitivity and tumor recognition. *J Immunol* **189**(2): 598-605.
- Williams, M. A. and Fukuda, M.** (1990) Accumulation of membrane glycoproteins in lysosomes requires a tyrosine residue at a particular position in the cytoplasmic tail. *J Cell Biol* **111**(3): 955-966.
- Wolfl, M., Kuball, J., Ho, W. Y., Nguyen, H., Manley, T. J., Bleakley, M. and Greenberg, P. D.** (2007) 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* **110**(1): 201-210.
- Wong, S. B., Bos, R. and Sherman, L. A.** (2008) Tumor-specific CD4⁺ T cells render the tumor environment permissive for infiltration by low-avidity CD8⁺ T cells. *J Immunol* **180**(5): 3122-3131.
- Wright, G. P., Ehrenstein, M. R. and Stauss, H. J.** (2011) Regulatory T-cell adoptive immunotherapy: potential for treatment of autoimmunity. *Expert Rev Clin Immunol* **7**(2): 213-225.
- Wrzesinski, C., Paulos, C. M., Kaiser, A., Muranski, P., Palmer, D. C., Gattinoni, L., Yu, Z., Rosenberg, S. A. and Restifo, N. P.** (2010) Increased intensity lymphodepletion enhances tumor treatment efficacy of adoptively transferred tumor-specific T cells. *J Immunother* **33**(1): 1-7.
- Wu, T. C., Guarnieri, F. G., Staveley-O'Carroll, K. F., Viscidi, R. P., Levitsky, H. I., Hedrick, L., Cho, K. R., August, J. T. and Pardoll, D. M.** (1995) Engineering an intracellular pathway for major histocompatibility complex class II presentation of antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(25): 11671-11675.
- Yee, C., Thompson, J. A., Byrd, D., Riddell, S. R., Roche, P., Celis, E. and Greenberg, P. D.** (2002) Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8⁺ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(25): 16168-16173.
- Zajac, A. J., Murali-Krishna, K., Blattman, J. N. and Ahmed, R.** (1998) Therapeutic vaccination against chronic viral infection: the importance of cooperation between CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Curr Opin Immunol* **10**(4): 444-449.
- Zarour, H. M., Maillere, B., Brusica, V., Coval, K., Williams, E., Pouvelle-Moratille, S., Castelli, F., Land, S., Bennouna, J., Logan, T. and Kirkwood, J. M.** (2002) NY-ESO-1 119-143 is a promiscuous major histocompatibility complex class II T-helper epitope recognized by Th1- and Th2-type tumor-reactive CD4⁺ T cells. *Cancer Res* **62**(1): 213-218.

- Zeng, G., Wang, X., Robbins, P. F., Rosenberg, S. A. and Wang, R. F.** (2001) CD4(+) T cell recognition of MHC class II-restricted epitopes from NY-ESO-1 presented by a prevalent HLA DP4 allele: association with NY-ESO-1 antibody production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(7): 3964-3969.
- Zhou, D., Srivastava, R., Grummel, V., Cepok, S., Hartung, H. P. and Hemmer, B.** (2006) High throughput analysis of TCR-beta rearrangement and gene expression in single T cells. *Lab Invest* **86**(3): 314-321.
- Zinkernagel, R. M. and Doherty, P. C.** (1974) Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* **248**(450): 701-702.
- Zobywalski, A., Javorovic, M., Frankenberger, B., Pohla, H., Kremmer, E., Bigalke, I. and Schendel, D. J.** (2007) Generation of clinical grade dendritic cells with capacity to produce biologically active IL-12p70. *J Transl Med* **5**: 18.

7 Abkürzungsverzeichnis

Tab. 7.1: Abkürzungen

3d-mDZ	Mature DZ, generiert nach dem 3-Tages-Protokoll
7d-mDZ	Mature DZ, generiert nach dem 7-Tages-Protokoll
Ag	Antigen
AICD	Aktivierungsinduzierter Zelltod (engl. activation induced cell death)
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
C/T-Antigen	Tumor/Testis-Antigen (engl. cancer/testis antigen)
C-Region	Konstante Region (engl. constant region)
CCR	Chemokin-(CC-Motiv)-Rezeptor
CD	Differenzierungscluster (engl. cluster of differentiation)
cDNS	Komplementäre DNS (engl. complementary DNA)
CDR	Engl. Complementarity Determining Region
Cy7	Cyanin-7
D-Segment	Diversifizierendes Segment
DC-LAMP	Dendritische Zellen - Lysosomal-assoziiertes Membran-Protein (LAMP3)
DC-SIGN	Engl. DC-specific ICAM-Grabbing Nonintegrin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEPI	Direkte Epitop-Identifizierung
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5-Trisphosphat
DZ	Dendritische Zelle
EBV	Epstein-Barr-Virus
EGFR	Engl. Epidermal growth factor receptor
ELISA	Engl. Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay
F	Farad
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer (engl. fluorescence activated cell sorter)
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreuung (engl. forward scatter)
GAGE-1	G Protein 1 (C/T-Antigen 4.1)
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HS	Humanserum
iDZ	Unreife Dendritische Zelle (engl. immature dendritic cell)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMI	Institut für Molekulare Immunologie
IU	Internationale Einheit (engl. international unit)
<i>Ivt</i> -mRNS	<i>In vitro</i> transkribierte mRNS
J-Segment	Verbindendes Segment (engl. joining segment)
LAMP1	Lysosomal-assoziiertes Membran-Protein 1
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LCL	Lymphoblastoide B-Zell-Linie (engl. lymphlastoide cell line)
LPS	LPS Lipopolysaccharid
MAGE-A4	Melanom-Antigen Familie A, 4 (C/T-Antigen 1.4)

Mart-1	Engl. Melanoma antigen recognized by T-cells 1
mDZ	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)
mLCL	Mini-EBV transformierte LCL
NY-ESO1	CTAG1B (C/T-Antigen 6.1)
OD _x	Optische Dichte der Wellenlänge x nm
ORF	Offener Leserahmen (engl. open reading frame)
p53	Proteinprodukt des TP53-Tumorsuppressor-Gens
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBL	Periphere Blut-Lymphozyten
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen (engl. peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PI	Propidiumiodid
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI 1640	Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640
SSC	Seitwärtsstreuung (engl. sideward scatter)
SSX4	Synovial Sarcoma, X Bruchpunkt 4 (C/T-Antigen 5.4)
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
TAP	Transportprotein (engl. transporter associated with antigen processing)
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor β (von engl. transforming growth factor β)
Th	T-Helfer-Zelle
TIL	Tumor-infiltrierender T-Lymphozyt
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (engl. Toll-like receptor)
TNF	Tumornekrosefaktor
TSA	Tumor-spezifisches Antigen
TZR	T-Zell-Rezeptor
V-Segment	Variables Segment
VLE	sehr wenig Endotoxin (engl. very low endotoxin)
XAGE-1	X Antigen-Familie, Element 1 (C/T-Antigen 12.1)
ZTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt

Tab. 8.3: HLA-Typisierung einzelner Blutspender

Spender	HLA-Loci									
	A	B	C	DRB1	DRB3	DRB4	DRB5	DQA1	DQB1	DPB1
ME	*02:xx *29:xx	*15:xx *44:xx	*03:xx *16:xx	*13:02 *15:01	*03:01	negativ	*01:01	*01:02	*06:02 *06:04	*03:01 *14:01
EMT	*02:xx *03:xx	*07:xx *14:xx	*07:xx *08:xx	*01:02 *11:xx	*02:xx	negativ	negativ	*01:xx *05:xx	*03:01 *05:01	*02:xx *04:02
MRE	*02:xx *24:xx	*18:xx *44:xx	*05:xx *07:xx	*11:xx *13:xx	*01:01 *02:02	negativ	negativ	*01:03 *05:xx	*03:01 *06:03	*04:xx
VT	*03:xx *11:xx	*07:xx *14:xx	*07:xx *08:xx	*01:xx *15:xx	negativ	negativ	*01:xx	*01:xx *01:02	*05:01 *06:02	*02:xx *04:xx
UB	*01:01 *02:01	*07:02 *35:03	*04:01 *07:02	*07:01 *11:01	*02:02	*01:03	negativ	*02:01 *05:05	*03:01 *03:03	*02:01 *03:01
#7	*02:05 *03:01	*07:02 *50:01	*06:02 *07:02	*07:01 *15:01	negativ	*01:03	*01:01	n.d.	*02:02 *06:02	*04:01 *04:02
TK	*02:01 *33:01	*07:02 *14:02	*07:02 *08:02	*03:01 *13:02	*01:01 *02:02	negativ	negativ	*01:03 *05:01	*02:01 *06:03	*02:01 *04:01
Ata	*01:01 *02:06	*49:01 *51:01	*03:04 *07:01	*11:01 *13:02	*02:02 *03:01	negativ	negativ	n.d.	*03:01 *06:04	*04:01
LeS	*02:01 *03:01	*18:01 *37:01	*02:02 *07:01	*15:01	negativ	negativ	*01:01	*01:02	*05:02 *06:03	*04:01 *14:01

xx: HLA-Typisierung wurde nur in mittlerer Auflösung durchgeführt, Sub-Allel ist nicht bekannt.
n.d.: Typisierung nicht durchgeführt

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieses Projekts beigetragen haben:

Herzlich danke ich Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß für die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät für Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Ich danke für die hilfreichen Anregungen und die Korrektur dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Slavoljub Milošević. Ich danke für die thematische Vorbereitung und umfassende wissenschaftliche Vorarbeit dieser Dissertation sowie die engagierte und intensive Betreuung. Für die immerwährende Verfügbarkeit und die fachliche Kompetenz. Ich freue mich auf die weitere Zusammenarbeit.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Dolores J. Schendel für die Möglichkeit diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Ich danke für ihren Optimismus, für die Freiheiten bei der wissenschaftlichen Auslegung der thematischen Vorgaben als auch im Besonderen für die unbedingte Unterstützung während meiner Auslandsaufenthalte. Vielen Dank für die wiederholte inhaltliche Korrektur dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe – für ihre Hilfsbereitschaft, für inhaltliche Diskussionen und Anregungen. Ich bedanke mich herzlich bei meiner Kollegin Carina Wehner für die essentielle und professionelle Zusammenarbeit sowie alle großen und kleinen Hilfestellungen, wissenschaftlichen Diskussionen und Problemlösungen. Bei Dr. Bernhard Frankenberger herzlichst für die Korrektur dieser Arbeit und die Hilfe auf dem Gebiet der TZR-Analyse. Bei Dr. Susanne Wilde für ihre konstruktive Kritik und ihre Bereitschaft all meinen Fragen hilfsbereit nachzugehen. Bei Judith Eckl und Isabel Römer für ihre Hilfe im Rahmen der Durchflusszytometrie. Bei Sabine Eichenlaub und Adam Slusarski für diverse Hilfestellungen.

Herzlich bedanke ich mich bei Dr. Josef Mysliwietz, Dr. Joachim Ellwart, Dagmar und Sebastian Tiedt für ihre Hilfe bei der Sortierung am Zellsortierer.

Bedanken möchte ich mich auch herzlich bei Prof. Dr. Josef Mautner, Dr. Elisabeth Kremmer und Dr. Marco Frentsch für die hilfsbereite Bereitstellung wertvoller Zelllinien und Reagenzien.

An dieser Stelle sei ebenfalls allen nicht namentlich genannten Mitarbeiter des Instituts für Molekulare Immunologie gedankt, die dazu beitragen, das Institut zu etwas Besonderem zu machen.

Erklärung

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

München den, 17.03.2013

(Christian Ellinger)