Identifikation, Klonierung und retroviraler Transfer allorestringierter FMNL1-peptidspezifischer T-Zellrezeptoren für die Entwicklung adoptiver Immuntherapien gegen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome

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

angefertigt am Helmholtz Zentrum München –
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt
Institut für Molekulare Immunologie
unter der Leitung von Prof. Dr. Dolores Schendel
und der Betreuung von Dr. Angela Krackhardt

vorgelegt von
Ingrid Schuster
München, den 30.04.2008

Erstgutachterin:	Prof. Dr. Elisabeth Weiß
Zweitgutachterin:	PD Dr. Christine Falk
Tag der mündlichen Prüfung:	17.10.2008

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung 1

2 Einleitung 4

2.1 Tumor und Immunsystem 4
2.1.1 Geschichte 4
2.1.2 Zytotoxische T-Zellen zur Tumorbekämpfung 5
2.1.3 Identifizierung von Tumorantigenen 9
2.1.4 FMNL1 als tumorassoziiertes Antigen 11

2.2 Adoptive T-Zelltherapie 13
2.2.1 Virusspezifische T-Zellen 13
2.2.2 T-Zellen gegen tumorassoziierte Antigene im autologen System 13
2.2.3 T-Zellen im allogenen System 14
2.2.4 T-Zellrezeptor-Transfer 15

2.3 B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (B-NHL) 16
2.3.1 Chronische lymphatische Leukämie (CLL) 17
2.3.2 Bisherige Therapien 17
2.3.3 Zukünftige Therapiemöglichkeit 18

2.4 Zielsetzung der Arbeit 19

3 Material 21

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial 21

3.2 Chemikalien, Enzyme und Zytokine 22

3.3 Kits 24

3.4 Puffer und Lösungen 24

3.5 Zellkulturmedien 25

3.6 Zellen 27
3.6.1 Primäre Zellen 27
3.6.2 Zelllinien und Bakterien 27

3.7 Peptide 30

3.8 Multimere und Antikörper 31

3.9 DNS-Material 32
3.9.1 Vektoren für retroviralen T-Zellrezeptor-Transfer 32
3.9.2 Primer 33
3.9.2.1 Primer für das T-Zellrezeptor-Repertoire 33
3.9.2.2 Primer für T-Zellrezeptor-Klonierung 35

3.10 Computerprogramme und Internetseiten 36

4 Methoden 37

4.1 Zellkulturmethoden 37
4.1.1 Allgemeine Zellkulturmethoden 37
4.1.1.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen 37
4.1.1.2 Kultivierung von Zelllinien 37
4.1.1.3 Bestimmung der Zellzahl 37
4.1.2 Peptidbeladung von T2-Zellen 38
4.1.3 Gewinnung von PBL aus Vollblut 38
4.1.4 Isolation von B-Zellen 38
4.1.5 Kultivierung von B-Zellen und CLL-Zellen 39
4.1.6 Unspezifische Stimulation von PBL 39
4.1.7 Kultivierung von zytotoxischen T-Zellen 39
4.1.7.1 Kultivierung des T-Zellklons IVSB 39
4.1.7.2 Isolation von T-Zellen mittels magnetischer Körperchen 39
4.1.7.3 Stimulation von T-Zellen 40
4.1.7.4 Klonierung sortierter T-Zellen 40

4.2 Durchflusszytometrie 41
4.2.1 Färbung von Oberflächenmolekülen 41
4.2.2 Sortierung von Zellen am Durchflusszytometer 41

4.3 Funktionelle Analysen 42
4.3.1 Koinkubation (Stimulationsansatz) 42
4.3.2 IFNγ-ELISA 42
4.3.3 Multiplex-Verfahren 43
4.3.4 Thymidin-Proliferationsversuch 44
4.3.5 Chrom-Freisetzungsversuch 44

4.4 Molekularbiologische Methoden 45
4.4.1 Analyse des T-Zellrezeptor (TZR)-Vαβ-Repertoires 45
4.4.1.1 RNS-Isolation 45
4.4.1.2 cDNS-Synthese 46
4.4.1.3 T-Zellrezeptor-Analyse: Vαβ Repertoire 46
4.4.1.4 Gelelektrophorese und Gel-Extraktion von PCR-Produkten 48
4.4.1.5 Sequenzierung 48
4.4.2 Klonierung des T-Zellrezeptors in den retroviralen Vektor pMP71G$_{PRE}$ 49
4.4.2.1 Enzym-Schnittstellen-Synthese an die T-Zellrezeptor-Sequenzen 50
4.4.2.2 Restriktionsspaltung der PCR-Produkte 51
4.4.2.3 Aufreinigung von gespaltenen DNS-Fragmenten 51
4.4.2.4 Ligation von DNS-Fragmenten 51
4.4.2.5 Transformation von Bakterien 52
4.4.2.6 Selektion der transformierten Bakterien 52
4.4.2.7 Plasmid-DNS-Extraktion aus transformierten Bakterien und Probespaltung 52
4.4.2.8 Besondere Klonierung: P2A-Klonierung und Austausch der menschlichen konstanten Region mit der konstanten Region eines Maus-T-Zellrezeptors 54

4.5 Retroviraler Transfer 59
4.5.1 Calcium-Phosphat-Transfektion 59
4.5.2 Transduktion von Jurkat76-Zellen und IVSB-CTL 60
4.5.3 Transduktion von PBL 60

5 Ergebnisse 62

5.1 Auswahl von Peptiden des Proteins FMNL1 62
5.1.1 Auswahl von Peptidepitopen 62
5.1.2 Überprüfung der Bindung der Peptidkandidaten an HLA-A2 64

5.2 Etablierung des Stimulationsansatzes zur Selektion allorestringierter peptidspezifischer zytotoxischer T-Zellen 66
5.2.1 Parameter zur Stimulation von T-Zellen 66
5.2.2 Einfluss der Kostimulation auf die Proliferation von T-Zellen 67
5.2.3 Vorgehensweise bei erfolgreicher Stimulation 69

5.3 Selektion allorestringierter FMNL1-PP2 spezifischer T-Zellen 70
5.3.1 Sortierung und Klonierung von mit FMNL1-PP2 stimulierten T-Zellen 70
5.3.2 Analyse der T-Zellklone 73
5.3.2.1 Erster Funktionstest der mono- bzw. oligoklonalen T-Zellen 73
5.3.2.2 Peptidspezifität im Kontext von HLA-A2 74
5.3.2.3 Avidität 77
5.3.2.4 Reaktivität gegen natürliche Zielzellen 78
5.3.2.5 Kreuzreaktivität 81
5.3.2.6 Zytokinsekretion 82
5.3.2.7 Phänotypische Charakterisierung der T-Zellpopulation 83

5.4 Identifizierung des T-Zellrezeptors 84

5.5 Retroviraler Transfer des T-Zellrezeptors 88
5.5.1 Klonierung der T-Zellrezeptor-Vektoren 88
5.5.2 CD8-Abhängigkeit der T-Zellrezeptor-Expression 88
5.5.3 Durchsetzungsfähigkeit des T-Zellrezeptors 90
5.5.4 Transduktion in IVSB 93
5.5.5 Transduktion in PBL 93

6 Diskussion 97

6.1 Prädiktionsalgorithmen zur Peptidauswahl 98

6.2 Selektion allorestringierter peptidspezifischer zytotoxischer T-Zellen 100

6.3 Charakterisierung FMNL1-PP2 spezifischer allorestringierter T-Zellen 102
6.3.1 Phänotypische Charakterisierung und Lebensdauer 102
6.3.2 T-Zellrezeptor der selektierten T-Zellen 103
6.3.3 Peptidspezifität und Avidität von SK22 103
6.3.4 Reaktivität gegen natürliche Zielzellen 105
6.3.5 Kreuzreaktivität alloreaktiver T-Zellen 106

6.4 T-Zellrezeptor-Transfer 108
6.4.1 Drei T-Zellrezeptor-Vektoren im Vergleich 109
6.4.2 CD8-Abhängigkeit 111
6.4.3 Durchsetzungsfähigkeit des TZR-SK22 111

6.5 TZR-SK22 in der Therapie und Ausblick 113

7 Literaturverzeichnis 116

8 Abkürzungen 130

9 Danksagung.....132

10 Lebenslauf 134

1 Zusammenfassung

Die adoptive T-Zelltherapie ist eine attraktive Alternative zu konventionellen Therapien zur Behandlung von malignen Erkrankungen. So konnten bereits Tumorremissionen bei Melanompatienten nach adoptivem T-Zelltransfer erreicht werden (Dudley et al, 2002b; Morgan et al, 2006). Während im autologen System jedoch oft nur unzureichende Antitumorantworten zu generieren sind, zeigt der Erfolg der allogenen Stammzelltransplantation, dass im allogenen System T-Zellen hoch effektiv Tumorzellen bekämpfen können. Die allogene Stammzelltransplantation konnte auch bei B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen, wie beispielsweise der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL), mit Hilfe eines Transplantat-gegen-Leukämie-Effektes (Graft-versus-Leukemia, GvL) lang andauerndes, krankheitsfreies Überleben bewirken. Sie birgt aber ein sehr hohes Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko auf Grund der Transplantat-gegen-Wirts-Erkrankung (Graft-versus-Host-Disease, GvHD) in sich. Die im Transplantat enthaltenen T-Zellen sind hierbei sowohl für den erwünschten GvL-Effekt verantwortlich, gleichzeitig aber auch für die unerwünschte GvHD (Horowitz et al, 1990; Kolb et al, 2004). Zur Minimierung des Risikos einer GvHD könnten T-Zellen eingesetzt werden, die spezifisch und allorestringiert Peptide von tumorspezifischen Antigenen erkennen und somit bevorzugt Tumorzellen angreifen. Die Reaktivität der T-Zellen kann durch einen T-Zellrezeptor (TZR)-Transfer auf sekundäre Zellen übertragen werden. Diese transgenen Zellen können dann mittels adoptivem T-Zelltransfer im Patienten zur selektiven Bekämpfung von Tumorzellen zum Einsatz kommen. In Vorarbeiten wurde FMNL1 (formin related protein in leukocytes 1) als hoch attraktives tumorassoziiertes Antigen identifiziert, das in der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) und in anderen Lymphomen, sowie in Zelllinien solider Tumoren stark überexprimiert wird, während es in gesunden Zellen fast ausschließlich in hämatopoetischen Zellen vorkommt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, allorestringierte FMNL1-peptidspezifische T-Zellen zu isolieren, zu charakterisieren und den T-Zellrezeptor dieser T-Zellen in sekundäre Zellen zu transduzieren. Hierzu wurden Peptide des tumorassoziierten Antigens FMNL1 mit Hilfe von Prädiktionsalgorithmen vorhergesagt und in T-Zell-Stimulationsansätzen eingesetzt. Unter Einsatz von HLA-A2-positiven T2-Zellen als antigenpräsentierende Zellen, die mit dem prädizierten synthetischen Peptid FMNL1-PP2 beladen waren, ist es gelungen allorestringierte, FMNL1-PP2-spezifische T-Zellen eines gesunden HLA-A2-negativen Spenders zu isolieren. Von 67 T-Zellklonen bzw. oligoklonalen T-Zellen konnte bei neun T-Zellklonen Allorestriktion und FMNL1-PP2-Peptidspezifität nachgewiesen werden. Der T-Zellklon SK22 war für diese neun T-Zellklone, die auf Sequenzebene einen identischen T-Zellrezeptor aufwiesen, repräsentativ.

Der T-Zellklon SK22 zeigte in Reaktion auf peptidbeladene T2-Zellen eine hohe Peptidspezifität für FMNL1-PP2 im Kontext mit dem für SK22 allogenen HLA-A2. Nach Zielzellerkennung sezernierte der T-Zellklon Zytokine wie IFNγ, TNFα, GM-CSF und teilweise IL2. Der T-Zellklon zeigte eine hohe Aktivität und mittlere Avidität gegen FMNL1-PP2-beladene T2-Zellen. Des Weiteren wurde die Reaktivität gegen unbeladene native Zellen getestet. Der T-Zellklon SK22 erkannte verschiedene Zellen, wenn sie HLA-A2-positiv waren und gleichzeitig FMNL1 exprimierten. Hierzu zählten zum einen maligne Zellen, darunter verschiedene Epstein-Barr-Virus (EBV)-positive und EBV-negative Lymphomzelllinien und die Nierenzellkarzinomzelllinie RCC26, die gut erkannt wurden sowie CD40-aktivierte CLL-Zellen, die schwächer erkannt wurden. Bei der Untersuchung von gesundem Gewebe wurden FMNL1-exprimierende HLA-A2-positive periphere Blutleukozyten (PBL) schwach und B-Zellen in mittlerer Stärke erkannt. HLA-A2-positive Zellen, die FMNL1 nicht exprimieren, wie beispielsweise Lungenfibroblasten, wurden vom T-Zellklon SK22 nicht erkannt. Der T-Zellklon zeigte Kreuzreaktivität gegen neun verschiedene lymphoblastoide Zelllinien (LCL), die Allelvarianten von HLA-A2 exprimierten. Zusätzlich wurden 4 von 18 HLA-A2-negativen LCL-Zelllinien erkannt. Jeweils zwei dieser vom T-Zellklon SK22 erkannten HLA-A2-negativen LCL-Zelllinien trugen ein gemeinsames MHC-Klasse-I-Molekül. Eines davon war HLA-A*3303, welches durch die Erkennung der HLA-A*3303-positiven Transfektante der C1R-Zelllinie bestätigt werden konnte. Das andere war HLA-A*6802, welches zur HLA-A2-Superfamilie gehört.

Der T-Zellrezeptor des T-Zellklons SK22 wurde identifiziert, sequenziert und kloniert, sowie mit Hilfe von Retroviren in sekundäre Zellen eingebracht. Durch den Transfer des T-Zellrezeptors von SK22 in sekundäre Zellen konnte nachgewiesen werden, dass dieser T-Zellrezeptor für die spezifische Reaktivität des T-Zellklons SK22 verantwortlich war. Dies zeigte sich in der T-Zellrezeptor-Oberflächenexpression nach Transduktion in Jurkat76-CD8α-Zellen und in der Übertragung der Funktionalität des T-Zellklons in PBL. Der T-Zellrezeptor von SK22 ist ein „schwacher“ Rezeptor, da er in der Konkurrenzsituation mit einem weiteren Rezeptor nur in geringem Grade an der Zelloberfläche von PBL exprimiert wurde. Durch einen Austausch der jeweiligen konstanten Regionen der T-Zellrezeptor-SK22-Sequenzen durch die konstanten Bereiche eines murinen T-Zellrezeptors konnten in der Summe verbesserte Expressionswerte in Jurkat76-Zellen und eine verbesserte Funktionalität in PBL erreicht werden.

Der T-Zellklon SK22 zeigte Allorestriktion, FMNL1-PP2-Peptidspezifität und Zytotoxizität gegen FMNL1-exprimierende Zellen, insbesondere gegen Tumorzellen. Die beobachtete Kreuzreaktivität ist Fokus weiterführender Untersuchungen. Im Fall des T-Zellrezeptors von SK22 bedeutet es, dass Spender und Patienten sorgfältig nach Analyse des gesamten MHC-

Klasse-I-Expressionsmuster ausgewählt werden müssen. Im Rahmen einer haploidentischen Stammzelltransplantation ist jedoch der klinische Einsatz dieses spezifischen T-Zellrezeptors zur Behandlung von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen und anderen FMNL1-überexprimierenden Tumorerkrankungen vielversprechend.

2 Einleitung

2.1 Tumor und Immunsystem

2.1.1 Geschichte

Eine der in der Immunologie meist diskutierten Fragen des letzten Jahrhunderts war, ob das Immunsystem maligne Tumore erkennen und beseitigen kann. Eine der ersten Beobachtungen, dass das Immunsystem auf Tumorgewebe reagieren kann, machte William Coley in den 1890er Jahren, als er zufällig bei fieberhaften Erkrankungen Tumorremissionen beobachtete. Daraufhin behandelte er Tumorpatienten mit einer Bakterienpräparation, die als „Coley's toxin" bekannt wurde, und bewirkte damit eine 10 %ige Heilungsrate (Übersichtsartikel, Wiemann und Starnes, 1994). Frank Macfarlane Burnet stellte 1949 die Hypothese auf, dass Lymphozyten, die in der Lage wären, körpereigenes Gewebe zu erkennen, während der Entwicklung des Immunsystems deletiert werden (erworbene immunologische Toleranz) (Burnet *et al*, 1949), was wenig später experimentell bestätigt wurde (Billingham et al, 1953). In den 1960er Jahren stellte er zusammen mit Lewis Thomas die Theorie auf, dass Lymphozyten kontinuierlich im Gewebe patroullieren und transformierte Zellen eliminieren (Immunüberwachung) (Burnet, 1970). Diese Idee hatte Paul Ehrlich bereits 1909 in vereinfachten Zügen vorgeschlagen (Ehrlich, 1909). Diese Theorie wurde lange kontrovers diskutiert, insbesondere als der Prozess der Selektion von T-Zellen im Thymus erforscht wurde, und postuliert wurde, dass autoreaktive Zellen sehr effizient während der Entwicklung deletiert werden (Zinkernagel und Doherty, 1979). Erst als tumorassoziierte Antigene in der Maus und im Menschen charakterisiert wurden (Urban und Schreiber, 1992; van der Bruggen et al, 1991), wurde die Idee der Tumorüberwachung durch das Immunsystem wieder favorisiert. Die Beobachtungen von spontanen Tumorrückgängen in immunkompetenten Wirten und von einer größeren Tumorhäufigkeit in immunbeeinträchtigten Mäusen schien diese These weiter zu unterstützen (Dunn et al, 2004; Shankaran et al, 2001; Street et al, 2001). Es ist heute anerkannt, dass das erworbene sowie das angeborene Immunsystem das Potential haben, Tumorzellen zu bekämpfen. Welche Rolle das erworbene Immunsystem bei der Immunüberwachung bei der Tumorentstehung in vivo spielt, ist weiterhin umstritten (Galon et al, 2006; Willimsky und Blankenstein, 2005). Allerdings können in vitro tumorspezifische T-Zellen, als Bestandteile des erworbenen Immunsystems, durch professionelle antigenpräsentierende Zellen induziert werden und sehr effizient Tumorzellen beseitigen (Brossart et al, 2001; Celluzzi et al, 1996; Flamand et al, 1994; Mayordomo et al, 1995).

2.1.2 Zytotoxische T-Zellen zur Tumorbekämpfung

Verschiedene Bestandteile des Immunsystems können bei der Beseitigung von Tumoren mitwirken. Dazu zählen Zellen des angeborenen Immunsystems, wie natürliche Killerzellen (NK), Makrophagen und Neutrophile, aber auch Zellen des erworbenen Immunsystems, wie B-Zellen und T-Zellen. Die T-Zellen sind Schlüsselzellen bei der Bekämpfung von Tumoren.

T-Zellen entstehen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark und durchlaufen einen wichtigen Entwicklungsschritt im Thymus (daher „T“). Die Spezifität und Reaktivität von T-Zellen liegt in ihrem T-Zellrezeptor (TZR), den sie auf der Oberfäche tragen. Mit diesem können sie Peptide erkennen, die an Hauptgewebeverträglichkeitskomplexe (Major histocompatibility complexes, MHC) gebunden sind und von Zellen präsentiert werden. Hierbei werden T-Zellen hinsichtlich der Expression von Korezeptoren in zwei Hauptgruppen eingeteilt: CD4- und CD8-positive Zellen (CD: cluster of differentiation). Diese unterscheiden sich in ihrer Erkennung von verschiedenen MHC-Klassen und in ihrer Effektorfunktion. CD8-positive Zellen sind zumeist zytotoxische T-Zellen, die an MHC-Klasse-I-Moleküle binden. Diese werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentieren zytoplasmatisch prozessierte Peptide. Nach spezifischer Bindung und Aktivierung können CD8-positive Zellen körpereigene Zellen lysieren, beispielsweise, wenn ein virales Antigen oder ein Tumorantigen präsentiert wird. Bei den CD4-positiven Zellen handelt es sich zumeist um Helferzellen (Th), die MHC-Klasse-II-Moleküle erkennen. Diese MHC-Klasse-II-Moleküle werden von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und präsentieren in der Regel über Vesikel aufgenommene extrazelluläre Peptide. Während Th1-Zellen CD8-Zellen unterstützen, stimulieren Th2-Zellen antikörperproduzierende B-Zellen. Die Korezeptoren binden an invariable Stellen der MHC-Moleküle und sind an der Signalweiterleitung beteiligt.

Der T-Zellrezeptor gehört zu der Immunglobulin-Superfamilie und besteht aus einem αβ- (oder seltener γδ)-Heterodimer. Im Gegensatz zu den Antikörpern, die von B-Zellen produziert werden und auch freie Antigene erkennen, bindet der T-Zellrezeptor nur an MHC-gebundene Peptide. Jede TZR-Kette besteht aus einer variablen (V) und einer konstanten (C) immungloblulinähnlichen Domäne, einem kurzen Gelenk, einer Transmembrandomäne sowie einem kurzen zytoplasmatischen Ende. Die T-Zellrezeptor-Ketten sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Der T-Zellrezeptor liegt im Komplex mit CD3-Ketten, bestehend aus einem εγ- und einem εδ-Heterodimer, und zusätzlich dazu mit einem ζζ-Homodimer vor, die für die T-Zellrezeptor-Expression und Weiterleitung des TZR-Signals ins Zellinnere notwendig sind. Diese Ketten besitzen ITAM-Motive (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs), über die nach Phosphorylierung der Tyrosine im ITAM-Motiv die Signalweiterleitung erfolgt (Malissen und Schmitt-Verhulst, 1993) (siehe Abbildung 2.1).

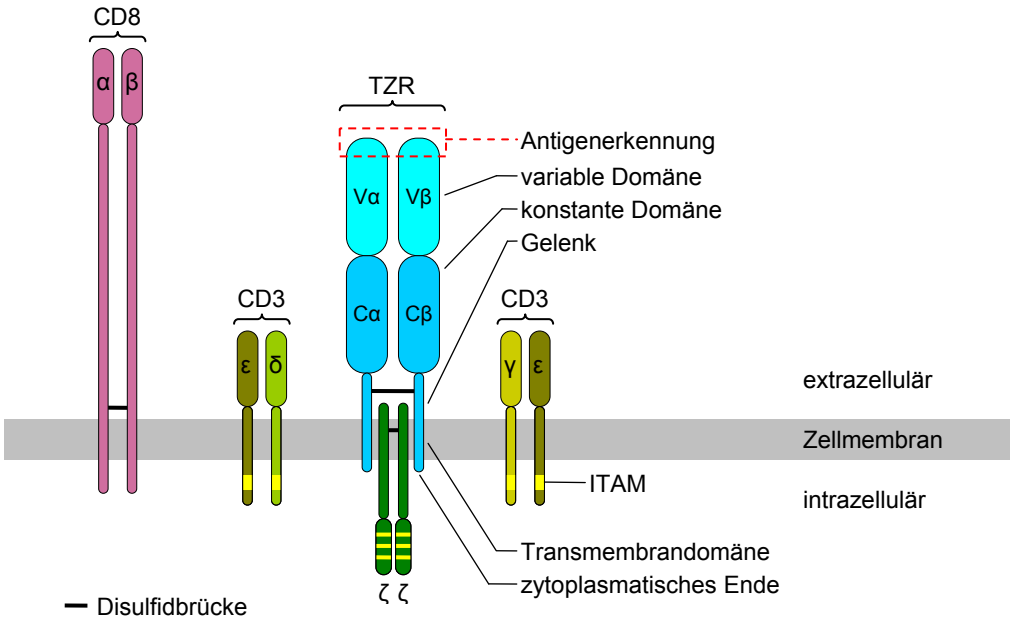


Abbildung 2.1 T-Zellrezeptorkomplex mit CD8-Korezeptor. Dargestellt ist ein T-Zellrezeptor-αβ-Heterodimer, das im Bereich der Antigenerkennung hoch variabel ist. Er besteht aus einer variablen Domäne (V), konstanten Domäne (C), einem Gelenk, einer Transmembrandomäne und einem zytoplasmatischen Ende. Die Signalleitung ins Zytoplasma erfolgt durch invariable akzessorische Ketten, dem CD3-Komlex. Dieser besteht aus einem εγ- und einem εδ-Heterodimer. Zusätzlich dazu ist ein ζζ-Homodimer assoziiert. Diese Ketten besitzen alle ITAM-Motive (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs). Der CD8-Korezeptor besteht aus einem αβ-Heterodimer, dessen Ketten über eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verbunden sind. Er kann auch als αα-Homodimer vorliegen (modifiziert nach Murphey (Janeway's), 2008).

Ein T-Zellrezeptor besitzt eine hohe Antigenspezifität, die durch Genumlagerungen (somatische Rekombination) von verschiedenen Gensegmenten („variable" (V), „diversity" (D), „joining" (J) und „constant" (C) Region) entsteht. Der α-Genlokus besteht aus 70 bis 80 V-, 61 J- und einer C-Region, der β-Genlokus aus 52 V-, zwei D-, 13 J- und zwei C-Regionen. In der Entwicklung der T-Zellen werden die genomischen Kettensegmente, die getrennt voneinander vorliegen, umgelagert und miteinander rekombiniert, so dass jede T-Zellrezeptorkette aus einer Kombination von jeweils einem Kettensegment jeder Region (α-Kette: VJC, β-Kette: VDJC) besteht. Durch die zufällige Rekombination verschiedener V(D)JC-Gensegmente und die Kombination von jeweils zwei T-Zellrezeptorketten können Millionen verschiedener T-Zellrezeptoren gebildet werden. Die Vielfalt von T-Zellrezeptoren wird durch den zufälligen Einbau von Nukleotiden an den Rekombinationsstellen noch vergrößert. Die V(D)J-Gensegmente kodieren für die variablen Domänen im Protein, das C-Genssegment kodiert für die konstante Proteindomäne, das Gelenk, die Transmembrandomäne und das zytoplasmatische Ende (siehe Abbildung 2.2), (Davis und Bjorkman, 1988, Murphey (Janeway's), 2008).

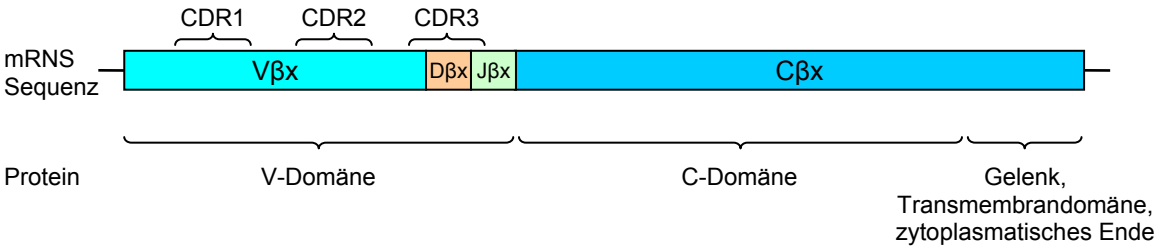


Abbildung 2.2 Gensequenzen und Proteindomänen am Beispiel der T-Zellrezeptor-β-Kette. Nach somatischer Rekombination der Gensegmente auf genomischer Ebene und Prozessierung der RNS entsteht eine mRNS-Sequenz, bei der jeweils eine V („variable"), D („diversity"), J („joining") und C („constant")-Region aneinandergelagert sind. Die CDR (complementarity-determining region)1 und CDR2-Regionen befinden sich in der V-Region. Die CDR3-Region wird durch den Übergang zwischen der V-, D- und J-Region gebildet und ist hoch variabel. Auf Proteinebene wird die V-Domäne von den V-, D- und J-Sequenzen kodiert. Die C-Sequenzen kodieren für die C-Domäne, das Gelenk, die Transmembrandomäne und das zytoplasmatische Ende. Bei T-Zellrezeptor-α-Ketten fehlt die D-Region (modifiziert nach Murphey (Janeway's), 2008).

CD8-positive zytotoxische T-Zellen binden an peptidpräsentierende MHC-Klasse-I-Moleküle. MHC-Klasse-I-Moleküle bestehen aus drei α-Untereinheiten und sind mit β_2-Mikroglobulin assoziiert. Die Peptidbindungsgrube wird von den α_1- und α_2-Domänen gebildet und besteht aus einem β-Faltblatt (Grubenboden) und zwei α-Helices, in die das Peptid gebunden ist. MHC-Klasse-I-Moleküle binden 8 bis 10 Aminosäuren lange Peptide (Rudolph et al, 2006). Der Kontakt zwischen dem T-Zellrezeptor und seinem Liganden (Peptid-MHC-Molekül) wird über Schlaufen der variablen Domäne des T-Zellrezeptors vermittelt, den CDR (complementarity-determining regions)-Regionen, die eine hohe Vielfalt aufweisen. Die hypervariablen CDR3-Regionen liegen im Übergangsbereich zwischen den Gensegmenten Vα und Jα bzw. Vβ, Dβ und Jβ. Sie binden an die hoch variablen Bereiche des Peptid-MHC-Moleküls. Die Sequenzen von CDR1 und CDR2 sind durch die jeweiligen V-Regionen kodiert und weniger variabel. Sie binden in der Regel an die weniger variablen Bereiche der α_1- und α_2-Helices von MHC-Klasse-I-Molekülen. Erst vor kurzem wurde jedoch gezeigt, dass auch Aminosäuren aus den CDR1- und CDR2-Regionen der β-Kette eines immundominanten T-Zellrezeptors für das spezifische Erkennen eines Influenza-Peptid-HLA-A2-Moleküls (HLA: human leukocyte antigen; MHC-Klasse-I) von Bedeutung sind (Ishizuka et al, 2008).

Ein T-Zellrezeptor bindet in der Regel hoch spezifisch an ein bestimmtes Peptid-selbst-MHC-Molekül. T-Zellrezeptoren können jedoch auch fremd-MHC-Moleküle erkennen (Alloreaktivität). In den letzten Jahren wurden wiederholt polyspezifische und kreuzreaktiven T-Zellen, teilweise mit einer hohen Avidität, beschrieben (Archbold et al, 2006; Colf et al, 2007; Felix et al, 2007; Ueno et al, 2002). Dieses Phänomen deutet darauf hin, dass T-Zellrezeptoren mit verschiedenen peptidpräsentierenden selbst- sowie fremd-MHC-Molekülen kreuzreagieren können, was für die Immunüberwachung von einer großen Anzahl von potentiellen Pathogenen von Vorteil sein könnte (Sherman und Chattopadhyay, 1993).

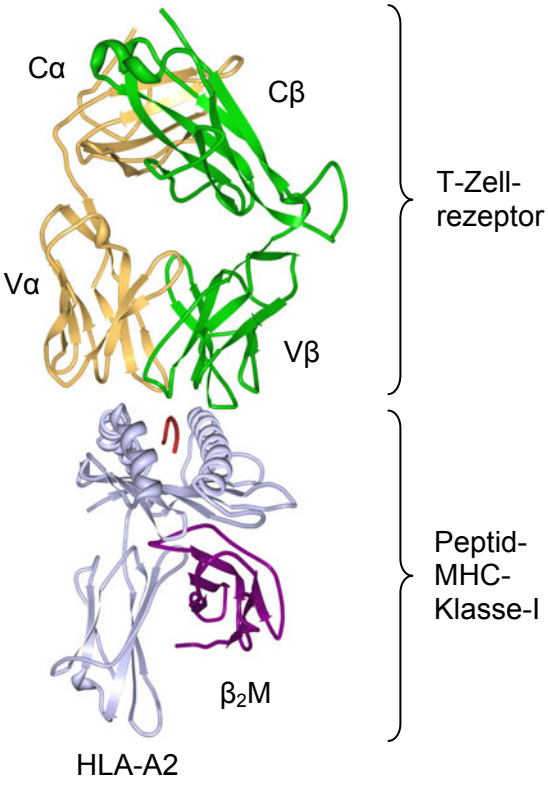


Abbildung 2.3 Ein T-Zellrezeptor (TZR) bindet an ein Peptid-MHC-Klasse-I-Molekül. Dargestellt ist der menschliche TZR JM22, der an HLA-A2 bindet, welcher das Influenza-Peptid Flu (MP58) präsentiert. C: konstante TZR-Domäne; V: variable TZR-Domäne; gelb: TZR-α-Kette; grün: TZR-β-Kette; hellblau: HLA-A2; lila: β_2Mikroglobulin (β_2M), rot: Peptid (modifiziert aus Ishizuka et al, 2008, und der Proteindatenbank RCSB www.rcsb.org)

Die Rekombination der Gensegmente bringt ein großes Potenzial für T-Zellrezeptoren, höchst unterschiedliche Peptide gebunden an MHC-Moleküle zu erkennen. Jedoch bringt dies auch das Risiko mit sich, dass T-Zellrezeptoren entstehen, die dem eigenen Körper schaden könnten. Um dies zu verhindern, durchlaufen T-Zellen eine positive und negative Selektion im Thymus. T-Zellen, die in der Lage sind Selbst-Peptid-Selbst-MHC-Moleküle mit adäquater Affinität zu binden, erhalten ein Überlebenssignal (positive Selektion). Potentiell autoreaktive T-Zellen werden negativ selektiert, wenn sie mit zu hoher Affinität an Selbst-MHC-Moleküle binden. Dadurch ergibt sich ein Repertoire an T-Zellen, die mit körpereigenen MHC-Molekülen interagieren, sie jedoch nicht angreifen (zentrale Toleranz). Weniger als 5 % der sich entwickelnden T-Zellen werden in die Peripherie entlassen (Starr et al, 2003).

Bevor zytotoxische T-Zellen Zielzellen in der Peripherie töten können, müssen sie aktiviert werden. Dies geschieht über professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ), darunter dendritsche Zellen und B-Zellen, die Antigene aufnehmen, diese über MHC-Klasse-I und II präsentieren und kostimulatorische Moleküle exprimieren, wenn sie durch Gefahrensignale aktiviert worden sind (Huang et al, 1994). Für eine Aktivierung von reifen, naiven T-Zellen zu funktionstüchtigen Effektorzellen sind in der Regel zwei Stimuli notwendig: zum einen das Signal, das durch die spezifische Bindung des T-Zellrezeptors an das peptidtragende MHC-Molekül der APZ ausgelöst wird, und zum anderen das kostimulatorische Signal. Eine adäquate Kostimulation und Aufrechterhaltung der spezifischen T-Zellstimulation kann über

Mitglieder der B7-Familie oder der TNF (Tumor-Nekrose-Faktor)-Rezeptorfamilie einschließlich CD40/CD40L erfolgen (Watts, 2005). Bei Fehlen des kostimulatorischen Signals wird die Zelle in einen anergen Zustand versetzt. Da anerge Zellen unempfänglich für äußere Einflüsse sind und sie keine eigenen Zytokine und Überlebensfaktoren produzieren können, kann Anergie zur Apoptose führen. Durch diesen peripheren Toleranzmechanismus kann Autoimmunität verhindert werden (Appleman und Boussiotis, 2003; Barron et al, 2008; Schwartz, 1990).

Sind die zytotoxischen T-Zellen aktiviert, können sie Zielzellen töten, wenn der T-Zellrezeptor ein Peptid-MHC-Klasse-I-Molekül spezifisch auf der Zielzelle erkennt. Der Mechanismus der Zytotoxizität beruht auf der Induktion von Apoptose in der Zielzelle. Dies kann auf verschiedene Weisen erfolgen: über den Todesrezeptor-Signalweg oder über die Ausschüttung von Effektormolekülen. Beim Todesrezeptor-Signalweg bindet FasL (FAS-Ligand) auf der T-Zelle an Fas (CD95, Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie) auf der Zielzelle. Hierdurch kann über eine Kaskade von Caspasen oder über den mitochondrialen Weg Apoptose eingeleitet werden (Krammer et al, 2007). Des Weiteren können lytische Granula ausgeschüttet werden und über Perforin und die Serinproteasen Granzym A und B und die noch relativ unbekannten Granzyme K und M Apoptose auslösen (Cullen und Martin, 2008). Perforin kann Poren in der Plasmamembran der Zielzelle bilden oder nach Endozytose in der Endosomenmembran und somit den Granzymen den Eintritt in die Zielzelle ermöglichen. Diese können unterschiedliche Apoptosewege initiieren (Barry und Bleackley, 2002; Lieberman, 2003). Zytotoxische T-Zellen sezernieren zudem nach Zielzellerkennung Zytokine, darunter IFNγ, das Leukozyten anlockt, eine Th1-Antwort fördert und die Antigenpräsentation durch Induktion des Immunproteasoms und erhöhte MHC-Expression steigert. Dies wiederum verstärkt die Immunantwort (Schroder et al, 2004). Viele Studien zeigen eine bedeutende antitumorale Wirkung von IFNγ (Ibe et al, 2001; Shankaran et al, 2001; Street et al, 2001).

2.1.3 Identifizierung von Tumorantigenen

T-Zellen erkennen Tumorzellen über Peptide von Tumorantigenen, die auf MHC-Molekülen präsentiert werden. Es gibt zwei Arten von Tumorantigenen: tumorspezifische Antigene (TSA), die nur im Tumor exprimiert werden, und tumorassoziierte Antigene (TAA), die verstärkt in Tumorzellen, aber auch in gesunden Zellen exprimiert werden. TSA können aus Mutationen (Spleißvarianten, Punktmutationen, Chromosomenumlagerungen, wie beispielsweise das Fusionsprotein bcr/abl) oder Onkogenen mit viralem Ursprung entstehen, die neue Epitope erzeugen. T-Zellen, die gegen TSA spezifisch sind, werden nicht im Thymus negativ selektiert, da die TSA im normalen Gewebe nicht vorkommen. T-Zellantworten gegen TSA

sind jedoch seltener, da sie nicht gegen die große Menge an normalen zellulären Proteinen konkurrieren können und daher oft nicht ausreichend präsentiert werden (Morris et al, 2003). TAA sind normale Proteine, die ubiquitär oder gewebespezifisch (so genannte „Cancer-testis"-Antigene, die in Tumorzellen und in Spermatozyten der Testis vorkommen) exprimiert werden oder es kann sich um Differenzierungsantigene, wie z. B. Melan-A oder Tyrosinase handeln. TAA werden im Tumorgewebe überexprimiert (Rosenberg, 1999).

Die Identifizierung von Tumorantigenen, die von T-Zellen erkannt werden, ist durch zwei grundsätzlich verschiedene Wege möglich: (1) mit Hilfe der „direkten Immunologie", bei der T-Zellklone mit unbekannter Spezifität bereits existieren und das Antigen nachträglich identifiziert wird, wie beispielsweise das Melanomantigen MAGE-1 als eines der ersten Antigene für tumorspezifische T-Zellen (Traversari et al, 1992; van der Bruggen et al, 1991) und (2) mit Hilfe der „reversen Immunologie", bei der zunächst ein Tumorantigen identifiziert wird und anschließend T-Zellen selektiert werden, die das Peptid spezifisch erkennen (Kessler und Melief, 2007). Die SEREX (serologic identification by recombinant expression cloning)-Methode bietet hierbei eine Möglichkeit, Tumorantigene basierend auf humorale Immunantworten zu identifizierten und für den Ansatz der reversen Immunologie einzusetzen. Für das Tumorantigen NY-ESO-1, als Beispiel für eine große Anzahl von mittels SEREX identifizierten Antigenen, wurde eine Korrelation der humoralen Immunanwort mit der CD8-T-Zellantwort nachgewiesen (Chen et al, 1997).

Bei der reversen Methode werden immunogene T-Zellepitope von Tumorantigenen mit Hilfe von Prädiktionsalgorithmen vorhergesagt (Kessler und Melief, 2007). Hierbei sind mehrere Faktoren in der Prozessierung von Antigenen zu berücksichtigen, die für die Präsentation der Peptide auf der Zelloberfläche entscheidend sind. (1) Zytoplasmatische ubiquitinylierte Proteinsubstrate müssen im Proteasom in Peptide geschnitten werden. (2) Die Peptide müssen über den heterodimeren TAP-Transporter (transporters associated with antigen processing) in das endoplasmatische Retikulum transportiert werden, und (3) die Bindungs-fähigkeit des Peptides an ein MHC-Klasse-I-Molekül muss gegeben sein, damit der stabile Peptid-MHC-Klasse-I-Komplex anschließend über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert wird (siehe Abbildung 2.4), (Pamer und Cresswell, 1998). Durch IFNγ-Induktion werden andere proteasomale Untereinheiten eingebaut, die für ein anderes Peptidrepertoire sorgen (Kloetzel, 2004).

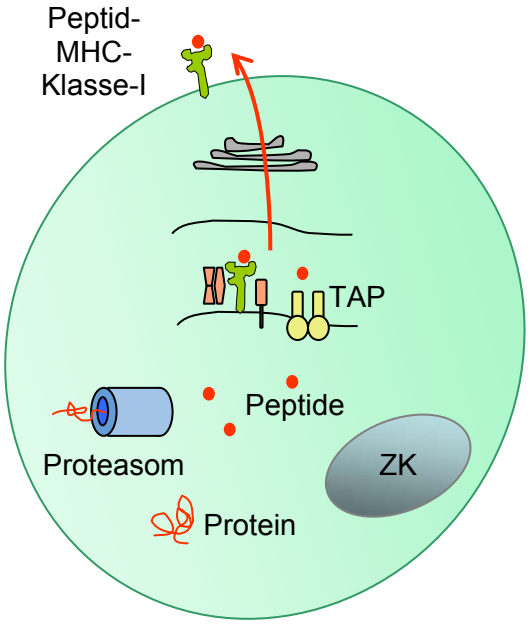


Abbildung 2.4 Weg vom Protein zum präsentierten Peptid auf der Zelloberfläche. Ubiquitinylierte Proteinsubstrate werden im Proteasom zu Peptiden geschnitten. Anschließend werden die Peptide über den TAP-Transporter ins endoplasmatische Retikulum transportiert. Hier werden sie auf MHC-Klasse-I-Moleküle, die über Tapasin mit TAP verbunden sind, geladen, wobei sie von den Chaperonen Erp57 und Calreticulin bei der Faltung unterstützt werden. Über den Golgi-Apparat werden die Peptid-MHC-Klasse-I-Moleküle anschließend an die Zelloberfläche gebracht, ZK: Zellkern, TAP: transporters associated with antigen processing (modifiziert nach Murphey (Janeway's), 2008)

2.1.4 FMNL1 als tumorassoziiertes Antigen

Für den Erfolg einer effektiven Immuntherapie durch spezifische T-Zellen ist insbesondere die Wahl des Antigens entscheidend. In Vorarbeiten wurden lymphomassoziierte Antigene in der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) unter Anwendung der SEREX-Methode identifiziert (Krackhardt et al, 2002b). Eines dieser Antigene (KW13) ist homolog zu FMNL1 (formin related protein in leukocytes 1).

Ausführliche Expressionsanalysen wurden auf mRNS- und Proteinebene durchgeführt. Fünf von 25 verschiedenen gesunden Gewebetypen, die auf FMNL1-mRNS-Expression getestet worden waren, exprimierten FMNL1. Die Expression von FMNL1 beschränkte sich auf periphere Blutleukozyten (PBL) und Gewebe, in denen sich hämatopoetische Zellen befinden (Knochenmark, Milz, Thymus und Lunge). In peripheren Blutzellen, wie beispielsweise in T-Zellen, B-Zellen, dendritischen Zellen sowie in Monozyten und CD34-positiven Zellen, ist die FMNL1-Expression am stärksten. FMNL1 ist in CLL-Zellen und in anderen malignen Zelllinien und soliden Tumoren (z. B. akuten Leukämien, lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) oder Nierenzellkarzinomen) teilweise stark überexprimiert (Krackhardt et al, 2002b; Schuster et al, 2007). FMNL1 ist ein attraktives tumorassoziiertes Antigen, weil die FMNL1-Expression in gesunden Zellen auf hämatopoetische Zellen beschränkt ist und FMNL1 in malignen Zellen überexprimiert ist.

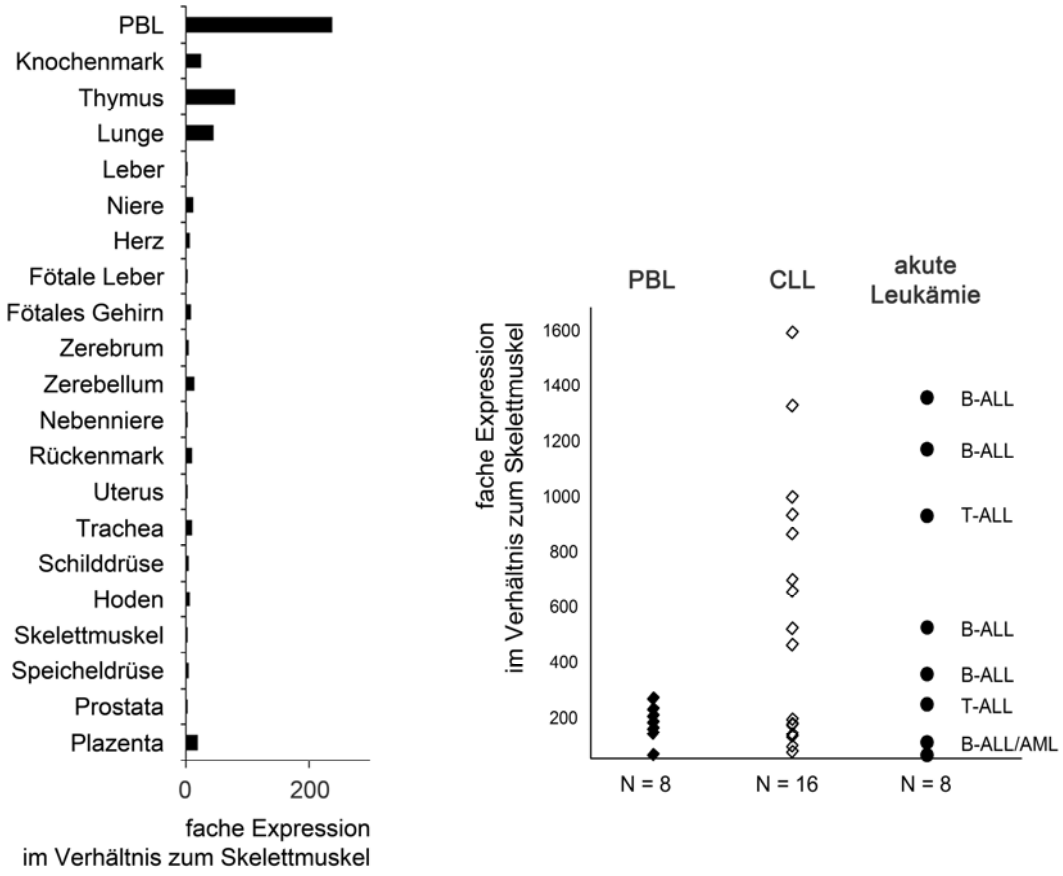


Abbildung 2.5 mRNS-Expression von FMNL1. Messung der mRNS-Expression von FMNL1 mittels quantitativer Echtzeit-PCR und relative Expression in verschiedenen Geweben im Vergleich zum Skelettmuskel. links: relative Expression in verschiedenen gesunden Geweben, die von verschiedenen Spendern gemischt waren. rechts: relative Expression von PBL-Proben von gesunden Spendern, CLL-Patienten, B- und T-ALL-Proben (ALL: akute lymphoblastische Leukämie), (Schuster et al, 2007).

FMNL1 gehört zur Familie der DRFs (Diaphanous-related formins), die die Aktindynamik regulieren. Formine besitzen hochkonservierte FH (formin homology)-Domänen. Sie können über die FH2-Domänen dimerisieren und einen Ring bilden, der als Nukleationskeim der Aktinpolymerisation fungiert. Mit der prolinreichen FH1-Domäne können Formine Profilin binden und ATP-Aktin aus Profilin-G-Aktinkomplexen rekrutieren. Durch kleine GTPasen der Rho-Familie werden Formine aktiviert (Vavylonis et al, 2006). Auf Grund ihrer Rolle bei der Umorganisation des Aktinzytoskeletts sind Formine an zahlreichen Zellfunktionen, wie der Aufrechterhaltung der Zellmorphologie, Zellpolarität, Zellmigration, am vesikulären Transport und in der Zytokinese beteiligt (Faix und Grosse, 2006). FMNL1 ist in der Literatur bisher kaum beschrieben. In T-Zellen wurde FMNL1 jedoch eine Rolle bei der Zentrosom-Polarisierung nach T-Zellaktivierung zugesprochen und eine defekte zellvermittelte Zytotoxizität von T-Zellen nach FMNL1-Depletion beobachtet (Gomez et al, 2007). Formine könnten durch ihre Rolle beim Bau des Aktinzytoskeletts attraktive Zielstrukturen für Medikamente zur Behandlung von invasiven Erkrankungen oder Metastasen sein (Faix und Grosse, 2006).

2.2 Adoptive T-Zelltherapie

Der adoptive T-Zelltransfer ist eine Behandlungsform in der Tumorimmuntherapie, bei der Patienten mit T-Zellen passiv immunisiert werden. Verschiedene Vorgehensweisen wurden hierzu bereits durchgeführt.

2.2.1 Virusspezifische T-Zellen

Erste Erfolge im adoptiven T-Zelltransfer wurden mit CD8-positiven T-Zellen gemacht, die gegen virale Antigene spezifisch waren. Auf Grund der Immunsuppression nach einer Stammzelltransplantation sind Patienten anfällig für eine Infektion durch Cytomegaloviren (CMV) oder für eine sogenannte PTLD (post transplantat lymphoproliferative disorder) durch Epstein-Barr-Virus (EBV) und konnten durch den adoptiven T-Zelltransfer zytotoxischer virusspezifischer T-Zellen der Knochenmarksspender oder von T-Zellklonen erfolgreich behandelt werden (Papadopoulos et al, 1994; Riddell et al, 1992).

2.2.2 T-Zellen gegen tumorassoziierte Antigene im autologen System

Die Generierung von spezifischen T-Zellantworten gegen nicht-virale Tumorantigene ist schwieriger, da diese Tumorantigene in der Regel weniger immunogen sind. Ansätze hierzu wurden zunächst im autologen System bei Melanomen durchgeführt, wobei die meisten Erfahrungen in der Arbeitsgruppe von S. A. Rosenberg gesammelt wurden. Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) wurden aus Melanom-Tumorgeweben oder PBL von Patienten entnommen und nach in vitro-Stimulation und Expansion dem Patienten zurückgegeben. Erste Studien im Menschen (Melanompatienten im fortgeschrittenen Stadium) waren in der Klinik nicht erfolgreich, obwohl die T-Zellen eine hohe Antitumor-reaktivität in vitro zeigten (Dudley et al, 2001; Dudley et al, 2002a) und TIL in der Maus tumorprotektiv waren (Alexander und Rosenberg, 1990). In weiteren Studien, in denen heterogene TIL-Populationen im immunsupprimierten Patienten zum Einsatz kamen, konnten daraufhin verlängertes Überleben der tumorspezifischen T-Zellen sowie klinische Tumorrremissionen beobachtet werden (Dudley et al, 2002b; Dudley et al, 2005).

Diese Ergebnisse zeigen einerseits, dass die Aktivität von zytotoxischen T-Zellen in vitro allein keine Aussage darüber gibt, wie effektiv die adoptiv transferierten Zellen in vivo sind (Gattinoni et al, 2005). Verschiedene Mechanismen können in vivo dazu führen, dass funktionstüchtige T-Zellen nicht reagieren. So könnte das Fehlen von CD4-positiven T-Helferzellen eine verminderte Aktivität und Persistenz der tumorreaktiven CD8-positiven T-Zellklone bewirkt haben (Rosenberg und Dudley, 2004). Es werden aber auch andere Mechanismen diskutiert, die zu einer Beeinträchtigung der Immunantwort gegen Tumorzellen führen können. Hierzu zählen beispielsweise eine Toleranzinduktion durch den Tumor

(Willimsky und Blankenstein, 2005), eine Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen (Curiel et al, 2004), die immunologische Ignoranz durch Wachstum an immunprivilegierten Orten (Ochsenbein et al, 1999) oder auch durch verminderte Antigenpräsentation (Restifo et al, 1996; Seung et al, 1993).

Die Ergebnisse zeigen andererseits auch, dass durch den adoptiven Transfer von tumorspezifischen T-Zellen Tumorrückgänge im Patienten möglich sind. Die breite Anwendung von autologen TIL ist allerdings limitiert. (1) Nicht von jedem Patienten kann genügend Tumormaterial zur Isolation von TIL gewonnen werden und (2) auch bei ausreichendem Material können nicht bei jedem Patienten tumorreaktive TIL insbesondere im autologen System isoliert werden (Rosenberg und Dudley, 2004). (3) Bei malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, wie beispielsweise der CLL, weisen oft auch die T-Zellen Defekte auf (Gorgun et al, 2005). (4) Die Gewinnung von TIL ist aufwendig und zeitintensiv (Dudley et al, 2003).

2.2.3 T-Zellen im allogenen System

T-Zellen können nicht nur die körpereigenen, sondern auch fremde MHC-Moleküle erkennen (Alloreaktivität). Dies zeigt sich im negativen Sinne z. B. in der Transplantatabstoßung oder nach allogener Stammzelltransplantation in der Transplantat-gegen-Wirts-Reaktion (Graft-versus-host-disease, GvHD), im positiven Sinne aber auch im Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt (Graft-versus-Leukemia, GvL). Hierbei reagieren T-Zellen gegen das für sie fremde Gewebe (Kolb et al, 2004). Gerade die genetischen Unterschiede zwischen Spender und Empfänger scheinen für die Reaktivität der T-Zellen wichtig zu sein, da T-Zellen nach Transfer zwischen eineiigen Zwillingen ein höheres Rezidiv-Risiko zeigten (Horowitz et al, 1990). Es wird geschätzt, dass circa 1 bis 10 % der T-Zellen eines Individuums alloreaktiv sind (Lindahl und Wilson, 1977). Die Bindung eines alloreaktiven T-Zellrezeptors an seinen Liganden (Peptid-fremd-MHC-Molekül) scheint hierbei in vielen Fällen vergleichbar mit der konventionellen Erkennung von Peptid-selbst-MHC zu erfolgen, bei der der T-Zellrezeptor ein Peptid im MHC-Kontext spezifisch erkennt (Felix et al, 2007). Allogene Stammzelltransplantationen und Donor-Lymphozyten-Infusionen (DLI) zeigen bei der Behandlung von Lymphomen, dass T-Zellen im allogenen System in der Lage sind, Tumorzellen in vivo zu bekämpfen (Kolb et al, 2004). Im Gegensatz zum autologen System werden T-Zellen, die spezifisch für ein selbst-Peptid im allogenen MHC-Kontext sind, im Thymus nicht negativ selektiert. Diese könnten für die Tumorimmuntherapie eingesetzt werden.

In ersten Versuchen in der Maus konnten hoch avide allorestringierte mdm2 (murine double-minute 2)-peptidspezifische T-Zellen selektiert werden, die in vivo eine Verzögerung des Tumorwachstums bewirkten (Sadovnikova und Stauss, 1996). Stanislawski und Kollegen

zeigten, dass durch den T-Zellrezeptor-Transfer eines hoch aviden allorestringierten MDM2-peptidspezifischen T-Zellrezeptors in autologe T-Zellen, die Toleranz gegenüber Peptid-Selbst-MHC-Molekülen in der Maus durchbrochen werden kann (Stanislawski et al, 2001).

Antigenpräsentierende Zellen, die andere MHC-Moleküle tragen als die T-Zellen und die das gewünschte Epitop eines Tumorantigens präsentieren, können dazu eingesetzt werden, alloreaktive peptidspezifische T-Zellen anzureichern. Hierbei bieten sich T2-Zellen als Stimulatorzellen an, deren Vorteil gegenüber anderen antigenpräsentierenden Zellen darin liegt, dass sie TAP-defizient sind und somit nur ineffizient zelleigene Peptide präsentieren. Durch exogene Peptidbeladung können sie selektiv gewünschte Peptide auf dem MHC-Klasse-I-Molekül HLA-A2 präsentieren (HLA: Human Leukocyte Antigen). Durch Stimulation von HLA-A2-negativen PBL mit peptidbeladenen T2-Zellen können allorestringierte peptid-spezifische T-Zellen selektiert werden. Auf diese Weise konnten im menschlichen System bereits allorestringierte peptidspezifische T-Zellen gegen die tumorassoziierten Antigene WT1 (Wilms tumor antigen-1) und Cyclin D1 selektiert werden, die in vitro Tumorspezifität zeigten (Gao et al, 2000; Sadovnikova et al, 1998).

Durch Einsatz von Multimeren kann die Selektion antigenspezifischer T-Zellen noch verfeinert werden. Multimere sind Fluoreszenzmolekül-gekoppelt und bestehen aus mehreren Peptid-MHC-Klasse-I-Molekülen. Sie imitieren den natürlichen Liganden eines T-Zellrezeptors (Knabel et al, 2002). Aus einer gemischten Population können geringe Populationen an T-Zellen, die die gewünschte Peptid-MHC-Spezifität besitzen, unter Einsatz von Multimeren angereichert werden (Yee et al, 1999).

2.2.4 T-Zellrezeptor-Transfer

Der Einsatz von allorestringierten peptidspezifischen T-Zellpopulationen im Patienten ist jedoch begrenzt. Durch die Verschiedenheit der MHC-Moleküle zwischen Spender-T-Zellen und Wirt könnte eine GvHD- oder Wirt-gegen-Transplantat (Host-versus-Graft, HvG)-Reaktion entstehen. Eine effektive Antitumorreaktion kann nur stattfinden, wenn sich die adoptiv transferierten T-Zellen im Wirt etablieren und ein Chimerismus entsteht. Somit ist es vorteilhafter statt der ganzen T-Zellen lediglich die Spezifität eines gut charakterisierten tumorantigenspezifischen T-Zellklons auf den Patienten zu übertragen. Da die molekulare Grundlage der Spezifität und Reaktivität von T-Zellen im T-Zellrezeptor liegt, könnte dieser in autologe T-Zellen des Patienten oder in passende Spenderzellen eingebracht werden. Durch die Übertragung in frische T-Zellen würde auch die Schwierigkeit umgangen werden, dass T-Zellen in der Regel nur zeitlich eingeschränkt aktiv sind.

Es ist bereits vielfach gezeigt worden, dass durch die Übertragung der Sequenzen der α- und β-Ketten eines T-Zellrezeptors die Reaktivität und Spezifität eines T-Zellklons auf sekundäre Zellen übertragen werden kann. Bereits in den 1980er Jahren wurde die Übertragbarkeit der T-Zellrezeptor-Reaktivität nach Protoplastenfusion in Mauszellen gezeigt (Dembic et al, 1986). Seither wurden verschiedene tumorantigenspezifische oder virusspezifische T-Zellrezeptoren in menschliche Zellen (T-Zellen, PBL oder hämatopoetische Vorläuferzellen) meist retroviral eingebracht (Clay et al, 1999; Heemskerk et al, 2004; Johnson et al, 2006; van Lent et al, 2007; Zhao et al, 2005), wobei die Übertragung der T-Zellrezeptor-Aktivität der ursprünglichen T-Zellen auf die sekundären Zellen in vitro bestätigt werden konnte. Verschiedene Studien zeigen auch die funktionelle Aktivität T-Zellrezeptor-transduzierter Zellen in der Maus (Kessels et al, 2001; Xue et al, 2005). Ein allogener T-Zellrezeptor in autologen T-Zellen zeigte im Mausmodell Zielzellspezifität ohne erkennbare GvHD (de Witte et al, 2006). Auch im Menschen konnte mit Hilfe von T-Zellrezeptor-transduzierten Zellen nach adoptivem T-Zelltransfer Erfolge erzielt werden. Bei zwei von 17 Melanompatienten im fortgeschrittenen Stadium konnten Tumorrückgänge erreicht werden, deren PBL mit einem, allerdings im autologen System generierten, anti-MART1 (melanoma antigen recognized by T-cells)-spezifischen T-Zellrezeptor transduziert worden waren (Morgan et al, 2006).

2.3 B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (B-NHL)

Das tumorassoziierte Antigen FMNL1 ist in verschiedenen Lymphomen überexprimiert (Krackhardt et al, 2002b; Schuster et al, 2007). Maligne Lymphome sind Neoplasien des lymphatischen Systems, die sich in zwei Gruppen einteilen lassen: die Hodgkin-Lymphomen und die Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). Hodgkin-Lymphome haben als histologisches Merkmal die Sternberg-Reed-Riesenzellen, die aus den sog. Hodgkin-Zellen hervorgehen. Die Non-Hodgkin-Lymphome grenzen sich durch das Fehlen dieser Riesenzellen von den Hodgkin-Lymphomen ab. Die NHL sind maligne klonale Neoplasien, die von den B- (80 bis 85 % der Fälle) oder T-Lymphozyten (15 bis 20 % der Fälle) ausgehen (Freund, 1999). Nach der WHO-Klassifikation werden die Lymphome nach zytomorphologischen, immunologischen und genetischen Merkmalen unterschieden, sowie in Lymphome der Vorläuferzellen oder reifen Zellreihe eingeteilt. Die NHL unterscheiden sich außerdem durch ihren Verlauf, der indolent (d. h. langsam fortschreitend/progredient), aggressiv bzw. sehr aggressiv sein kann und daher unterschiedliche Behandlungen erfordert.

Für viele B-NHL gibt es noch keine kurative Therapie. Zur Entwicklung von neuen Immuntherapien ist es sinnvoll, eine langsam progrediente Erkrankung zu wählen, da sich in diesen

Patienten eine Immunantwort gegen Tumorzellen entwickeln kann. Als Modell wurde daher die chronische lymphatische Leukämie gewählt, die in der Regel langsam fortschreitend ist, bei der aber auch schnell progrediente Fälle mit schlechter Prognose auftreten.

2.3.1 Chronische lymphatische Leukämie (CLL)

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) ist eine Sonderform der B-NHL, die leukämisch verläuft und von niedrigem Malignitätsgrad ist. Die CLL ist mit 25 % der Fälle die häufigste Leukämieform in der westlichen Welt. Sie zeichnet sich durch eine klonale Proliferation und Akkumulation immuninkompetenter CD5-positiver B-Lymphozyten aus, die eine verlängerte Überlebenszeit haben. Schwere Hypogammaglobulinämie, fehlerhafter Immunglobulinklassenwechsel und verminderte Keimzentrumsbildung führen zu einer größeren Anfälligkeit für bakterielle Infektionen oder Autoimmunerkrankungen, was zumeist zur Morbidität und Mortalität in der CLL beiträgt. Das mediane Lebensalter bei Erstdiagnose liegt bei 65 Jahren (Kalil und Cheson, 1999; Rozman und Montserrat, 1995). Der Verlauf der Krankheit ist sehr unterschiedlich. Während viele Patienten aufgrund eines langsamen Krankheitsverlaufs lange leben können, haben CLL-Patienten mit einem progressiven Verlauf der Krankheit eine mediane Überlebenszeit von nur 68 Monaten (Keating et al, 1998). Patienten, die nicht mehr auf das Chemotherapeutikum Fludarabin ansprechen, haben eine mediane Überlebenszeit von nur einem Jahr (Perkins et al, 2002). Besonders für jüngere Patienten mit einer aggressiven Krankheit sind neue Therapieansätze dringend erforderlich.

2.3.2 Bisherige Therapien

Die CLL gilt in der Regel als nicht heilbar. Chemotherapien (Purinanaloge z. B. Fludarabin, oder Cyclophosphamid) und ein anti-CD20-Antikörper (Rituximab) können zwar Remissionen bewirken und die Überlebenszeit verlängern (Keating et al, 2005; Wierda et al, 2005), führen aber nicht zur Heilung. Hochdosierte Chemotherapien, die dem Patienten im Zusammenhang mit einer autologen Stammzelltransplantation verabreicht werden, konnten bei 58 % der Patienten mit progressiver CLL zu einer verbesserten Gesamtüberlebensrate führen (Gribben et al, 2005). Jedoch sind auch diese Remissionen nicht dauerhaft (Paneesha und Milligan, 2005). Bei der allogenen Stammzelltransplantation kommt die Komponente der zellulären Immuntherapie hinzu. Sowohl bei myeloablativer Behandlung (Pavletic et al, 2000) als auch bei nicht-myeloblativer Präkonditionierung mit reduzierter Intensität (Caballero et al, 2005; Sorror et al, 2005) konnten klinische Remissionen und im Verlauf ein sinkendes Risiko für Rezidive beobachtet werden. Verschiedene Studien zeigen, dass hierbei die Donor-T-Zellen für den erwünschten GvL-Effekt verantwortlich sind: (1) Das Rezidiv-Risiko ist

erhöht, wenn T-Zell-depletierte Transplantate verabreicht wurden (Horowitz et al, 1990). (2) Donor-Lymphozyten-Infusionen (DLI) können bei Resttumorzellen nach Allotransplantation zu molekularen Remissionen führen (Gribben et al, 2005; Kolb et al, 2004). (3) Der GvL-Effekt ist ausgeprägter bei anhaltender GvHD (Dreger et al, 2005). Die allogene Stammzell-transplantation ist bei der CLL bisher die einzige Therapie mit Heilungschancen. Die breite Anwendung ist jedoch stark limitiert, da die Behandlung mit einer sehr hohen Mortalität verbunden ist und die Patienten unter starken Beeinträchtigungen durch die GvHD leiden (Caballero et al, 2005; Pavletic et al, 2000; Schetelig et al, 2003). Hauptgrund für die schweren Nebenwirkungen der allogenen Stammzelltransplantation liegt in der mangelnden Selektivität der alloreaktiven T-Zellen gegen Tumorzellen.

2.3.3 Zukünftige Therapiemöglichkeit

Zukünftige Therapien sollten also den vorteilhaften anti-Tumor-Effekt von T-Zellen ausnutzen und gleichzeitig das Risiko der lebensbedrohlichen GvHD reduzieren. Dies könnte durch den adoptiven Transfer von allorestringierten T-Zellen erreicht werden, die spezifisch sind für ein Peptid eines Tumorantigens, beispielsweise FMNL1, sind. Hierzu könnte für die Behandlung von beispielsweise HLA-A2-positiven Patienten wie folgt vorgegangen werden (siehe Abbildung 2.6): Aus einem HLA-A2-negativen gesunden Spender könnten T-Zellen isoliert werden, die mit HLA-A2-positiven tumorpeptidbeladenen antigenpräsentierenden Zellen stimuliert werden. Der T-Zellrezeptor von spezifischen allorestringierten T-Zellen, die gegen Tumorzellen reagieren, könnte in sekundäre Zellen retroviral transduziert werden. Wenn das Tumorantigen auch in gesunden hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, wie das für FMNL1 der Fall ist, sollte der T-Zellrezeptor nicht in patienteneigene T-Zellen, sondern in Spenderzellen transduziert werden. Diese Spenderzellen sollten MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren, die nicht von den transgenen T-Zellen erkannt werden. Der adoptive Transfer dieser transgenen T-Zellen könnte daher im Rahmen einer haploidentischen Stammzell-transplantation stattfinden, da hierbei das Immunsystem im Patienten durch das des Spenders ersetzt wird.

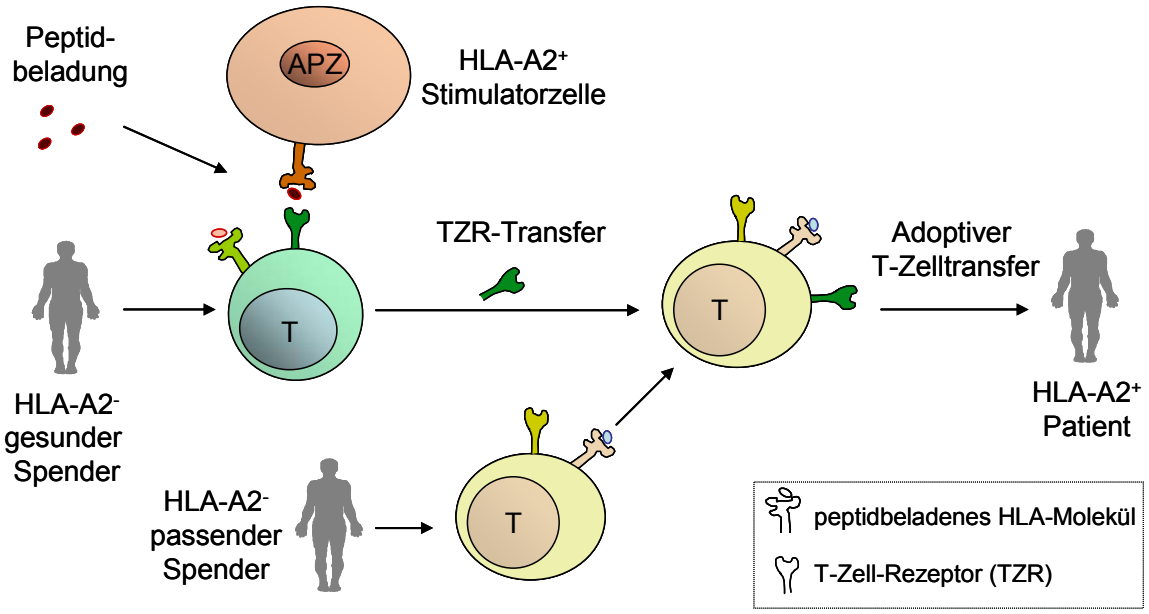


Abbildung 2.6 Schematische Darstellung des adoptiven T-Zelltransfers. Aus einem HLA-A2-negativen gesunden Spender werden T-Zellen isoliert. Diese werden in vitro mit HLA-A2-positiven antigenpräsentierenden Zellen stimuliert, die zuvor mit Peptiden eines Tumorantigens (z. B. FMNL1) beladen worden waren. Der T-Zellrezeptor (TZR) von allorestringierten peptidspezifischen T-Zellen wird identifiziert und retroviral in Zellen eines passenden HLA-A2-negativen Spenders transduziert. Diese TZR-transduzierten T-Zellen werden dem HLA-A2-positiven Tumorpatienten im Rahmen einer haploidentischen Stammzelltransplantation adoptiv transferiert.

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es, allorestringierte, peptidspezifische T-Zellen für den adoptiven T-Zelltransfer zur Therapie von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen zu selektieren. FMNL1 wurde als Antigen gewählt, weil es eine Expression zeigt, die in gesunden Zellen auf hämatopoetische Zellen beschränkt ist, während es in malignen Zellen überexprimiert ist. Das HLA-A2 (MHC-Klasse-I)-Allel wurde gewählt, da dieses in der kaukasischen Bevölkerung am häufigsten vorkommt und am besten erforscht ist. Von FMNL1 sind noch keine immunogenen T-Zellepitope bekannt.

In der vorliegenden Arbeit sollte herausgefunden werden, ob immunogene Peptide von FMNL1 mittels in silico-Prädiktionsanalysen vorhergesagt werden können, die natürlich präsentiert werden. Wichtige Parameter zur Vorhersage von präsentierten Peptiden sind hierbei die Bindung an das MHC-Klasse-I-Molekül HLA-A2, günstige Aminosäuren für einen erfolgreichen TAP-Transport und die Schnittwahrscheinlichkeit im Proteasom.

Des Weiteren sollte herausgefunden werden, ob es möglich ist, mit Hilfe von antigenpräsentierenden Zellen, die mit diesen vorhergesagten synthetischen Peptiden beladen werden sollten, T-Zellen von gesunden Spendern zu isolieren, die allorestringiert und FMNL1-peptidspezifisch reagieren. Multimere sollten herangezogen werden, um geringe

Populationen von allorestringierten peptidspezifischen T-Zellen am Durchflusszytometer zu isolieren. Isolierte T-Zellen sollten dann auf ihr Reaktionsmuster hin detailliert untersucht werden, um herauszufinden, welche Aktivität und Spezifität diese T-Zellen haben. Der T-Zellrezeptor von tumorreaktiven T-Zellkandidaten sollte dann identifiziert und sequenziert werden. Mit Hilfe des retroviralen Transfers sollte der T-Zellrezeptor in sekundäre Zellen eingebracht werden und überprüft werden, ob die Funktionalität von den ursprünglichen FMNL1-spezifischen T-Zellen auf sekundäre Zellen übertragen werden kann.

3 Material

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

0,1-10 / 10-200 / 100-1000 µl Spitzen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
24-Loch-Zellkulturplatten	Becton Dickinson, Heidelberg
6-Loch-Zellkulturplatten	Becton Dickinson, Heidelberg
96-Loch U-Boden Zellkulturplatten	Becton Dickinson, Heidelberg
Abdeckfolien	Neolab, Heidelberg
Bestrahlungsanlage Gammacell 40	Atomic energy of Canada limited, Ottawa, Kanada Bezugsdatum: 15.06.1979, 125,8 R/min Halbwertszeit: 30 Jahre
EIA/RIA Platten	Corning, New York, USA
FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Calibur Zellsortierer	Becton Dickinson, Heidelberg
Filterplatten Thymidin	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt
Fluoreszenz Mikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Geldokumentationssysteme:	
Gelkammer	Harnischmacher, Kassel
Gelprint 2000i	Biophotonics, Ann Arbor (USA)
InGenius System IG-E	Synoptics, Cambridge (UK)
Inkubator	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Latexhandschuhe	Rösner-Mautby Meditrade GmbH, Kiefersfelden
LSRII	Becton Dickinson, Heidelberg
Luma Platten	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt
Luminex Bio-Plex	System Bio-Rad, München
Mehrkanalpipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz- GmbH, Hamburg
Mikroskop	Zeiss AG, Jena
MilliQ System	Millipore GmbH, Schwalbach
MoFlow	Dako, Hamburg
Nitrilhandschuhe	Kimberly-Clark Corporation, Neenah, USA
Petrischalen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Pipettierhilfe	Integra Biosciences, Fernwald
Röhrchen, 1,5 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Röhrchen, 50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Rundboden FACS Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
SpektralphotometerUltrospec 1100	Amersham Bioscience, Freiburg
Spritzen 50 ml	Becton Dickinson and Company, New Jersey, USA
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Sterilfilter	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Sunrise Photometer, ELISA Reader	Tecan, Groot-Bijgaarden, Belgien
Thermocycler	Biometra, Göttingen

Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Thymidin-Waschanlage Filtermate 196	PerkinElmer, Waltham, USA
Top count NXT (Microplate Scintillation & Luminescence Counter)	PerkinElmer, Waltham, USA
UV-Transilluminator	Ltf Labortechnik, Wasserburg
Vortexer	Bender & Hobei AG, Schweiz
Wasserbad	Memmert, Schwabbach
Zählkammer	Brand GmbH & Co., Wertheim
Zellkulturflaschen	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifuge	Hettich, Kirchlengern

3.2 Chemikalien, Enzyme und Zytokine

100 bp DNS Leiter	New England Biolabs, Ipswich, England
1-Bromo-3-Chloro-Propan	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Agarose	Biozym, Oldendorf
AIM-V	Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
B7.1 Fusionsprotein, Fc-Chimäre	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
$CaCl_2$	Merck, Darmstadt
Chloroform-Isoamylalkohol 24:1	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Chloroquin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DEPC-H_2O	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
DMEM	Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe
DMSO	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
dNTP	Fermentas, St. Leon-Rot
D-PBS	Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe
EcoRI	Fermentas, St. Leon-Rot
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
F12-Medium	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ficoll	Biochrom, Berlin
FKS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Fungizon	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
G418	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Gentamycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Glucose	Merck, Darmstadt
H_3PO_4	Merck KGaA, Darmstadt
Heparin	B. Braun, Melsungen AG
HEPES, 1 M	Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe
HEPES, Pulver	Biochrom KG, Berlin
Humanserum	Helmholtz Zentrum München
Hygromycin	Invitrogen Corporation, Karlsruhe

HyperLadder I	BIOLine GmbH, Luckenwalde
IFNγ	Peprotech, New Jersey, USA
IL15	Peprotech, New Jersey, USA
IL1β	Peprotech, New Jersey, USA
IL2	Chiron Vaccines International, Marburg
IL4	Peprotech, New Jersey, USA
IL6	Peprotech, New Jersey, USA
IL7	Peprotech, New Jersey, USA
IMDM	Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Insulin-Transferrin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
Ladepuffer	Fermentas, St. Leon-Rot
LB-Agar	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
LB-Broth	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
L-Glutamin	Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Milchpulver	Frema, Lüneburg
Mycoplasma-Removal-Agent	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Na_2CO_3	Merck, Darmstadt
Na_2HCO_3	Merck, Darmstadt
Na_2HPO_4*$2H_2O$	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaN_3	Merck KGaA, Darmstadt
Nicht essentielle Aminosäuren	Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe
NotI	Fermentas, St. Leon-Rot
Oligo(dT)-Primer	Promega, Madison, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
PBS Dulbecco's	Biochrom AG, Berlin
Penicillin Streptomycin	Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Pfu-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Phenol, äquilibriert	Roth, Karlsruhe
Propidiumiodid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Protaminsulfat	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Puffer NEB3 und 4	New England Biolabs, Ipswich, England
RetroNectin	TaKaRa, Japan
RNase Out	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
RPMI 1640 (-L-Glutamine)	Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Sheath fluid	Dako, Glostrup, Dänemark
Sodium Chlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Sodium Chromat	Hartmann Analytik GmbH, Braunschweig
Sodium Pyruvat	Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Sodium Zitrat 2 H_2O	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Sterilium, Cutasept F	Bode Chemie, Hamburg
SuperScript II Reverse Transkriptase	Invitrogen Corporation, Karlsruhe

T4-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
TAE (Tris Acetat EDTA) Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-Polymerase	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
TMB Substrate Reagent Set	Becton Dickinson, Heidelberg
Tri Reagent	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trypanblau	Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Trypsin EDTA 0,5 %	Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Tween 20	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
VLE-RPMI 1640	Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe
β_2-Mikroglobulin	Calbiochem Novabiochem, Bad Soden

3.3 Kits

Bio-Plex „Cytokine Reagent Kit"	Bio-Rad, München
CD8 negative isolation Kit	Dynal, Invitrogen Corporation, Karlsruhe
NucleoSpin Gelpurifikationskit	Macherey Nagel, Düren
Human IFN-γ ELISA Set	Becton Dickinson, Heidelberg
JETstar Plasmid Purification MAXI KIT	Genomed, Löhne
T cell negative isolation Kit	Dynal, Invitrogen Corporation, Karlsruhe

3.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 3.1 Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusätze	Stock-konzentration	End-konzentr.	Menge
FACS-Puffer	D-PBS (- $CaCl_2$; $MgCl_2$)			500 ml
	FKS	100 %	1 %	5 ml
FKS oder HS	Hitzeinaktivierung: 20 min bei 58 °C			
0,1 M Sodium-Carbonat-Puffer [ELISA]	$NaHCO_3$	84,01 g/mol	0,1 M	8.40 g
	Na_2CO_3	105,99 g/mol	0,03 M	3.56 g
	H_2O pH 9,5			add 1 l
Waschpuffer [ELISA]	PBS mit 0.05% Tween-20			
2x HBSS-Puffer [Ca-Phosphat-Transfektion]	NaCl	58,44 g/mol	280 mM	1,64 g
	KCl	74,56 g/mol	10 mM	0,075 g
	Glucose	180,16 g/mol	12 mM	0,216 g
	HEPES	238,31 g/mol	50 mM	1,1916 g
	$Na_2 HPO_4$*$2H_2O$	177,99 g/mol	1,5 mM	0,0267 g
	H_2Odest			add 100 ml
$CaCl_2$ [Ca-Phosphat-Transfektion]	$CaCl_2$	110,99 g/mol	2 M	2,22 g
	H_2O bidest			10 ml

Puffer / Lösung	Zusätze	Stock-konzentration	End-konzentr.	Menge
Milchpulver [ELISA]	Milchpulver	100 %	1 %	1 g
	PBS			100 ml
DNS-Agarose Gel	TAE-Puffer	10x	1x	20 ml
	H_2Odest			add 120 ml
	Agarose	100 %	1,7 %	2 g
	Ethidiumbromid	10 µg/µl	0,7 µg/ml	8 µl
DNS-Elektrophorese Laufpuffer	TAE-Puffer	10x	1x	50 ml
	H_2Odest			add 500 ml

3.5 Zellkulturmedien

Tabelle 3.2 Zellkulturmedien

Medium	Zusätze	Stock-konzentration	End-konzentration	Menge
Einfriermedim	FKS	100 %	90 %	1,55 ml
	DMSO	100 %	10 %	150 µl
Medium für CD40L-Fibroblasten (Wildtyp-Medium: ohne G418)	F12 + DMEM (mit 15 mM HEPES, NaHCO3, Pyridoxin, L-Glutamin)			500 ml
	FKS	100 %	10 %	50 ml
	L-Glutamin	200 mM	2 mM	5 ml
	nicht essentielle Aminosäuren	100 x	1 x	5 ml
	HEPES; pH 7,4	1 M	10 mM	5 ml
	Gentamycin	10 mg/ml	16,6 µg/ml	0,83 ml
	G418	50 mg/ml	400 µg/ml	4 ml
RPMI (10 % FKS)	RPMI-1640 – L-Glutamin			500 ml
	FKS	100 %	10 %	50 ml
	L-Glutamin	200 mM	2 mM	5 ml
	nicht essentielle Aminosäuren	100 x	1 x	5 ml
	Sodium-Pyruvat	100 mM	1 mM	5 ml
	Penicillin-Streptomycin	P.: 10000 U/ml S.: 10000 µg/ml	P.: 100 U/ml S.: 100 µg/ml	5 ml
RPMI-1640 (serumfrei)	RPMI-1640 – L-Glutamin			500 ml
	L-Glutamin	200 mM	2 mM	5 ml
	nicht essentielle Aminosäuren	100 x	1 x	5 ml
	Sodium-Pyruvat	100 mM	1 mM	5 ml
	Penicillin-Streptomycin	P.: 10000 U/ml S.: 10000 µg/ml	P.: 100 U/ml S.: 100 µg/ml	5 ml

Medium	Zusätze	Stock-konzentration	End-konzentration	Menge
B-Zell-Medium	IMDM			500 ml
	Insulin-Transferrin	je 2,5 mg/1,5 ml	je 50 µg/ml	1,5 ml
	FKS (oder HS)	100 %	10 %	50 ml
	L-Glutamin	200 mM	2 mM	5 ml
	Gentamycin	10 mg/ml	16,6 µg/ml	0,83 ml
T-Zell-Medium	RPMI-1640 – L-Glutamin			500 ml
	HS	100 %	10 %	50 ml
	L-Glutamin	200 mM	2 mM	5 ml
	nicht essentielle Aminosäuren	100 x	1 x	5 ml
	Sodium-Pyruvat	100 mM	1 mM	5 ml
	Penicillin-Streptomycin	P.: 10000 U/ml S.: 10000 µg/ml	P.: 100 U/ml S.: 100 µg/ml	5 ml
	HEPES; pH 7,4	1 M	10 mM	5 ml
	Gentamycin	10 mg/ml	16,6 µg/ml	0,83 ml
Klon-Medium	RPMI-1640 – L-Glutamin			500 ml
	FKS	100 %	7,5 %	37,5 ml
	HS	100 %	7,5 %	37,5 ml
	L-Glutamin	200 mM	2 mM	5 ml
	nicht essentielle Aminosäuren	100 x	1 x	5 ml
	Sodium-Pyruvat	100 mM	1 mM	5 ml
	Penicillin-Streptomycin	P.: 10000 U/ml S.: 10000 µg/ml	P.: 100 U/ml S.: 100 µg/ml	5 ml
	HEPES; pH 7,4	1 M	10 mM	5 ml
	Fungizon	250 µg/ml	2,5 µg/ml	5 ml
DMEM (10 % bzw. 3 % FKS)	DMEM (4,5 g/l Glukose)			500 ml
	FKS	100 %	10 % oder 3 %	50 ml/15 ml
	L-Glutamin	200 mM	2 mM	5 ml
	nicht essentielle Aminosäuren	100 x	1 x	5 ml
	Sodium-Pyruvat	100 mM	1 mM	5 ml
	Penicillin-Streptomycin	P.: 10000 U/ml S.: 10000 µg/ml	P.: 100 U/ml S.: 100 µg/ml	5 ml
IVSB-Medium	AIM-V			500 ml
	HS	100 %	10 %	50 ml
	L-Glutamin	200 mM	2 mM	5 ml
	Sodium-Pyruvat	100 mM	1 mM	5 ml
	Penicillin-Streptomycin	P.: 10000 U/ml S.: 10000 µg/ml	P.: 100 U/ml S.: 100 µg/ml	5 ml 5 ml
LB-(Broth) Medium	Pulver auflösen in H_2O und autoklavieren nach Angabe des Herstellers			
LB-Agar	Pulver auflösen in H_2O und autoklavieren nach Angabe des Herstellers, ausplattieren in Petrischalen nach Zugabe von Ampicillin (100 ng/ml)			
S.O.C.-Medium (fertig geliefert)	2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM Sodiumchlorid, 2,5 mM Potassiumchlorid, 10 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Magnesiumsulfat, 20 mM Glucose			

3.6 Zellen

3.6.1 Primäre Zellen

Periphere Blutleukozyten (PBL) von gesunden Spendern und Patienten wurden mit dem Einverständnis der Spender gemäß der Erklärung von Helsinki des Weltärztebundes zu ethischen Grundätzen für die medizinische Forschung am Menschen und gemäß des Ethikvotums der lokalen Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München entnommen.

Tabelle 3.3 Primäre Zellen

Zellen	Beschreibung	Kultur-medium	Quelle
PBL	Periphere Blutleukozyten, gewonnen aus Vollblut mittels Dichtegradienten-zentrifugation	T-Zell-Medium oder Klon-Medium	freiwillige gesunde Spender
B-Zellen	Gewonnen aus PBL mittels E-Rosetting	B-Zell-Medium	freiwillige gesunde Spender
CLL	PBL von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie, 50 % bis 95 % CD5+CD19+-Zellen	B-Zell-Medium	Hämato-Onkologische Praxis Prof. Dr. C. Salat, München
PBL-Pool	PBL-Gemisch von mindestens vier gesunden männlichen kaukasischen Spendern; Verwendung für Restimulation von T-Zellen	T-Zell-Medium oder Klon-Medium	IMI, Helmholtz Zentrum München

3.6.2 Zelllinien und Bakterien

Tabelle 3.4 Zelllinien und Bakterien

Zelllinie	Beschreibung	Kulturmedium	Quelle / Referenz
BJAB	EBV-negative Lymphom-Zelllinie, HLA-A2+	RPMI (10 % FKS)	Joseph Mautner, Helmholtz Zentrum München
C1R	B-Zelllinie	RPMI (10 % FKS)	S. Stevanovic
C1R A*0201	C1R, transfiziert mit A*0201	RPMI (10 % FKS) 0,8 mg/ml G418	S. Stevanovic
C1R A*3303	C1R, transfiziert mit A*3303	RPMI (10 % FKS) + 0,5 mg/ml G418	S. Stevanovic
C1R A*6601	C1R, transfiziert mit A*6601	RPMI (10 % FKS) + 0,25 mg/ml Hygromycin	S. Stevanovic

Zelllinie	Beschreibung	Kulturmedium	Quelle / Referenz
CD40L-Fibroblasten	NIH3T3-Fibroblasten, exprimieren CD40L	CD40L-Medium mit 400 µg/ml G418	Boston, USA (Krackhardt et al, 2002a)
Daudi	Burkitts Lymphom B-Lymphoblasten, β_2-Mikroglobulin-defizient (ATCC CCL-213)	RPMI (10% FKS)	Helmholtz Zentrum München
DG75	EBV-negative Burkitts-Lymphom-Zelllinie, HLA-A2+ (ATCC CRL-2625)	RPMI (10% FKS)	Joseph Mautner, Helmholtz Zentrum München
HEK 293 / 293T	Embryonale Nierenzellen, HLA-A2+ (ATCC CRL-1573)	RPMI (10 % FKS)	Joseph Mautner, Helmholtz Zentrum München
IVSB ZTL	Klonale ZTL-Linie; HLA-A*0201-restringiert; spezifisch für das $Tyrosinase_{369}$-Epitop	IVSB-Medium	Wölfel, T. (Wolfel et al, 1994)
Jurkat76	TZR-defiziente CD4+ T-Zellen	RPMI (10 % FKS)	Mirjam Heemskerk, Leiden, Niederlande
Jurkat76-CD8α	TZR-defiziente CD4+ T-Zellen, transduziert mit CD8α	RPMI (10 % FKS)	Wolfgang Uckert, MDC, Berlin
K562	humane Chronische myeloide Leukämie (CML)-Zelllinie, MHC-Klasse-I-defizient (ATCC CCL-243)	RPMI (10 % FKS)	Helmholtz Zentrum München
K562-A2	K562, transfiziert mit HLA-A2	RPMI (10 % FKS) + 1 mg/ml G418	(Britten et al, 2002)
KT187	Nierenzellkarzinomlinie, HLA-A2-	RPMI (10 % FKS)	DKFZ, Heidelberg
Lungen-fibroblasten	143 TK-, HLA-A2+	RPMI (10 % FKS)	Ralph Mocikat, IMI, Helmholtz Zentrum München
Lymphoblastoide Zelllinien (LCL)	EBV-transformierte B-Zelllinien	RPMI (10 % FKS)	(siehe Tabelle 3.5)
Raji	Burkitts-Lymphom-Zelllinie, HLA-A2- , EBV+ (ATCC CCL-86)	RPMI (10 % FKS)	Helmholtz Zentrum München
RCC26	humane Nierenzellkarzinomzelllinie, HLA-A2+	RPMI (10 % FKS)	IMI, Helmholtz Zentrum München
SK29-Mel1	Melanomzelllinie	RPMI (10 % FKS)	Wölfel, T. (Wolfel et al, 1994)
T2	TAP-defizienter Hybrid einer T- und B-lympho-blastoiden Zelllinie; HLA-A2+, (ATCC CRL-1992)	RPMI (10 % FKS)	IMI, Helmholtz Zentrum München (Salter und Cresswell, 1986)
TOP10	Chemisch kompetente E.coli-Bakterien	LB-Broth-Medium	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 3.5 EBV-transformierte lymphoblastoide Zelllinien (LCL)

LCL	HLA-A	HLA-B	HLA-C	Workshop-Nummer*
1 (AK-EBV-B)	A*0201/A6801			(Wolfel et al, 1994)
2 (k. w. N.)	A2	B*8/B*60		IMI
3 (k. w. N.)	A2			IMI
4 (JY)	A*0201	B*0702	Cw*0702	9287
5 (RML)	A*0204	B*5101	Cw*1502	9016
6 (WT49)	A*0205	B*5801		9285
7 (CLA)	A*0206/A*24	B*8/B*35	Cw*7	9209
8 (TABO89)	A*0207	B*4601	Cw*0102	9066
9 (KLO)	A*0208	B*8/B*50	Cw*7/Cw*6	9213
10 (OZB)	A*0209/A3	B*39/B*35	Cw*4	9216
11 (XLIND)	A*0210/A*30	B*13/B*61	Cw*6	9220
12 (TUBO)	A*0216/A*0301	B*5101	Cw*0704/Cw*1501-3	9045
13 (AMALA)	A*0217	B*1501	Cw*0303	9064
14 (PMG075)	A*3301/A*0301	B*1402	Cw*0802	9078
15 (Jo 528239)	A*0101	B*3502	Cw*0401	9041
16 (BM15)	A*0101	B*4901	Cw*0701	9040
17 (BM21)	A*0101	B*4101	Cw*1701	9043
18 (VAVY)	A*0101	B*0801	Cw*0701	9023
19 (HOM2)	A*0301	B*27.052	Cw*0102	9005
20 (KAS116)	A*2402	B*5101	Cw*1203	9003
21 (DKB)	A*2402	B*4001	Cw*0304	9075
22 (YAR)	A*2601	B*3801	Cw*1203	9026
23 (SWEIG007)	A*2902	B*40.02	Cw*02022	9037
24 (DUCAF)	A*3002	B*1801	Cw*0501	9019
25 (k. w. N.)	A*3/A*31	B*5101/B*3503	Cw*0602/Cw*15	IMI
26 (IBW9)	A*3301	B*1402	Cw*0802	9049
27 (LWAGS)	A*3301	B*1402	Cw*0802	9079
28 (HOR)	A*3303	B*44031	Cw*1401	9053
29 (k. w. N.)	A*3303/A*0101	B*08/B*27052	Cw*0701/Cw*0202	IMI
30 (AMAL)	A*6802	B*5301	Cw*0401	9010
31 (RSH)	A*6802/A*3001	B*4201	Cw*1701	9021

* falls nicht anders angegeben: Workshop-Reference Panel (Prasad und Yang, 1996)
„IMI“: hergestellt im Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München
k. w. N.: kein weiterer Name

3.7 Peptide

Die meisten Peptide wurden bei der Firma BIOSYNTAN hergestellt. Die Reinheit der Peptide lag bei > 90 % und wurde mittels Flugzeitmassenspektrometrie am MALDI-TOF von der Firma Shimadzu gemessen. Die Stockkonzentration betrug jeweils 2 mM (Ausnahme: Tyrosinase$_{369}$ c_{stock} = 20 µg/µl).

Tabelle 3.6 Peptide

Peptid	Sequenz	Beschreibung	Hersteller
Flu (MP58)	GILGFVFTL	bindet HLA-A2 (Nijman et al, 1993)	BIOSYNTAN GmbH, Berlin
FMNL1-PP1	VLLEYLAFA	prädiziert, bindet HLA-A2	BIOSYNTAN GmbH, Berlin
FMNL1-PP2	RLPERMTTL	prädiziert, bindet HLA-A2	BIOSYNTAN GmbH, Berlin
FMNL1-PP6	CVNEIALSL	prädiziert, bindet HLA-A2	BIOSYNTAN GmbH, Berlin
FMNL1-PP7	RLRLTESDKL	prädiziert	BIOSYNTAN GmbH, Berlin
FMNL1-PP8	TLLHYLVKV	prädiziert, bindet HLA-A2	BIOSYNTAN GmbH, Berlin
FRL-PP1	RLPERMNTL	prädiziert, bindet HLA-A2, Peptid des murinen FMNL1-Homolog	BIOSYNTAN GmbH, Berlin
HDAC6-PP1 (862-871)	RLAERMTTR	prädiziert, bindet HLA-A2	BIOSYNTAN GmbH, Berlin
Her2/neu$_{369}$ (369-378)	KIFGSLAFL	bindet HLA-A2 (Fisk et al, 1995)	BIOSYNTAN GmbH, Berlin
IPS pp65 (123-131)	IPSINVHHY	bindet HLA-B35 Cytomegalovirus (Gavin et al, 1993)	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Andreas Moosmann
Tyrosinase$_{369}$ (369-377)	YMDGTMSQV	bindet HLA-A2 (Mosse et al, 1998)	Genzentrum, München

3.8 Multimere und Antikörper

Tabelle 3.7 Multimere

Multimer	Peptidsequenz	Konjugation	Quelle
HLA-A*0201-FMNL1-PP2 (Hβ2m)	RLPERMTTL	PE	Dirk Busch, TU München
HLA-A*0201-Flu (MP58) (Hβ2m)	GILGFVFTL	PE	Dirk Busch, TU München
HLA-A*0201-Her2/neu$_{369}$ (Hβ2m)	KIFGSLAFL	PE	Dirk Busch, TU München
HLA-A*0201-pp65 (495-503, Cytomegalovirus) (Hβ2m)	NLVPMVATV	PE	Dirk Busch, TU München
HLA-B7-pp65 (495-503, Cytomegalovirus) (Hβ2m)	NLVPMVATV	PE	Dirk Busch, TU München
HLA-A*0201-BC2 (Hβ2m)	YLGPGCQAL	PE	Dirk Busch, TU München

Tabelle 3.8 Antikörper

Antikörper	Klon	Isotyp	Konjugation	Hersteller
F_c-Blockier-Antikörper (50 µg/ml)		IgG_{2A}, IgG_{2B}	-	Elisabeth Kremmer, Helmholtz Zentrum München
αHLA-A2	HB54	IgG1	-	Elisabeth Kremmer, Helmholtz Zentrum München
IgG 2b κ	27-35	IgG 2b κ	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
IgG1 κ	MOPC-21	IgG1 κ	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
IgG1 κ	MOPC-21	IgG1 κ	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
α-hCCR7	2H4	IgM	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
α-hCD14	M5E2	IgG2a	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
α-hCD19	HIB19	IgG1 κ	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
α-hCD25		IgG1 κ	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
α-hCD27	L128	IgG1 κ	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
α-hCD28	JJ319	IgG1 κ	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
α-hCD28	CD28.2	IgG1 κ	-	Becton Dickinson, Heidelberg
α-hCD3	OKT-3	IgG2a	-	Elisabeth Kremmer, Helmholtz Zentrum München
α-hCD3	UCHT1	IgG1 κ	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
α-hCD4	RPA-T4	IgG1 κ	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
α-hCD45 RA	L48	IgG1 κ	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
α-hCD45RO	UCHL1	IgG2a	PE	Becton Dickinson, Heidelberg

Antikörper	Klon	Isotyp	Konjugation	Hersteller
α-hCD5	BL1a	IgG2a	FITC	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
α-hCD56	B159	IgG1 κ	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
α-hCD62L	DREG-56	IgG1 κ	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
α-hCD8	RPA-T8	IgG1 κ	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
α-hCD8	HIT8a	IgG1 κ	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
α-hCD8	RPA-T8	IgG1 κ	APC	Becton Dickinson, Heidelberg
α-hCD80	MAB104	IgG1	PE	Immunotech (Coulter) Marseille, Frankreich
α-hCD83	HB15e	IgG1 κ	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
α-hCD86	2331	IgG1 κ	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
α-HLA-A2	BB7.2	IgG 2b	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
α-hVβ14	CAS1.1.3	IgG1	FITC	Immunotech (Coulter) Marseille, Frankreich
α-hVβ14	CAS1.1.3	IgG1	PE	Immunotech (Coulter) Marseille, Frankreich
αß-human TCR	T10B9.1A -31	IgM κ	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
αß-murine TCR	HB 218	IgG	FITC	ATCC

3.9 DNS-Material

3.9.1 Vektoren für retroviralen T-Zellrezeptor-Transfer

Tabelle 3.9 Vektoren

Vektor	Beschreibung	Resistenz	Quelle
pALF10A1 (“env”)	Gen der 10A1-Virushülle des murinen Leukämievirus unter Friend-Maus-Leukämie-Virus-LTR-Kontrolle	Ampicillin	Wolfgang Uckert, Berlin (Stitz et al, 2000)
pcDNA3.1-MLV g/p (“gag-pol”)	Gene für gruppenspezifische Antigene und Polymerasen unter Kontrolle des CMV-Promotors	Ampicillin	Wolfgang Uckert, Berlin, Chrisopher Baum, Hannover
pMP71G$_{PRE}$	Retroviraler Vektor mit eGFP-Markergen unter MPSV-LTR-Kontrolle, ergänzt durch mSS und PRE	Ampicillin	Wolfgang Uckert, Berlin (Engels et al, 2003)

Vektor	Beschreibung	Resistenz	Quelle
mit TZR-Einbau:			
pMP71G$_{PRE}$ & SK22α	pMP71G$_{PRE}$ mit humanem FMNL1-PP2-spezifischem TZR-SK22 (α-Kette), ohne eGFP	Ampicillin	in der vorliegenden Arbeit hergestellt
pMP71G$_{PRE}$ & SK22β	pMP71G$_{PRE}$ mit humanem FMNL1-PP2-spezifischem TZR-SK22 (β-Kette), ohne eGFP	Ampicillin	in der vorliegenden Arbeit hergestellt
pMP71G$_{PRE}$ & SK22 βP2Aα	pMP71G$_{PRE}$ mit humanem FMNL1-PP2-spezifischem TZR-SK22 (β-Kette-P2A-α-Kette), ohne eGFP	Ampicillin	in der vorliegenden Arbeit hergestellt
pMP71G$_{PRE}$ & SK22 βmuP2Aαmu	pMP71G$_{PRE}$ mit humanem FMNL1-PP2-spezifischem TZR-SK22 mit konstanter Kette aus der Maus (mu) (β-Kette mu-P2A-α-Kette mu), ohne eGFP	Ampicillin	in der vorliegenden Arbeit hergestellt
pMP71G$_{PRE}$ & P14 βP2Aα	pMP71G$_{PRE}$ mit murinem TZR P14 (β-Kette-P2A-α-Kette), ohne eGFP, Aminosäurenaustausch an Position 363 A→V	Ampicillin	Hergestellt im Labor Wolfgang Uckert, Berlin (Sommermeyer et al, 2006)
pMP71G$_{PRE}$ & D1α	pMP71G$_{PRE}$ mit humanem Her2/neu$_{369}$-spezifischem TZR-D1 (α-Kette), ohne eGFP	Ampicillin	hergestellt von Luise Weigand und Xiaoling Liang (AG Angela Krackhardt)
pMP71G$_{PRE}$ & D1β	pMP71G$_{PRE}$ mit humanem Her2/neu$_{369}$-spezifischem TZR-D1 (β-Kette), ohne eGFP	Ampicillin	hergestellt von Luise Weigand und Xiaoling Liang (AG Angela Krackhardt)

3.9.2 Primer

Die Primer wurden bei Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg, oder Sigma-Aldrich, Taufkirchen, synthetisiert. Alle Primer sind in 5' → 3'-Richtung angegeben.

3.9.2.1 Primer für das T-Zellrezeptor-Repertoire

Die Nomeklatur bezieht sich auf B. Arden (Arden et al, 1995).

T-Zellrezeptor-α-Kette – Repertoire (Steinle et al, 1995)

Konzentration: 2,5 pmol/µl, falls nicht anders angegeben

P-5'αST	CTG TGC TAG ACA TGA GGT CT	
P-3'αST	CTT GCC TCT GCC GTG AAT GT	
3'T-Cα	GGT GAA TAG GCA GAC AGA CTT GTC ACT GGA	c = 5 pmol/µl

PANVα1	AGA GCC CAG TCT GTG ASC CAG	S = C/G
PANVα1.1	AGA GCC CAG TCR GTG ACC CAG	R = A/G
Vα2	GTT TGG AGC CAA CRG AAG GAG	
Vα3	GGT GAA CAG TCA ACA GGG AGA	
Vα4	TGA TGC TAA GAC CAC MCA GC	
Vα5	GGC CCT GAA CAT TCA GGA	
Vα6	GGT CAC AGC TTC ACT GTG GCT A	
Vα7	ATG TTT CCA TGA AGA TGG GAG	
Vα8	TGT GGC TGC AGG TGG ACT	
Vα9	ATC TCA GTG CTT GTG ATA ATA	
Vα10	ACC CAG CTG CTG GAG CAG AGC CCT	
Vα11	AGA AAG CAA GGA CCA AGT GTT	
Vα12	CAG AAG GTA ACT CAA GCG CAG ACT	
Vα13	GAG CCA ATT CCA CGC TGC G	
Vα14.1	CAG TCC CAG CCA GAG ATG TC	
Vα14	CAG TCT CAA CCA GAG ATG TC	
Vα15	GAT GTG GAG CAG AGT CTT TTC	
Vα16	TCA GCG GAA GAT CAG GTC AAC	
Vα17	GCT TAT GAG AAC ACT GCG T	
Vα18	GCA GCT TCC CTT CCA GCA AT	
Vα19	AGA ACC TGA CTG CCC AGG AA	
Vα20	CAT CTC CAT GGA CTC ATA TGA	
Vα21	GTG ACT ATA CTA ACA GCA TGT	
Vα22	TAC ACA GCC ACA GGA TAC CCT TCC	
Vα23	TGA CAC AGA TTC CTG CAG CTC	
Vα24	GAA CTG CAC TCT TCA ATG C	
Vα25	ATC AGA GTC CTC AAT CTA TGT TTA	
Vα26	AGA GGG AAA GAA TCT CAC CAT AA	
Vα27	ACC CTC TGT TCC TGA GCA TG	
Vα28	CAA AGC CCT CTA TCT CTG GTT	
Vα29	AGG GGA AGA TGC TGT CAC CA	
Vα30	GAG GGA GAG AGT AGC AGT	
Vα31NEU	TCG GAG GGA GCA TCT GTG ACT A	
Vα32	CAA ATT CCT CAG TAC CAG CA	

T-Zellrezeptor-β-Kette – Repertoire (Steinle et al, 1995)

Konzentration: 2,5 pmol/µl, falls nicht anders angegeben

P-5βST	AAG CAG AGA TCT CCC ACA C	c = 5 pmol/µl
P-3βST	GAG GTA AAG CCA CAG TCT GCT	c = 5 pmol/µl
P-3CβII	GAT GGC TCA AAC ACA GCG ACC TC	c = 5 pmol/µl
Vβ1	GCA CAA CAG TTC CCT GAC TTG GCA C	c = 5 pmol/µl
Vβ2	TCA TCA ACC ATG CAA GCC TGA CCT	
Vβ3	GTC TCT ACA TAT GAG AGT GGA TTT GTC ATT	
Vβ5.1	ATA CTT CAG TGA GAC ACA GAG AAA C	
Vβ5.2	TTC CCT AAC TAT AGC TCT GAG CTG	Vß5.2+Vß5.2T 1:1 MIX c = 5 pmol/µl
Vβ6.1	GCC CAG AGT TTC TGA CTT ACT TC	
Vβ6.2	ACT CTG ASG ATC CAG CGC ACA	S=C/G
Vβ6.3	ACT CTG AAG ATC CAG CGC ACA	

Vβ7	CCT GAA TGC CCC AAC AGC TCT C	
Vβ8	ATT TAC TTT AAC AAC AAC GTT CCG	
Vβ8S3	GCT TAC TTC CGC AAC CGG GCT CCT	c = 5 pmol/µl
Vβ9	CCT AAA TCT CCA GAC AAA GCT	
Vβ10	CTC CAA AAA CTC ATC CTG TAC CTT	
Vβ11	TCA ACA GTC TCC AGA ATA AGG ACG	c = 5 pmol/µl
Vβ12	AAA GGA GAA GTC TCA GAT	c = 5 pmol/µl
Vβ12S3	GCA GCT GCT GAT ATT ACA GAT	
Vβ13	TCG ACA AGA CCC AGG CAT GG	
Vβ13.1	CAA GGA GAA GTC CCC AAT	
Vβ13.2	GGT GAG GGT ACA ACT GCC	c = 5 pmol/µl
Vβ13S5	ATA CTG CAG GTA CCA CTG GCA	
Vβ14	GTC TCT CGA AAA GAG AAG AGG AAT	
Vβ15	AGT GTC TCT CGA CAG GCA CAG GCT	c = 5 pmol/µl
Vβ16	AAA GAG TCT AAA CAG GAT GAG TCC	
Vβ17	CAG ATA GTA AAT GAC TTT CAG	
Vβ18	GAT GAG TCA GGA ATG CCA AAG GAA	
Vβ19	CAA TGC CCC AAG AAC GCA CCC TGC	
Vβ20	AGC TCT GAG GTG CCC CAG AAT CTC	
Vβß21	AAA GGA GTA GAC TCC ACT CTC	
Vβ22.1	CAT CTC TAA TCA CTT ATA CT	c = 5 pmol/µl
Vβ22.2	AAG TGA TCT TGC GCT GTG TCC CCA	c = 5 pmol/µl
Vβ22.3	CTC AGA GAA GTC TGA AAT ATT CG	
Vβ23	GCA GGG TCC AGG TCA GGA CCC CCA	
Vβ24	ATC CAG GAG GCC GAA CAC TTC T	c = 5 pmol/µl
Vβ25	TGA AAA TGT CTT TGA TGA AAC AG	
Vβ26	CCT AAC GGA ACG TCT TCC AC	c = 5 pmol/µl
Vβ27	ATA CTG GAA TTA CCC AGA CAC	c = 5 pmol/µl
Vβ28	TAC ACA ATT CCC AAG ACA CAG	c = 5 pmol/µl

T-Zellrezeptor-β-Kette – degenerierte Primer (Zhou et al, 2006)

Konzentration: 5 pmol/µl

VP1	GCI ITK TIY TGG TAY MGA CA
VP2	CTI TKT WTT GGT AYC IKC AG
CP1	GCA CCT CCT TCC CAT TCA C

3.9.2.2 Primer für T-Zellrezeptor-Klonierung

Konzentration: 10 pmol/µl

Primer für T-Zellrezeptor-Klonierung

5' TCR beta NotI Kozak	CAG GCG GCC GCC ACC ATG GGC CCC CAG C
3' TCR beta C2 EcoR1	TGG AAT TCC TAG CCT CTG GAA TCC TTT CTC
3' TCR beta C2 P2A	TTC CAC GTC TCC TGC TTG CTT TAA CAG AGA GAA GTT CGT GGC GCC GCT TCC GCC TCT GGA ATC CTT TCT CTT GAC CAT GGC
5' TCR alpha NotI Kozak	TAG CGG CCG CCA CCA TGG CAT GCC CTG GCT TCC TG
3' TCR alpha C EcoR1	TGG AAT TCT CAG CTG GAC CAC AGC CGC AGC
5' TCR alpha P2A	AAC TTC TCT CTG TTA AAG CAA GCA GGA GAC GTG GAA GAA AAC CCC GGT CCC ATG GCA TGC CCT GGC TTC CTG TGG GCA CTT GT

Primer für die Klonierung der konstanten T-Zellrezeptor-Kette aus der Maus

(Quelle: Wolfgang Uckert, Daniel Sommermeyer, Berlin)

hVa rev	CTG GTA CAC GGC AGG TTC AGG GTT CTG GAT
mCa fwd	ATC CAG AAC CCT GAA CCT GCC GTG TAC CAG
P14a EcoRI rev	CCG GAA TTC TCA ACT GGA CCA CAG CCT CAG
hVb rev	CTT GGG TGG AGT CAC GTT TCT CAG GTC CTC
mCb fwd	GAG GAC CTG AGA AAC GTG ACT CCA CCC AAG
P14b P2A rev	TTC CAC GTC TCC TGC TTG CTT TAA CAG AGA GAA GTT CGT GGC GCC GCT TCC GGA ATT TTT TTT CTT GAC CAT GGC C

3.10 Computerprogramme und Internetseiten

Auswertung von durchflusszytometrischen Daten:
BD CellQuest™ Pro, FlowJo

Auswertung von DNS-Sequenzen und Planung von Klonierungen:
Sequencher 4.5, Clone Manager 7

Analyse der T-Zell-Rezeptor-Sequenzen:
IMGT (http://imgt.cines.fr)

Errechnung der Standardkurven (ELISA):
SigmaPlot 10.0

Auswertung der Bioplex-Daten:
BioPlex-Manager Software (Version 4.0)

Prädiktionsanalysen:

HLA-A2-Bindungsmotive:
www.syfpeithi.de
www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind

Proteasomale Schnittstellen:
www.paproc2.de

4 Methoden

4.1 Zellkulturmethoden

4.1.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

Alle verwendeten Zellen wurden bei 37 °C und 5 bis 6 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Die Arbeiten mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Arbeiten mit Retroviren oder ungetestetem Blut (Testung auf HIV, Hepatitis B und C) wurden unter den gentechnischen Sicherheitsbedingungen der Stufe S2 und biologischen Sicherheitsbedingungen L2 durchgeführt.

4.1.1.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

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

Zum Auftauen wurden die Zellen zunächst kurz bei 37 °C im Wasserbad aufgewärmt und sofort in Medium aufgenommen, gewaschen und je nach Zellart entsprechend in Kultur genommen.

4.1.1.2 Kultivierung von Zelllinien

Suspensionszellen wurden alle 3 bis 4 Tage in frisches Medium gegeben. Falls nötig wurde ein Antibiotikum als Selektionsdruck zugegeben (siehe Tabelle 3.4). Adhärente Zellen wurden ebenso alle 3 bis 4 Tage in neue Flaschen umgesetzt und frisches Medium zugegeben. Hierzu wurden sie noch in der Flasche einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml Trypsin von den Zellkulturflaschen gelöst und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Das Röhrchen wurde mit PBS aufgefüllt und abzentrifugiert (1800 rpm, 5 min). Nach Aufnahme in frischem Medium wurden die Zellen je nach Zellart 1:2 bis 1:20 geteilt und in neue Zellkulturflaschen überführt. Falls nötig wurde ein Antibiotikum als Selektionsdruck zugegeben (siehe Tabelle 3.4).

4.1.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in Trypanblau zur Lebend-Tot-Unterscheidung verdünnt. Trypanblau kann nur in tote Zellen eindringen und färbt diese blau. Unter dem Mikroskop wurden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die ungefärbten

lebenden Zellen in zwei bis vier Großquadraten gezählt, die toten ausgeschlossen und nach folgender Formel die Zellzahl bestimmt:

c [Zellen/ml] = Anzahl der Zellen / Anzahl der Großquadrate · Verdünnungsfaktor · 10^4

4.1.2 Peptidbeladung von T2-Zellen

T2-Zellen wurden zweimal serumfrei in RPMI gewaschen (Zentrifugation bei 1800 rpm 5 min), in AIM-V-Medium aufgenommen und eine Konzentration von 2 Mio Zellen/ml eingestellt. 5 µg/ml β_2-Mikroglobulin und Peptid in unterschiedlichen Konzentrationen (von 100 pM bis 100 µM) wurden hinzugegeben und 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden sie einmal gewaschen und in T-Zellmedium aufgenommen. Falls für die anschließende Verwendung notwendig (z. B. für die Stimulation von T-Zellen) wurden sie bei 35 Gy in der Bestahlungsanlage Gammacell 40 (Bezugsdatum: 15.06.1979, 125,8 R/min, Halbwertszeit von ^{137}Cäsium: 30 Jahre) bestrahlt.

4.1.3 Gewinnung von PBL aus Vollblut

Periphere Blutleukozyten Zellen (PBL) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Volllblut gewonnen. Bei der Blutabnahme wurden die Spritzen zur Gerinnungshemmung mit circa 200 µl Heparin benetzt (c_{stock} = 5000 I.E./ml). Das Blut wurde 1:1 in RPMI verdünnt. 15 ml Ficoll wurde mit 35 ml Blut-Medium-Mischung überschichtet und 20 min bei 2000 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurden die PBL-Schichten (Interphasen) gesammelt, mit RPMI verdünnt und abzentrifugiert. Das Zellsediment wurden erneut gewaschen, in T-Zellmedium aufgenommen und gezählt.

4.1.4 Isolation von B-Zellen

B-Zellen und Monozyten wurden aus PBL mittels dem sogenannten E-Rosetting (E: Erythrozyten) gewonnen. Hierbei werden die PBL mit Hammel-Erythrozyten inkubiert. CD2-positive Zellen (T- und NK-Zellen) binden an die Erythrozyten und können durch Dichtegradientenzentrifugation von den übrigen Zellen getrennt werden.

Hammel-Erythrozyten wurden mehrfach gewaschen und auf 5 % verdünnt und 1:1 mit PBL gut gemischt. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur (RT) wurde das Gemisch bei 400 rpm 10 min zentrifugiert und 1 h bei 37 °C inkubiert. Sehr vorsichtig wurden die Zellen resuspendiert und 10 ml RPMI zugegeben. 15 ml Ficoll wurde mit der Zellmischung unterschichtet. Es folgte ein Zentrifugationsschritt ohne Bremse bei 1100 rpm, der nach 20 min für weitere 10 min auf 1800 rpm hochgestellt wurde. Die Interphase wurde geerntet und zweimal gewaschen. Die erhaltenen Zellen wurden in B-Zellmedium aufgenommen und gezählt. Die Monozyten wuchsen nicht und konnten daher vernachlässigt werden.

4.1.5 Kultivierung von B-Zellen und CLL-Zellen

Isolierte CLL (chronische lymphatische Leukämie)- oder B-Zellen wurden auf bestrahlten (90 Gy) TCD40L-Fibroblasten unter Zugabe von Interleukin (IL)4 (5 ng/ml) und Cyclosporin A (0,66 µg/ml) in 6-Loch-Platten kultiviert. Nach 3 bis 4 Tagen wurden sie auf frische TCD40L-Platten umgesetzt. Die CD40-aktivierten CLL-Zellen wurden nach drei bis sieben Tagen für Versuche eingesetzt. B-Zellen wurden nach circa 14 Tagen für Versuche eingesetzt, wenn die Reinheit der Zellen bei mindestens 70 % lag. Die Reinheit wurde durchflusszytometrisch mit einem anti-CD19-Antikörper, der an B-Zellen bindet, bestimmt.

4.1.6 Unspezifische Stimulation von PBL

Zur unspezifischen Stimulation von PBL wurden diese für 3 Tage in T-Zellmedium mit IL2 (50 U/ml) und OKT3 (100 ng/ml) kultiviert.

4.1.7 Kultivierung von zytotoxischen T-Zellen

4.1.7.1 Kultivierung des T-Zellklons IVSB

Der zytotoxische T-Zellklon IVSB (Wolfel et al, 1994) (0,4 Mio Zellen) wurde mit bestrahlten (10 Gy) AK-EBV-B (0,2 Mio Zellen) und SK-29-Mel1 (0,1 Mio Zellen), IL2 (500 U/ml) und Mycoplasma Removal Agent (MRA, 0,5 µg/ml) in 1,5 ml IVSB-Medium je Loch einer 24-Loch-Platte stimuliert. Alle 3 bis 4 Tage wurde IL2 (125 U/ml) zugegeben. Die Zellen wurden alle 7 oder 14 Tage mit AK-EBV-B und SK-29-Mel1 restimuliert und frühestens 7 Tage nach Restimulation für Versuche eingesetzt.

4.1.7.2 Isolation von T-Zellen mittels magnetischer Körperchen

T-Zellen wurden aus PBL von HLA-A2-negativen, gesunden Spendern mit Hilfe magnetischer Körperchen (Dynal, Hamburg) negativ isoliert. Die Zellen wurden hierbei mit primären Antikörpern (αCD14, αCD16, αCD56, αHLA-II-DR/DP, αCD235a) markiert, die an alle PBL mit Ausnahme von T-Zellen binden. Mit magnetischen Körperchen gekoppelte Sekundärantikörper (humaner IgG_4- Antikörper anti Maus IgG) binden an den konstanten Teil (Fc, Fragment cristallizable) der Primärantikörper, wodurch mit Hilfe eines Magneten alle übrigen Zellen in den PBL von den T-Zellen separiert werden konnten.

Hierzu wurde nach der Anleitung des Herstellers verfahren: Die magnetischen Körperchen wurden gewaschen, die PBL wurden mit den Antikörpern in FKS 30 min bei 4 °C inkubiert und einmal gewaschen. Anschließend wurden die PBL mit magnetischen Körperchen 30 min bei 37 °C inkubiert, vorsichtig gemischt und zweimal dem Magneten ausgesetzt. Die im Überstand befindlichen T-Zellen wurden gesammelt, gewaschen und in T-Zellmedium

aufgenommen. Die Reinheit der Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt und lag bei > 95 %.

4.1.7.3 Stimulation von T-Zellen

Die mittels negativer Isolation gewonnenen T-Zellen wurden mit 10 µM peptidbeladenen, bestrahlten T2-Zellen in einem Effektor-Stimulator-Verhältnis von 10:1 zusammengegeben und spezifisch stimuliert. IL7 (10 ng/ml) und IL15 (10 ng/ml) wurden an Tag 0 (Primärstimulation) zugegeben und IL2 (50 U/ml) an Tag 1. An Tag 5 wurden die T-Zellen erneut mit 10 µM peptidbeladenen bestrahlten T2-Zellen im gleichen Verhältnis unter Zugabe von Zytokinen restimuliert. Bis zur Sortierung an Tag 12 wurden den Zellen alle drei Tage IL2 (50 U/ml) zugegeben.

Zunächst wurde der Stimulationsansatz zur Gewinnung allorestringierter peptidspezifischer T-Zellen etabliert (siehe Kapitel 5.2, S. 66). Zur Austestung der optimalen Kostimulation der T-Zellen wurden zusätzlich zu den peptidbeladenen T2-Zellen ein B7.1-Fusionsprotein, ein agonistischer CD28-Antikörper oder B-Zellen eingesetzt, die auf CD40L exprimierenden Fibroblasten (NIH3T3) aktiviert worden waren. Die bestrahlten B-Zellen wurden im Verhältnis 1:2 zu den T-Zellen in der Primärstimulation und/oder zur Restimulation eingesetzt. Das B7.1-Fusionsprotein wurde in einer Konzentration von 2 µg/ml in der Primärstimulation eingesetzt. Der CD28-Antikörper wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml in der Primärstimulation und/oder in der Restimulation verwendet.

Des Weiteren wurden verschiedene antigenpräsentierende Zellen (APZ) getestet. T-Zellen wurden mit 10 µM peptidbeladenen K562-A2 im Verhältnis 10:1 in der Primärstimulation stimuliert. Außerdem wurden die T-Zellen in unterschiedlichen Verhältnissen (10:1, 100:1) mit CLL-Zellen, die auf CD40L exprimierenden Fibroblasten aktiviert worden waren, in der Primär- oder Restimulation stimuliert.

4.1.7.4 Klonierung sortierter T-Zellen

Nach der Sortierung Multimer-positiver T-Zellen aus einem Primärstimulationsansatz mittels Durchflusszytometrie (siehe Kapitel 4.2.2) wurden die Zellen zum einen als Zelllinie angesetzt, zum anderen mittels Verdünnungsverfahren kloniert. Für die Zelllinie wurden circa 4000 Zellen in einem 96-Loch einer Rundbodenplatte kultiviert. Im Verdünnungsverfahren wurden die sortierten Zellen entweder sofort (Primärklone), oder nach 14 Tagen aus der Zelllinie (Subklone) kultiviert. Hierzu wurden sie so verdünnt, dass sich rechnerisch eine Zelle pro Loch in einer 96-Loch-Rundboden-Platte befand (limitierendes Verdünnungsverfahren).

Alle kultivierten Zellen wurden je Loch einer 96-Loch-Platte mit 50 000 Zellen eines mit 60 Gy bestrahlten allogenen PBL-Pools aus verschiedenen Spendern im Klon-Medium stimuliert unter Zugabe von IL2 (50 U/ml), IL7 (5 ng/ml), IL15 (5 ng/ml) sowie OKT3 (30 ng/ml). Alle 3 bis 4 Tage wurde IL2 zugegeben und alle 14 Tage wurden die Zellen wieder mit wechselndem PBL-Pool restimuliert.

4.2 Durchflusszytometrie

4.2.1 Färbung von Oberflächenmolekülen

Oberflächenmolekülen von Zellen wurden mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper und der Durchflusszytometrie detektiert. Maximal 0,2 Mio Zellen wurden je Röhrchen angesetzt. Zellen, die Fc-Rezeptoren (Fc: Fragment crystallizable) besaßen, wurden mit 50 µl Humanserum oder unmarkierten Antikörper-Mix (IgG_{2A} und IgG_{2B}, je 50 µg/ml) 10 min auf Eis blockiert, um eine unspezifische Bindung der antigenspezifischen Antikörper mit ihrem Fc-Teil zu verhindern. Nach Waschen mit FACS-Puffer (PBS mit 1 % FKS) wurden die Zellen mit dem spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörper (FITC: Fluorescein Isothiocyanat, PE: Phycoerythrin oder APC: Allophycocyanin) circa 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach nochmaligem Waschen wurden die Zellen in 50 µl FACS-Puffer aufgenommen. Gegebenenfalls wurden die Zellen zur Lebend-Tot-Unterscheidung mit Propidium-Iodid (PI, 0,5 µg/ml) markiert. Anschließend wurden die Zellen am Durchflusszytometer (FACS Calibur oder LSRII; BD, Heidelberg) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm CellQuest Pro (BD) oder Flowjo (TreeStar Corp).

Für die Negativkontrollen wurden Antikörper irrelevanter Spezifität eingesetzt, die aber denselben Isotypen wie die spezifischen Antikörper besaßen.

4.2.2 Sortierung von Zellen am Durchflusszytometer

Multimere sind fluoreszenzbeladen und bestehen aus mehreren MHC-Klasse-I-Molekülen, die mit Peptid beladen sind. Sie binden an T-Zellrezeptoren, die für dieses MHC-Molekül im Zusammenhang mit einem bestimmten Peptid spezifisch sind.

Um Multimer-spezifische Zellen aus der Hauptkultur zu sortieren, wurden T-Zellen aus dem Primärstimulationsansatz (siehe Kapitel 4.1.7.3) an Tag 12 mit dem Multimer gefärbt, welches das Peptid trug, mit dem die T2-Zellen zur Stimulation der T-Zellen beladen worden waren. In einem sterilen 4 ml Röhrchen wurden zu 4 Mio Zellen 6 µl Multimer in einem Volumen von 100 µl zugegeben und 25 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 4 µl eines CD8-APC-Antikörpers zugegeben und erneut 20 min auf Eis inkubiert. Die

Zellsuspension wurden mit 4 ml sterilem FACS-Puffer aufgefülllt, bei 1800 rpm 5 min zentrifugiert und wieder in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen. Als Kontrollzellen dienten ungefärbte und mit dem entsprechenden Isotyp-Kontrollantikörper gefärbte Zellen.

Anschließend wurden die Zellen durch Dr. Joachim Ellwart und Karin Nispel (IMI, Helmholtz Zentrum München) am Durchflusszytometer (MoFlow, Dako, Hamburg) sortiert, in Klon-Medium aufgefangen und restimuliert (siehe Kapitel 4.1.7.4).

4.3 Funktionelle Analysen

4.3.1 Koinkubation (Stimulationsansatz)

Für Funktionsanalysen wurden T-Zellen mit verschiedenen Zielzellen koinkubiert. Die T-Zellen wurden 7 bis 14 Tage nach der letzten Restimulation eingesetzt. 2 bis 3 Tage vor dem Stimulationsansatz wurden keine Zytokine mehr zugegeben. Für die Koinkubation wurden die T-Zellen (Effektoren, E) mit den Zielzellen (Stimulatoren, Targets, T) in verschiedenen Verhältnissen (E:T = 1:5, 1:2, 1:1, mit T = 10 000 Zellen) in einem Volumen von 200 µl je Loch einer 96-Loch-Platte im Brutschrank angesetzt. Zur internen Kontrolle wurden die Effekor- und Stimulatorzellen jeweils alleine im Loch inkubiert. Eine Mediumkontrolle wurde ebenso mitgeführt. Nach 24 h wurde 150 µl des Überstandes entnommen und bei -20 °C gelagert. Zytokinkonzentrationen in den Überständen wurden mittels ELISA oder Bioplex gemessen.

4.3.2 IFNγ-ELISA

Die IFNγ-Freisetzung (Interferon γ) von Effektorzellen wurde im Zellkulturüberstand aus der Koinkubation mit Zielzellen im ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) mit Hilfe des “OptEIA Human IFNγ Set” nach Angaben des Herstellers (BD, Heidelberg) gemessen.

Prinzipiell wurde wie folgt vorgegangen: Eine 96-Loch-Flachboden-Platte wurde mit einem Fänger-Antikörper, in Carbonatpuffer verdünnt, über Nacht (ÜN) bei 4 °C beschichtet und danach 1 h bei RT mit 1 %igem Milchpulver (in PBS) blockiert. Das im Kit enthaltene IFNγ-Standardprotein mit bekannter Konzentration wurde in demselben Medium aufgenommen wie die Zellen in der Koinkubation und in einer Konzentrationsreihe verdünnt. 50 µl Standard und 50 µl Koinkubationsüberstand wurden 1 h bei RT auf den Platten inkubiert. Nachdem die IFNγ-Moleküle an die Fänger-Antikörper auf der Platte gebunden hatten, wurde ein biotinylierter Maus-Anti-IFNγ-Detektions-Antikörper zusammen mit Avidin-konjugierter Rettich-Peroxidase zugegeben. Als Substrat für die Peroxidase dienten Hydrogenperoxid in Kombination mit Tetramethylbenzidin (Substrat Reagenz A und B). Die enzymatische

Reaktion (Blaufärbung) wurde mit 1 M Phosphorsäure gestoppt (Gelbfärbung). Die Farbintensität ist proportional zur Menge an gebundenem IFNγ. Die Extinktion wurde bei 450 nm am Photometer Sunrise (Tecan, Groot-Bijgaarden, Belgien) gemessen. Die IFNγ-Konzentrationen der Proben wurden mit Hilfe der Standard-Kurve berechnet. Hierzu wurde folgende Formel zur Berechnung einer sigmoidalen Kurve mit 5 Parametern angewendet:

$$y = y_0 + \frac{a}{1 + e^{-\left(\frac{x - x_0}{b}\right)^c}}$$

Alle gezeigten Daten sind Mittelwerte mit den Abweichungen, die sich aus Koinkubationsduplikaten oder -triplikaten ergaben.

4.3.3 Multiplex-Verfahren

Mit Hilfe des Multiplex-Verfahrens (Bio-Rad, München) können mehrere Zytokine gleichzeitig im Probenüberstand gemessen werden. Zytokinspezifische Antikörper sind hierbei an Polystyren-Kügelchen gebunden, die in verschiedenen Verhältnissen mit zwei verschiedenen Fluorophoren beladen sind. Jeweils 10 Farbabstufungen stehen pro Fluorophor zur Verfügung, so dass es 100 mögliche Farbkodierungen für die Kügelchen gibt und somit 100 verschiedene Zytokine gleichzeitig in dem Kulturüberstand oder Serum gemessen werden können. Die Quantifizierung des jeweiligen Zytokins erfolgt mit Hilfe eines weiteren Antikörpers, der ebenso an das Zytokin direkt gebunden ist und über eine Biotin-Streptavidin-Brücke PE-gekoppelt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde der „Bio-Plex Human Cytokine 8-Plex A Panel“ zur Messung acht verschiedener Zytokine (IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, GM-CSF, IFNγ, TNFα) durchgeführt. Hierbei wurde nach der Anleitung des Herstellers (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) verfahren.

Prinzipiell wurde wie folgt vorgegangen: Zunächst wurden monoklonale Fänger-Antikörper zugegeben, die an ein Kügelchen bestimmter Fluoreszenz gekoppelt waren. Nach Bindung der Fänger-Antikörper an ihr jeweiliges Zytokin wurde ein biotinylierter Antikörper hinzugefügt, der ein anderes Epitop auf dem jeweiligen Zytokin erkannte. PE-konjugiertes Streptavidin konnte an den biotinylierten Antikörper binden und quantifiziert werden. Die verschiedenen Fluoreszenzen wurden von einer Photozelle im Bio-Plex-Arrayreader des Luminex Bio-Plex Systems (Bio-Rad, München) gemessen. Die Eigenfluoreszenz des Kügelchens gab hierbei Aufschluss über die Art des Zytokins, die Intensität der zweiten Fluoreszenz (PE) über die Menge des sezernierten Zytokins. Im Bio-Plex-Kit enthaltene Zytokin-Standard-Mischungen mit definierten Konzentrationen ermöglichten eine Quantifizierung jedes Analyten über seine individuelle Standardkurve. Die Konzentrationen der Analyten wurden automatisch von der BioPlex-Manager Software (Version 4.0) berechnet.

50 µl der Kulturüberstände aus den Koinkubationsansätzen (siehe Kapitel 4.3.1, S. 42) wurden je Reaktion eingesetzt. Als Negativkontrollen dienten die im Koinkubatinsansatz verwendeten Medien und die Zielzellen- bzw. Stimulatorzellen alleine. Die Proben wurden zusammen mit den Standards und der entsprechenden Verdünnungsreihe auf derselben 96-Loch-Analyseplatte aufgetragen.

4.3.4 Thymidin-Proliferationsversuch

Zur Untersuchung der Proliferation von T-Zellen in Reaktion auf unterschiedliche Stimulationen wurde ein Thymidin-Proliferationsversuch durchgeführt. Hierbei wurde mit Tritium (^{3}H) radioaktiv markiertes Thymidin zu den Zellen gegeben, welches in die DNS der Zellen eingebaut wurde, wenn sie sich teilten.

In dem durchgeführten Versuch wurde der Einfluss von Stimulatorzellen mit und ohne zusätzlicher Kostimulation auf die T-Zellen in der Primärstimulation (Tag 0) und in der Restimulation (Tag 5) in unterschiedlichen Konditionen untersucht. Die T-Zellen wurden hierbei ähnlich wie in Kapitel 4.1.7.3 (S. 40) beschrieben stimuliert. Mit 10 µM Tyrosinase$_{369}$-Peptid beladene und bestahlte (35 Gy) T2- und K562-A2-Zellen wurden als antigen-präsentierende Zellen in der Primär- und Restimulation im Verhältnis 1:10 zu den T-Zellen eingesetzt. Zur Austestung von zusätzlicher Kostimulation auf die Proliferation der T-Zellen wurden bestrahlte (35 Gy) B-Zellen, die auf CD40L exprimierenden Fibroblasten aktiviert worden waren, im Verhältnis 1:2 zu den T-Zellen in der Primärstimulation und/oder zur Restimulation eingesetzt. Das B7.1-Fusionsprotein wurde in einer Konzentration von 2 µg/ml in der Primärstimulation eingesetzt. Ein antiCD28-Antikörper wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml in der Primärstimulation und/oder in der Restimulation verwendet. Die Zellen wurden zunächst in 24-Loch-Platten angesetzt.

Zur Restimulation wurden die Zellen dann in 96-Loch-Platten überführt, wobei 20 000 T-Zellen je Loch (V_{gesamt} = 150 µl) eingesetzt wurden. Zwei Tage nach der Restimulation wurde zu den Ansätzen 50 µl vorverdünntes radioaktiv markiertes Thymidin (1 mCi/ml = 37 MBq/ml, 1:100 in Medium verdünnt) zugegeben. Wiederum 19 h später wurden die Zellen geerntet und auf Filterplatten übertragen. Nicht eingebautes Thymidin wurde mit Methanol und Wasser an der Waschanlage Filtermate 196 (Perkin Elmer, Waltham, USA) in mehreren Waschgängen entfernt, und die Platten wurden 24 h unter dem Abzug getrocknet. Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Top count NXT (Perkin Elmer, Waltham, USA).

4.3.5 Chrom-Freisetzungsversuch

Zur Untersuchung der zytotoxischen Aktivität von T-Zellen wurden 4 h Standard ^{51}Chrom-Freisetzungs-Versuche durchgeführt. Die T-Zellen (Effektorzellen) wurden 7 bis 14 Tage

nach der letzten Restimulation eingesetzt und 2 bis 3 Tage vor dem Stimulationsansatz keine Zytokine mehr zugegeben. Zielzellen wurden 1 bis 1,5 h mit circa 50 µCi (= 1,85 MBq) ^{51}Chrom im Brutschrank inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die jetzt radioaktiv markierten Zielzellen in RPMI (10 % FKS) aufgenommen, gezählt und verdünnt. In verschiedenen Effektor zu Zielzell-Verhältnissen (E:T = 1:1 bis 100:1) wurden die Zielzellen zu den T-Zellen (in 50 µl) gegeben, wobei jeweils 2000 Zielzellen (in 50 µl) eingesetzt wurden. Das Gesamtvolumen in den 96-Loch-Platten betrug also 100 µl. Nach 4 h Inkubation im Brutschrank wurden 50 µl Überstand je Loch entnommen und auf Lumaplatten übertragen und über Nacht getrocknet. Die aus den Zielzellen freigesetzte Radioaktivität (cpm, counts per minute) wurde am Top count NXT (PerkinElmer, Waltham, USA) gemessen. Der Prozentsatz der spezifischen Lyse wurde wie folgt berechnet:

Zytotoxizität [%] = (Probenwert - Spontanwert) / (Maximalwert - Spontanwert) · 100.

Zur Ermittlung des Spontanwertes (spontane Lyse) wurden die Zielzellen ohne T-Zellen in einem Volumen von 100 µl inkubiert und 50 µl Überstand, wie bei den Proben gemessen. Für den Maximalwert (maximale Lyse der Zielzellen) wurden 50 µl Zielzellen (= 2000 Zellen) direkt und ohne Verdünnung auf die Lumaplatten pipettert. Die Menge an Radioaktivität, die von den unverdünnten Zielzellen direkt freigesetzt wurde, lag rechnerisch doppelt so hoch wie die freigesetzte Radioaktivität in den 1:1 verdünnten Proben. Der Wert wurde daher durch zwei geteilt. Die spontane Lyse sollte nicht mehr als 15 % der Maximallyse betragen.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Analyse des T-Zellrezeptor (TZR)-Vαβ-Repertoires

4.4.1.1 RNS-Isolation

Für die RNS-Extraktion aus T-Zellen wurden circa 0,1 Mio Zellen abzentrifugiert und das Sediment in 200 µl Tri-Reagent aufgenommen, gemischt und 5 min bei RT stehen gelassen. 10 µg Hefe-tRNS und 40 µl 1-Bromo-3-Chloro-Propan wurden zugegeben, gemischt und 1 bis 15 min bei RT stehen gelassen. Nach 15 min Zentrifugation bei 4 °C wurde die obere, wässrige, RNS-enthaltende Phase entnommen und somit von den Proteinen (organische untere Phase) und der DNS (Interphase) getrennt. 100 µl Isopropanol wurden zugegeben und über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Sediment mit 75 %igem Ethanol gewaschen (Zentrifugation 12 000 rpm, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde erneut verworfen und die RNS kurz an der Luft getrocknet und in 20 µl aufgenommen. Die RNS-Konzentration wurde am Spektrometer durch Messung der optischen Dichte bestimmt. Die RNS wurde bei -80 °C gelagert.

4.4.1.2 cDNS-Synthese

Je Röhrchen wurden folgende Reagenzien zugegeben (die Inkubationen erfolgten im Thermocycler, Biometra, Göttingen):

RNS	1 µg
Oligo(dT)-Primer	1 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
DEPC-H_2O	add 12 µl

→ Inkubation bei 65 °C für 5 min; auf Eis abkühlen lassen

5x First Strand Puffer	4 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
RNaseOut (40 U/µl)	1 µl

→ Inkubation bei 42 °C für 2 min

Superscript II Reverse Transkriptase 1 µl

→ Inkubation bei 42 °C für 50 min
70° C für 15 min
4 °C

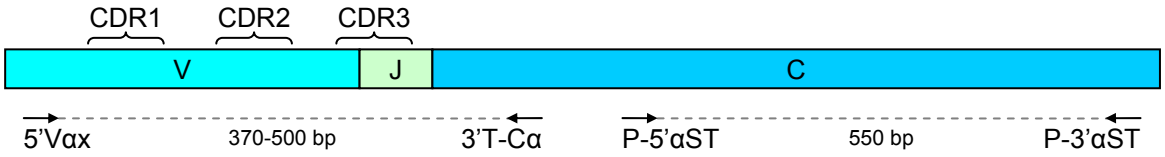
Die cDNS wurde bei -20 °C gelagert.

4.4.1.3 T-Zellrezeptor-Analyse: Vαβ Repertoire

Das TZR-Vαβ-Repertoire wurde mittels Polymerase Ketten Reaktion (PCR) untersucht. Hierzu wurden nach RNS-Isolation und cDNS-Synthese die Gensegmente der variablen Ketten des T-Zellrezeptors mit spezifischen Primern amplifiziert und nach Aufreinigung sequenziert.

Hierbei lagen 34 verschiedene 5'-Vα-Primer bzw. 38 verschiedene 5'-Vβ-Primer in den variablen (V) TZR-Regionen. Der entsprechende 3'-Primer (3'T-Cα bzw P-3'CβII) lag im jeweiligen konstanten Bereich (C) des TZR-Gens. Als interne Kontrolle diente ein Primerpaar, das sich komplett in der konstanten Region befand: P5'-(α bzw. β) ST und P3'-(α bzw. β) ST.

α-Kette



β-Kette

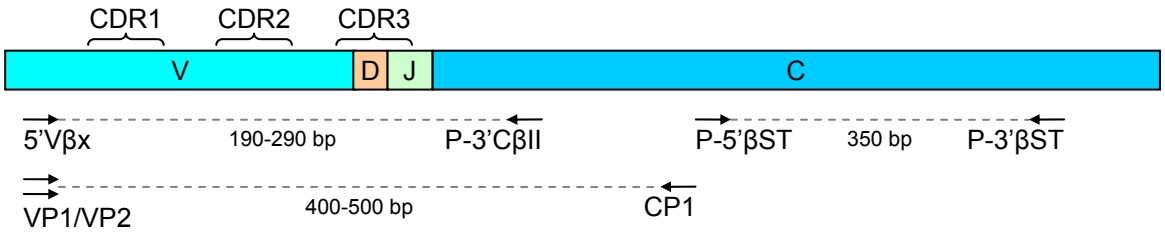


Abbildung 4.1 Lage der Primer für PCR-Reaktionen zur Untersuchung des TZR-Vαβ Repertoires von T-Zellen. Dargestellt sind unterschiedliche Genbereiche der TZR-Ketten auf mRNS-Ebene und unterschiedliche Primerpaare der TZR-α-Kette (oben) bzw. TZR-β-Kette (unten). (V: variable, C: constant, D: diversity, J: joint, Gensegmente der T-Zellrezeptorketten)

PCR-Mischung:

TCR α-Kette	
5'Vαx (2,5 pmol/µl)	6 µl
Puffer (10x)	4,0 µl
dNTP (10 mM)	0,8 µl
P-5'αST (2,5 pmol/µl)	2,8 µl
P-3'αST (2,5 pmol/µl)	2,8 µl
3'T-Cα (5 pmol/µl)	4,0 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,4 µl
$MgCl_2$ (50 mM)	1,2 µl
cDNS (aus T-Zellen)	1 µl
DEPC-H_2O	add 40 µl

TCR β-Kette	
5'Vβx (2,5 bzw 5 pmol/µl)	6 µl
Puffer (10x)	4,0 µl
dNTP (10 mM)	0,8 µl
P-5'βST (5 pmol/µl)	4,0 µl
P-3'βST (5 pmol/µl)	4,0 µl
P-3'CβII (5 pmol/µl)	4,0 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,4 µl
$MgCl_2$ (50 mM)	1,2 µl
cDNS (aus T-Zellen)	1 µl
DEPC-H_2O	add 40 µl

PCR-Programm:

1.	initiale Denaturierung	94 °C	2 min
2.	Denaturierung	94 °C	30 s
3.	Annealing	56 °C	30 s
4.	Elongation	72 °C	1 min
5.	terminale Elongation	72 °C	10 min
6.	Kühlung	4 °C	

38 Zyklen von Schritt 2 bis Schritt 4

PCR mit degenerierten Primern (TZR-β-Kette)

Da von T-Zellklonen oft nur wenig Material vorhanden war, wurden zur Analyse der TZR-β-Kette zwei degenertierte Primer-Paare verwendet (Zhou et al, 2006), die in nur 2 PCR-Reaktionen insgesamt 96 % (76 % mit VP1 und 20 % mit VP2) von 55 bekannten Vβ-Regionen abdeckten. Die Gensegmente Vß10.1 und Vß16.1 (Arden-Nomenklatur) konnten mit diesen Primern nicht amplifiziert werden.

PCR Mix:	Puffer (10x)	4,0 µl	
	dNTP (10 mM)	0,8 µl	
	VP1 oder VP2 (5 pmol/µl)	16 µl	
	CP1 (5 pmol/µl)	1,6 µl	
	Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	
	$MgCl_2$ (50 mM)	1,2 µl	
	cDNS (aus T-Zellen)	1,5 µl	
	DEPC-H_2O	add 40 µl	
Negativkontrolle:	DEPC-H_2O statt cDNS		
PCR-Programm:	1. initiale Denaturierung	94 °C	2 min
	2. Denaturierung	94 °C	30 s
	3. Annealing	50 °C	30 s
	4. Elongation	72 °C	1 min
	5. terminale Elongation	72 °C	10 min
	6. Kühlung	4 °C	
	40 Zyklen von Schritt 2 bis Schritt 4		

4.4.1.4 Gelelektrophorese und Gel-Extraktion von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte wurden im Verhältnis 5:1 in einem 6-fach-Ladepuffer aufgenommen und in einem 1,7 %igen Agarose-Gel (mit 0,7 µg/ml Ethidiumbromid) unter einer Spannung von 110 mV in einem Zeitraum von circa 50 min einer Gelelektrophoresekammer aufgetrennt. Als Größenkontrolle diente eine 100 bp bis 1 kbp DNS-Leiter. Amplifizierte DNS-Produkte wurden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und dokumentiert. Geeignete Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin Gel-Extraktions-Kits der Firma Macherey-Nagel nach Angabe des Herstellers aus dem Gel eluiert.

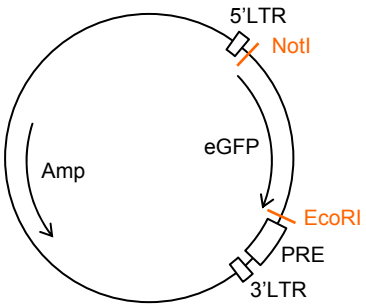
4.4.1.5 Sequenzierung

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden bei der Firma Sequiserve (Vaterstetten) sequenziert.

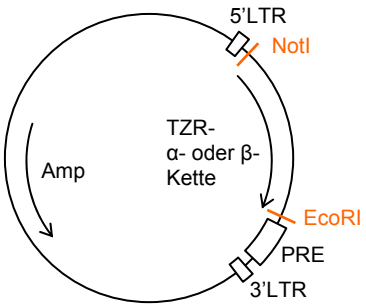
4.4.2 Klonierung des T-Zellrezeptors in den retroviralen Vektor pMP71G$_{PRE}$

Um den T-Zellrezeptor mittels retroviralem Transfer in sekundäre Zellen einzubringen, wurden die TZR-α- und β-Ketten in den retroviralen Vektor pMP71G$_{PRE}$ kloniert. Hierzu wurden zusätzlich zum ursprünglichen Vektor vier modifizierte Vektoren hergestellt, die unterschiedliche T-Zellrezeptor-Sequenzen enthielten (siehe Abbildung 4.2).

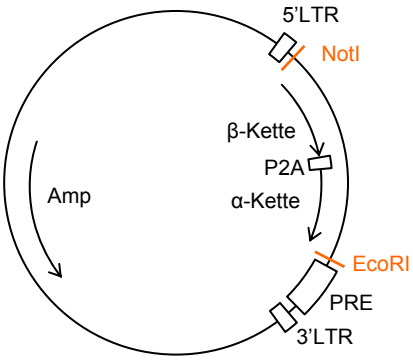
A eGFP



B TZR-α oder β



C TZR-β-P2A-α



D TZR-β mu-P2A-α mu

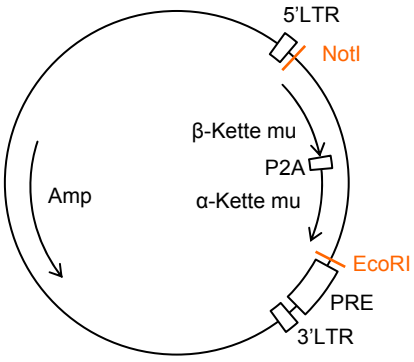


Abbildung 4.2 Retroviraler Vektor pMP71G$_{PRE}$. A: mit eGFP, ohne TZR-Insertion, B: mit integrierter TZR-α- oder β-Ketten-Sequenz, C: P2A-Vektor: β-Kette gefolgt von der P2A- und α-Ketten-Sequenz, D: TZR-Ketten, bei denen die konstanten Ketten mit den konstanten Ketten eines T-Zellrezeptors aus der Maus (mu) ausgetauscht wurden, mit P2A-Einbau. Orange: verwendete Schnittstellen, LTR: long terminal repeat, Amp: Ampicillinrestistenzgen, TZR: T-Zellrezeptor

Im den folgenden Kapiteln wird zunächst auf den T-Zellrezeptor-Einzelketten-Einbau aus Abbildung 4.2 B eingegangen. Die P2A-Klonierung und Austausch der menschlichen konstanten Region mit der konstanten Region eines T-Zellrezeptors aus der Maus aus Abbildung 4.2 C und D wird im Kapitel 4.4.2.8 (S. 54) beschrieben.

4.4.2.1 Enzym-Schnittstellen-Synthese an die T-Zellrezeptor-Sequenzen

Um passende enzymatische Schnittstellen an die Enden der TZR-Ketten-Gene zu synthetisieren, wurden Primer hergestellt (Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg, bzw. Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen), die die entsprechenden Sequenzen enthielten. In der PCR-Reaktion wurden dann die Schnittstellen-Sequenzen an die TZR-Gene angebaut. Zusätzlich wurde an den 5'-Enden der Gene um das Startcodon ATG eine Kozak-Sequenz (CCRCCATGG, R = A oder G) eingebaut, die eine effizientere Translation ermöglichte.

PCR Mix	Puffer (10x)	4,0 µl
	5'Primer (10 pmol/µl)	16 µl
	3'Primer (10 pmol/µl)	1,6 µl
	Pfu-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
	$MgSO_4$ (25 mM)	1,2 µl
	dNTP (2 mM)	4 µl
	cDNS	2 µl
	DEPC-H_2O	add 40 µl

	α-Kette	β-Kette
5' Primer	5' TCR α NotI Kozak	5' TCR β NotI Kozak
3' Primer	3' TCR α C EcoRI	3' TCR β C2 EcoRI

Negativkontrolle	DEPC-H_2O statt cDNS		
PCR-Programm	1. initiale Denaturierung	94 °C	2 min
	2. Denaturierung	94 °C	30 s
	3. Annealing	65 °C	30 s
	4. Elongation	72 °C	2 min
	5. terminale Elongation	72 °C	10 min
	6. Kühlung	4 °C	
	36 oder 38 Zyklen von Schritt 2 bis Schritt 4		

14 PCR-Ansätze wurden je T-Zellrezeptorkette durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden im Verhältnis 5:1 in einem 6-fach-Ladepuffer aufgenommen und in einem 1 %igen Agarose-Gel (mit 0,7 µg/ml Ethidiumbromid) unter einer Spannung von 110 mV in einem Zeitraum von circa 50 min aufgetrennt. Als Größenkontrolle diente eine 100 bp bis 1 kbp DNS-Leiter. Amplifizierte DNS-Produkte wurden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und dokumentiert. Die Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin Gel-Extraktions-Kits der Firma Macherey-Nagel nach Angabe des Herstellers aus dem Gel eluiert. Am Spektrometer wurde die optische Dichte gemessen und die DNS-Menge bestimmt.

4.4.2.2 Restriktionsspaltung der PCR-Produkte

Die aufgereinigten PCR-Produkte und der Vektor pMP71G_{PRE} mit den Enzymen NotI und EcoRI gespalten. Beim Vektor pMP71G_{PRE} wurde hierdurch das eGFP-Gen ausgeschnitten. Es wurden 2 Ansätze (à 2 µg) für die Spaltung des PCR-Produktes durchgeführt.

PCR-Produkt bzw. Vektor	2 µg bzw. 20 µg	
Puffer NEB3 (10x)	10 µl	
BSA (100x)	1 µl	
NotI (10 U/µl)	4 µl	(100 %ige Aktivität in Puffer NEB3)
EcoRI (10 U/µl)	4 µl	(100 %ige Aktivität in Puffer NEB3)
DEPC-H_20	add 100 µl	
Inkubation	37 °C, 2 h	
Kühlung	4 °C	
Aufbewahrung	-20 °C	

4.4.2.3 Aufreinigung von gespaltenen DNS-Fragmenten

Zur Aufreinigung des gewünschten größeren Vektorfragments wurde der gespaltene Vektor im Verhältnis 5:1 in einem 6 fach-Ladepuffer aufgenommen und in einem 1 %igen Agarose-Gel (mit 0,7 µg/ml Ethidiumbromid) unter einer Spannung von 110 mV in einem Zeitraum von circa 70 min von dem kleineren eGFP-Gen-Fragment aufgetrennt. Als Größenkontrolle diente eine DNS-Leiter (DNA-Hyperladder I von BIOLine GmbH, Luckenwalde). Die passende Bande wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin Gel-Extraktions-Kits der Firma Macherey-Nagel nach Angabe des Herstellers aus dem Gel eluiert und in DEPC-H_2O aufgenommen. Am Spektrometer wurde die optische Dichte gemessen und die DNS-Menge bestimmt.

Die gespaltenen PCR-Produkte wurden mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt, um Enzyme und kleine DNS-Schnittfragmente zu entfernen. Hierzu wurde zu jedem Spaltansatz 500 µl äquilibriertes Phenol gegeben und sehr gut gemischt. Nach Zentrifugation (2 min, 14 000 rpm) wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 500 µl Chloroform-Isoamylalkohol zugegeben. Nach Mischen und Zentrifugation (2 min, 14 000 rpm) wurde die obere Phase erneut abgenommen und mit 10 µl Natrium-Acetat (3 M) und 1 ml Ethanol (99 %) gemischt. Nach Zentrifugation (20 min, 14 000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das DNS-Sediment nach Lufttrocknung in DEPC-H_2O aufgenommen. Die DNS-Menge wurde am Spektrometer gemessen.

4.4.2.4 Ligation von DNS-Fragmenten

Geschnittene und erneut aufgereinigte PCR-Produkte und Vektoren wurden in einem Verhältnis von PCR-Produkt : Vektor = 3 : 1 ligiert. Hierbei wurde die DNS-Menge wie folgt berechnet: PCR-Produkt [ng] = 3 · (PCR-Produkt [bp]) · (Vektor [ng]) / (Vektor [bp]).

PCR-Produkt	300 ng
Vektor	100 ng
Ligationspuffer (10 x)	1 µl
T4 Ligase	1 µl (5 Weiss Units)
DEPC-H_20	add 10 µl
Reaktion	16 °C, ÜN
Inaktivierung	65 °C, 10 min
Kühlung	4 °C
Lagerung	-20 °C

4.4.2.5 Transformation von Bakterien

Ligationsprodukte oder aufgereinigte Vektoren wurden mittels Hitzeschock in chemisch kompetente E. coli (Escherichia coli, One Shot TOP10, Invitrogen, Karlsruhe) gebracht. Hierzu wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut und 2 µl Ligationsprodukt oder 1 µg aufgereinigter Vektor zugegeben und mit einer Spitze umgerührt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien 45 s bei 42 °C inkubiert und sofort wieder auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 250 µl S.O.C.-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) wurden die Bakterien 1 h bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt und in drei verschiedenen Mengen (10 µl, 50 µl, 200 µl) auf vorgewärmte LB-Agar-Platten, die mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen (z. B. Ampicilllin: c_{end} = 100 µg/ml) versetzt waren, mit der Impföse ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert und bei 4 °C maximal eine Woche aufbewahrt.

4.4.2.6 Selektion der transformierten Bakterien

Auf den Agar-Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum konnten nur Bakterien wachsen, die mit dem Plasmid transformiert worden waren, da sie die Antibiotika-Resistenz mit dem Vektor übertragen bekommen hatten. Einzelne Kolonien wurden mit einem Zahnstocher herausgepickt, in 5 ml-LB-Medium überführt und bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Das LB-Medium enthielt ebenfalls das Antibiotikum.

4.4.2.7 Plasmid-DNS-Extraktion aus transformierten Bakterien und Probespaltung

Um zu überprüfen, ob das Ligationsprodukt richtig in den Vektor eingebaut war, wurde eine Minipräparation der Plasmid-DNS von 10 Starterkulturen durchgeführt. Die Plasmid-DNS wurde mit dem „JETstar Plasmid Purification MAXI KIT“ als Minipräparation nach Angaben des Herstellers (Genomed, Löhne) aufgereinigt. Nach Bestimmung der DNS-Menge am Spektrometer wurde eine Probespaltung durchgeführt, bei dem ein enzymatischer Schnitt innerhalb der inserierten TZR-Sequenz lag.

Probespaltung

Vektor	circa 1 µg
Puffer NEB3 oder 4 (10x)	2 µl
BSA (100x)	0,2 µl
Enzym I (10 U/µl)	1 µl
Enzym II (10 U/µl)	1 µl
DEPC-H_20	add 20 µl
Inkubation	37 °C, 2 h
Kühlung	4 °C
Aufbewahrung	-20 °C

Vektor pMP71G$_{PRE}$ mit inserierten TZR-Sequenzen	**Enzym I**	**Enzym II**	**Bandengrößen (bp)**
α-SK22	XhoI	Bgl II	2237, 3408, 676
β-SK22	XhoI	-	2247, 4179
βP2Aα-SK22	XhoI	-	3121, 4179
βmuP2Aαmu-SK22	XhoI	-	3105, 4179
α-D1	XhoI	NotI	3781, 2534
β-D1	XhoI	NotI	3781, 2247, 404

Probespaltung von Vektoren ohne TZR-Insertion	**Enzym I**	**Enzym II**	**Bandengrößen (bp)**
pMP71G$_{PRE}$	XhoI	NotI	2437, 3781
pALF10A1 („env"),	XbaI*	ClaI*	circa 1700 und 5000
pcDNA3.1-MLV („gag-pol")	XhoI	-	4309, 6857

für alle Enzyme: Puffer NEB3, 100 %ige Aktivität, Ausnahme siehe *
* Puffer NEB4: 2 µl XbaI (75 %ige Aktivität), 1 µl ClaI (100 %ige Aktivität) eingesetzt

Anschließend wurden die Fragmente gelelektrophoretisch getrennt (siehe Kapitel 4.4.1.4, S. 48). Plasmide, die Fragmente der richtigen Größe hatten, wurden bei der Firma Sequiserve (Vaterstetten) sequenziert.

Bei richtiger Sequenz wurde aus der entsprechenden Starterkultur eine Hauptkultur angesetzt, um größere Mengen Plasmid-DNS zu erhalten. Hierzu wurden 30 µl der Starterkulturen in 300 ml LB-Medium (mit dem Antibiotikum) überführt und die Zellen über Nacht bei 37 °C unter Schütteln expandiert. Die Maxipräparation zur Plasmidextraktion wurde mit dem „JETstar Plasmid Purification MAXI KIT" nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Bestimmung der DNS-Menge am Spektrometer wurde erneut zur Kontrolle eine Probespaltung durchgeführt und die Fragmentgröße mittels Gelelektrophorese überprüft.

Zur Amplifikation von bereits bestehenden Vektoren wurde in der gleichen Weise vorgegangen, allerdings ohne erneute Sequenzierung. Nach Transformation der Vektoren in E.coli wurden die Bakterien ausplattiert und Starterkulturen angesetzt, die in Hauptkulturen expandiert wurden. Nach Verifizierung durch Probespaltung wurden die Vektoren eingesetzt.

4.4.2.8 Besondere Klonierung: P2A-Klonierung und Austausch der menschlichen konstanten Region mit der konstanten Region eines Maus-T-Zellrezeptors

Klonierung des P2A-Elementes

Die TZR-α- und β-Ketten waren zunächst getrennt in pMP71G_{PRE}-Vektoren kloniert worden. Um eine äquimolare Transduktion der beiden Ketten in sekundäre Zielzellen zu erreichen, wurden die beiden Ketten später zusammen in einen Vektor kloniert. Hierdurch können nach Transfektion der relevanten Vektoren in 293T-Zellen (siehe Kapitel 4.5.1, S. 59) Viren entstehen, die beide Ketten beinhalten und somit eine Zielzelle mit beiden Ketten äquimolar transduzieren. Damit die TZR-Ketten als Proteine getrennt vorlagen, wurde ein P2A-Element eingefügt. Die Trennung geschah durch einen ribosomalen Sprung bei der Translation im P2A-Element (Leisegang et al, 2008; Szymczak et al, 2004).

Die TZR-Gensequenzen wurden in der Reihenfolge (NotI) 5'-β-P2A-α-3' (EcoRI) kloniert. Die PCR wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurde das P2A-Element mit Hilfe von überhängenden Primern an den konstanten Teil der β-Kette und an den variablen Teil der α-Kette angebaut. Anschließend wurden die P2A-Stücke aneinander angelagert (Annealing). In einer zweiten PCR wurde dann das komplette Produkt β-P2A-α amplifiziert.

Enzymatisch passende Schnittstellen wurden an das 5'-Ende der β-Kette (NotI) und an das 3'-Ende der α-Kette (EcoRI) synthetisiert. Die Kozak-Sequenz wurde lediglich an den β-Ketten-Start eingebaut.

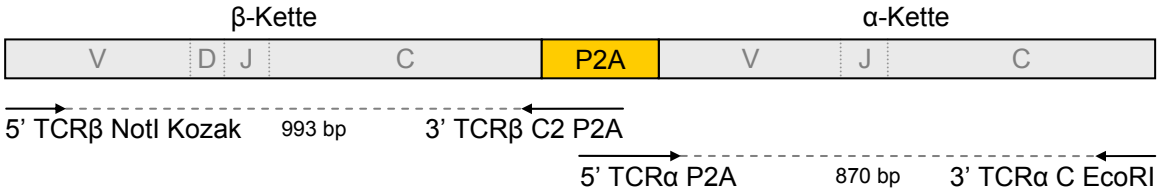


Abbildung 4.3 Lage der Primer in der PCR für den Einbau des P2A-Elements. Dargestellt sind die TZR-α und β-Ketten auf mRNS-Ebene, getrennt durch ein P2A-Element und zwei Primerpaare. Das P2A-Element wurde mit Hilfe verschiedener Primer in der PCR-Reaktion an die α- und β-Ketten synthetisiert und in einem Ligationsschritt aneinander gelagert, wobei die β-Kette im 5'-Bereich lag. V, D, J, C: unterschiedliche Genbereiche der T-Zellrezeptorketten

1. PCR:	**Anbau des P2A-Elements an die einzelnen TZR-Ketten**	
PCR Mix	Puffer (10x)	10 µl
	5' Primer (10 pmol/µl)	3 µl
	3' Primer (10 pmol/µl)	3 µl
	Pfu-Polymerase (2,5 U/µl)	4 µl
	$MgSO_4$ (25 mM)	16 µl
	dNTP (10 mM)	2 µl
	cDNS (aus T-Zellen)	5 µl
	DEPC-H_2O	add 100 µl

verwendete Primer	α-Kette	β-Kette	
	5’ TCR α P2A	5’ TCR β NotI Kozak	
	3’ TCR α C EcoRI	3’ TCR β C2 P2A	
Negativ-Kontrolle	DEPC-H_2O statt cDNS		
PCR-Programm	1. initiale Denaturierung	95 °C	2 min
	2. Denaturierung	95 °C	30 s
	3. Annealing	65 °C	30 s
	4. Elongation	72 °C	2 min
	5. terminale Elongation	72 °C	10 min
	6. Kühlung	4 °C	
	38 Zyklen von Schritt 2 bis Schritt 4		

Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch getrennt, wie in Kapitel 4.4.1.4, S. 48 beschrieben. Als Größenkontrolle diente eine DNS-Leiter (DNA-Hypperladder I von BIOLine GmbH, Luckenwalde). Die amplifizierten PCR-Produkte wurden aus dem Gel eluiert und die DNS-Menge am Spektrometer bestimmt.

2. PCR: Zusammenbau und Amplifikation

PCR Mix	Puffer (10x)	10 µl	
	Pfu-Polymerase (2,5 U/µl)	4 µl	
	$MgSO_4$ (25 mM)	16 µl	
	dNTP (10 mM)	2 µl	
	α-Produkt aus 1. PCR	100 ng	
	β-Produkt aus 1. PCR	100 ng	
	DEPC-H_2O	add 100 µl	
Anlagerung	1. initiale Denaturierung	95 °C	10s
	2. langsame Abkühlung auf	40 °C	10 °C/min
	3. Annealing	72 °C	2 min
	4. Kühlung	4 °C	
	5 Zyklen von Schritt 1 bis Schritt 3		
Zugabe von	5’ TCRβ NotI Kozak (10 pmol/µl)	3 µl	
	3’ TCRα C EcoRI (10 pmol/µl)	3 µl	
	Pfu-Polymerase (2,5 U/µl)	4 µl	
Negativ-Kontrolle	DEPC-H_2O statt PCR-Produkt		
PCR-Programm	1. initiale Denaturierung	95 °C	2 min
	2. Denaturierung	95 °C	30 s
	3. Annealing	52 °C	30 s
	4. Elongation	72 °C	4 min
	5. terminale Elongation	72 °C	10 min
	6. Kühlung	4 °C	
	30 Zyklen von Schritt 2 bis Schritt 4		

Die PCR-Produkte wurden erneut wie in Kapitel 4.4.1.4, S. 48 beschrieben mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, die Banden aus dem Gel eluiert und die DNS-Menge gemessen.

Der Einbau dieses PCR-Produktes in den Vektor pMP71G$_{PRE}$ wurde, wie bereits in den Kapiteln 4.4.2.2 bis 4.4.2.7 (S. 51 ff.) beschrieben, durchgeführt.

Austausch der konstanten Region des menschlichen T-Zellrezeptors mit der konstanten Region eines Maus-T-Zellrezeptors

Die konstanten Teile des menschlichen („h“) T-Zellrezeptors wurden mit den konstanten Teilen eines T-Zellrezeptors (P14) aus der Maus („m“) (Sommermeyer et al, 2006) ausgetauscht. Auch in diesem Fall wurde das P2A-Element eingebaut.

Die TZR-Gensequenzen wurden in der Reihenfolge (NotI)-5’-Vβh-Cβm-P2A-Vαh-Cαm-3’-(EcoRI) kloniert. Die PCR wurde in drei Schritten durchgeführt. Zunächst wurden die variablen und konstanten Teile jeweils einzeln amplifiziert und dabei überlappende Sequenzen angebaut (P2A bzw. Überlappung zwischen V- und C-Teil). Anschließend wurden die V- und C-Bereiche der einzelnen Ketten aneinander gebaut (Annealing) und dann die β- bzw. α-Ketten, die nun aus Sequenzen des Menschen und der Maus bestanden, amplifiziert. In einem dritten Schritt wurden diese α- und β-Ketten-Amplifikate über das P2A-Element aneinandergebaut und das komplette Produkt 5’-Vβh-Cβm-P2A-Vαh-Cαm-3’ vervielfacht. Enzymatisch passende Schnittstellen wurden an das 5’-Ende der β-Kette (NotI) und an das 3’-Ende α-Kette (EcoRI) synthetisiert. Die Kozak-Sequenz wurde lediglich an den β-Ketten-Start eingebaut.

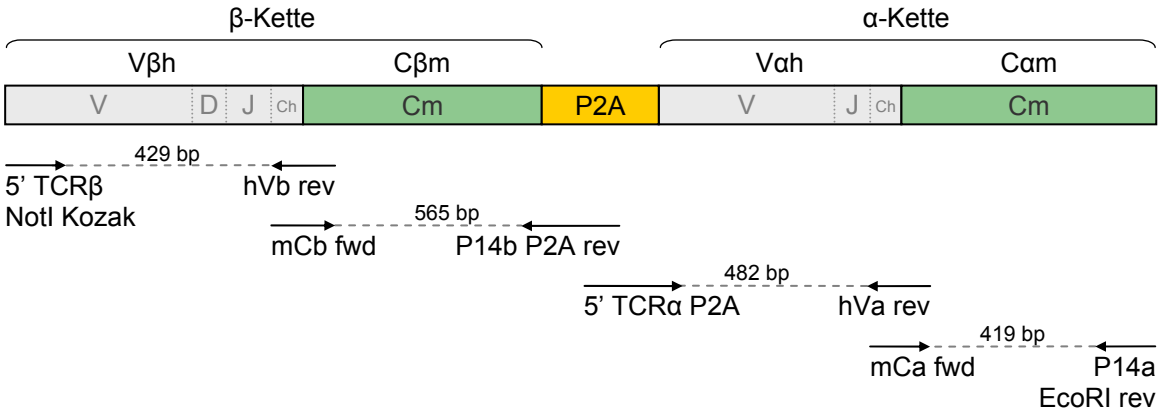


Abbildung 4.4 Lage der Primer in der PCR für den Austausch der menschlichen konstanten Region mit der konstanten Region eines T-Zellrezeptors aus der Maus einschließlich Einbau des P2A-Elements. Dargestellt sind die TZR-α und β-Ketten, getrennt durch ein P2A-Element und vier Primerpaare. Die konstanten Bereiche des menschlichen T-Zellrezeptors (h) wurden mit Sequenzen eines Maus-TZR (m) ersetzt. Mit Hilfe verschiedener Primer wurden Teilsequenzen in der PCR amplifiziert und in Ligationsschritten aneinander gelagert. Die β-Kette lag hierbei im 5’-Bereich, gefolgt vom P2A-Element und der α-Kette. V, D, J, C: unterschiedliche Genbereiche einer T-Zellrezeptorkette

1. PCR:	**Einzel-PCR der variablen und konstanten TZR-Bereiche (4 Ansätze)**			
PCR Mix	Puffer (10x)		10 µl	
	5’ Primer (10 pmol/µl)		3 µl	
	3’ Primer (10 pmol/µl)		3 µl	
	Pfu-Polymerase (2,5 U/µl)		4 µl	
	$MgSO_4$ (25 mM)		16 µl	
	dNTP (10 mM)		2 µl	
	Template		5 µl	
	DEPC-H_2O		add 100 µl	
	Vβh	**Cβm**	**Vαh**	**Cαm**
5’ Primer	5’ TCR β NotI Kozak	mCb fwd	5’ TCR α P2A	mCa fwd
3’ Primer	3’ hVb rev	P14bP2A rev	h V α rev	P14 Eco RI rev
Template	cDNS aus T-Zellklon	P14 βP2Aα	cDNS	P14 βP2Aα
Negativ-Kontrolle	DEPC-H_2O statt cDNS oder Vektor			
PCR-Programm	1. initiale Denaturierung		95 °C	2 min
	2. Denaturierung		95 °C	30 s
	3. Annealing		65 °C	30 s
	4. Elongation		72 °C	2 min
	5. terminale Elongation		72 °C	10 min
	6. Kühlung		4 °C	
	30 Zyklen von Schritt 2 bis Schritt 4			
Gelelektrophorese	1 %iges Agarose Gel (mit 0,7 µg/ml Ethidiumbromid) 100 bp bis 1 kb-Leiter 110m mV, 50 min			

Die PCR-Produkte wurden wie in Kapitel 4.4.1.4 (S. 48) beschrieben mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, die Banden aus dem Gel eluiert und die DNS-Menge gemessen.

2. PCR:	**Zusammenbau der konstanten und variablen Teile, Amplifikation (2 Ansätze)**		
PCR Mix	Puffer (10x)	10 µl	
	Pfu-Polymerase (2,5 U/µl)	4 µl	
	$MgSO_4$ (25 mM)	16 µl	
	dNTP (10 mM)	2 µl	
	Vαh bzw. Vβh-Produkt aus 1. PCR	100 ng	
	Cαm bzw. Cβm-Produkt aus 1. PCR	100 ng	
	DEPC-H_2O	add 100 µl	
Anlagerung	1. initiale Denaturierung	95 °C	10 s
	2. langsame Abkühlung auf	40 °C	10 °C/min
	3. Annealing	72 °C	2 min
	4. Kühlung	4 °C	
	5 Zyklen von Schritt 1 bis Schritt 3		

Zugabe von	5’ Primer (10 pmol/µl)	3 µl	
	3’ Primer (10 pmol/µl)	3 µl	
	Pfu-Polymerase (2,5 U/µl)	4 µl	
	Vβh-Cβm-Kette	Vαh-Cαm-Kette	
5’ Primer	5’ TCR β NotI Kozak	5’ TCR α P2A	
3’ Primer	P14bP2A rev	P14 Eco RI rev	
Negativkontrolle	DEPC-H_2O statt PCR-Produkt		
PCR-Programm	1. initiale Denaturierung	95 °C	2 min
	2. Denaturierung	95 °C	30 s
	3. Annealing	55 °C	30 s
	4. Elongation	72 °C	2 min
	5. terminale Elongation	72 °C	10 min
	6. Kühlung	4 °C	
	35 Zyklen von Schritt 2 bis Schritt 4		

Die PCR-Produkte wurden erneut wie in Kapitel 4.4.1.4 (S. 48) beschrieben mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, die Banden aus dem Gel eluiert und die DNS-Menge gemessen.

3. PCR:	**Zusammenbau der α- und β-Ketten, Amplifikation (1 Ansatz)**		
PCR Mix	Puffer (10x)	10 µl	
	Pfu-Polymerase (2,5 U/µl)	4 µl	
	$MgSO_4$ (25 mM)	16 µl	
	dNTP (10 mM)	2 µl	
	βChVm aus 2. PCR	100 ng	
	αChVm aus 2. PCR	100 ng	
	DEPC-H_2O	add 100 µl	
Anlagerung	1. initiale Denaturierung	95 °C	10 s
	2. langsame Abkühlung auf	40 °C	10 °C/min
	3. Annealing	72 °C	2 min
	4. Kühlung	4 °C	
	5 Zyklen von Schritt 1 bis Schritt 3		
Zugabe von	5’ TCR β NotI Kozak (10 pmol/µl)	3 µl	
	P14 Eco RI rev (10 pmol/µl)	3 µl	
	Pfu-Polymerase (2,5 U/µl)	4 µl	
Negativkontrolle	DEPC-H_2O statt PCR-Produkt		
PCR-Programm	1. initiale Denaturierung	95 °C	2 min
	2. Denaturierung	95 °C	30 s
	3. Annealing	55 °C	30 s
	4. Elongation	72 °C	4 min
	5. terminale Elongation	72 °C	10 min
	6. Kühlung	4 °C	
	35 Zyklen von Schritt 2 bis Schritt 4		

Die PCR-Produkte wurden erneut wie in Kapitel 4.4.1.4 (S. 48) beschrieben mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, die Banden aus dem Gel eluiert und die DNS-Menge gemessen.

Der Einbau dieses PCR-Produktes in den Vektor pMP71G$_{PRE}$ wurde, wie bereits in den Kapiteln 4.4.2.2 bis 4.4.2.7 (S. 51 ff.) beschrieben, durchgeführt.

4.5 Retroviraler Transfer

4.5.1 Calcium-Phosphat-Transfektion

Für den Zusammenbau von Viren wurden die drei Vektoren pALF10A1 („env"), pcDNA3.1-MLV („gag-pol") und pMP71G$_{PRE}$ (in der jeweiligen Kondition ohne oder mit unterschiedlicher TZR-Insertion) in sogenannte Helferzellen (293T) eingebracht, in denen die Viren hergestellt wurden.

Hierzu wurden 16 h vor Transfektion die 293T-Zellen so ausgesät (circa 0,7 Mio Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte, 3 ml je Loch), dass die Zellen zur Transfektion eine Konfluenz von 60 bis 70 % aufwiesen. Die 293T-Zellen wurden dann 30 bis 60 min vor Transfektion auf „Hungermedium" (DMEM-Medium mit nur 3 % FKS) umgestellt.

2x HBSS Puffer wurde auf pH 7,06 eingestellt, 2 M $CaCl_2$ wurde kurz vor der Transfektion hergestellt und beides sterilfiltriert.

Plasmidzubereitung in 1,5 ml Reaktionsgefäß für je ein Loch 293T einer 6-Loch-Platte (je nach Anzahl der Löcher wurde die Plasmidmischung entsprechend multipliziert):

	c_{stock}	c_{end}	V_{mix}	V_{stock}
Chloroquin	100 mM	126,7 µM	300 µl	0,38 µl
$CaCl_2$ (2 M)	2 M	100 mM	300 µl	15 µl
Plasmid-DNS				18 µg
steriles H_2O				add 150 µl

150 µl Plasmidmischung + 150 µl 2x HBSS-Puffer
= 300 µl Mischung auf 3 ml Medium je Loch einer 6-Loch-Platte

Zusammensetzung der Plasmid DNS:

Ansätze mit	3 Vektoren	4 Vektoren
pALF10A1 ("env")	6 µg	4,5 µg
pcDNA3.1-MLV ("gag-pol")	6 µg	4,5 µg
pMP71G$_{PRE}$ eGFP / SK22 P2A / SK22 mu P2A	6 µg	
pMP71G$_{PRE}$ α-Kette (SK22, D1)		4,5 µg
pMP71G$_{PRE}$ β-Kette (SK22, D1)		4,5 µg
Summe	18 µg	18 µg

Zur Komplexbildung wurde 150 µl 2x HBSS in einem 13 ml Röhrchen je Ansatz vorgelegt und mit einer 2 ml Pipette Blasen aufgeworfen. Währenddessen wurde mit einer 1 ml Pipette tröpfchenweise die Plasmidmischung zugegeben (nun leicht milchig). Nach 30 min Inkubation bei RT wurde die Mischung tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und dabei die

Platte leicht geschwenkt. Nach 6 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann 3 ml DMEM-Medium (10 % FKS) zugegeben.

Als Transfektionskontrolle wurde der ursprüngliche pMP71G$_{PRE}$-Vektor, der die eGFP-Sequenz beinhaltet, eingesetzt. Die Transfektionseffizienzen waren gut, wenn mehr als 90 % der 293T-Zellen GFP-positiv waren.

4.5.2 Transduktion von Jurkat76-Zellen und IVSB-CTL

Zur Steigerung der Aufnahme von retroviralen Partikeln durch Zellen wurden die Transduktionen in RetroNectin beschichteten Platten durchgeführt. Hierzu wurden unbehandelte 24-Loch-Platten mit 400 µl RetroNectin (c_{end} = 12,5 mg/ml) beschichtet. Nach 2 h Inkubation bei RT wurde das RetroNectin durch 500 µl 2 %ige BSA-Lösung ersetzt. Nach weiterer Inkubation (30 min bei 37 °C) wurden die Löcher mit 2 ml PBS (2,5 % HEPES) gewaschen, in 2 ml PBS (2,5% HEPES) bei 4°C gelagert und innerhalb einer Woche verwendet.

Zur Transduktion von Jurkat76-Zellen oder Jurkat76-CD8α-Zellen wurden 0,1 Mio Zellen mit 4 µg/ml Protaminsulfat in 1 ml RPMI (10 % FKS) aufgenommen und in ein RetroNectin-beschichtetes Loch überführt. Der Virusüberstand wurde 48 h nach der Transfektion von den 293T-Zellen abgenommen und durch einem 0,45 µm-Filter filtriert. 1 ml Virusüberstand wurde je Loch zugegeben. Die Platten wurden bei 2 000 rpm und 32 °C 90 min zentrifugiert und anschließend im Brutschrank inkubiert. Nach circa 3 bis 4 Tagen konnten die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert werden.

Zur Transduktion von IVSB-CTL wurde in der gleichen Weise vorgegangen. Die Zellen wurden 7 Tage nach ihrer letzten Restimulation eingesetzt. Die Transduktion von 0,5 Mio Zellen je Loch wurde unter Zugabe von 125 U/ml IL2 und 0,05 µg/ml MRA durchgeführt.

Als Transfektionskontrolle wurde der ursprüngliche pMP71G$_{PRE}$-Vektor, der die eGFP-Sequenz beinhaltet, eingesetzt. Die Anzahl an grün fluoreszierenden Jurkat76-Zellen gab Aufschluß über die Transduktionseffizienz und wurde am Durchflusszytometer gemessen.

4.5.3 Transduktion von PBL

PBL wurden mittels Dichtegradienten-Zentrifugation aus Vollblut gewonnen (siehe Kapitel 4.1.3, S. 38). 1 Mio PBL wurden in 1 ml T-Zell-Medium je 24-Loch aufgenommen und OKT3 (50 ng/ml) und IL2 (50 U/ml) zugegeben.

Nach 48 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen in RetroNectin beschichtete Platten (s. o.) überführt und Protaminsulfat (4 µg/ml) und IL2 (100 U/ml) zugegeben. Der Virusüberstand wurde 48 h nach der Transfektion von 293T-Zellen geerntet und durch einen 0,45 µm-Filter

filtriert. 1 ml Virusüberstand wurde je Loch zugegeben. Der restliche Überstand wurde bei -20 °C eingefroren. Die Platten wurden bei 2 000 rpm und 32 °C 90 min zentrifugiert und anschließend im Brutschrank inkubiert.

Nach 24 h wurden die PBL erneut transduziert. Die PBL wurden einmal gewaschen und in frischem T-Zell-Medium in einer Konzentration von 0,3 Mio Zellen je Loch einer 24-Loch-Platte ausgesät. Die Zellen wurden in frische RetroNectin-Platten unter Zugabe von Protaminsulfat und IL2 gegeben. Der eingefrorene Virusüberstand vom Vortag wurde zur Transduktion eingesetzt (Zentrifugation wie oben). 24 h nach der 2. Transduktion wurden die Zellen gewaschen und in frischem T-Zell-Medium und IL2-Zugabe (100 U/ml) aufgenommen.

Nach circa 3 bis 4 Tagen konnten die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert werden oder funktionell untersucht werden. Als Transfektionskontrolle wurde der ursprüngliche pMP71G_{PRE}-Vektor, der die eGFP-Sequenz beinhaltet, eingesetzt. Die Anzahl an grün fluoreszierenden Zellen gab Aufschluss über die Transduktionseffizienz und wurde am Durchflusszytometer gemessen.

5 Ergebnisse

5.1 Auswahl von Peptiden des Proteins FMNL1

5.1.1 Auswahl von Peptidepitopen

Für FMNL1 waren bislang noch keine Epitope bekannt, die auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden und von T-Zellen erkannt werden. Wichtige Schritte für die Präsentation von Peptiden sind das Schneiden im Proteasom, der TAP-Transport ins endoplasmatische Retikulum und die Bindung an das MHC-Klasse-I-Molekül, in unserem Fall HLA-A*0201.

Computerbasierte Algorithmen können angewendet werden, um herauszufinden, welche Peptide eines Proteins potentiell auf dem MHC-Klasse-I-Molekül HLA-A*0201 präsentiert werden können und somit immunogene Epitope darstellen.

Für die Bindungsvorhersage an HLA-A*0201 wurden die Programme BIMAS (Bioinformatics and Molecular Analysis Section, www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind, Parker et al, 1994), und SYFPEITHI (www.syphpeithy.de, Rammensee et al, 1999) verwendet. In diesen Programmen sind den Aminosäuren im Peptid unterschiedliche Bewertungskoeffizienten zugewiesen. Die Koeffizienten sind abhängig von der individuellen Aminosäure, deren Position im Peptid und der Auswahl des HLA-Moleküls. Die Programme berechnen Endbewertungen für die nonameren Peptidkandidaten. Die Endbewertung bei BIMAS gibt eine Abschätzung über die Halbzeit-Dissoziation: je größer die Zahl, desto stärker ist die Bindung des Peptides an das HLA-Molekül. Bei SYFPEITHI liegt die maximale Endbewertung für eine hohe Bindungswahrscheinlichkeit eines Peptides an HLA-A*0201 bei 36.

Für den TAP-Transport der Peptide ins endoplasmatische Retikulum spielen die Länge des Peptides und insbesondere die Art der Aminosäuren am Carboxy (C)- und Amino (N)-Terminus eine große Rolle. Peptide mit einer Länge zwischen 8 und 16 Aminosäuren werden am besten transportiert. Am C-Terminus sind beispielsweise die Aminosäuren Phenylalanin oder Leucin bevorzugt, während Asparaginsäure oder Serin an dieser Position für den TAP-Transport eher hinderlich sind. Für die vorhergesagten Peptide wurde die Anzahl günstiger und ungünstiger Aminosäuren anhand veröffentlichter Daten (Brusic et al, 1999; Uebel und Tampe, 1999) herausgesucht. In Tabelle 5.1 ist die Anzahl günstiger und ungünstiger Aminosäuren für die entsprechenden Peptide aufgeführt.

Mit dem Programm PAProC II (Prediction Algorithm for Proteasomal Cleavages, Kuttler et al, 2000; Nussbaum et al, 2001) wurde die Wahrscheinlichkeit für immunproteasomale Schnitte bestimmt (freundlicherweise durchgeführt von C. Kuttler, Institut für Biomathematik und

Biometrie, Helmholtz Zentrum München). Hierbei ist besonders der Schnitt am C-Terminus des Peptides entscheidend. In Tabelle 5.1 ist die Anzahl möglicher Schnitte innerhalb des Peptides und die Schnittwahrscheinlichkeit am C-Terminus aufgeführt.

Tabelle 5.1 Bewertungen verschiedener Peptidkandidaten von FMNL1

	Bindung an HLA-A2		TAP-Transport*		Proteasomale Schnittstellen°
Peptid	**SYFPEITHI** (Rammensee et al, 1999)	**BIMAS** (Parker et al, 1994)	**TAP** (Brusic et al, 1999)	**TAP** (Uebel und Tampe, 1999)	**PAProC II** (Kuttler et al, 2000; Nussbaum et al, 2001)
FMNL1-PP1 VLLEYLAFA	26	1620	1 / 0	0 / 1	+++ (3)
FMNL1-PP2 RLPERMTTL	24	201	4 / 0	2 / 1	++ (2)
FMNL1-PP6 CVNEIALSL	20	7,7	2 / 1	1 / 0	++ (1)
FMNL1-PP7 RLRLTESDKL	22	20,4	2 / 1	2 / 1	++ (2)
FMNL1-PP8 TLLHYLVKV	31	592	2 / 0	1 / 1	++ (4)
Flu GILGFVFTL	30	551	3 / 0	1 / 0	++ (3)
Her2/neu$_{369}$ KIFGSLAFL	28	481	4 / 0	3 / 0	- (3)
Tyrosinase$_{369}$ YMDGTMSQV	22	213	2 / 2	1 / 2	+ (1)
IPS IPSINVHHY	7	0 (HLA B35: 40)	1 / 1	0 / 1	+++ (2)
FRL-PP1 RLPERMNTL	25	201	~	~	~
HDAC6-PP1 RLAERMTTR	16	0	4 / 0	2 / 0	++ (1)

* Anzahl günstiger / ungünstiger Aminosäuren
° Schnittwahrscheinlichkeit am C-Terminus: +++ sehr hoch, ++ hoch, + schwach, - unwahrscheinlich (Anzahl vorhergesagter Schnitte innerhalb des Peptides)
~ nicht durchgeführt, da es sich um ein Mauspeptid handelt
orange: Peptid gegen das spezifische T-Zellen selektiert werden konnten
PP: Peptid

In Tabelle 5.1 sind einige Peptidkandidaten von FMNL1 aufgeführt. Zum Vergleich sind zusätzlich die bereits bekannten HLA-A2 bindenden T-Zellepitope Flu, Her2/neu$_{369}$ und Tyrosinase$_{369}$, sowie das HLA-B35-bindende Peptid IPS gezeigt. Des Weiteren sind die in verschiedenen Experimenten zur Kontrolle eingesetzten Peptide FRL-PP1 (FRL: formin-related protein in leukocytes) und HDAC6-PP1 (HDAC6: Histondeacetylase 6) angegeben. Die ausgewählten FMNL1-Peptide PP1, PP2, PP6, PP7 und PP8 zeigten eine hohe

Bindungswahrscheinlichkeit an HLA-A2 und hatten mehr günstige als ungünstige Aminosäuren für den TAP-Transport. Darüber hinaus wiesen sie eine hohe bis sehr hohe Wahrscheinlichkeit auf, am C-Terminus im Proteasom geschnitten zu werden. Die bekannten T-Zellepitope Flu, Her2/neu$_{369}$ und Tyrosinase$_{369}$ hatten eine hohe Bindungswahrscheinlichkeit an HLA-A2 und wiesen mehr günstige als ungünstige Aminosäuren für den TAP-Transport auf. Sie zeigten eine schwache bis hohe C-terminale Schnittwahrscheinlichkeit, für Her2/neu$_{369}$ wurde jedoch kein C-terminaler Schnitt vorhergesagt. Das HLA-B35-bindende Peptid IPS hat erwartungsgemäß eine niedrige Bewertung für eine Bindung an HLA-A2. Das Peptid FRL-PP1 bindet nach den Berechnungen beider Programme gut an HLA-A2. Die Bindungswahrscheinlichkeit für HDAC6 ist niedrig.

5.1.2 Überprüfung der Bindung der Peptidkandidaten an HLA-A2

Im ersten Schritt wurden Peptide von FMNL1 mittels computerbasierter Algorithmen ausgewählt. Danach wurden für die vorwiegend verwendeten Peptide Peptid-Kompetitionsversuche durchgeführt, um die tatsächliche Bindungsfähigkeit an HLA-A2 zu untersuchen. Hierzu wurde der T-Zell-Klon IVSB (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von T. Wölfel, Wolfel et al, 1994), der das Peptid Tyrosinase$_{369}$ erkennt, in einem Chrom-Freisetzungsversuch als Werkzeug eingesetzt. T2-Zellen wurden zunächst mit den Peptidkandidaten (100 µM) beladen, die auf Bindung an HLA-A2 untersucht werden sollten. Darüber hinaus wurden sie 30 min später mit dem Peptid Tyrosinase$_{369}$ (1 µg/ml) beladen. Nach weiteren 1,5 h Inkubation im Brutschrank wurden die T2-Zellen im Chrom-Freisetzungsversuch mit einem E:T-Verhältnis von 2,5:1 eingesetzt. Wenn das zu untersuchende Peptid binden konnte, wurde die Bindung des danach beladenen Tyrosinase$_{369}$-Peptids inhibiert. Das Resultat war eine verminderte Zytotoxizität des IVSB-T-Zellklons gegen die T2-Zellen. Indirekt konnte somit die Bindung des zu untersuchenden Peptids nachgewiesen werden. Als Kontrollpeptide wurden das HLA-A2 bindende Influenza-Epitop Flu und das HLA-B35 bindende Cytomegalo-Virus-Epitop IPS verwendet.

Für die Peptide Flu, FMNL1-PP1, FMNL1-PP2, FMNL1-PP6 und FMNL1-PP8 konnte eine Bindung an HLA-A2 nachgewiesen werden. Sie inhibierten die Bindung des Tyrosinase$_{369}$-Peptides unterschiedlich stark. Die Peptide Flu, FMNL1-PP1 und FMNL1-PP8, die eine sehr hohe Bindungsvorhersage an HLA-A2 hatten, zeigten auch die stärkste Inhibition im Versuch. Das Kontrollpeptid IPS inhibierte die Tyrosinase$_{369}$-spezifische Zytotoxizität nicht. T2-Zellen, die nur mit den zu untersuchenden Peptiden beladen worden waren, wurden nicht erkannt (siehe Abbildung 5.1). Eine Bindung von FMNL1-PP7 konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Die Bindung des Peptides HDAC6-PP1 an HLA-A2 wurde in einem Stimulationsansatz überprüft, in dem der FMNL1-PP2-spezifische T-Zell-Klon SK22 eingesetzt wurde, der in der vorliegenden Arbeit selektiert und charakterisiert wurde. Hierzu wurden 100 µM HDAC6-PP1 und 1 µM FMNL1-PP2 auf T2-Zellen zur Bindungskompetition auf HLA-A2 beladen (E:T = 1:2). Im Vergleich zu T2-Zellen, die nur mit FMNL1-PP2 beladen worden waren, wurden T2-Zellen, die zunächst mit HDAC6-PP1 und anschließend mit FMNL1-PP2 beladen worden waren, schwächer erkannt. Durch verminderte IFNγ-Ausschüttung (Messung im ELISA) konnte somit trotz niedriger Bindungsvorhersage die Bindung von HDAC6-PP1 an HLA-A2 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

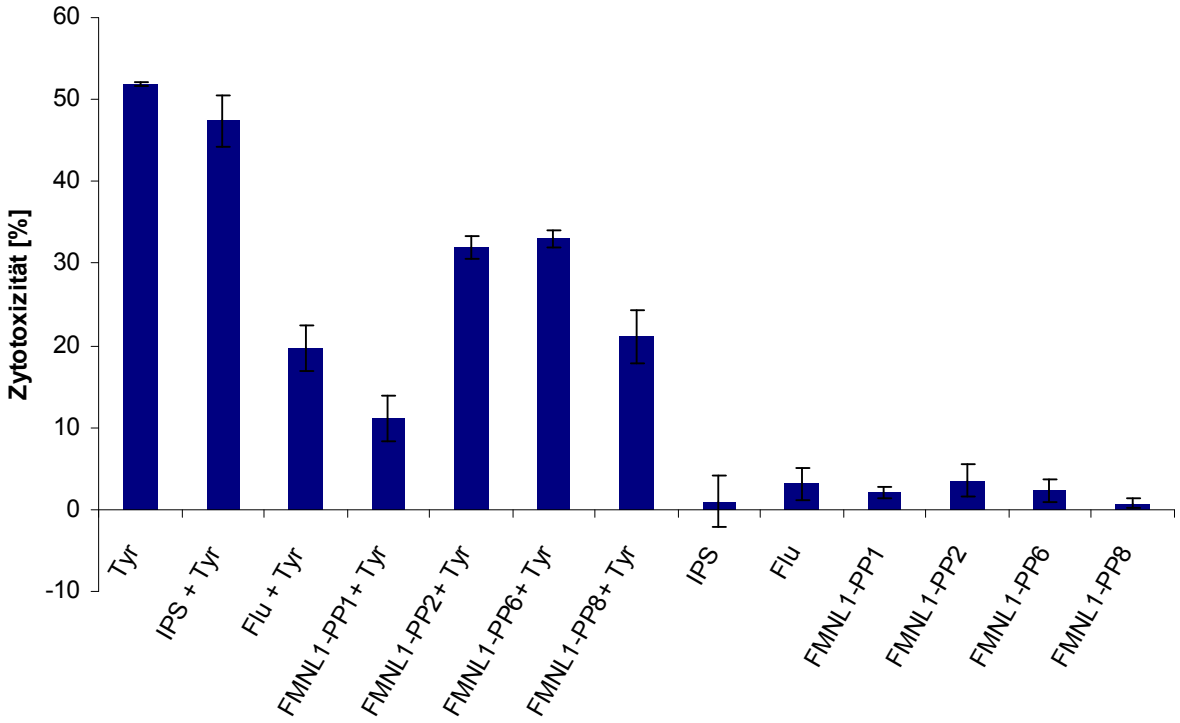


Abbildung 5.1 Bindungsnachweis verschiedener Peptide an HLA-A2. T2-Zellen wurden zunächst mit Peptiden, die auf ihre Bindungsfähigkeit an HLA-A2 untersucht werden sollten, beladen. Zusätzlich dazu wurden sie 30 min später mit dem Peptid Tyrosinase$_{369}$ (Tyr) beladen. Zur Kontrolle wurden die T2-Zellen mit den Peptiden auch einzeln beladen. Die T2-Zellen wurden mit ^{51}Chrom markiert und mit dem Tyrosinase$_{369}$-spezifischen T-Zellklon IVSB für 4 h inkubiert. Das im Überstand befindliche ^{51}Chrom wurde gemessen und die spezifische Zelllyse in Prozent errechnet. Das HLA-A2-bindende Peptid Flu diente als Positivkontrolle und das HLA-B35-bindende Peptid IPS als Negativkontrolle. Eine verminderte Lyse von T2-Zellen, die mit dem zu untersuchenden Peptid und Tyrosinase$_{369}$ beladen waren, durch den T-Zellklons IVSB zeigte indirekt eine Bindung des zu untersuchenden Peptides an. Es sind die Mittelwerte von Triplikaten ± Standardabweichung gezeigt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens 2 Experimente.

5.2 Etablierung des Stimulationsansatzes zur Selektion allo-restringierter peptidspezifischer zytotoxischer T-Zellen

5.2.1 Parameter zur Stimulation von T-Zellen

Wie können allo-HLA-A2-restringierte, peptidspezifische T-Zellen selektiert werden? Prinzipiell werden hierzu HLA-A2-negative T-Zellen mit HLA-A2-positiven Stimulatorzellen, die das gewünschte Peptid präsentieren, in vitro stimuliert. Stauss und Kollegen setzten als antigenpräsentierende Zellen peptidbeladene T2-Zellen ein und konnten allo-MHC-restringierte peptidspezifische T-Zellen selektieren (Morris et al, 2003; Stauss, 1999). Die zur Stimulation eingesetzten TAP-defizienten T2-Zellen haben einen Defekt in der Präsentation zelleigener Peptide. Sie eigenen sich zur Stimulation von T-Zellen, da sie mit dem gewünschten Peptid beladen werden können und aufgrund geringer Präsentation zelleigener Peptide eine selektive Anreicherung der gewünschten Peptidspezifität bei T-Zellen versprechen. Britten und Kollegen zeigten jedoch im Vergleich zu K526-A2 eine erhöhte Hintergrundaktivität gegen T2-Zellen, wenn diese als antigenpräsentierende Zellen in T-Zell-Funktionsversuchen eingesetzt wurden (Britten et al, 2002).

Zahlreiche Parameter spielen bei der Stimulation und Selektion von allorestringierten peptid-spezifischen T-Zellen eine Rolle und sind nicht sicher definiert: die Zusammensetzung der Ausgangspopulation bei der Primärstimulation, die Peptidmenge zur Beladung von T2-Zellen, das Stimulationsverhältnis Effektor- zu Stimulatorzellen, die Menge an Zytokinen (v. a. IL2), ebenso wie die Anzahl und Zeitpunkte der Restimulationen und Sortierung. Weiterhin spielt die Art der antigenpräsentierenden Zelle (z. B. T2, K526-A2, CLL) vermutlich eine große Rolle in Hinblick auf die selektive Präsentation des Peptides und passende Kostimulation.

Da optimale Stimulationsbedingungen im allogenen System nicht bekannt sind, wurden verschiedene Stimulationsansätze zur Selektion von allorestringierten peptidspezifischen T-Zellen durchgeführt, von denen einige in Tabelle 5.2 gezeigt sind. Bestimmte Stimulations-ansätze wurden nach einer Multimer-Vorfärbung zur Sortierung ausgewählt. Unter diesen Stimulationsansätzen war jedoch nur eine Kondition, in der letztendlich Multimer-positive Zellen nachgewiesen werden konnten. Die Untersuchungen konnten jedoch nicht für jeden Stimulationsparameter quantitativ durchgeführt werden. Der Einfluss der Kostimulation wurde in einem vergleichenden Thymidin-Proliferationsversuch untersucht (siehe Kapitel 5.2.2). Zur genaueren Bestimmung weiterer Parameter zur Selektion allorestringierter, peptidspezifischer T-Zellen müssten jedoch noch weitere Versuche folgen. In Kapitel 5.2.3 ist beschrieben wie bei dem erfolgreichen Ansatz vorgegangen wurde.

Tabelle 5.2 Unterschiedliche Ansätze zur allogenen Stimulation von T-Zellen HLA-A2-negativer gesunder Spender.

Spender	Primärstimulation (Tag 0)		Restimulation (Tag 5)		Peptide	IL2 (U/ml)
A	T2	(10:1)	T2	(10:1)	**FMNL1-PP2, -PP6**, -PP7,	50
	T2	(10:1)	T2+BZ	(10:1:5)	FMNL1-PP2, -PP6, -PP7	50
	T2	(10:1)	K562-A2 + CD28-Antikörper	(10:1)	FMNL1-PP2, -PP6, **-PP7**	50
B	T2	(10:1)	CLL	(100:1)	**FMNL1-PP2, -PP6, PP7**	250
	T2	(10:1)	CLL	(10:1)	FMNL1-PP2, -PP6, PP7	250
	T2+BZ	(10:1:5)	CLL	(100:1)	FMNL1-PP6	50
	T2+BZ	(10:1:5)	CLL	(10:1)	FMNL1-PP6	50
	CLL	(10:1)	CLL	(10:1)	**Sortierung mit Multimeren FMNL1-PP2, -PP6, PP7**	250
C	T2	(10:1)	T2+BZ	(10:1:5)	**FMNL1-PP2, -PP6, PP7**	250
	T2	(10:1)	T2+BZ	(10:1:5)	**FMNL1-PP2, -PP6, -PP7**	50
	T2+BZ	(10:1:5)	T2+BZ	(10:1:5)	FMNL1-PP6	50
	CLL	(10:1)	CLL	(10:1)	-	250

T-Zellen HLA-A2-negativer Spender wurden aus peripherem Blut negativ isoliert und an Tag 0 zur Primärstimulation eingesetzt. Als antigenpräsentierende Zellen dienten mit 10 µM Peptid beladene T2-Zellen oder CD40-aktivierte CLL-Zellen. Zusätzlich wurden in manchen Ansätzen autologe CD40-aktivierte B-Zellen (BZ) aus demselben Spender eingesetzt. An Tag 5 wurden die T-Zellen unterschiedlich restimuliert: mit 10 µM peptidbeladenen T2-Zellen, mit 10 µM peptidbeladenen K526-A2-Zellen einschließlich agonistischer CD28-Antikörper, mit CD40-aktivierten CLL-Zellen oder zusätzlich mit CD40-aktivierten B-Zellen. Unterschiedliche IL2-Konzentrationen wurden wie angegeben verwendet. In Klammern ist das Verhältnis T-Zelle zu antigenpräsentierender Zelle oder T-Zelle zu antigenpräsentierender Zelle zu B-Zelle angegeben. Fett markierte Peptide markieren Ansätze, bei denen T-Zellen mit Hilfe von Multimeren sortiert wurden. In der Farbe orange ist der Ansatz angegeben, der erfolgreich zur Anreicherung von allorestringierten, peptidspezifischen T-Zellen führte.

5.2.2 Einfluss der Kostimulation auf die Proliferation von T-Zellen

Einerseits ist eine kostimulatorische Komponente für eine ausreichende Aktivierung von T-Zellen essentiell, andererseits wurde aber auch beobachtet, dass kostimulatorische Signale (CD28) bei starkem T-Zellrezeptor-Signal eine T-Zellexpansion verhindern können (Yu et al, 2003). Um den Einfluss der Kostimulation auf die Proliferation von T-Zellen im allogenen System zu untersuchen, wurde ein Thymidin-Proliferationsversuch durchgeführt. Hierzu wurden zwei verschiedene Zelllinien (T2 und K526-A2) als antigenpräsentierende

Zellen (APZ) eingesetzt und mit 10 µM Tyrosinase$_{369}$ beladen. Außerdem wurden unterschiedliche Kostimulationsbedingungen ausgetestet. Hierzu wurden B-Zellen, die auf CD40L-exprimierenden Fibroblasten aktiviert worden waren, ein agonistischer CD28-Antikörper oder B7.1-Fusionsproteine eingesetzt. Sie wurden entweder in der Primärstimulation (Tag 0) oder in der Restimulation (Tag 5) eingesetzt. Drei Tage nach der Restimulation wurde die Proliferation der T-Zellen gemessen. Im Gegensatz zu K562-A2 exprimieren T2-Zellen eigene kostimulatorische Moleküle (CD80 und CD86) auf der Oberfläche (Daten nicht gezeigt).

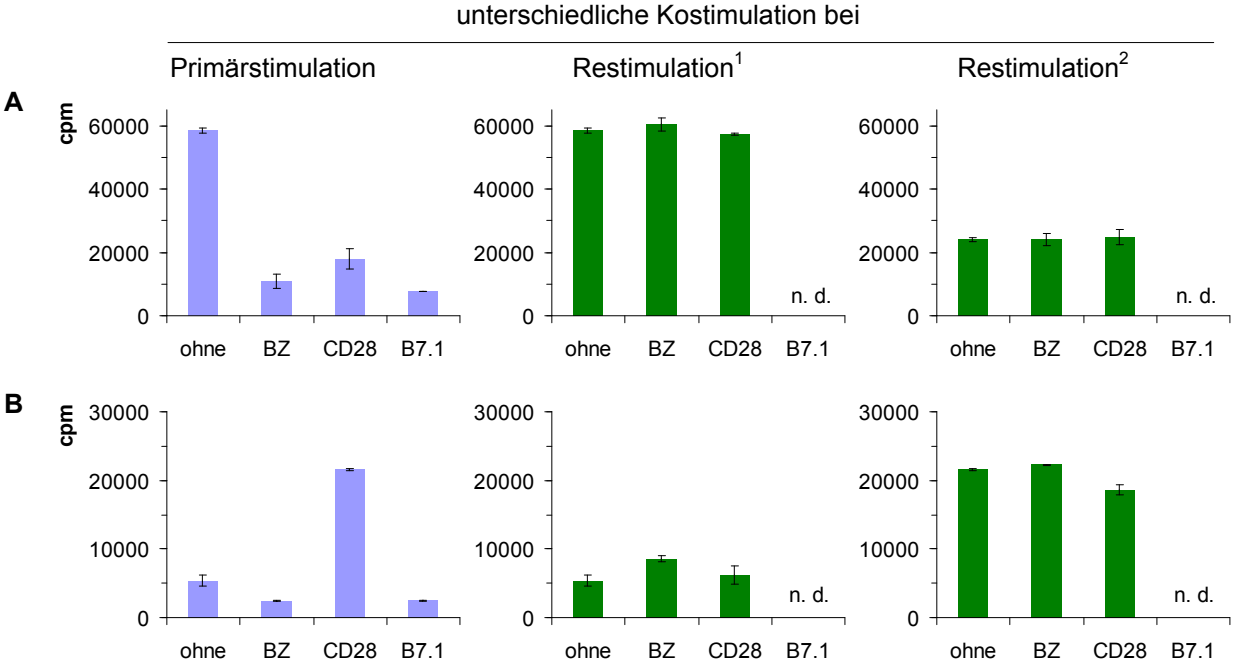


Abbildung 5.2 Effekt verschiedener Kostimulationsbedingungen auf die Proliferation von allogenen T-Zellen in Antwort auf peptidbeladene T2- bzw. K526-A2-Zellen. T-Zellen wurden von HLA-A2-negativen Spendern negativ isoliert und mit Tyrosinase$_{369}$-beladenen (A) T2-Zellen bzw. (B) K526-A2-Zellen an Tag 0 primärstimuliert und an Tag 5 restimuliert. Zur Primär- bzw. Restimulation der T-Zellen wurden verschiedene kostimulatorische Bedingungen getestet. Hierzu wurde keine zusätzliche Kostimulation („ohne“), autologe CD40-aktivierte B-Zellen (BZ), ein agonistischer CD28-Antikörper oder ein B7.1-Fusionsprotein eingesetzt. Die Thymidinaufnahme der Zellen drei Tage nach der Restimulation gab hierbei Aufschluss über die Proliferation. Die blauen Diagramme zeigen Versuchsbedingungen an, bei denen in der Primärstimulation unterschiedlich kostimuliert wurde und bei der Restimulation nicht kostimuliert wurde. Die grünen Diagramme zeigen Ergebnisse von Versuchen, die in der Restimulation unterschiedliche kostimulatorische Bedingungen hatten, und in der Primärstimulation entweder [1] nicht kostimuliert, oder [2] mit einem CD28-Antikörper behandelt wurden. Es sind Duplikate mit Abweichung gezeigt. cpm: counts per minute; n. d.: nicht durchgeführt.

Unter Einsatz von T2-Zellen als APZ zeigten T-Zellen die größte Proliferation, wenn sie bei der Primärstimulation nicht zusätzlich kostimuliert wurden (siehe Abbildung 5.2 A). Bei K526-A2 Zellen als APZ war die Proliferation von T-Zellen deutlich erhöht, wenn ein CD28-Antikörper in der Primärstimulation zugegeben wurde (siehe Abbildung 5.2 B). Sowohl bei Stimulation mit T2-Zellen, als auch mit K526-A2, war die Stimulationsart bei der Primär-

stimulation entscheidend. Unterschiedliche Stimulationsbedingungen bei der Restimulation hatten keinen großen Einfluss auf die Proliferation der Zellen. Insgesamt proliferierten die T-Zellen in Antwort auf K562-A2 wesentlich schwächer als in den Ansätzen mit T2-Zellen als APZ.

5.2.3 Vorgehensweise bei erfolgreicher Stimulation

Verschiedene Stimulationsansätze wurden zur Generierung allorestringierter, peptidspezifischer T-Zellen durchgeführt. Der Ansatz, der erfolgreich zur Isolation dieser Zellen führte, enthielt in der Tat keine zusätzliche Kostimulation. Um gesicherte Aussagen über eine optimale Vorgehensweise zu bekommen, müssten breit angelegte Versuchsreihen durchgeführt werden. Dies war jedoch nicht primäres Ziel der vorliegenden Arbeit. In dem erfolgreichen Stimulationsansatz zur Stimulation von allorestringierten peptidspezifischen T-Zellen wurde wie folgt vorgegangen (siehe Abbildung 5.3):

PBL von HLA-A2-negativen gesunden Spendern wurden mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll) aus dem Blut isoliert und die CD3-positiven Zellen mittels magnetischer Kügelchen von den restlichen Zellen getrennt. TAP-defiziente HLA-A2-positive T2-Zellen wurden mit 10 µM Peptid (FMNL1-PP2) beladen, bestrahlt und in einem Effektor zu Stimulator-Verhältnis von 10:1 zu den CD3-positiven Zellen gegeben (Primärstimulation, Tag 0). An Tag 5 wurden die T-Zellen erneut mit peptidbeladenen, bestrahlten T2-Zellen im gleichen Verhältnis restimultiert. Alle drei bis vier Tage wurde IL2 (50 U/ml) zugegeben. Aus der Hauptpopulation von peptidunspezifischen Zellen wurden die peptidspezifischen allorestringierten T-Zellen mit Hilfe von Mulitmeren am Durchflusszytometer sortiert und sofort wieder kultiviert. Hierzu wurden die Zellen mittels limitierender Verdünnung vereinzelt (Klonierung) oder als Linie angesetzt. Die Zellen wurden mit allogenem PBL-Pool unspezifisch stimuliert. Gewachsene T-Zellklone und T-Zelllinien wurden auf ihre Oberflächenmoleküle, lytische Aktivität, Zytokinproduktion, Klonalität und auf ihren T-Zellrezeptor hin untersucht.

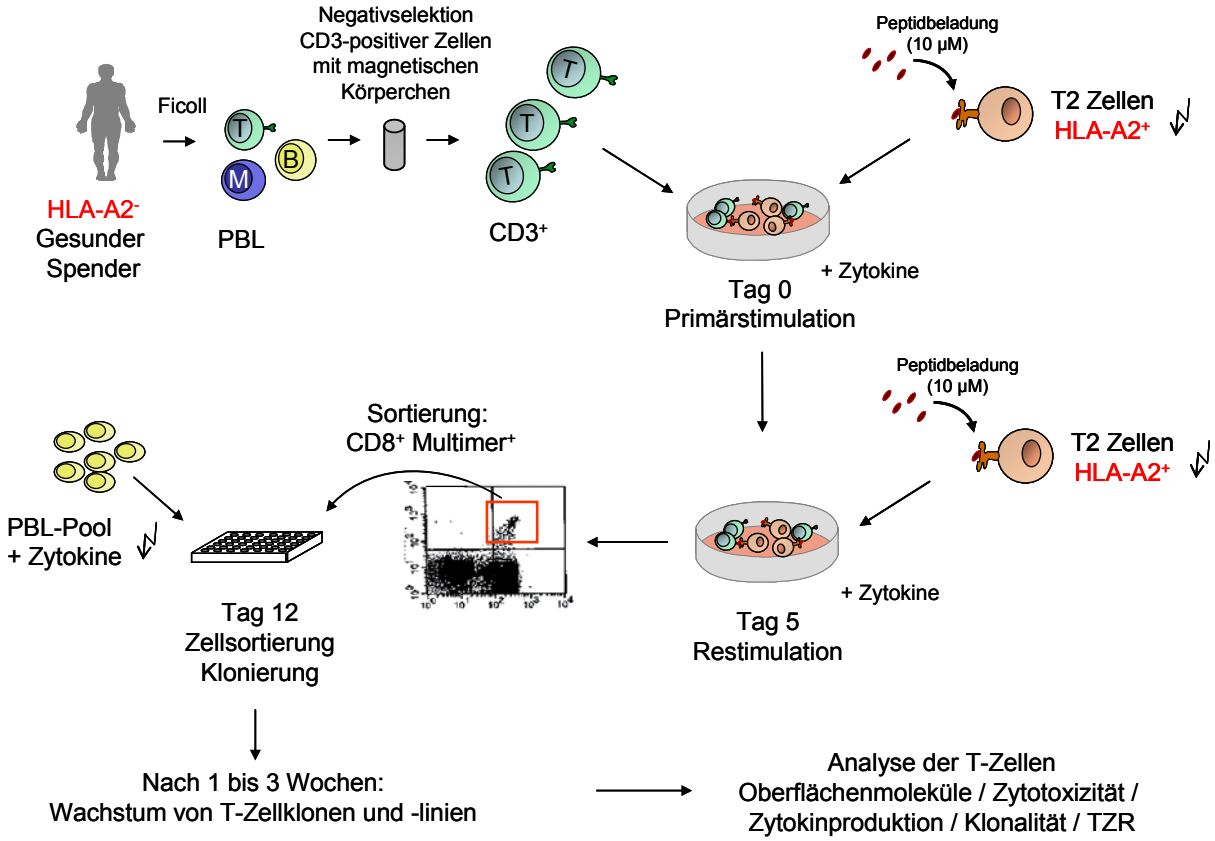


Abbildung 5.3 Stimulationsansatz zur Selektion allorestringierter, peptidspezifischer T-Zellen. Erläuterung siehe Text

5.3 Selektion allorestringierter FMNL1-PP2 spezifischer T-Zellen

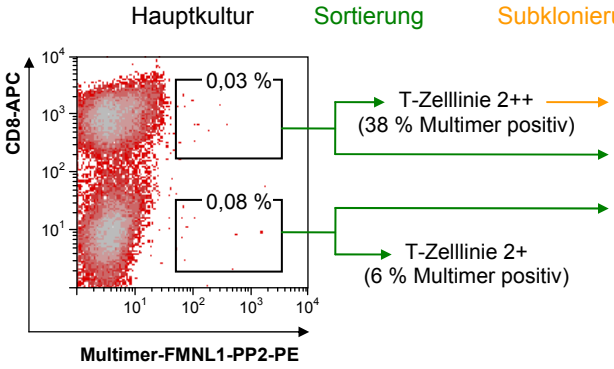
Wie bereits in Kapitel 5.2.3 beschrieben, wurde in dem erfolgreichen Ansatz zur Selektion von allorestringierten peptidspezifischen T-Zellen das Peptid FMNL1-PP2 eingesetzt. Alle folgenden hier beschriebenen Ergebnisse beziehen sich auf diesen Ansatz.

5.3.1 Sortierung und Klonierung von mit FMNL1-PP2 stimulierten T-Zellen

Die T-Zellkultur, die zwei mal mit 10 µM FMNL1-PP2 beladenen T2-Zellen stimuliert worden war, wurde am Tag 12 nach der Primärstimulation mit dem FMNL1-PP2-Multimer und einem CD8-Antikörper gefärbt und am Durchflusszytometer sortiert. Wie in Abbildung 5.4 im Überblick gezeigt, wurden hierbei Zellen sortiert, die sowohl CD8- als auch Multimer-positiv waren („2++“). Außerdem wurden Zellen sortiert, die CD8-negativ und Multimer-positiv waren („2+“), um nicht Zellen zu verlieren, die evtl. fälschlicherweise im FACS CD8-negativ erschienen (beispielsweise aufgrund sterischer Behinderung des großen Multimers oder verminderter CD8-Expression). Von beiden Konditionen wurden Linien angesetzt (circa 4000 bzw. 6000 Zellen pro 96-Loch) und mittels limitierender Verdünnung kloniert. Hierzu wurden

die Zellen so verdünnt, dass rechnerisch eine Zelle je 96-Loch ausplattiert wurde (drei Platten für 2++, zwei Platten für 2+). Alle Konditionen wurden mit allogenem PBL-Pool und Zytokinen unspezifisch restimuliert. Neun Tage nach Sortierung wurden die beiden T-Zelllinien durchflusszytometrisch untersucht. In der Linie 2+ waren 6 % der Zellen Multimer-FMNL1-PP2-positiv, in der Linie 2++ 38 %. Letztere wurde zusätzlich 14 Tage nach der Sortierung subkloniert („SK“) (10 Platten, eine Zelle pro 96-Loch).

In Abbildung 5.4 ist eine Übersicht über die Vorgehensweise, Namensgebung und die Anzahl der gewachsenen monoklonalen oder oligoklonalen T-Zellen gezeigt. Außerdem ist die Anzahl der mono- bzw. oligoklonalen T-Zellen aufgeführt, die in einem ersten Zytotoxizitätsversuch gegen FMNL1-PP2-beladene T2-Zellen spezifisch reagierten und gleichzeitig nicht T2-Zellen erkannten, die mit dem Influenza-Peptid Flu (MP58) beladen worden waren oder unbeladen waren (spezifisches Reaktionsmuster). Mono- bzw. oligoklonale T-Zellen mit unspezifischem Reaktionsmuster erkannten beide Peptide auf T2-Zellen gleich stark oder nur schwach (siehe insbesondere Kapitel 5.3.2.1, S. 73).



	Anzahl mono- / oligo-klonaler T-Zellen	Reaktionsmuster gegen peptidbeladene T2	
		FMNL1-PP2 spezifisch	FMNL1-PP2 unspezifisch
Subklone „SK“	54	29	25
Primärklone „2++“	7	2	5
Primärklone „2+“	6	1	5
Summe	67	32	35

Abbildung 5.4 Vorgehensweise bei der Sortierung und Klonierung zur Selektion allo-restringierter, peptidspezifischer T-Zellen. Am Tag 12 nach der Primärstimulation wurden Multimer-FMNL1-PP2-positive Zellen aus der Hauptkultur am Durchflusszytometer sortiert. CD8/Multimer doppelt-positive (2++) und CD8-negative/Multimer-positive (2+) Populationen wurden sortiert und sowohl als Linien kultiviert, als auch direkt kloniert. In Klammern ist bei den T-Zelllinien der prozentuale Anteil Multimer-FMNL1-PP2-positiver Zellen circa 14 Tage nach Sortierung angegeben. Die T-Zelllinie 2++ wurde 14 Tage nach der Sortierung subkloniert. In der Tabelle ist die Anzahl gewachsener mono- bzw. oligoklonaler T-Zellen der entsprechenden Konditionen aufgeführt. Des Weiteren ist das Reaktionsmuster gegen peptidbeladene T2-Zellen aus einem ersten Chrom-Freisetzungsversuch gezeigt. FMNL1-PP2 spezifisch: mit FMNL1-PP2 beladene T2-Zellen wurden erkannt und gleichzeitig wurden mit Flu beladene oder unbeladene T2-Zellen nicht erkannt; FMNL1-PP2 unspezifisch: die beiden FMNL1-PP2 und Flu-peptidbeladenen T2-Zell-Konditionen wurden gleich stark oder schwach erkannt.

In Abbildung 5.5 A ist der Aufreinigungsprozess von Multimer-FMNL1-PP2/CD8 doppelt positiven Zellen durch Sortierung der Hauptkultur an Tag 12 nach Primärstimulation und Subklonierung der Linie 2++ 14 Tage nach Sortierung dargestellt. T-Zellklone mit bis zu 99 % Multimer-FMNL1-PP2-positiven Zellen konnten selektiert werden (17 mono- bzw. oligoklonale T-Zellen wurden gefärbt, von denen 10 Multimer-FMNL1-PP2-positiv waren). Die T-Zelllinie 2++ wurde außerdem mit verschiedenen Kontroll-Multimeren (HLA-A2 oder HLA-B7) gefärbt, die das Cytomegalovirus (CMV)-Peptid $pp65_{495\text{-}503}$ (NLVPMVATV) präsentierten (Multimer-A2-CMV-pp65, Multimer-B7-CMV-pp65). Beide Multimere wurden nicht gebunden (siehe Abbildung 5.5 B).

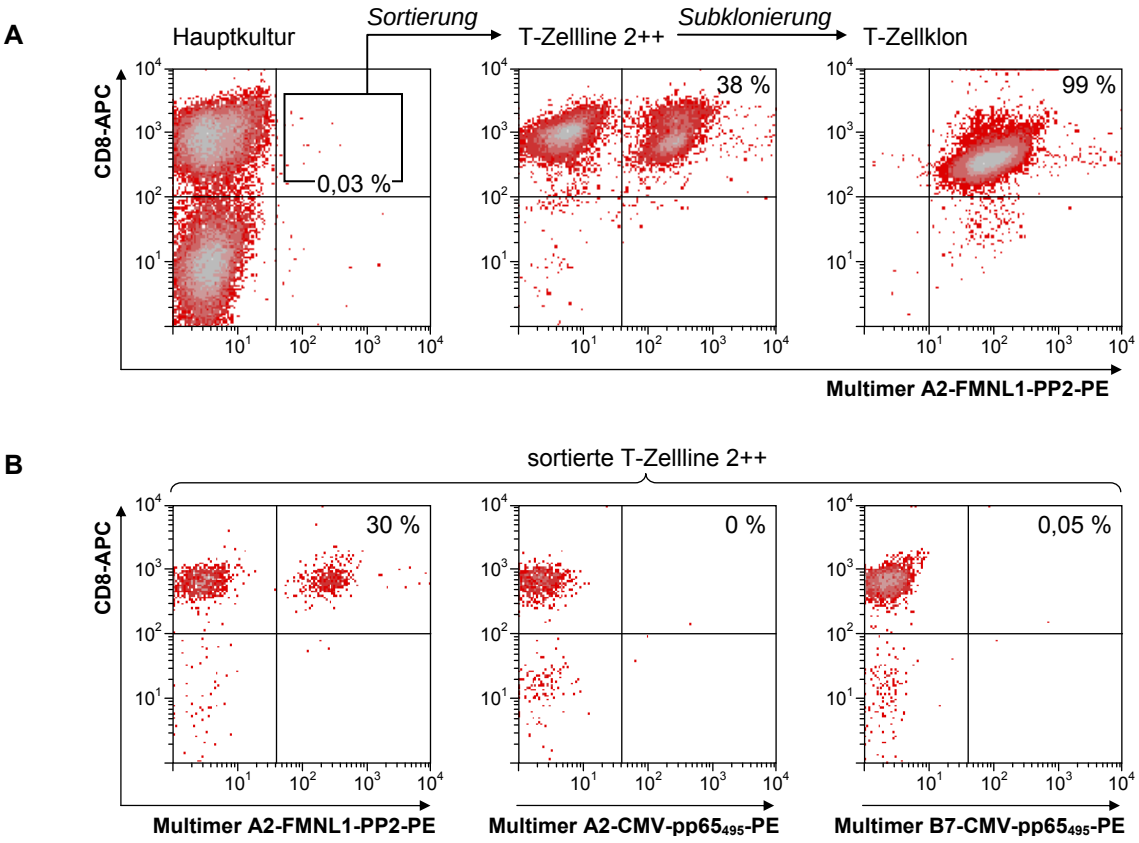


Abbildung 5.5 Sortierung und Klonierung allorestringierter, peptidspezifischer T-Zellen mit Hilfe von Multimeren. A: Aus der Hauptkultur von T-Zellen, die mit FMNL1-PP2 beladenen T2-Zellen stimuliert worden waren, wurde an Tag 12 nach der Primärstimulation die CD8/Multimer-doppelt positive Population am Durchflusszytometer sortiert. Die hieraus gewachsene T-Zelllinie 2++ wurde subkloniert, wodurch T-Zellklone isoliert werden konnten, die einen hohen Reinheitsgrad an Multimer-FMNL1-PP2-positiven Zellen aufwiesen. B: die sortierte T-Zelllinie 2++ wurde mit verschiedenen Multimeren und CD8 gefärbt.

5.3.2 Analyse der T-Zellklone

5.3.2.1 Erster Funktionstest der mono- bzw. oligoklonalen T-Zellen

Von den insgesamt 67 gewachsenen mono- bzw. oligoklonalen T-Zellen wurde ein erster Test zur Untersuchung ihrer lytischen Aktivität durchgeführt. Hierzu wurden T2-Zellen mit 10 µM FMNL1-PP2 beladen, und in einem Standard-4 h-Chrom-Freisetzungsversuch als Zielzellen eingesetzt. Als Kontrollzellen dienten unbeladene oder mit 10 µM Flu beladene T2-Zellen. Das E:T-Verhältnis wurde in diesem Versuch geschätzt und lag zwischen 0,5:1 und 8:1.

32 mono- bzw. oligoklonale T-Zellen lysierten spezifisch FMNL1-PP2 beladene T2-Zellen, aber nicht die Kontrollzellen. 35 mono- bzw. oligoklonale T-Zellen erkannten T2-Zielzellen gleich stark oder schwach, unabhängig davon, mit welchem Peptid die T2 Zellen beladen worden waren. In Abbildung 5.6 sind repräsentative mono- bzw. oligoklonale T-Zellen gezeigt.

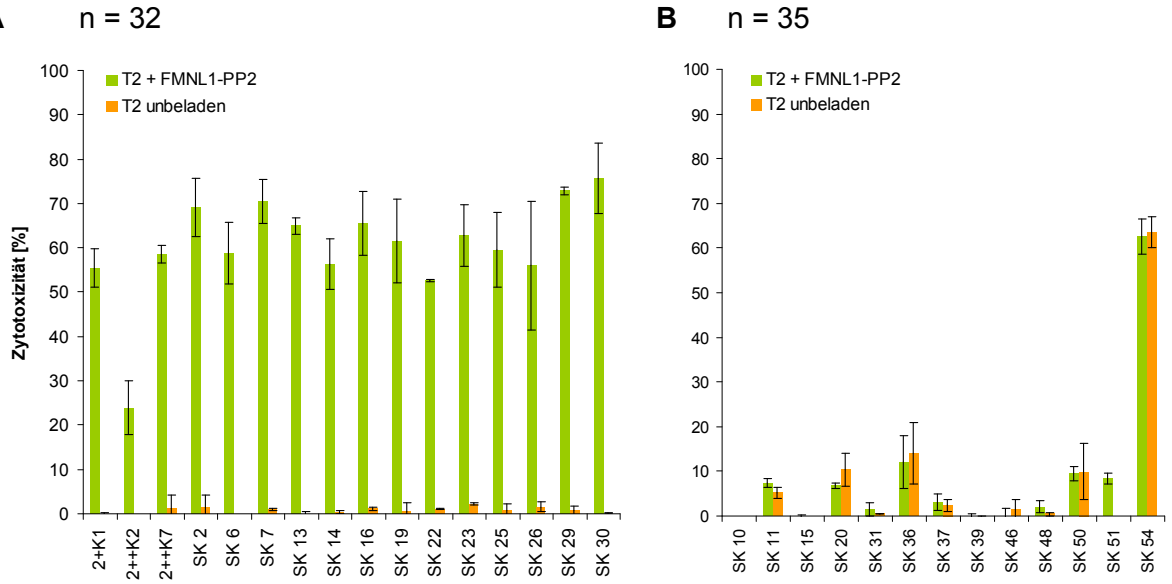


Abbildung 5.6 Erste Zytotoxizitätsuntersuchung zur Selektion allorestringierter, FMNL1-PP2-spezifischer T-Zellklone/oligoklonaler T-Zellen. In einem Standard-4 h-Chrom-Freisetzungsversuch wurden T2-Zellen, mit 10 µM FMNL1-PP2 beladen oder unbeladen, als Zielzellen für die gewachsenen mono- bzw. oligoklonalen T-Zellen eingesetzt. Für repräsentative Klone ist die berechnete spezifische Zelllyse in Prozent gezeigt. A: spezifische Reaktion auf FMNL1-PP2-beladene T2-Zellen (32 mono- bzw. oligoklonale T-Zellen); B: unspezifische oder fehlende Reaktivität (35 mono- bzw. oligoklonale T-Zellen). Das E:T-Verhältnis wurde geschätzt und lag zwischen 0,5:1 und 8:1. Es sind die Mittelwerte und Abweichung von Duplikaten gezeigt.

Nicht aktive oder unspezifisch reagierende mono- bzw. oligoklonale T-Zellen wurden verworfen. Mono- bzw. oligoklonale T-Zellen, die im ersten Zytotoxizitätsversuch FMNL1-PP2-beladene T2-Zellen spezifisch erkannten, wurden in Kultur gehalten. Die

meisten mono- bzw. oligoklonale T-Zellen hatten nur eine begrenzte Lebensdauer und konnten nicht weiter analysiert werden. Elf mono- bzw. oligoklonale T-Zellen wuchsen über einen Zeitraum von einigen Wochen. SK22 konnte als einziger T-Zellklon bis zu 44 Wochen (22 Restimulationen) kultiviert werden.

Die T-Zellrezeptor-Analyse ergab, dass neun dieser elf analysieren T-Zellpopulationen (2++K2, SK2, SK13, SK14, SK16, SK19, SK22, SK29, SK30) einen identischen T-Zell-Rezeptor besaßen und tatsächlich monoklonal waren. Eine war biklonal (SK23), eine weitere oligoklonal (2+K1) (siehe insbesondere Kapitel 5.4, S. 84). Die T-Zellklone, die denselben T-Zellrezeptor besaßen wie SK22, zeigten ähnliche Aktivität wie der gut proliferative T-Zellklon SK22. Im Folgenden wird daher ausschließlich auf die Funktionalität des T-Zellklons SK22 eingegangen.

5.3.2.2 Peptidspezifität im Kontext von HLA-A2

Die Peptidspezifität des T-Zellklons SK22 wurde durch Untersuchung der Reaktivität auf ein ausgeweitetes Peptidspektrum in Chrom-Freisetzungsversuchen analysiert. Hierzu wurden T2-Zellen mit 10 µM Peptid beladen. T2-Zellen, die mit FMNL1-PP2 beladen waren, wurden lysiert, während sechs weitere HLA-A2-bindende Peptide (Flu, Tyrosinase$_{369}$, Her2/neu$_{369}$, FMNL1-PP1, FMNL1-PP6, FMNL1-PP8) nicht erkannt wurden (siehe Abbildung 5.7 A). Des Weiteren wurden zwei HLA-A2-bindende Peptide (FRL-PP1, HDAC6-PP1) getestet, die sich nur in wenigen Aminosäuren von FMNL1-PP2 unterschieden (siehe Abbildung 5.7 B).

FRL ist das zu 87,5 % homologe Protein von FMNL1 in der Maus (Krackhardt et al, 2002b). Das Peptid FRL-PP1 ist das entsprechende Peptid-Homolog zu FMNL1-PP2. Die beiden Peptide unterscheiden sich lediglich in einer Aminosäure. T2-Zellen, die mit FRL-PP1 beladen waren, wurden in ähnlichem Ausmaß erkannt wie FMNL1-PP2 beladene T2-Zellen. Somit ist eine wichtige Voraussetzung gegeben, den T-Zellrezeptor des T-Zellklons SK22 im Tiermodell einer HLA-A2-transgenen Maus zu untersuchen.

Das Peptid HDAC6-PP1 hat ebenfalls eine hohe Homologie zu FMNL1-PP2 und unterscheidet sich von diesem in nur zwei Aminosäuren. Mit HDAC6-PP1 beladene T2-Zellen wurden nicht erkannt, was auf eine hohe Peptidspezifität von SK22 schließen lässt.

Peptid	*Aminosäuresequenz*
FMNL1-PP2	RLPERMTTL
FRL-PP1	RLPERMNTL
HDAC6-PP1	RLAERMTTR

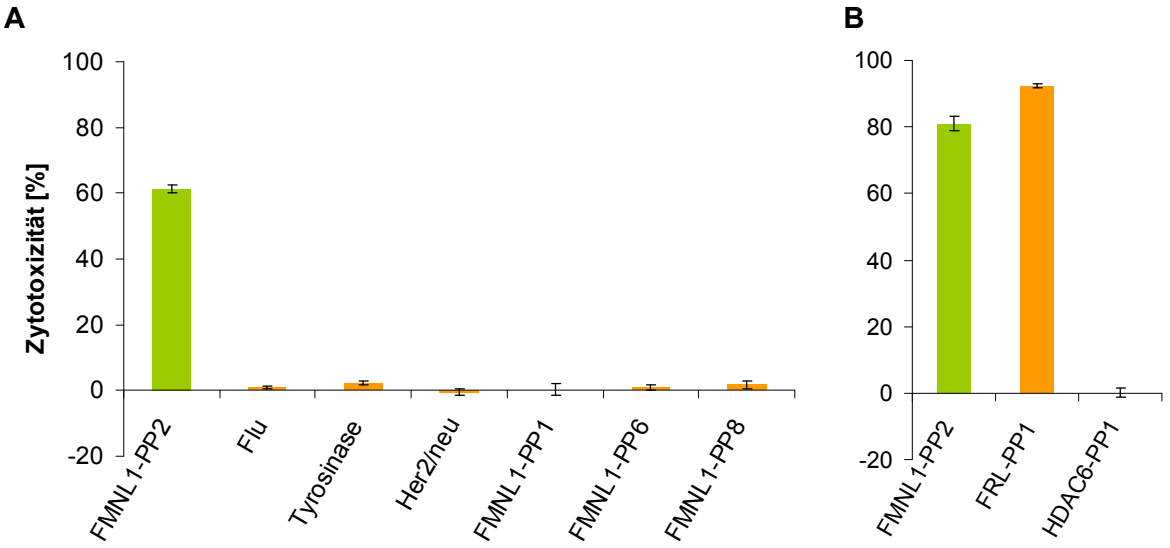


Abbildung 5.7 Peptidspezifität des T-Zellklons SK22. T2-Zellen wurden mit verschiedenen Peptiden (10 µM) beladen und als Zielzellen für den T-Zellklon SK22 in Chrom-Freisetzungsversuchen eingesetzt. A: sieben komplett verschiedene Peptide (E:T = 7,5:1); B: Peptide, die sich nur in ein oder zwei Aminosäuren von FMNL1-PP2 unterscheiden; FRL-PP1 ist das Maus-Homolog zu FMNL1-PP2 (E:T = 15:1). Es sind die Mittelwerte der spezifischen Zelllyse in Prozent ± Abweichung von Duplikaten gezeigt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei Versuche.

Die HLA-A2-Restriktion wurde in einem Blockierungsversuch nachgewiesen. In einem Stimulationsansatz wurden hierzu mit 10 µM FMNL1-PP2 beladene T2-Zellen mit dem HLA-A2-bindenden Antikörper HB54 (c_{end} = 4 ng/µl) blockiert und als Zielzellen für den T-Zellklon SK22 eingesetzt (E:T = 1:2). Die Überstände wurden nach 24 h Kokultur entnommen und die IFNγ-Konzentration im ELISA gemessen. Die Erkennung von FMNL1-PP2 beladenen T2-Zellen durch den T-Zellklon SK22 wurde durch den Antikörper blockiert (siehe Abbildung 5.8 A).

Um die T-Zellrezeptor-Abhängigkeit der Aktivität des T-Zellklons SK22 nachzuweisen, wurde die lytische Aktivität gegen K526 und Daudi in einem Chrom-Freisetzungsversuch überprüft. Die Zelllinie K526 exprimiert keine MHC-Klasse-I-Moleküle und wird somit gut von natürlichen Killerzellen (NK)-Zellen erkannt. Daudi ist eine Burkitts-Lymphom-Zelllinie, die β_2-Mikroglobulin-defizient ist und somit auch keine MHC-Klasse-I-Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert. Sie kann von einigen γδ-T-Zellpopulationen erkannt werden (Rothenfusser et al, 2002). Beide Zelllinien wurden nicht lysiert, und somit konnte eine NK-Zell- und nicht-MHC-Klasse-I-gebundene Reaktivität des T-Zellklons SK22 ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 5.8 B).

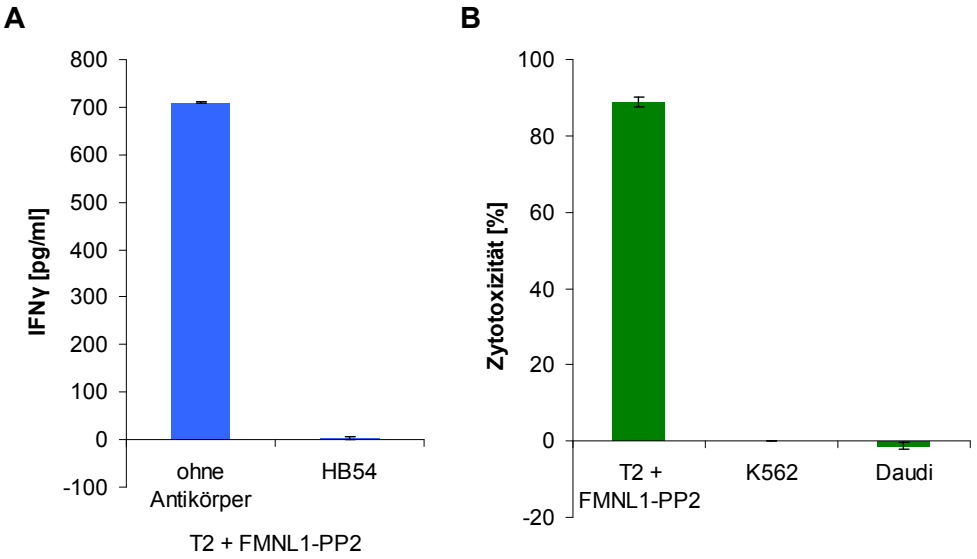


Abbildung 5.8 Blockade von HLA-A2 und T-Zellrezeptor-Abhängigkeit der Reaktivität des T-Zellklons SK22. A: FMNL1-PP2 beladene T2-Zellen wurden mit und ohne den HLA-A2-blockierenden Antikörper HB54 inkubiert und als Zielzellen für SK22 eingesetzt (E:T = 1:2). Die IFNγ-Konzentration im Überstand wurde nach 24 h Kokultur im ELISA gemessen. B: T-Zellrezeptor-Abhängigkeit des T-Zellklons SK22. K562 und Daudi wurden in einem Chrom-Freisetzungsversuch als Zielzellen eingesetzt, um NK-Zell- und nicht-MHC-Klasse-I-gebundene Reaktivität auszuschließen (E:T = 7,5:1). Es sind die Mittelwerte von Duplikaten ± Abweichung gezeigt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei Versuche.

Auch in einem weiteren speziellen Chrom-Freisetzungsversuch konnte nachgewiesen werden, dass der T-Zellklon SK22 HLA-A2-positive T2-Zellen, die mit FMNL1-PP2 beladen waren, spezifisch erkennt. Hierzu wurde die Nierenzellkarzinom-Zelllinie RCC26, die von SK22 erkannt wird (siehe hierzu Kapitel 5.3.2.4, Abbildung 5.11, S. 79), mit ^{51}Chrom markiert und in steigender Menge verschiedene Zielzellen, die nicht mit ^{51}Chrom markiert waren, zugegeben. Als unmarkierte Zielzellen wurden T2-Zellen, die mit FMNL1-PP2 oder Flu beladen waren, bzw. RCC26 eingesetzt. Wenn die unmarkierten Zielzellen erkannt wurden, wurden bei steigender Menge der unmarkierten Zielzellen relativ weniger markierte Zielzellen lysiert und es war somit weniger detektierbare Radioaktivität im Überstand. Die unmarkierten Zielzellen T2, beladen mit FMNL1-PP2, konnten die lytische Aktivität gegen die natürlichen, nicht peptidbeladenen Zielzellen RCC26 inhibieren, nicht aber Flu-beladene T2-Zellen. Im Vergleich zu unmarkierten mit FMNL1-PP2 beladenen T2-Zellen inhibierten unmarkierte RCC26 die Lyse von markierten RCC26 etwas schwächer (siehe Abbildung 5.9).

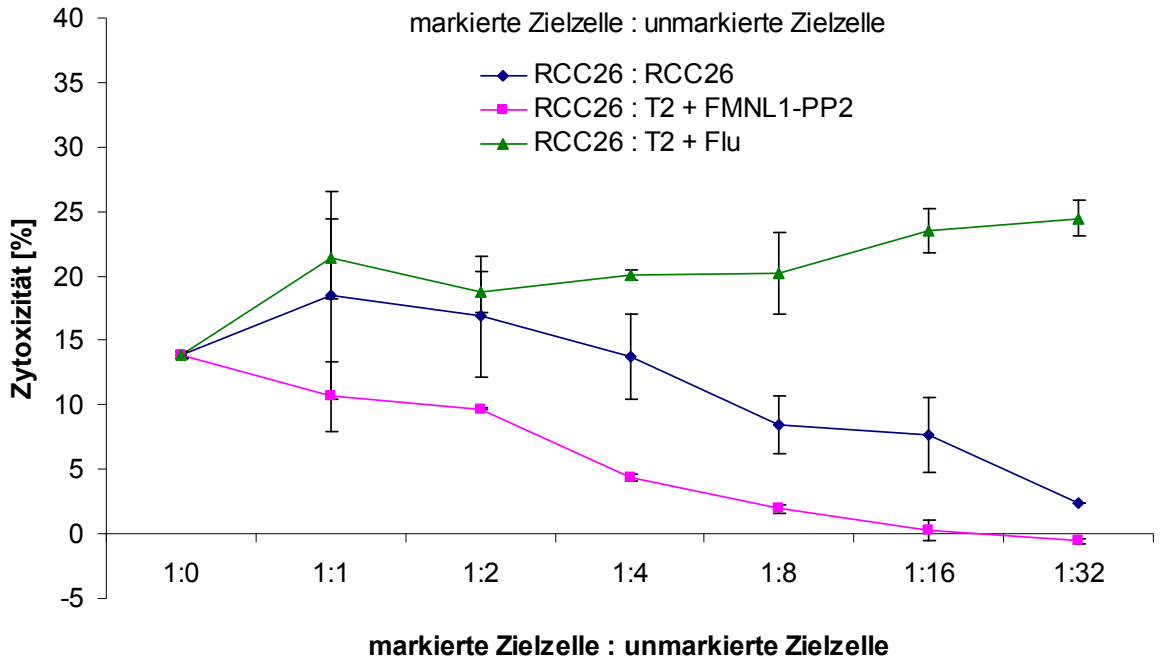


Abbildung 5.9 Spezifische Erkennung von FMNL1-PP2-beladenen T2-Zellen durch den T-Zellklon SK22. In einem Chrom-Freisetzungsversuch wurden als mit ^{51}Chrom markierte Zielzellen die Zelllinie RCC26, die von SK22 erkannt wird, und als unmarkierte Zielzellen FMNL1-PP2-belandene T2-Zellen (T2 + FMNL1-PP2), Flu-beladene T2-Zellen (T2 + Flu) bzw. RCC26 eingesetzt. Die unmarkierten Zielzellen wurden in steigender Menge zu den markierten Zielzellen titriert. Eine Inhibition der lytischen Aktivität des T-Zellklons SK22 gegen die markierten Zielzellen bedeutete Erkennung der unmarkierten Zielzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der spezifischen Zelllyse von Duplikaten ± Abweichung.

5.3.2.3 Avidität

Zur Bestimmmung der Avidität des T-Zellklons SK22 wurde das Peptid FMNL1-PP2 in sinkender Konzentration auf T2-Zellen geladen und in einem Chrom-Freisetzungsversuch die halbmaximale Lyse bestimmt. Bei 100 nM Peptidbeladung wurden 40 % der Zellen lysiert, welches dem halbmaximalen Wert entsprach (siehe Abbildung 5.10 A). SK22 ist somit ein T-Zellklon mit einer mittleren Avidität.

Des Weiteren wurde für die Untersuchung der funktionellen Aktivität des T-Zellklons SK22 das E:T-Verhältnis in einer Reihe von 100:1 bis 0,8:1 variiert und als Zielzellen mit 10 µM FMNL1-PP2 beladene T2-Zellen eingesetzt (siehe Abbildung 5.10 B). Die halbmaximale Lyse war hier erst bei circa 1:1 erreicht, was für eine hohe funktionelle Aktivität der Zellen spricht.

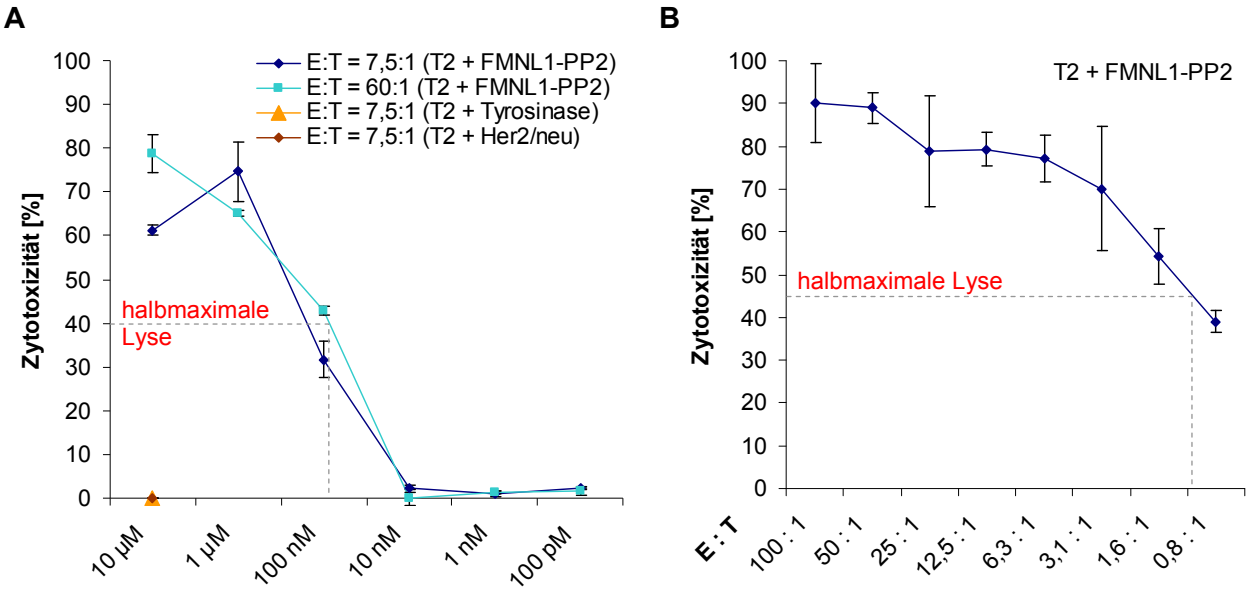


Abbildung 5.10 Funktionelle Avidität und Aktivität des T-Zellklons SK22. A: T2-Zellen wurden mit FMNL1-PP2 mit unterschiedlicher Peptidkonzentration beladen und zur Kontrolle mit 10 µM Tyrosinase$_{369}$- bzw. Her2/neu$_{369}$-Peptid. Sie wurden als Zielzellen in einem Chrom-Freisetzungsversuch eingesetzt. Die Peptidkonzentration bei halbmaximaler Lyse durch SK22 gab einen Hinweis auf die funktionelle Avidität. B: T2-Zellen, die mit 10 µM FMNL1-PP2 beladen waren, dienten in einem Chrom-Freisetzungsversuch als Zielzellen für den T-Zellklon SK22 bei sinkendem E:T-Verhältnis. Das E:T-Verhältnis bei halbmaximaler Lyse gab Aufschluss auf die funktionelle Aktivität von SK22. Dargestellt sind die Mittelwerte der spezifischen Zelllyse in Prozent von Duplikaten ± Standardabweichung.

5.3.2.4 Reaktivität gegen natürliche Zielzellen

Die Erkennung von natürlichen, nicht FMNL1-PP2-beladenen Zielzellen durch den T-Zellklon SK22 wurde durch Bestimmung der Zytotoxizität in Chrom-Freisetzungsversuchen oder durch Messung der IFNγ-Ausschüttung in Antwort auf verschiedene Zielzellen getestet. Wie in Abbildung 5.11 A gezeigt, wurden die EBV-negativen HLA-A2-positiven Lymphom-Zelllinien BJAB und DG75 erkannt, nicht aber die HLA-A2-negative Burkitts-Lymphom-Zelllinie Raji. Von den Nierenzellkarzinom-Zelllinien wurde RCC26 (HLA-A2-positiv) erkannt, KT187 (HLA-A2-negativ) nicht. Vier verschiedene EBV-positive und HLA-A2-positive Lymphoblastoide Zelllinien (LCL) wurden erkannt (siehe Abbildung 5.11 B). Alle diese Zelllinien exprimieren FMNL1 (Schuster et al, 2007).

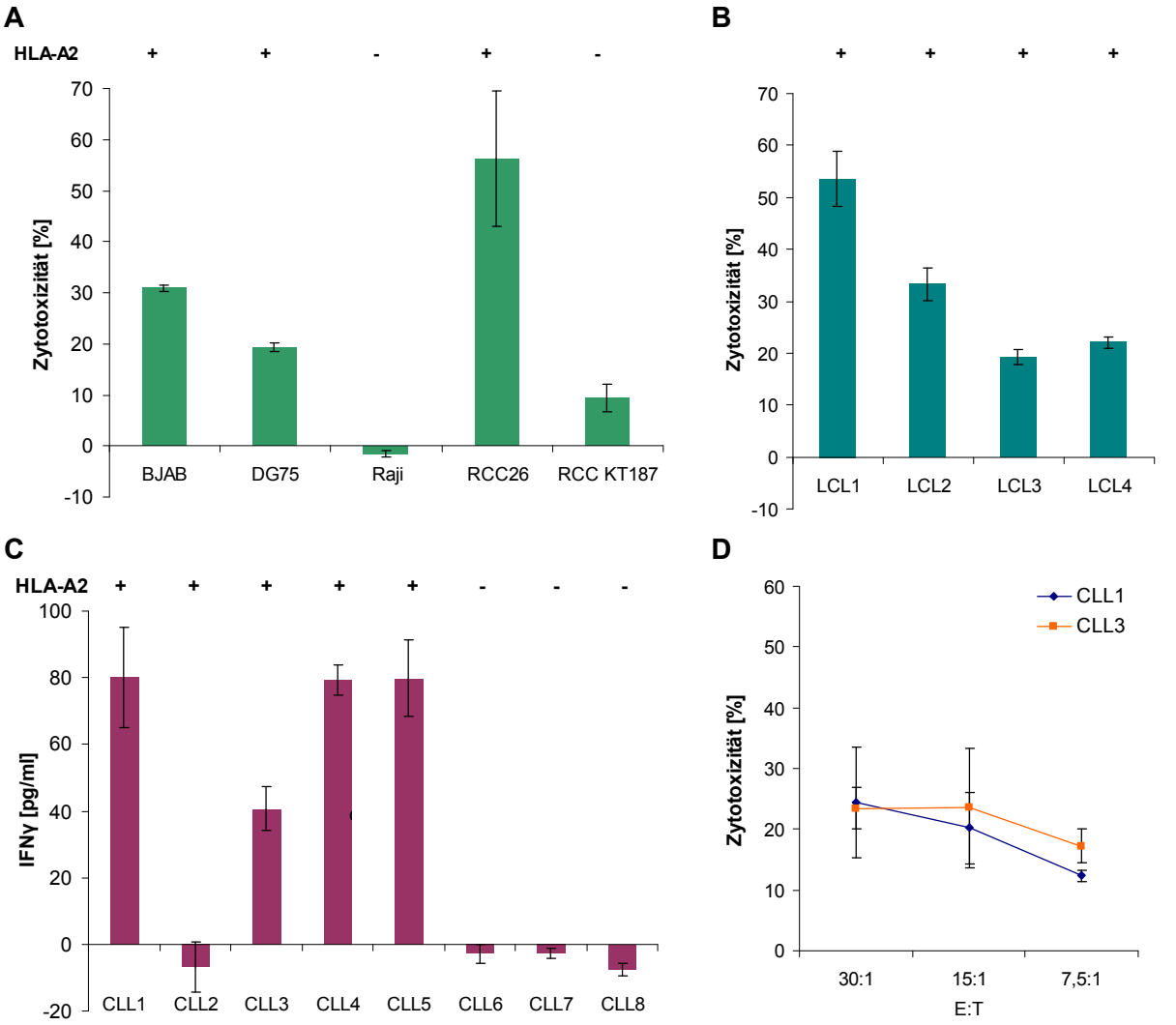


Abbildung 5.11 Aktivität des T-Zellklons SK22 gegen FMNL1-exprimierende Tumorzelllinien und CLL-Zellen. A, B: In Chrom-Freisetzungsversuchen wurde die Lyse von HLA-A2-positiven und HLA-A2-negativen Lymphomzelllinien (BJAB, DG75, Raji) und Nierenzellkarzinom-Zelllinien (RCC26, RCC KT187), sowie von HLA-A2-positiven LCL durch den T-Zellklon SK22 untersucht, E:T = 7,5:1; Dargestellt sind die Mittelwerte der spezifischen Zelllyse in Prozent von Duplikaten ± Abweichungen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei Experimente. C: Messung der IFNγ-Konzentration in den Überständen nach 24 h Koinkubation des T-Zellklons SK22 mit verschiedenen CLL-Zellen im ELISA, E:T = 1:2; Dargestellt sind die Mittelwerte der IFNγ-Konzentration von Triplikaten ± Standardabweichung. D: Durch den T-Zellklon SK22 vermittelte Zelllyse von CLL-Zellen in einem Chrom-Freisetzungsversuch in den angegebenen E:T-Verhältnissen. Gezeigt sind die Mittelwerte von Triplikaten ± Standardabweichung. In C und D eingesetzte CLL-Zellen wurden auf CD40L-Fibroblasten aktiviert.

Des Weiteren wurden Zellen von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) eingesetzt, die eine hohe mRNS-Expression von FMNL1 aufwiesen. Sie wurden circa sieben Tage auf CD40L-Fibroblasten aktiviert. Vier von fünf HLA-A2-positiven CLL-Proben wurden erkannt, aber keine der HLA-A2-negativen Zellen (siehe Abbildung 5.11 C). Zusätzlich wurden zwei der HLA-A2-positiven CLL-Proben (CLL1 und CLL3) im Chrom-Freisetzungsversuch bei unterschiedlichem E:T-Verhältnis eingesetzt (siehe Abbildung 5.11 D). Sie wurden durch den T-Zellklon SK22 lysiert. Die HLA-A2-positive Probe CLL2, die trotz einer

hohen FMNL1-RNS Expression nicht erkannt worden war, wurde nach Beladung mit 10 µM FMNL1-PP2 in einem Chrom-Freisetzungsversuch mit einem E:T-Verhältnis von 7,5:1 eingesetzt. Nach Peptidbeladung wurden die Zellen durch den T-Zellklon SK22 lysiert (Daten nicht gezeigt).

In einem weiteren Chrom-Freisetzungsversuch wurde die Zytotoxizität des T-Zellklons SK22 gegen Zellen von gesunden Spendern (PBL und B-Zellen) und nicht transformierten Zelllinien getestet (siehe Abbildung 5.12). PBL und B-Zellen exprimieren FMNL1, Lungenfibroblasten und embryonale Nierenzellen (293 HEK, human embryonal kidney cells) nicht. Die PBL aus HLA-A2-positiven oder negativen Spendern waren zuvor aus dem Blut isoliert und drei Tage unter IL2- und OKT3-Zugabe aktiviert worden. Die B-Zellen waren aus den PBL isoliert und auf CD40L-Fibroblasten aktiviert worden. Während nur eine geringe Zytotoxizität gegen HLA-A2-positive PBL zu sehen war, wurden bis zu 35 % der HLA-A2-positiven B-Zellen durch den T-Zellklon SK22 lysiert. Die HLA-A2-positiven Lungenfibroblasten und 293 HEK wurden nicht erkannt ebenso wie HLA-A2-negative PBL und B-Zellen.

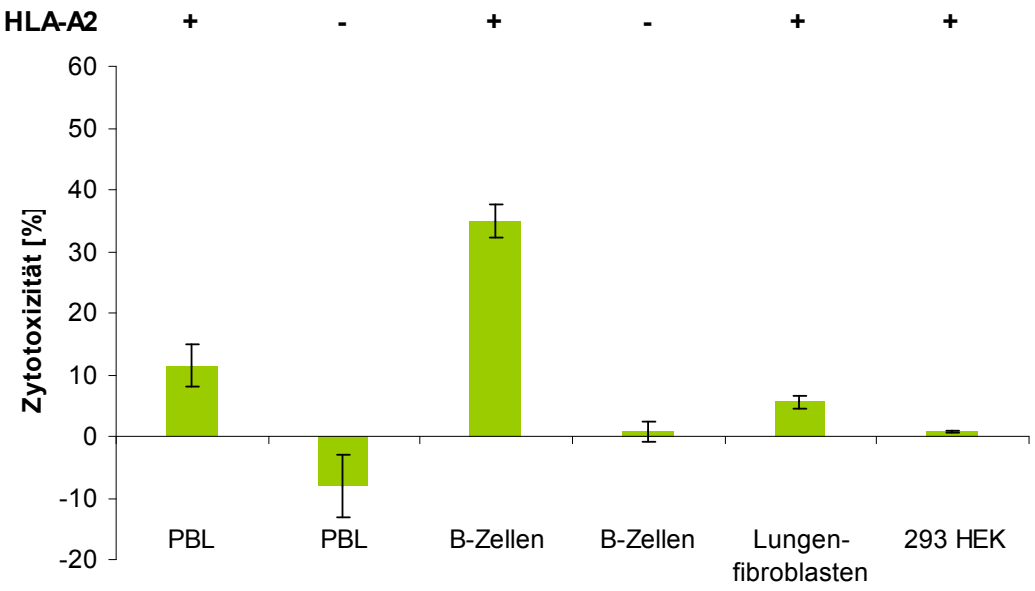


Abbildung 5.12 Lytische Aktivität des T-Zellklons SK22 gegen primäre Zellen aus gesunden Spendern und gegen nicht transformierte Zelllinien, die eine unterschiedliche FMNL1-Expression aufweisen. Die lytische Aktivität des T-Zellklons SK22 gegen HLA-A2-positive bzw. HLA-A2-negative PBL, B-Zellen, Lungenfibroblasten bzw. 293-HEK-Zellen wurde mittels Chromfreisetzung bestimmt. PBL und B-Zellen exprimieren FMNL1, Lungenfibroblasten und 293 HEK nicht. PBL von gesunden Spendern waren zuvor drei Tage mit IL2 und OKT3 stimuliert worden. Die B-Zellen wurden aus PBL von gesunden Spendern isoliert, auf CD40L-Fibroblasten aktiviert und als Zielzellen eingesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte der spezifischen Zelllyse von Duplikaten ± Abweichung. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens fünf Experimente. E:T = 7,5:1.

5.3.2.5 Kreuzreaktivität

Um die Spezifität des T-Zellklons SK22 genauer zu charakterisieren, wurden FMNL1-exprimierende LCL-Zelllinien mit unterschiedlicher MHC-Klasse-I-Expression in Chrom-Freisetzungsversuchen als Zielzellen für SK22 eingesetzt. Neun LCL-Zelllinien mit verschiedenen MHC-Klasse-I-Molekülen, die der HLA-A2-Superfamilie angehören, wurden unterschiedlich stark erkannt (siehe Abbildung 5.13 A). Vier von 18 HLA-A2-negativen LCL wurden von SK22 lysiert (siehe Abbildung 5.13 B). Zwei dieser LCL (LCL30 und 31) waren HLA-A*6802-positiv und hatten dieses als einziges gemeinsames MHC-Klasse-I-Molekül. HLA-A*6802 wird auch der HLA-A2-Superfamlie zugerechnet (del Guercio et al, 1995; Sidney et al, 2001). Die beiden anderen HLA-A2-negativen LCL (LCL28 und 29), die vom T-Zellklon SK22 erkannt worden waren, waren HLA-A*3303-positiv. Die Erkennung dieses Moleküls konnte durch eine HLA-A*3303-Transfektante der Zelllinie C1R bestätigt werden (siehe Abbildung 5.13 C).

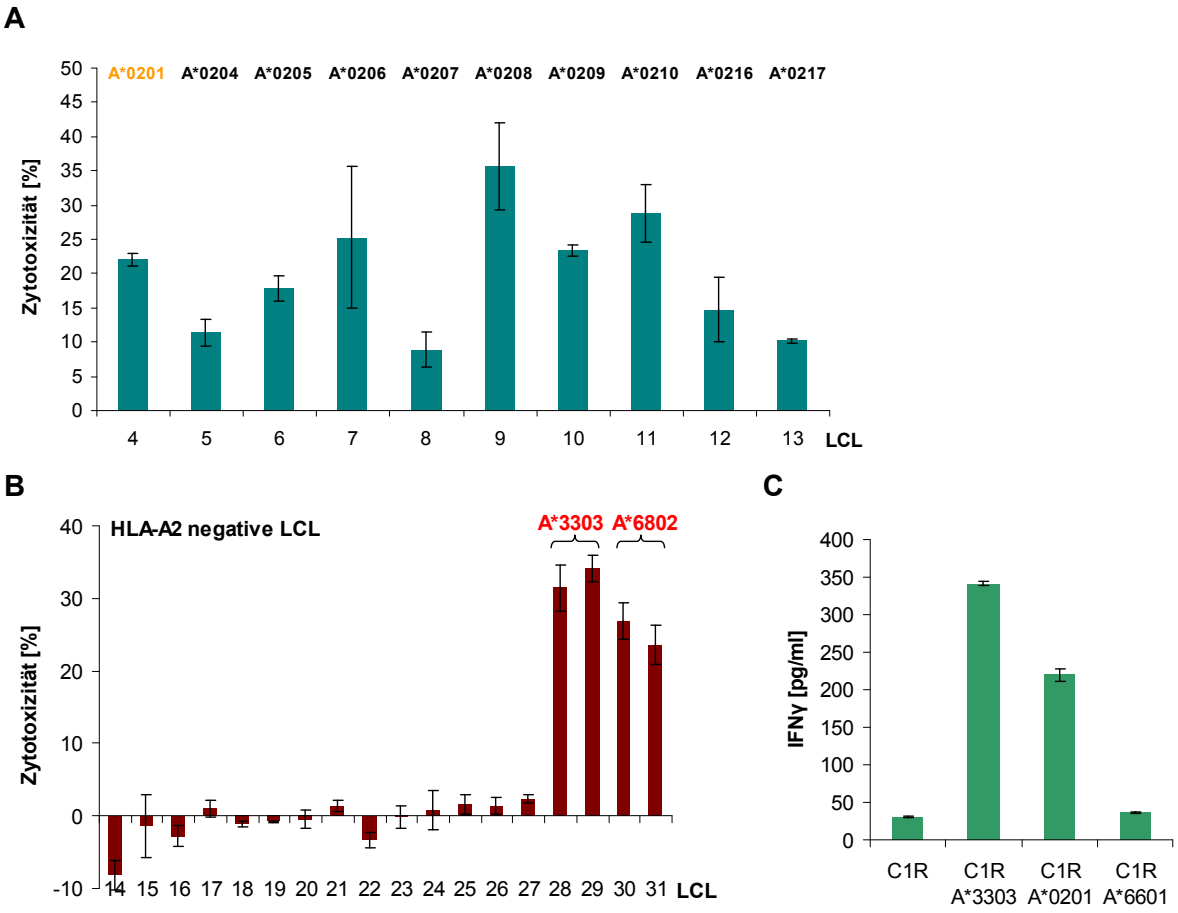


Abbildung 5.13 Kreuzreaktivität des T-Zellklons SK22. A: Die lytische Aktivität von SK22 wurde gegen LCL, die verschiedene MHC-Klasse-I-Moleküle aus der HLA-A2-Superfamilie tragen, im Chrom-Freisetzungsversuch gemessen, E:T = 7,5:1; B: lytische Aktivität von SK22 gegen HLA-A2-negative LCL im Chrom-Freisetzungsversuch, E:T = 7,5:1; C: Verifizierung der Reaktivität von SK22 gegen A*3303 unter Verwendung von Transfektanten von C1R durch Messung der IFNγ-Ausschüttung in den Überständen einer Kokultur, E:T = 1:2. Gezeigt sind die Mittelwerte von Triplikaten ± Standardabweichung.

Um einen Hinweis darauf zu bekommen, ob der T-Zellklon SK22 das Peptid FMNL1-PP2 neben HLA-A*0201 auch im Zusammenhang von den anderen MHC-Klasse-I-Molekülen, die zur HLA-A2-Superfamilie gehören, erkennt, wurde ein weiterer Stimulationsansatz durchgeführt. Bei diesem wurden die entsprechenden LCL-Zelllinien mit den MHC-Klasse-I-Molekülen der HLA-A2 Superfamilie mit 10 µM FMNL1-PP2 oder Flu beladen und mit dem T-Zellklon SK22 koinkubiert (E:T = 1:2). Die IFNγ-Ausschüttung in den Überständen wurde im ELISA gemessen. Vier von neun LCL-Zelllinien (LCL 6, 7, 8 und 11: HLA-A*0205, 0206, 0207 und 0210) wurden von SK22 besser erkannt, wenn FMNL1-PP2 beladen war, als Zellen, die Flu-beladen bzw. unbeladen waren. Die Zelllinie C1R-A*3303 wurde ebenso mit FMNL1-PP2 beladen, wurde aber vom T-Zellklon SK22 nicht besser erkannt, wenn FMNL1-PP2 beladen war, als die unbeladenen bzw. Flu-beladenen Zellen (Daten nicht gezeigt).

5.3.2.6 Zytokinsekretion

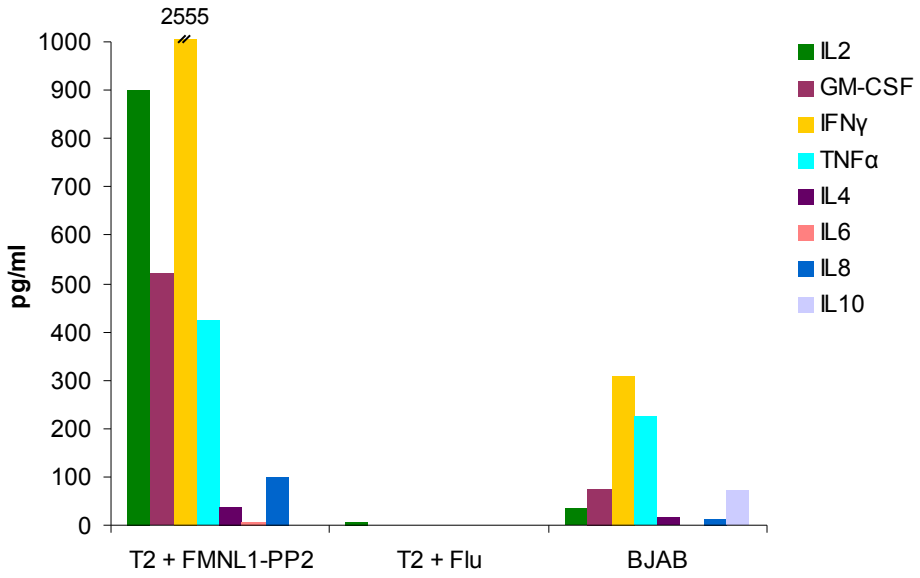


Abbildung 5.14 Zytokinproduktion des T-Zellklons SK22 in Reaktion auf verschiedene Zielzellen. Der T-Zellklon SK22 wurde mit FMNL1-PP2-beladenen T2-Zellen (T2 + FMNL1-PP2), Flu-beladenen T2-Zellen (T2 + Flu) bzw. mit der Lymphomzelllinie BJAB für 24 h koinkubiert (E:T = 1:5). Anschließend wurden im Multiplexverfahren acht verschiedene Zytokine (IL2, GM-CSF, IFNγ, TNFα, IL4, IL6, IL8, IL10) in den Überständen gemessen.

In einer Multiplex-Analyse wurde die Ausschüttung acht verschiedener Zytokine (IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, GM-CSF, IFNγ, TNFα) des T-Zellklons SK22 in Antwort auf verschiedene Zielzellen (FMNL1-PP2-beladene T2, Flu-beladene T2, BJAB) gemessen (siehe Abbildung 5.14). T2-Zellen wurden erkannt, wenn sie mit FMNL1-PP2 beladen waren, nicht aber wenn sie mit Flu beladen waren. In Reaktion auf die natürliche Zielzelle BJAB (nicht peptid-beladen) wurden ebenso Zytokine ausgeschüttet, allerdings deutlich geringer als bei den FMNL1-PP2 beladenen T2-Zellen. Es wurden vorwiegend die immunstimulierenden Zytokine

IFNγ und TNFα ausgeschüttet, bei den T2-Zellen (beladen mit FMNL1-PP2) zusätzlich IL2 und GM-CSF. IL4, IL6 und IL10, die antiinflammatorisch wirken, wurden kaum sezerniert, ebenso wie IL8, das u. a. bei der Chemotaxis von Neutrophilen eine Rolle spielt.

5.3.2.7 Phänotypische Charakterisierung der T-Zellpopulation

Die phänotypische Charakterisierung von SK22 sollte über die Subpopulationen des T-Zellklons Aufschluss geben. Hierzu wurden die Zellen (elf Tage nach Restimulation 19) mit verschiedenen Antikörpern inkubiert und am Durchflusszytometer gemessen.

Wie in Tabelle 5.3 gezeigt, waren so gut wie alle Zellen CD8, TZR, Vβ14 und Multimer-FMNL1-PP2-positiv. Fast keine Zellen waren CD62L, CD27 oder CD28-positiv. 4 % der Zellen waren schwach CD45RA-positiv und gleichzeitig CD45RO-negativ. 97 % der Zellen waren stark CD45RO-positiv. Die Zellen hatten somit einen Effektor-T-Zellstatus und es befanden sich keine Gedächtniszellen in der T-Zellpopulation. 5 % der Zellen waren CD5-positiv. CD5 wird mit T-Zellüberleben nach Tumorkontakt in Verbindung gebracht (Friedlein et al, 2007).

Tabelle 5.3 Phänotyp des T-Zellklons SK22

Antikörper	% positive Zellen	Expressionsstärke*
Isotypkontrolle	0	
CD8	98	++
Multimer FMNL1-PP2	95	+
Vβ14	94	+
TZR	93	+
CD62L	1	-/+
CD27	1	-/+
CD28	1	-/+
CD45RA	4	-/+
CD45RO	97	++
CD5	5	++

Detektion verschiedener Oberflächenmoleküle mittels Durchflusszytometrie
* -/+ schwach; + mittel; ++stark positiv (Fluoreszenzintensität)

5.4 Identifizierung des T-Zellrezeptors

Die T-Zellrezeptor (TZR)-Repertoire-Analysen dienten einerseits zur Identifizierung der α- und β-Ketten und andererseits zur Überprüfung der Klonalität der T-Zellen, die mittels limitierender Verdünnung kloniert worden waren. Hierzu wurden T-Zellrezeptor-Repertoire-PCRs durchgeführt (siehe Vorgehensweise und Schema Kapitel 4.4.1, S. 45) und spezifische Amplifikate der variablen Kettensegmente (V) sequenziert.

In Abbildung 5.15 ist als Beispiel das Bandenmuster für den T-Zellklon SK22 gezeigt. Jede PCR-Reaktion enthielt eine interne Reaktionskontrolle. Alle zusätzlichen Banden, die V-Ketten spezifisch waren, wurden ausgeschnitten und nach Elution aus dem Gel sequenziert. Für das TZR-α-Repertoire ergaben die Banden Vα14 und Vα14.1 dieselbe Sequenz für eine funktionstüchtige T-Zellrezeptorkette, während die schwache Bande bei Vα23 keine lesbare Sequenz ergab. Für das TZR-β-Repertoire ergaben die Banden Vβ13 und Vβ14 dieselbe Sequenz für eine funktionstüchtige T-Zellrezeptorkette, während hingegen die Sequenzen der Banden Vβ4, Vβ22.2 (größere und kleinere Bande) nicht im Leserahmen liegende Sequenzen und die Amplifikate der Banden Vβ6.2, Vβ6.3 (große und kleine Banden) keine lesbare Sequenz lieferten. Für die β-Kette von SK22 konnte außerdem eine PCR mit degenerierten Primern durchgeführt werden (siehe Abbildung 5.15 C), die in zwei Reaktionen 96 % der bekannten β-Ketten abdecken. Die Bande bei VP1 ergab dieselbe Sequenz wie die Banden für Vβ13 und Vβ14. VP2 ergab keine lesbare Sequenz. SK22 ist somit als monoklonaler T-Zellklon identifiziert (siehe Tabelle 5.4).

Bei zehn weiteren mono- bzw. oligoklonalen T-Zellen konnte das TZR-Repertoire untersucht werden, da sie ausreichend gewachsen waren und genug Material für die Untersuchung lieferten. Für die β-Kette von SK23 und 2+K1 wurde die umfangreiche PCR mit 38 PCR-Reaktionen durchgeführt, von allen anderen Klonen die VP-PCR. Von den zehn mono- bzw. oligoklonalen T-Zellen waren acht (2++K2, SK2, SK13, SK14, SK16, SK19, SK29, SK30) monoklonal und besaßen auf sequentieller Ebene die gleiche TZR-α- und β-Kette wie SK22 (siehe Tabelle 5.4). SK23 wies zusätzlich zu den identischen TZR-α- und β-Ketten wie SK22 eine weitere β-Kette auf und war somit biklonal. 2+K1 war oligoklonal.

Die Sequenz des repräsentativen T-Zellklons SK22 ist in Abbildung 5.17 dargestellt. Hierbei sind die verschiedenen umgelagerten Gensegmente und CDR-Regionen markiert.

Die Expression der Vβ14-Kette des T-Zellklons SK22 konnte zusätzlich am Durchfluss-zytometer mit einem Vβ14-spezifischen Antikörper überprüft werden. Alle Zellen waren Vβ14-positiv (siehe Abbildung 5.16).

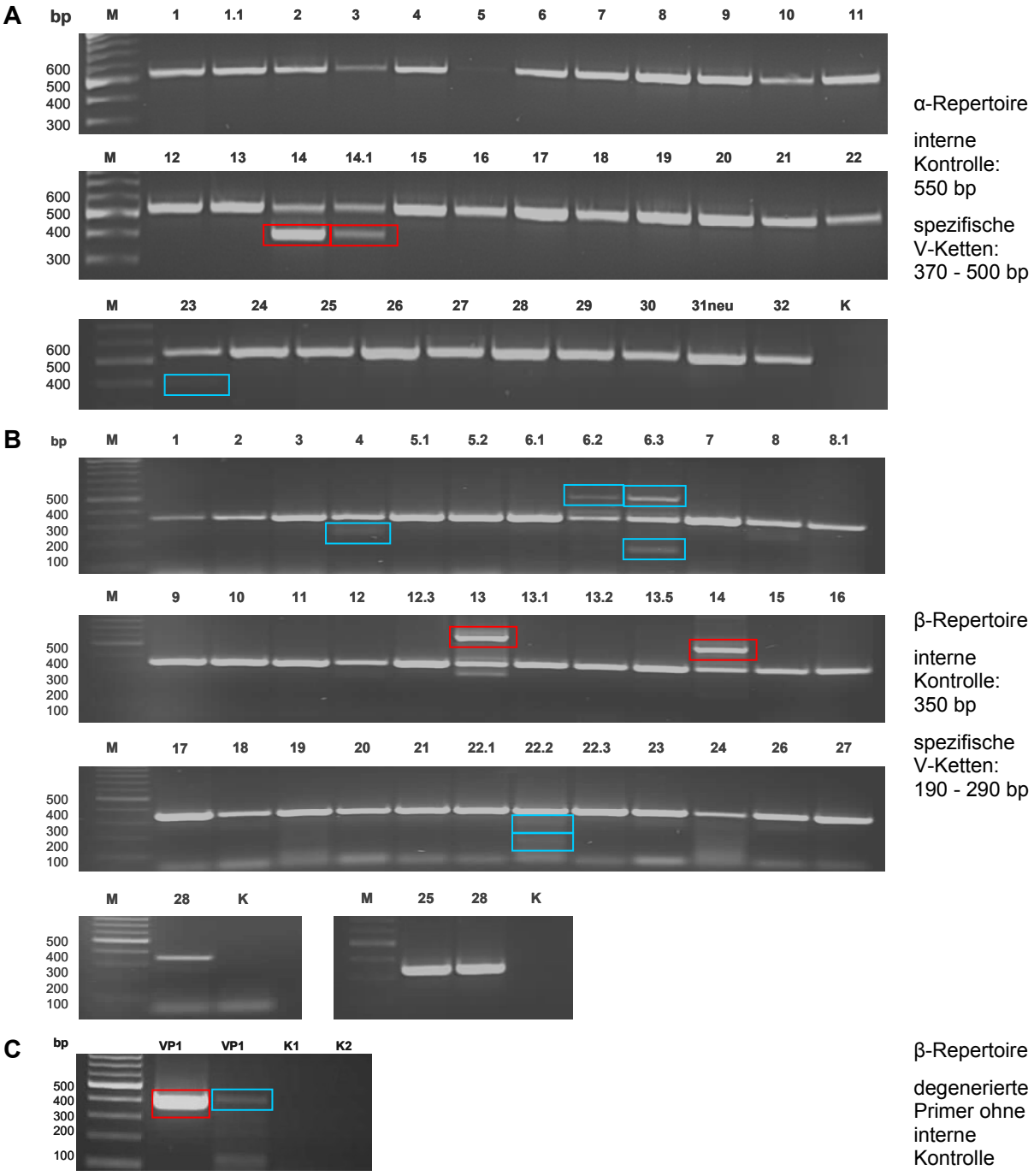


Abbildung 5.15 T-Zellrezeptor-Vαβ-Repertoire des T-Zellklons SK22. Die variablen α- und β-Ketten wurden mittels PCR detektiert. Die verwendeten Primer zur spezifischen Amplifikation der variablen TZR-Segmente Vαx und Vβx sind angegeben. A: TZR-α-Repertoire; B: TZR-β-Repertoire; In A und B wurden PCR-Reaktionen mit zwei Primerpaaren durchgeführt: Ein Primerpaar lag in der jeweiligen konstanten Region und diente als interne Kontrolle in jeder PCR-Reaktion. Bei dem zweiten Primerpaar lag der 5'-Primer (Vαx, Vβx) in unterschiedlichen variablen Kettensegmenten und der 3-Primer in der jeweiligen konstanen Region. Zu den internen Kontrollen zusätzliche Banden markierten Amplifikate der variablen Kettensegmente. Die erwarteten Bandengrößen sind angegeben. Banden in B, die größer als die interne Kontrolle sind, können aus Verknüpfungen von Primern der internen Kontrolle mit den V-Primern entstehen. C: TZR-β-Repertoire-Analyse mit degenerierten Primern, die in zwei PCR-Reaktionen insgesamt 53 variable β-Ketten abgreifen. Alle mit Kästen umrandeten Banden wurden aus dem Gel eluiert und sequenziert. Rote Kästen umranden Produkte, die eine funktionsfähige Kette ergaben, blau umrandete Produkte ergaben nicht funktionstüchtige Ketten oder unspezifische PCR-Mischprodukte. M: DNS-Leiter; K: Kontrolle

Tabelle 5.4 Identifizierte T-Zellrezeptor-α-und β-Ketten von mono- und oligoklonalen T-Zellen.

T-Zellen		IMTG (Folch und Lefranc, 2000) V	D	J	Arden (Arden et al, 1995)	Gel-bande	Konstante Region	CDR3-Region
Monoklonal								
2++K2 SK2 SK13 SK14 SK16 SK19 SK22 SK29 SK30	**α**	TRAV38-2	-	TRAJ41*01	14S2	14/14.1	Cα	CAY**ENSGYAL**NFGKG
	β	TRBV27*01	TRBD2*01	TRBJ2-5*01	14S1	13/14/ VP1	Cβ2	CAS**SFLGETQ**YFGPG
Oligoklonal								
SK23	**α**	TRAV38-2	-	TRAJ41*01	14S2	14/14.1	Cα	CAY**ENSGYAL**NFGKG
	β	TRBV27*01	TRBD2*01	TRBJ2-5*01	14S1	13/14/ VP1	Cβ2	CAS**SFLGETQ**YFGPG
		TRBV5-6*01	TRBD1*01	TRBJ1-1*01	5S2	VP2	n. d.*	CAS**SSPRDSHTEA**FFGPG
2+K1	**α**	TRAV38-2	-	TRAJ41*01	14S2	14/14.1	Cα	CAY**ENSGYAL**NFGKG
	β	TRBV27*01	TRBD2*01	TRBJ2-5*01	14S1	14	Cβ2	CAS**SFLGETQ**YFGPG
		TRBV7-4*01	n. d.	TRBJ2-3*01	6S8	6.1	n. d.	CQQ**LIAGGPTDTQ**YFGPF
		TRBV11-2*01	n. d.	TRBJ2-7*01	21S3	21	n. d.	CAS**SLAFGQGRSYEQ**YF GPG
		TRBV12-3*01	TRBD1*01	TRBJ1-2*01	8S1	8	n. d.	CAS**SSANYGY**TFGSG

Die variablen α- und β-Ketten wurden mittels PCR detektiert. Spezifische Banden wurden aus dem Gel eluiert und sequenziert. Mittels Datenbankanalysen (IMGT) wurden die CDR3-Regionen und Kettensegmente (VDJC) identifiziert. Die Nomenklaturen nach IMGT und Arden sind aufgeführt. *n. d. nicht durchgeführt

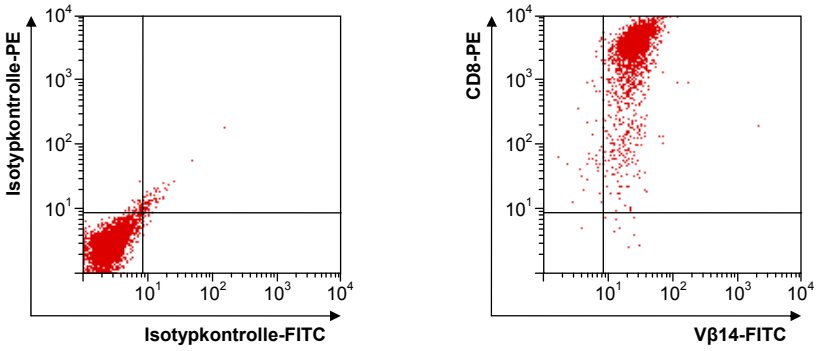
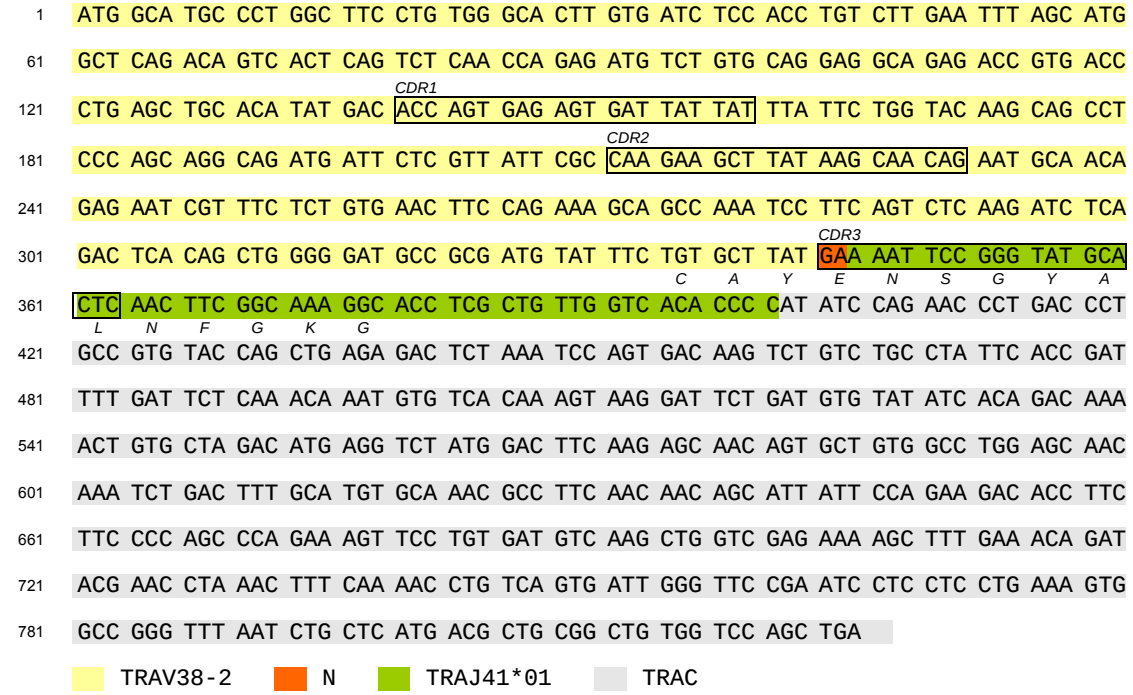


Abbildung 5.16 Vβ14-Oberflächenexpression des T-Zellklons SK22. Der T-Zellklon SK22 wurde auf die Expression von Vβ14 und CD8 mittels spezifischen Antikörpern am Durchflusszytometer analysiert. links: Isotypkontrolle, rechts: Vβ14- und CD8-Färbung.

A TZR α-Kette



B TZR β-Kette

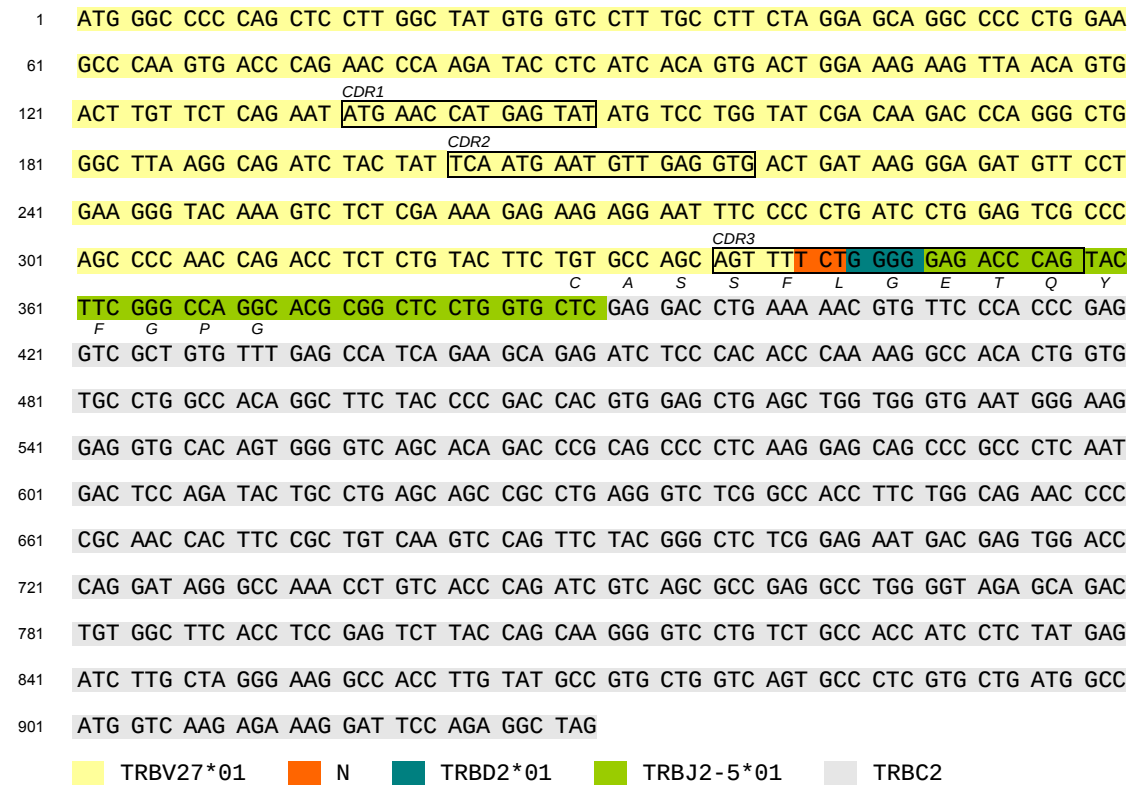


Abbildung 5.17 Nukleinsäuresequenz des T-Zell-Rezeptors des T-Zellklons SK22. A: α-Kette, B: β-Kette; Für die erweiterten CDR3-Regionen sind die Aminosäuresequenzen der Basentripletts angegeben; N: zufällig eingebaute Nukleotide; Nomenklatur nach IMGT

5.5 Retroviraler Transfer des T-Zellrezeptors

5.5.1 Klonierung der T-Zellrezeptor-Vektoren

Die TZR-α- und β-Kette des T-Zellklons SK22 wurden in den retroviralen Vektor pMP71G$_{PRE}$ kloniert. Hierbei wurde, wie in Kapitel 4.4.2 ab S. 49 beschrieben, vorgegangen. Vier verschiedene Vektoren wurden erstellt: die beiden Ketten einzeln im Vektor, die beiden Ketten gemeinsam in einem Vektor, getrennt durch ein P2A-Element, und die beiden Ketten gemeinsam in einem Vektor, getrennt durch ein P2A-Element, wobei der konstante Teil der Ketten durch den konstanten Teil des Maus-T-Zellrezeptors P14 (freundlicherweise von W. Uckert, Berlin, zur Verfügung gestellt) ersetzt wurde (siehe Abbildung 4.2, S. 49). Die Vektoren mit den TZR-Ketten des Her2/neu$_{369}$-spezifischen T-Zellklons D1 (nicht publizierte Daten) wurden von Xiaoling Liang und Luise Weigand aus unserer Arbeitsgruppe hergestellt.

Die beiden T-Zellrezeptorketten wurden zusammen in einen Vektor eingebaut, um eine äquimolare Transduktion der beiden Ketten in sekundäre Zielzellen zu erreichen. Nach Transfektion dieser Vektoren in 293T-Zellen können Viren entstehen, die beide Ketten beinhalten und somit Zielzellen mit beiden Ketten äquimolar transduzierten. Damit die T-Zellrezeptorketten als Proteine getrennt vorliegen, wurde ein P2A-Element eingefügt. Die Trennung geschieht durch einen ribosomalen Sprung bei der Translation im P2A-Element (Leisegang et al, 2008; Szymczak et al, 2004). Mit dem Austausch der menschlichen konstanten Regionen durch die konstanten Region des Maus-TZR sollte eine gesteigerte T-Zellrezeptor-Expression aufgrund besserer Kettenpaarung und CD3-Stabilität und daraus resultierend eine gesteigerte Zielzellerkennung erreicht werden (Cohen et al, 2006).

In den Abbildungen werden die Konditionen nach TZR-Transfer wie folgt abgekürzt:

Transduzierte Vektoren	*Benennung*
Einzelkettenvektoren des TZR-SK22	SK22
beide SK22-TZR-Ketten in einem Vektor	SK22-P2A
beide SK22-TZR-Ketten in einem Vektor, konstante Region aus der Maus	SK22-mu-P2A
Einzelkettenvektoren des TZR-D1	D1

5.5.2 CD8-Abhängigkeit der T-Zellrezeptor-Expression

Zunächst wurden alle durch T-Zellrezeptor-Insertion modifizierten Vektoren in der T-Zellrezeptor-defizienten CD4-positiven T-Zelllinie Jurkat76 ausgetestet. Jurkat76 stand auch transfiziert mit dem homodimeren Korezeptor CD8α zur Verfügung (freundlicherweise von Wolfgang Uckert, Berlin, zur Verfügung gestellt). Diese Zelllinien eignen sich besonders zur Analyse der Expression von transduzierten T-Zellrezeptoren, da die neu eingebrachten T-Zellrezeptoren nicht mit endogenen T-Zellrezeptoren konkurrieren müssen. Funktionelle Tests konnten mit diesen Zellen allerdings nicht durchgeführt werden, da sie weder zytotoxisch reagieren noch eine spezifische Zytokinsekretion bekannt ist.

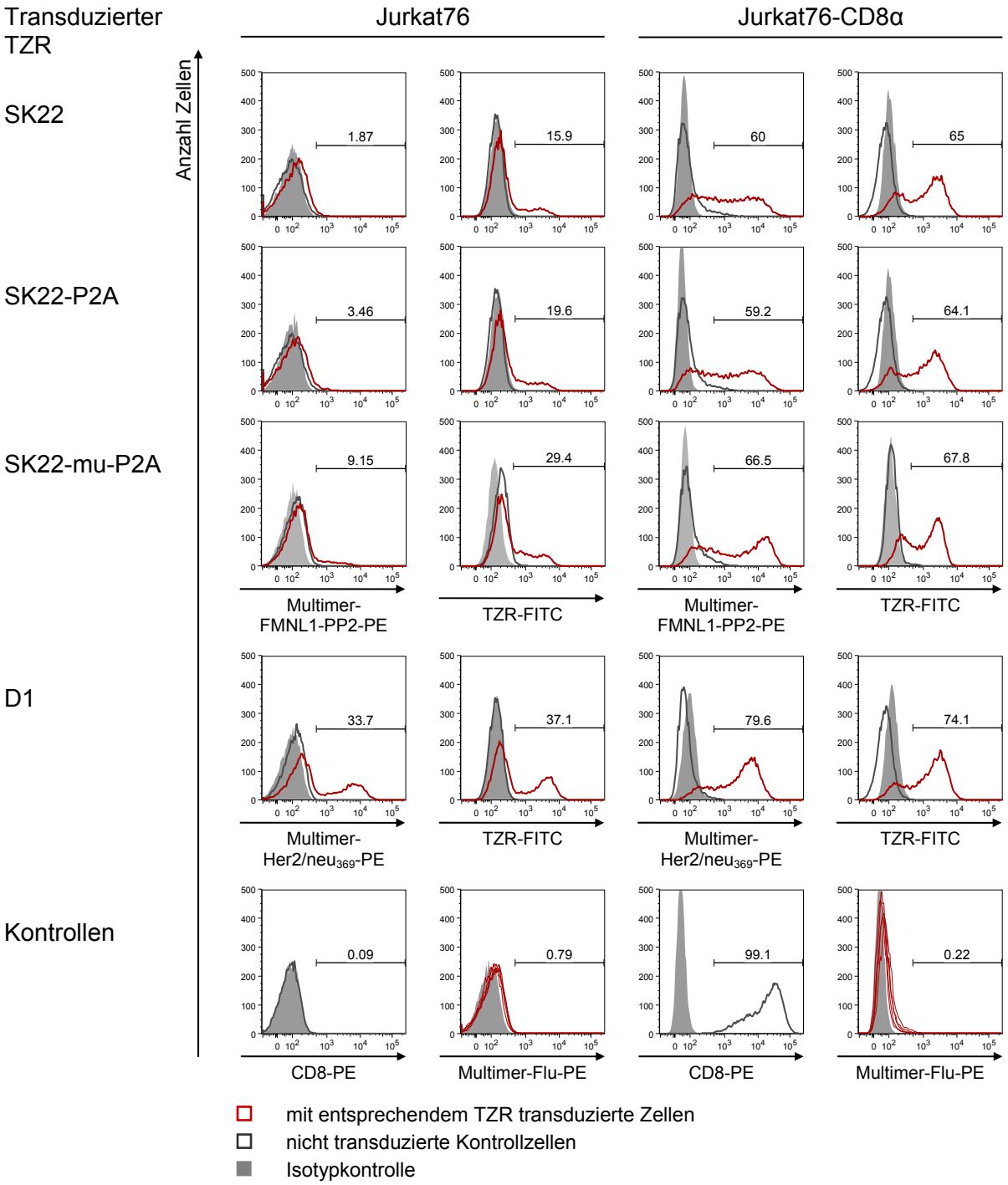


Abbildung 5.18 CD8-Abhängigkeit der T-Zellrezeptor-Expression. Nach Transduktion verschiedener retroviraler TZR-Konditionen in Jurkat76 und Jurkat76-CD8α wurden Multimer- und TZR-Färbungen durchgeführt und deren Expression mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die angegebenen Prozentualwerte beziehen sich auf die jeweils TZR-transduzierten Konditionen. Die Transduktionsrate der Mock-Vektorkontrolle lag bei circa 99 %. Der Hintergrund der Multimer-Färbungen in nicht transduzierten Zellen lag für das Multimer FMNL1-PP2 bei 5 % und für das Multimer-Her2/neu$_{369}$ bei 1,5 %. Folgende TZR-Konditionen wurden eingesetzt: SK22 und D1: α und β als Einzelketten-Vektoren; SK22-P2A: TZRα und TZRβ zusammen in einem Vektor, durch das P2A-Element getrennt; SK22-mu-P2A: TZRα und TZRβ zusammen in einem Vektor, durch das P2A-Element getrennt und mit konstanten TZR-Bereichen aus der Maus. In den Multimer-Flu-Kontrollen sind jeweils folgende Proben dargestellt: Jurkat76 bzw. Jurkat76-CD8α, jeweils mit SK22, SK22-P2A, SK22-mu-P2A, D1, transduziert sowie untransduziert, wobei für eine repräsentative Probe der Prozentualwert positiver Zellen gezeigt ist.

Die Vektoren wurden in die Helferzelllinie 293T transfiziert, die die zusammengebauten retroviralen Partikel in den Überstand entließen. Die Jurkat76-Zelllinien wurden mit diesem Überstand transduziert und nach drei bis vier Tagen am Durchflusszytometer analysiert.

Wie in Abbildung 5.18 gezeigt, wurden in der Zelllinie Jurkat76-CD8α alle T-Zellrezeptoren um das doppelt bis vierfache höher exprimiert als in Jurkat76. Die Expression in Jurkat76-CD8α-Zellen schwankte in verschiedenen Versuchen zwischen 60 und 90 % Multimer- und T-Zellrezeptor-positiven Zellen für SK22 (vier unabhängige Experimente) und zwischen 65 und 82 % für D1 (drei unabhängige Experimente).

Bei den T-Zellrezeptor-Transfer-Konditionen SK22 und SK22-P2A war nach Transduktion in Jurkat76 ohne CD8α eine geringe T-Zellrezeptor-Expression zu sehen, das Multimer FMNL1-PP2 konnte jedoch nicht binden. Bei der Kondition SK22-mu-P2A waren deutlich mehr Zellen T-Zellrezeptor-positiv als in den Konditionen mit rein menschlichen Sequenzen (29 % bei SK22-mu-P2A versus 16 % bei SK22 bzw 20 % bei SK22-P2A). Außerdem waren 9 % der Jurkat76 ohne CD8α Multimer-FMNL1-PP2-positiv.

Der TZR-D1 wurde im Vergleich zum TZR-SK22 in Jurkat76 wesentlich stärker exprimiert. Die Multimer-Her2/neu_{369}-Färbung entsprach hierbei auch der TZR-Färbung. Die Anfärbbarkeit mit spezifischem Multimer war bei diesem T-Zelllrezeptor unabhängig von einer CD8-Expression.

5.5.3 Durchsetzungsfähigkeit des T-Zellrezeptors

Wenn T-Zellrezeptoren in PBL oder andere T-Zellen transduziert werden, müssen sie mit dem zelleigenen TZR konkurrieren. Um die Durchsetzungsfähigkeit der verschiedenen T-Zellrezeptoren SK22-Vektorvarianten zu untersuchen, wurde ein T-Zellrezeptor-Verdrängungsversuch durchgeführt. Hierbei wurde der TZR-SK22 mit dem TZR-D1 verglichen.

Prinzipiell wurde wie folgt vorgegangen: Zunächst wurden die TZR-Konditionen SK22, SK22-P2A, SK22-mu-P2A und D1 in Jurkat76-CD8α eingebracht. Die unterschiedlich transduzierten Zellen wurden am Durchflusszytometer sortiert, so dass die Zellen mit einer vergleichbaren T-Zellrezeptor-Menge (mehr als 90 %) ausgestattet waren. Anschließend wurden die Zellen mit dem zweiten T-Zellrezeptor transduziert und die Durchsetzungsfähigkeit des nachträglich eingebrachten TZR gegenüber dem ursprünglichen T-Zellrezeptor analysiert. Die Effizienz der zweiten Transduktion wurde gemessen (= zweiter TZR alleine, siehe Abbildung 5.19).

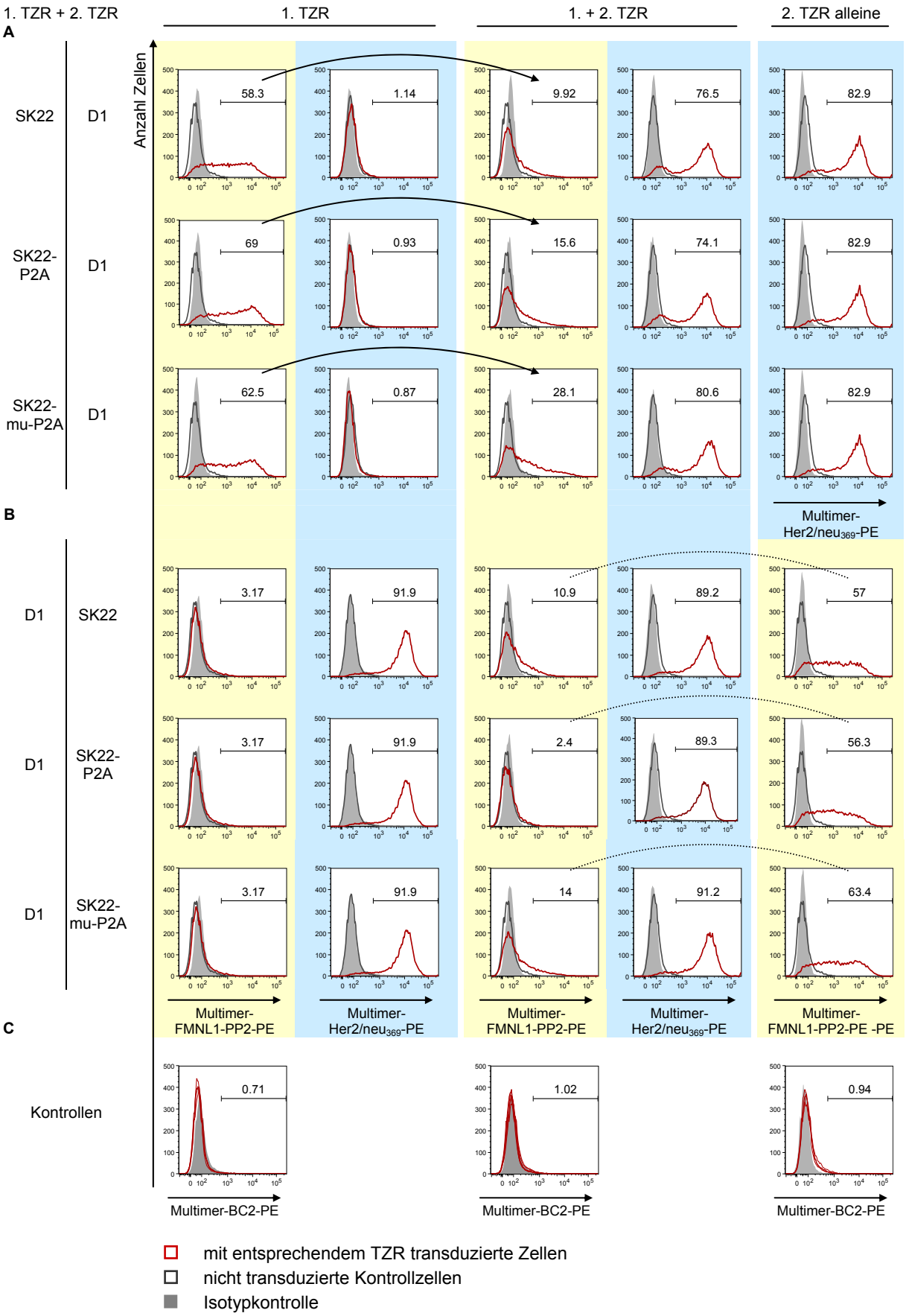


Abbildung 5.19 Durchsetzungsfähigkeit des TZR-SK22. Erläuterung siehe nächste Seite

Durchsetzungsfähigkeit des TZR-SK22. In Jurkat76-CD8α wurde zunächst ein erster T-Zellrezeptor eingebracht und später ein zweiter. A: erster TZR SK22, zweitere TZR D1; B erster TZR D1, zweiter TZR SK22; C: Kontrollen Die jeweiligen TZR-Expressionen (nur ein TZR oder in der Konkurrenzsituation zwei TZR) wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Transduktionseffizienz für die 2. Transduktion ist ebenso aufgeführt (= 2. TZR alleine). Die angegebenen Prozentualwerte beziehen sich auf die TZR-transduzierten Konditionen. Die Multimer-BC2-Kontrollen wurden für alle Ansätzen durchgeführt, wobei jeweils für eine repräsentative Probe der Anteil positiver Zellen gezeigt ist (SK22+D1, SK22-P2A+D1, SK22-mu-P2A+D1, D1+SK22, D1+SK22-P2A, D1+SK22-mu-P2A, SK22, SK22-P2A, SK22-mu-P2A, D1). Die Transduktionseffizienz der Vektorkontrolle Mock lag bei 100 %. Durchgezogener Pfeil: Sinken der TZR-SK22-Expression nach Transfer des 2. TZR. Gepunkteter Bogen: Vergleich zwischen Transduktionseffizienz der SK22-Konditionen (2. TZR alleine) mit der TZR-SK22 Expression in Konkurrenzsituation mit D1.

Wie in Abbildung 5.19 A gezeigt, wurden zunächst die Konditionen SK22, SK22-P2A und SK22-mu-P2A in die Zellen eingebracht und anschließend D1 als zweiter Rezeptor transduziert. TZR-D1 konnte sich hervorragend gegen alle TZR-SK22-Konditionen durchsetzen. Bei einer Transduktionseffizienz von 83 % (TZR-Expression und Multimer-Her2/neu_{369}-Färbung ohne TZR-Konkurrenz) konnten bei vorheriger Transduktion des TZR-SK22 immer noch 74 bis 81 % Multimer-Her2neu_{369}-positive Zellen gemessen werden. Die Expression der SK22-Rezeptoren sank hingegen nach Transduktion des TZR-D1 erheblich (bei der Kondition SK22 von ursprünglich 58 % auf circa 10 % und bei der Kondition SK22-P2A von 69 % auf 15,6 %). Der TZR-SK22 mit konstanten Ketten aus der Maus ließ sich nicht so leicht verdrängen wie die rein humanen TZR-SK22-Konditionen. Hier sank die Expression von 62 % auf 28 %.

Ein ähnliches Bild zeigte sich, wenn zuerst D1 und dann SK22 eingebracht wurde. Wie in Abbildung 5.19 B gezeigt, blieb der TZR-D1 stabil auf der Oberfläche, auch wenn ein zusätzlicher TZR eingebracht worden war (circa 90 % Multimer-Her2/neu_{369}-positive Zellen). Der TZR-SK22 konnte jedoch nur schwach eingebracht werden im Vergleich zur jeweiligen Transduktionseffizienz (2. TZR alleine: 56 bis 63 % Multimer-FMNL1-PP2-positive Zellen). In Konkurrenzsituation mit D1 konnten nur noch 10,9 % FMNL1-PP2-positive Zellen bei der TZR-Kondition SK22, 14 % bei SK22-mu-P2A, und im Hintergrundbereich liegende Multimer-FMNL1-PP2-positive Zellen von SK22-P2A detektiert werden.

Zusammenfassend konnte sich TZR-SK22 nur schlecht gegen TZR-D1 durchsetzen, wobei der TZR-SK22 mit den konstanten Ketten aus der Maus in Konkurrenzsituation etwas besser exprimiert wurde, als die beiden TZR-Konditionen mit den menschlichen konstanten T-Zellrezeptor-Bereichen.

5.5.4 Transduktion in IVSB

Die TZR-Kondition SK22 wurde in den T-Zellklon IVSB transduziert. Nach Anreicherung durch Sortierung Multimer-FMNL1-PP2-positiver Zellen am Durchflusszytometer konnten bis zu 39 % Multimer-FMNL1-PP2-positive Zellen detektiert werden. Die Aktivität gegen FMNL1-PP2 beladene Zellen war jedoch nur gering (Daten nicht gezeigt).

5.5.5 Transduktion in PBL

Der TZR-SK22 wurde in der Einzelketten-Vektorkondition in PBL des gesunden HLA-A2-negativen Spenders D transduziert und nach circa 18 Tagen auf Multimer-FMNL1-PP2-positive Zellen untersucht. Es konnten 8,7 % Multimer-FMNL1-PP2-positive Zellen detektiert werden (siehe Abbildung 5.20). Die Aktivität der transduzierten PBL wurde in einem Zytotoxizitätsversuch untersucht. Es zeigte sich, dass PBL, die mit dem TZR-SK22 transduziert worden waren, FMNL1-PP2-beladene T2-Zellen im Chrom-Freisetzungsversuch nur geringfügig besser erkannten als Flu-beladene T2-Zellen (Daten nicht gezeigt).

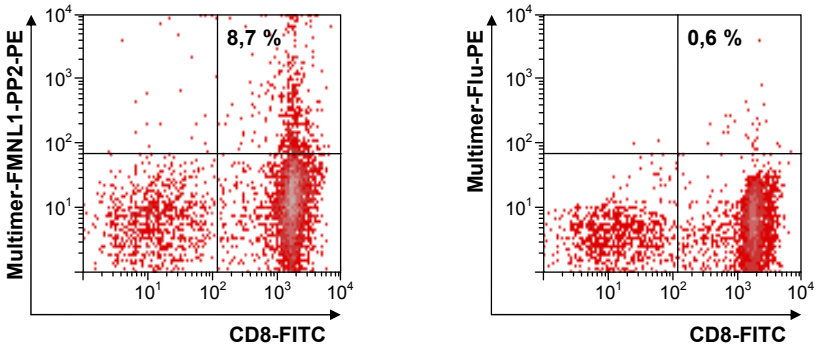


Abbildung 5.20 Durchlusszytometrische Analyse von PBL nach Transduktion des TZR-SK22. Der TZR-SK22 wurde in PBL des gesunden Spenders D retroviral transduziert. Nach 18 Tagen wurde die Oberflächenexpression des TZR-SK22 mit dem Multimer-FMNL1-PP2-PE am Durchflusszytometer gemessen. Des Weiteren wurden die PBL mit dem Kontroll-Multimer-Flu-PE gemessen. Dargestellt sind Multimer-CD8-Doppelfärbungen. Die angegebenen Prozentualwerte beziehen sich auf die Anzahl CD8-Multimer-doppelt positiver Zellen.

In einem weiteren Versuch wurden die verschiedenen TZR-SK22-Vektorkonditionen SK22, SK22-P2A und SK22-mu-P2A in PBL des gesunden HLA-A2-negativen Spenders E transduziert. An Tag 4 und 10 nach Transduktion wurden die Zellen am Durchflusszytometer auf die Expression der neu eingebrachten T-Zellrezeptoren untersucht. Während kaum Multimer-FMNL1-PP2-positive Zellen detektiert werden konnten, stieg jedoch der Anteil Vβ14-positiver Zellen von 3,7 % (diese waren natürlicherweise vor TZR-Transfer in den PBL vorhanden) auf 34 % bei der Kondition SK22, auf 23 % bei SK22-P2A und auf 12 % bei SK22-mu-P2A an (siehe Abbildung 5.21).

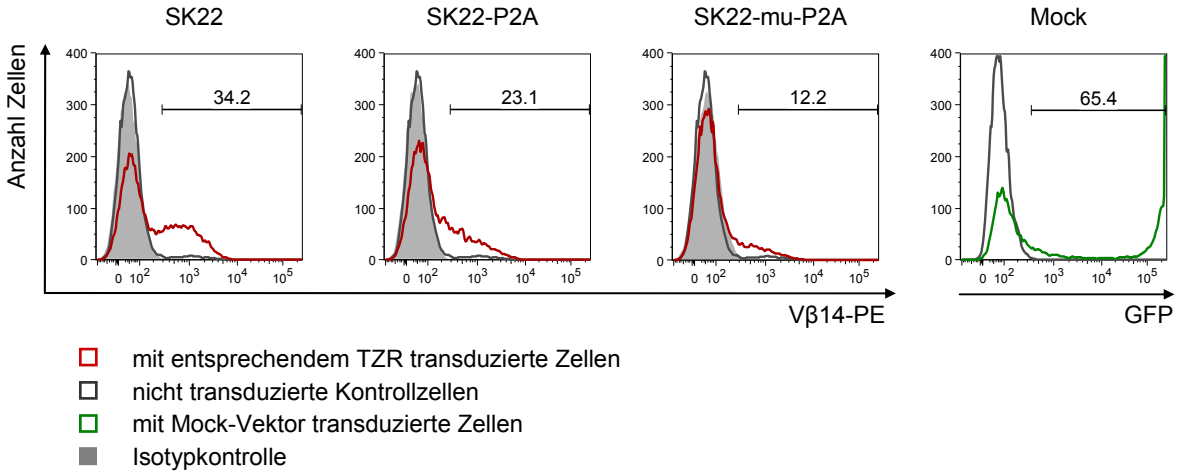


Abbildung 5.21 Durchflusszytometrische Analyse von PBL nach Transduktion des TZR-SK22. Der TZR-SK22 wurde mit Hilfe der vorhandenen Vektorvarianten SK22, SK22-P2A und SK22-mu-P2A in PBL des gesunden Spenders E transduziert und die Expression von Vβ14 mittels Durchflusszytometrie analysiert. In der Vektorkontrolle Mock ist das GFP-Gen enthalten. Die angegebenen Prozentualwerte beziehen sich auf die jeweils TZR-transduzierten Konditionen. 3,7 % Vβ14-positive Zellen befanden sich bereits vor Transduktion in den PBL. Es konnten keine Multimer-FMNL1-PP2-positiven Zellen am Durchflusszytometer detektiert werden.

Die transduzierten PBL wurden an Tag 11 und 14 nach Transduktion in Chrom-Freisetzungsversuchen eingesetzt und auf ihre Zytotoxizität untersucht. Wie in Abbildung 5.22 gezeigt, erkannten PBL, die mit der Vektorkontrolle Mock transduziert worden waren, T2-Zellen gleich gut, unabhängig davon, ob oder mit welchem Peptid sie beladen worden waren. LCL- oder C1R-Zellen wurden unabhängig von ihrem HLA-Typ kaum erkannt. Eine geringe Aktivität gegen Daudi und K526 war zu beobachten.

Bei den PBL, die mit den SK22-TZR-Konditionen transduziert worden waren, bildeten sich Unterschiede im Reaktionsmuster zur Vektorkontrolle aus. Am deutlichsten konnte dies bei dem TZR-SK22 mit den konstanten Ketten aus der Maus beobachtet werden. T2-Zellen, die mit FMNL1-PP2 beladen waren, wurden wesentlich stärker erkannt, als T2-Zellen, die mit anderen Peptiden beladen waren oder unbeladen waren. Die HLA-A2-transfizierte Zelllinie C1R wurde besser erkannt als die nicht transfizierte Zelllinie C1R. Die HLA-A2-positiven LCL-Zelllinien wurden wesentlich stärker lysiert als die HLA-A2-negativen LCL-Zelllinien. Es war nur eine minimale Aktivität gegen Daudi und K526 zu beobachten.

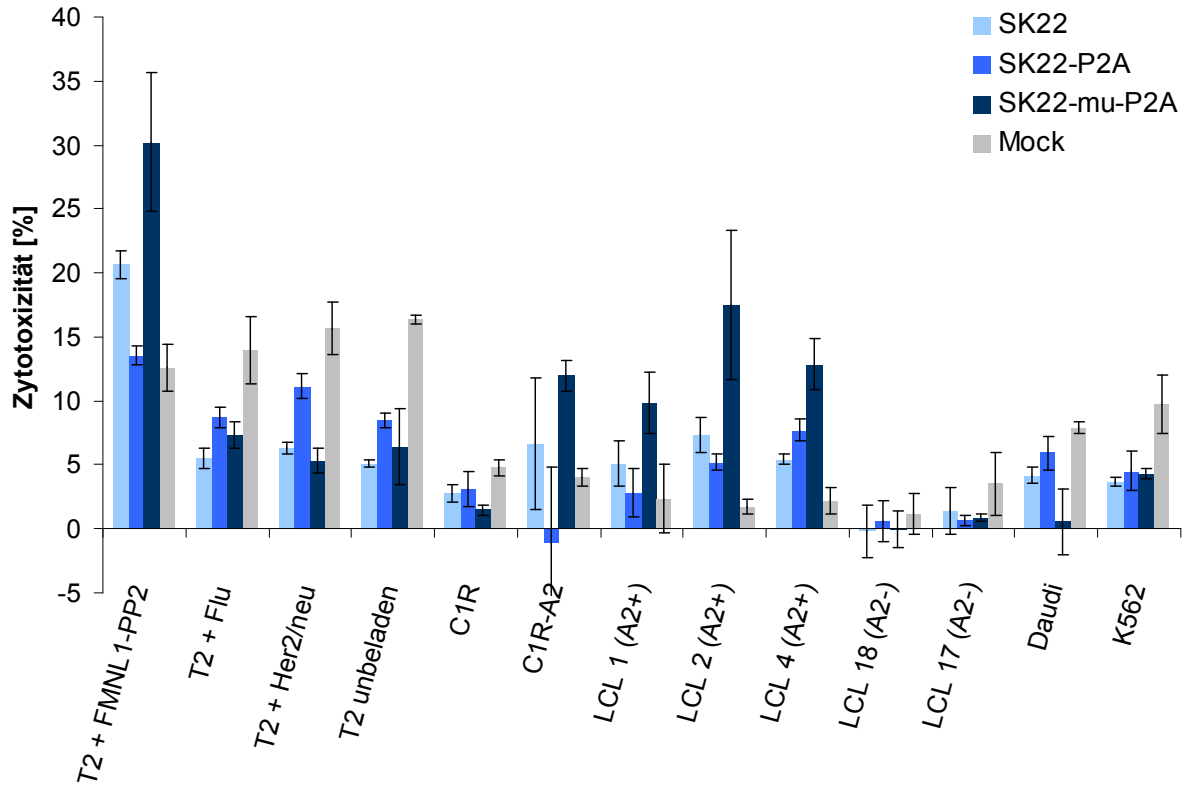


Abbildung 5.22 Lytische Aktivität von mit unterschiedlichen TZR-SK22-Konditionen transduzierten PBL gegen verschiedene Zielzellen. In einem Chrom-Freisetzungsversuch wurde die lytische Aktivität von PBL, die mit den angegebenen TZR-SK22-Konditionen bzw. mit der Vektorkontrolle (Mock) transduziert worden waren, gegen verschiedene Zielzellen getestet. Die T2-Zellen wurden mit 10 µM Peptid beladen. Die Mittelwerte von Triplikaten ± Standardabweichung sind gezeigt; E:T = 15:1.

In Abbildung 5.23 ist ein erweiterter Zytotoxizitätsversuch mit den transduzierten PBL des Spenders E gezeigt. Sie wurden in einer E:T-Reihe von 60:1 bis 1,9:1 eingesetzt. Die Erkennung von FMNL1-PP2-beladenen T2-Zellen konnte durch Transduktion aller TZR-SK22-Varianten gesteigert werden im Vergleich zur Vektorkontrolle Mock. Flu-beladene T2-Zellen wurden von den PBL, die mit TZR-SK22-Varianten transduziert waren, schlechter erkannt als FMNL1-PP2-beladene T2-Zellen. Die Vektorkontrolle zeigte keine Unterschiede in der Erkennung verschieden beladener T2-Zellen. C1R-A2 wurden von PBL SK22-P2A besser erkannt als die nicht MHC-Klasse-I-transduzierten C1R. HLA-A2-positive LCL wurden von den TZR-SK22 transduzierten PBL sehr gut erkannt (LCL2: siehe Abbildung 5.23, LCL 4: Daten nicht gezeigt), während sie gegen HLA-A2-negative LCL keine zytotoxische Aktivität zeigten (LCL17: siehe Abbildung 5.23, LCL 18: Daten nicht gezeigt).

Obwohl wesentlich weniger Vβ14-positive Zellen in der TZR-SK22-Kondition mit den konstanten Ketten aus der Maus zu sehen waren, zeigten diese PBL im Vergleich zu den TZR-Konditionen SK22 und SK22-P2A mitunter die höchste Aktivität gegen HLA-A2-positive LCL oder FMNL1-PP2-beladene T2-Zellen.

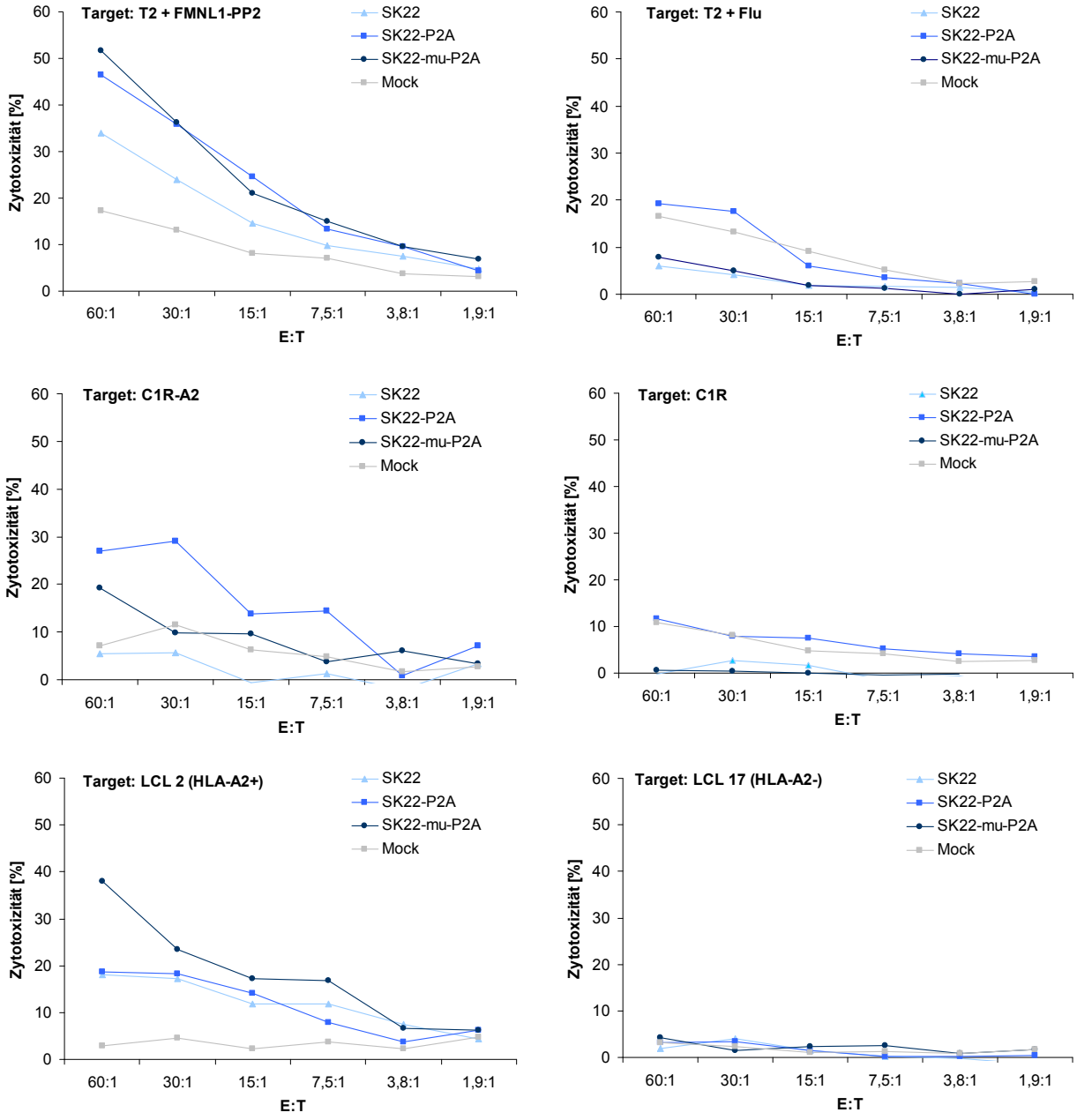


Abbildung 5.23 Lytische Aktivität von mit TZR-SK22 transduzierten PBL. In einem Chrom-Freisetzungsversuch wurden PBL, die mit den angegebenen TZR-SK22-Konditionen und mit der Vektorkontrolle (Mock) transduziert worden waren, in einer E:T-Reihe von 60:1 bis 1,9:1 eingesetzt. Als Zielzellen (Targets) dienten T2-Zellen, die mit 10 µM FMNL1-PP2 oder Flu beladen waren, sowie C1R, C1R transfiziert mit HLA-A*0201 (C1R-A2), die HLA-A2-positive LCL2 und HLA-A2-negative LCL17. Bei LCL4 (HLA-A2-positiv) und LCL18 (HLA-A2-negativ) waren die Ergebnisse vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Die Mittelwerte der spezifischen Lyse von Triplikaten ± Standardabweichung sind gezeigt.

6 Diskussion

Die adoptive T-Zelltherapie ist eine attraktive Alternative zu konventionellen Behandlungen von malignen Erkrankungen. So konnten bereits Remissionen bei Melanompatienten nach adoptivem T-Zelltransfer erreicht werden (Dudley et al, 2002b; Morgan et al, 2006). Während im autologen System jedoch oft nur unzureichende Antitumorantworten zu generieren sind, zeigt der Erfolg der Gabe von Spenderlymphozyten im Rahmen einer allogenen Stammzelltransplantation, dass im allogenen System T-Zellen hoch effektiv Tumorzellen bekämpfen können. Die allogene Stammzelltransplantation konnte auch bei B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen, wie beispielsweise der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL), mit Hilfe eines Transplantat-gegen-Leukämie-Effektes (Graft-versus-Leukemia, GvL) lang andauerndes krankheitsfreies Überleben bewirken. Sie birgt jedoch ein sehr hohes Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko auf Grund der Transplantat-gegen-Wirts-Erkrankung (Graft-versus-Host-Disease, GvHD), (Dreger et al, 2005). Die im Transplantat enthaltenen T-Zellen sind hierbei für den erwünschten GvL-Effekt verantwortlich, gleichzeitig aber auch für die unerwünschte GvHD (Horowitz et al, 1990; Kolb et al, 2004). Zur Minimierung des Risikos einer GvHD könnten T-Zellen eingesetzt werden, die spezifisch und allorestringiert Peptide von tumorspezifischen Antigenen erkennen und somit bevorzugt Tumorzellen angreifen. Die Reaktivität der T-Zellen kann durch den T-Zellrezeptor-Transfer auf sekundäre Zellen übertragen werden und mittels adoptivem T-Zelltransfer im Patienten zur selektiven Bekämpfung von Tumorzellen zum Einsatz kommen.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es, allorestringierte, peptidspezifische T-Zellrezeptoren im HLA-A2-positiven System zu selektieren, um neue Behandlungsformen bei B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen zu entwickeln. Als Tumorantigen wurde FMNL1 gewählt, da es in der CLL und in anderen Lymphomen sowie einigen soliden Tumoren überexprimiert wird und in gesunden Zellen fast ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird.

In dieser Arbeit wurden Peptide von FMNL1 mit Hilfe von Prädiktionsalgorithmen vorhergesagt und in Stimulationsansätzen von T-Zellen eingesetzt. Es konnten allo-restringierte zytotoxische T-Zellen mit Spezifität für das vorhergesagte Peptid FMNL1-PP2 selektiert werden, die FMNL1-exprimierende Tumorzellen erkannten und lysierten. Die Reaktivität dieser T-Zellen wurde detailliert charakterisiert. Nach Identifizierung des T-Zellrezeptors wurde dieser retroviral in sekundäre Zellen transduziert. Verschiedene Modifikationen wurden vorgenommen, um die T-Zellrezeptor-Expression zu erhöhen. Die Reaktivität der ursprünglichen T-Zellen konnte auf die sekundären Zellen übertragen werden.

6.1 Prädiktionsalgorithmen zur Peptidauswahl

FMNL1 ist ein attraktives tumorassoziiertes Antigen, das mittels der SEREX (serologic identification of immunotherapeutic stategies)-Methode identifiziert wurde. Es wird in CLL-Zellen und malignen Zelllinien überexprimiert, während es in gesunden Zellen fast ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (Krackhardt et al, 2002b; Schuster et al, 2007). Um zytotoxische T-Zellen zu selektieren, die spezifisch FMNL1-exprimierende Zellen erkennen, mussten zunächst immunogene T-Zellepitope dieses Proteins identifiziert werden, da bisher für FMNL1 noch keine T-Zellepitope bekannt waren. Zur Identifizierung von T-Zellepitopen wurde der Ansatz der „reversen Immunologie“ gewählt, bei der Epitope vorhergesagt und anschließend T-Zellen selektiert werden, die das Peptid spezifisch erkennen. Verschiedene in silico Prädiktionsalgorithmen können zur Vorhersage präsentierter Peptide herangezogen werden. Der Vorteil von Prädiktionsalgorithmen gegenüber experimentellen Methoden zur Identifizierung von Epitopen ist der wesentlich geringere Zeitaufwand (Kessler und Melief, 2007).

Für die Bildung von peptidbeladenen MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche müssen Peptide mit einer präferentiellen Länge von 8 bis 10 Aminosäuren im Zytoplasma proteolytisch geschnitten werden, anschließend über TAP-Transporter ins endoplasmatische Retikulum gelangen und dann an MHC-Klasse-I-Moleküle, in unserem Fall an HLA-A2, binden (Kloetzel, 2004). Zum Vergleich wurden neben FMNL1-Peptiden auch Vorhersagen für bekannte T-Zellepitope (Flu, Her2/neu$_{369}$, Tyrosinase$_{369}$ und IPS) berechnet.

Die C-terminale Schnittwahrscheinlichkeit des Peptids durch das Immunproteasom wurde mit Hilfe der Programmversion i20S von PAProC II (Kuttler et al, 2000; Nussbaum et al, 2001) berechnet. Der N-Terminus des Peptides kann postproteasomal im Zytoplasma oder im endoplasmatischen Retikulum durch Aminopeptidasen gekürzt werden, was eine Vorhersage schwierig macht (Serwold et al, 2001). Die Berechnung der Vorhersagewerte mit Hilfe des Immunproteasoms wurde gegenüber dem konstitutiven Proteasom bevorzugt, da die FMNL1-exprimierenden Tumorzellen vorwiegend B-Zellen sind, die nach Aktivierung immunproteasomal geschnittene Peptide präsentieren. Alle ausgewählten FMNL1-Peptide und die bekannten Epitope Flu, Tyrosinase$_{369}$ und IPS wiesen eine hohe bis sehr hohe Schnittwahrscheinlichkeit auf. Bei dem bekannten T-Zellepitop Her2/neu$_{369}$ wurde interessanterweise kein Schnitt am C-Terminus vorhergesagt. Das könnte einerseits daran liegen, dass als Grundlage des Algorithmus von PAProC II lediglich ein Protein (Enolase 1) in Kombination mit wenigen Peptiden (Kuttler et al, 2000; Toes et al, 2001) verwendet wurde und die von diesem Protein geschnittenen Peptide möglicherweise nicht repräsentativ für alle in vivo geschnittenen Peptide sind. Nach Berechnung mit Hilfe eines anderen

unveröffentlichten Programms („16komb2“) zur Vorhersage immunproteasomaler Schnitte, wurden bei Her2/neu_{369} eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit für einen C-terminalen Schnitt prädiziert (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass der von PAProC II nicht prädizierte C-terminale Schnitt möglicherweise auf Limitationen des Algorithmus zurückzuführen ist. Andererseits gibt es aber auch Peptide, die bevorzugt durch das konstitutive Proteasom und nicht im Immunproteasom erzeugt werden (Morel et al, 2000). Durch unterschiedliche katalytische Untereinheiten der Proteasome kann ein unterschiedliches Peptidrepertoire erzeugt werden (Toes et al, 2001). Neben dem C-terminalen Schnitt spielt die Wahrscheinlichkeit für Schnitte innerhalb des Peptides ebenfalls eine große Rolle. So können Peptide durch Schnitte innerhalb des Peptides zerstört werden, was für das $Tyrosinase_{369}$-Peptid im Immunproteasom gezeigt wurde (Chapiro et al, 2006). Für alle in der Tabelle 5.1 (S. 63) aufgeführten Peptide, auch für die bekannten T-Zellepitope, wurden unterschiedlich viele Schnitte innerhalb des Peptides vorhergesagt.

Auch für den TAP-Transport sind bestimmte Aminosäuren an bestimmten Stellen (insbesondere am N- und C-Terminus) eines Peptides förderlich oder hinderlich (Brusic et al, 1999; Uebel und Tampe, 1999; van Endert, 1996). Die meisten vorhergesagten Peptide wiesen mehr günstige als ungünstige Aminosäuren auf.

SYFPEITHI (Rammensee et al, 1999) und BIMAS (Parker et al, 1994) sind die bekanntesten Algorithmen zur Peptidbindungsvorhersage an MHC-Klasse-I-Moleküle. Da sowohl falsch positive als auch falsch negative Bindungsvorhersagen vorkommen und signifikante Unterschiede in der Vorhersage zwischen diesen Programmen beobachtet wurden (Kessler und Melief, 2007), wurden in der vorliegenden Arbeit beide Algorithmen verwendet, um eine zuverlässigere Aussage zu bekommen. Für vier von fünf ausgewählten vorhergesagten Peptiden von FMNL1, für die eine hohe Bindungswahrscheinlichkeit an HLA-A2 nach Berechnung mit diesen Programmen vorausgesagt worden war, konnte die Bindung an HLA-A2 experimentell nachgewiesen werden. Dabei korrelierte auch ein höherer Vorhersagewert mit einer stärkeren Bindung in vitro. FMNL1-PP6 und HDAC6-PP1 hatten für die Bindung an HLA-A2 nach Berechnung mit BIMAS einen schlechten Wert und einen mittleren nach Berechnung mit SYFPEITHI. Für beide Peptide konnte dennoch eine Bindung nachgewiesen werden.

Die Vorhersageprogramme geben somit nur Anhaltspunkte für eine mögliche Peptidpräsentation auf der Zelloberfläche. Ob die vorhergesagten Peptide tatsächlich in Tumor- oder anderen Zellen natürlicherweise präsentiert werden und somit antigene Epitope darstellen können, muss experimentell geprüft werden. Von den fünf ausgewählten Peptiden wurden drei Peptide für Stimulationsansätze bevorzugt: (FMNL1-PP2, -PP6, -PP7). Diese

zeigten in der Summe gute Vorhersagen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe der Prädiktionsalgorithmen ein Peptid (FMNL1-PP2) identifiziert werden, das von T-Zellen erkannt wurde.

6.2 Selektion allorestringierter peptidspezifischer zytotoxischer T-Zellen

T-Zellen können nicht-selbst-MHC-Moleküle (also „Allo"-MHC-Moleküle) peptidspezifisch erkennen (Heath et al, 1989). Dies kann dazu genutzt werden, im allogenen System T-Zellen zu gewinnen, die hoch affin Peptide tumorassoziierter Antigene erkennen (Stauss, 1999). Da eine optimale Vorgehensweise zur T-Zellstimulation im allogenen System noch nicht bekannt ist, wurden verschiedene Stimulationsbedingungen getestet.

Die Wahl der antigenpräsentierenden Zelle ist in Hinblick auf die selektive Antigenpräsentation und auf passende Kostimulation sehr wichtig. Weit verbreitet ist der Einsatz von dendritischen Zellen (DZ) als professionelle antigenpräsentierende Zellen, da sie eine hohe Kapazität zur Primärstimulation von naiven T-Zellen haben (Liao et al, 2004; Thurner et al, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde die HLA-A2-positive Zelllinie T2 (Hybrid einer T- und B-lymphoblastoiden Zelllinie) als antigenpräsentierende Zellen verwendet, da mit dieser Zelllinie bereits hoch avide peptidspezifische allorestringierte T-Zellen selektiert werden konnten (Sadovnikova et al, 1998; Stanislawski et al, 2001). T2-Zellen haben den Vorteil, dass sie effizient exogen mit einem gewünschten Peptid beladen werden können, da sie als TAP-defiziente Zellen nur gering zelleigene Peptide präsentieren (Salter et al, 1985; Stanislawski et al, 2001). Darüber hinaus wurden HLA-A*0201-transfizierte K526-Zellen (K526-A2), neben T2-Zellen als Stimulatorzellen ausgewählt, da in T-Zell-Funktionsversuchen gezeigt worden war, dass T-Zellen gegen K526-A2 eine geringere Hintergrundreaktivität zeigten als gegen T2-Zellen (Britten et al, 2002). Auch HLA-A2-positive aktivierte CLL-Zellen wurden zur Stimulation von allorestringierten peptidspezifischen T-Zellen eingesetzt.

Im autologen System ist ein kostimulatorisches Signal für eine Aktivierung von T-Zellen zu Effektorzellen essentiell. Eine Überstimulation kann hingegen auch zur Deletion spezifischer T-Zellen führen (activation induced cell death, AICD), was ein Mechansimus zur Prävention autoreaktiver Zellen sein könnte (Lenardo et al, 1999; Lenschow et al, 1996). Da eine optimale Stimulationsweise von allogenen T-Zellen durch T2-Zellen und K562-A2 noch nicht bekannt ist, wurde ein vergleichender Thymidinproliferationsversuch von allogenen T-Zellen nach Stimulation mit T2-Zellen bzw. K526-A2-Zellen durchgeführt. Hierbei wurden zusätzlich

unterschiedliche kostimulatorische Bedingungen zur Primärstimulation und zur Restimulation getestet.

Interessanterweise stellte sich heraus, dass es von großer Bedeutung ist, wie die allogenen T-Zellen in der Primärstimulation stimuliert werden. Kostimulatorische Komponenten in der Restimulation hatten hingegen kaum Einfluss auf die Proliferation der T-Zellen. T2-Zellen exprimieren im Gegensatz zu K526-A2 selbst kostimulatorische Moleküle. Nach Stimulation mit T2-Zellen proliferierten T-Zellen am stärksten, wenn sie nicht zusätzlich kostimuliert wurden. Zugabe des Fusionsproteins B7.1, eines agonistischen CD28-Antikörpers und aktivierter B-Zellen bewirkten hingegen eine deutlich reduzierte Proliferation von T-Zellen. Diese Ergebnisse stimmen mit unseren Beobachtungen in weiteren Stimulationsansätzen überein, bei denen T-Zellen, die mit dem B7.1-Fusionsprotein und T2-Zellen stimuliert worden waren, vergleichsweise kurz lebten und dann massiv in Apoptose gingen (Daten nicht gezeigt).

Bei Einsatz von K526-A2 als APZ, die keine kostimulatorischen Moleküle auf Oberfläche exprimieren, war ein weiterer Kostimulus wichtig. Die stärkste Proliferation der T-Zellen wurde mit dem agonistischen CD28-Antikörper erreicht, nicht aber durch Stimulation mit dem B7.1-Fusionsprotein oder mit aktivierten B-Zellen. Möglicherweise war die Dosierung des B7.1-Fusionsproteins noch nicht optimal und könnte durch eine Titration verbessert werden. Der Grund für die ungenügende Stimulation von T-Zellen mittels aktivierter B-Zellen könnte darin liegen, dass das kostimulatorische Signal von einer zweiten Zelle ausging und somit das T-Zellrezeptor-Signal und das kostimulatorische Signal nicht simultan stattfinden konnten, anders als bei den kleineren anti-CD28-Antikörpern. Es ist beschrieben, dass T-Zellen besser stimuliert werden, wenn beide Signale von derselben Zelle ausgehen (Liu und Janeway, 1992).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass auch im allogenen System ein adäquates kostimulatorisches Signal insbesondere bei der Primärstimulation für eine Proliferation der T-Zellen nötig ist. Ein zu starkes oder zu schwaches Signal hingegen kann inhibitorisch wirken. In Mausexperimenten konnte ebenfalls gezeigt werden, dass ein agonistisches CD28-Signal zur Herunterregulation von peripheren T-Zell-Antworten durch Apoptose führen kann, wenn der T-Zellrezeptor mit hoher Avidität an ein Alloantigen bindet (Yu et al, 2003).

Die Stimulation von T-Zellen mit CLL-Zellen, die auf CD40L-exprimierenden Fibroblasten aktiviert worden waren, gelang nicht, was möglicherweise trotz Aktivierung an einer unzureichenden Antigenpräsentation oder kostimulatorischen Kapazität der CLL-Zellen lag (Krackhardt et al, 2002a).

Eine erfolgreiche Anreicherung von allorestringierten peptidspezifischen T-Zellen ist unter Einsatz von mit 10 µM peptidbeladenen T2-Zellen ohne zusätzliche Kostimulation gelungen. Ein systematischer Vergleich verschiedener Stimulationsmethoden war jedoch nicht primäres Ziel der vorliegenden Arbeit und somit kann nicht sicher beurteilt werden, welche Stimulationsmethode zu den funktionell besten spezifischen T-Zellen führt. Zukünftig sind hier Vergleiche von verschiedenen Stimulatorzellen auch unter Berücksichtigung von dendritischen Zellen sinnvoll. Zusätzlich könnten unterschiedliche Antigenpräsentationen (beladenes Peptid versus prozessiertes Protein) und Antigenkonzentrationen anhand eines Standardantigens in Stimulationsansätzen miteinander verglichen werden.

6.3 Charakterisierung FMNL1-PP2 spezifischer allorestringierter T-Zellen

In dem erfolgreichen Stimulationsansatz konnten Multimer-FMNL1-PP2-spezifische T-Zellen nach Stimulation und Sortierung am Durchflusszytometer isoliert werden.

6.3.1 Phänotypische Charakterisierung und Lebensdauer

Die Lebensdauer der mono- oder oligoklonalen T-Zellpopulationen war erwartungsgemäß begrenzt. Die meisten (19 von 32) lebten nach der Sortierung lediglich zwischen sechs und acht Wochen lang und proliferierten nur schwach. Einige T-Zellpopulationen lebten noch wenige Wochen länger. Der stabilste Klon war SK22, der bis maximal 44 Wochen (22 Restimulationen) nach der Sortierung kultiviert werden konnte und in Phasen stark proliferierte. Die meisten normalen Zellen durchlaufen eine bestimmte Anzahl von Zellteilungen, werden durch Verkürzungen der Telomere „replikativ seneszent“ und sterben (Shay und Wright, 2005). Ob es eine definierte Lebensdauer von T-Zellen gibt, ist jedoch unklar. Möglicherweise ist die Apoptose von reifen aktivierten T-Zellen vielmehr stimulationsabhängig. Nach Aktivierung und einer Proliferationsphase gehen sie entweder durch starke T-Zellrezeptor-Signale in Apoptose (aktive Apoptose) oder durch Ausbleiben von Antigenstimulation (passive Apoptose). Eine Gedächtniszell-Population kann dem Zelltod entgehen und kann zu einer schnellen Expansion von spezifischen T-Zellen nach erneuter Antigenexposition führen (Lenardo et al, 1999). Eine Untersuchung der Oberflächenmoleküle ergab, dass es sich bei SK22 um eine reine Effektor-T-Zellpopulation handelte. Allerdings wurde die Messung erst spät in der Lebenszeit des Klones (38. Woche nach Sortierung) durchgeführt, zu einem Zeitpunkt zu dem möglicherweise früher vorhandene Gedächtniszellen bereits nicht mehr nachweisbar waren. 5 % der Zellen waren CD5-positiv. CD5 ist sowohl bei T- als auch bei B-Zellen mit dem Antigenrezeptor assoziiert und hat einen negativen Effekt auf die

Antigenrezeptorsignalleitung (Gary-Gouy et al, 2000; Tarakhovsky et al, 1995). Eine Rolle von CD5 in der Signalleitung, die zur Apoptoseresistenz von Zellen führen kann, wurde durch Vergleiche der Genexpressionsmuster der langlebigen CD5-positiven CLL-Zellen und CD5-transfizierten B-Zellen beobachtet (Gary-Gouy et al, 2007). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Expression von CD5 das Überleben von T-Zellen fördert, indem CD5 eine Überstimulation des T-Zellrezeptors und somit eine AICD durch Herunterregulation der FasL (Fas Ligand)-Expression und Inhibition der Caspase-8-Aktivierung verhindert (Friedlein et al, 2007). Die CD5-positive Fraktion könnte somit möglicherweise für die lange Lebensdauer des T-Zellklons SK22 verantwortlich gewesen sein. Diese lange Überlebenszeit von SK22 ermöglichte die ausführliche Untersuchung dieses T-Zellklons.

6.3.2 T-Zellrezeptor der selektierten T-Zellen

Auf Grund der beschränkten Proliferation der meisten mono- oder oligoklonalen T-Zellpopulationen konnten ausgeweitete Analysen des Reaktionsspektrums und des T-Zellrezeptors nur von wenigen (elf) T-Zellpopulationen durchgeführt werden. Bei allen elf T-Zellpopulationen konnte interessanterweise derselbe T-Zellrezeptor (Vα14 und Vβ14) mit identischen CDR3-Regionen identifiziert werden. Die Proliferation von T-Zellen mit diesem T-Zellrezeptor war offensichtlich dominant gegenüber anderen T-Zellen. In der T-Zelllinie (ursprünglich circa 4000 Zellen), aus der die meisten Klone stammten und die somit repräsentativ für die sortierten T-Zellen war, wurden neben den dominanten T-Zellrezeptor-ketten (Vα14 und Vβ14) lediglich sieben weitere α- und β-Ketten-Banden in der Gelanalyse der T-Zellrezeptor-PCR gefunden (Daten nicht gezeigt). Diese wurden nicht weiter untersucht, weil die meisten T-Zellen mit FMNL1-PP2-spezifischem Reaktionsmuster dieselben dominanten Ketten hatten und somit eine FMNL1-PP2-spezifische Reaktion der anderen Ketten unwahrscheinlich ist. Der langlebige SK22 war repräsentativ für die Reaktivität des identifizierten FMNL1-PP2-spezifischen T-Zellrezeptors.

6.3.3 Peptidspezifität und Avidität von SK22

Der T-Zellklon SK22 reagierte FMNL1-PP2-peptidspezifisch im Kontext von HLA-A2. Eine Auswahl von sechs verschiedenen anderen Peptiden, die auf T2-Zellen beladen wurden, wurde nicht erkannt, ebenso wie unbeladene T2-Zellen. Das Peptid FRL-PP1, welches das zum menschlichen FMNL1-PP2 homologe Peptid von FRL in der Maus ist, wurde vom T-Zellklon SK22 erkannt. Die beiden Peptide unterscheiden sich lediglich an der siebten Aminosäure, wobei beide Aminosäuren polar sind. Anstelle der Aminosäure Threonin in FMNL1-PP2 enthält das FRL-PP1-Peptid Asparagin. Die Erkennung des homologen Mauspeptides ist eine wichtige Voraussetzung, um den T-Zellrezeptor von SK22 im HLA-A2-

transgenen Mausmodell zu untersuchen. Für weiterführende Arbeiten müsste allerdings noch überprüft werden, ob FRL-PP1 in der murinen Zelle prozessiert und an der Oberfläche präsentiert wird. Das Peptid HDAC6-PP1, das sich lediglich in zwei Aminosäuren von FMNL1-PP2 unterscheidet, wurde nicht erkannt. Diese Ergebnisse zeigen, dass der T-Zellrezeptor von SK22 HLA-A2 peptidabhängig erkennt und eine hohe Präferenz für die Sequenz des Peptides FMNL1-PP2 aufweist. Zur genaueren Untersuchung, welche Aminosäurensequenz-Unterschiede im FMNL1-PP2-Peptid durch den TZR-SK22 toleriert werden, könnten Peptidreihen synthetisiert werden, in denen sich die Peptide jeweils nur durch eine Aminosäure an unterschiedlichen Stellen im Peptid unterscheiden.

Die T-Zellrezeptor- und MHC-Klasse-I-Abhängigkeit der Reaktivität von SK22 konnte dadurch nachgewiesen werden, dass weder K526 noch Daudi von SK22 lysiert wurden. K526 ist aufgrund fehlender MHC-Klasse-I-Moleküle eine hervorragende Zielzelle von natürlichen Killerzellen. Die Zelllinie Daudi ist β_2-Mikroglobulin-defizient, exprimiert ebenso kein MHC-Klasse-I und kann von einigen γδ-T-Zellpopulationen erkannt werden (Rothenfusser et al, 2002). Die Erkennung von HLA-A2 wurde durch Blockierungsversuche von FMNL1-PP2-beladenen T2-Zellen mit dem anti-HLA-A2-Antikörper HB54 bestätigt.

Die zytotoxische Reaktivität des T-Zellklons SK22 war sehr hoch. Die halbmaximale Lyse von FMNL1-PP2 beladenen T2-Zellen in einer E:T-Reihe lag bei circa 1:1. Die funktionelle Avidität lag bei einer halbmaximalen Lyse von mit 100 nM FMNL1-PP2 beladenen T2-Zellen im mittleren Bereich. Andere Arbeiten zeigten jedoch die Selektion von hoch affinen T-Zellen im allogenen System (Sadovnikova und Stauss, 1996; Stanislawski et al, 2001). Möglicherweise sind die hoch aviden T-Zellen aus dem Stimulationsansatz durch die Multimer-Sortierung in Apoptose gegangen. Da Multimere die natürlichen Liganden eines T-Zellrezeptors darstellen, kann ein zu starkes Signal zum Zelltod führen (Knabel et al, 2002). Möglicherweise spielt auch die geringere Bindungsaffinität des Peptides FMNL1-PP2 an HLA-A2 eine Rolle, da Peptide mit geringerer Affinität weniger stabile MHC-Peptid-Moleküle bilden und somit weniger immunogen sind (van der Burg et al, 1996). Es wird kontrovers diskutiert, welche funktionelle Avidität von T-Zellen zur effektiven Tumorbekämpfung optimal ist und ob die Stärke der funktionellen Avidität mit der Tumorreaktivität korreliert. Zwar gibt es Berichte, dass hoch avide T-Zellen in vivo eine höhere anti-Tumorwirkung haben können (Alexander-Miller et al, 1996; Zeh et al, 1999), jedoch korreliert die Avidität nicht in jedem Fall mit einer anti-Tumorreaktivität. So waren beispielsweise hoch avide allorestringierte MDM2-peptidspezifische T-Zellen in vivo nicht reaktiv (Bendle et al, 2004). Gering avide T-Zellen hingegen zeigten im Mausmodell durch CD4-Hilfe und mittels viraler Induktion Tumorreaktivität (Lyman et al, 2005). T-Zellen, die in Peptidbeladungsversuchen geringe Avidität zeigten, reagierten CD8-unabhängig, eine Eigenschaft, die hoch

affinen T-Zellrezeptoren zugesprochen wird. Nicht nur die TZR-Peptid-MHC-Bindungsaffinität, sondern auch die Expression von kostimulatorischen Molekülen und die extrazelluläre Mikroumgebung beeinflussen die funktionelle Avidität (McKee et al, 2005). So konnte in vivo eine funktionelle Aviditätsreifung von T-Zellen mittlerer Avidität in Abhängigkeit von der Antigendosis beobachtet werden (Slifka und Whitton, 2001). Des Weiteren könnte der Einsatz von T-Zellen mit einer geringeren Avidität den Vorteil eines geringeren Risikos in Hinblick auf die Auslösung einer Autoimmunität haben (Morgan et al, 1998).

6.3.4 Reaktivität gegen natürliche Zielzellen

Auch natürliche Zielzellen wurden vom T-Zellklon SK22 erkannt. Sowohl EBV-positive als auch EBV-negative Lymphomzelllinien wurden von SK22 lysiert, wenn sie HLA-A2-positiv waren. Darüber hinaus wurde auch die HLA-A2-positive Nierenzellkarziniom-Zelllinie RCC26 erkannt, nicht aber die HLA-A2-negative KT187. In unserer Arbeitsgruppe wurde zuvor gezeigt, dass Lymphom- und Nierenzellkarzinomzelllinien FMNL1 überexprimieren (Schuster et al, 2007).

Vier von fünf HLA-A2-positiven CLL-Zellen wurden erkannt, während hingegen keine HLA-A2-negative CLL erkannt wurde. Die Reaktivität von SK22 gegen CLL-Zellen war jedoch nur schwach. So wurden nur geringe Mengen IFNγ in Antwort auf CLL-Zellen ausgeschüttet und nur wenige CLL-Proben wurden im Zytotoxizitätsversuch lysiert. Des Weiteren wurden nur CLL-Zellen erkannt, die über CD40L aktiviert worden waren. Es ist vielfach beschrieben, dass CLL-Zellen nach CD40-Aktivierung Adhäsionsmoleküle, wie CD54, und kostimulatorische Moleküle (CD80, CD86) hochregulieren und Antigene besser präsentieren können (Ranheim und Kipps, 1993; Van den Hove et al, 1997; Yellin et al, 1994). So konnten allogene T-Zellen CLL-Zellen, die über CD40L aktiviert worden waren, wesentlich besser lysieren als unaktivierte CLL-Zellen (Krackhardt et al, 2002a). Möglicherweise haben CD40-aktivierte CLL-Zellen dennoch einen Defekt in der FMNL1-Antigenprozessierung und -präsentation, da sie trotz Überexpression von FMNL1 nicht entsprechend stark erkannt wurden.

Der T-Zellklon SK22 erkannte auch gesunde hämatopoetische Zellen, die FMNL1 exprimieren. HLA-A2-positive B-Zellen wurden am stärksten erkannt, PBL deutlich weniger. HLA-A2-negative PBL oder B-Zellen wurden nicht erkannt. Die HLA-A2-positiven Lungenfibroblasten und Nierenzellen (239 HEK), die kein FMNL1 exprimieren, wurden hingegen nicht erkannt (Schuster et al, 2007).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass das durch Computeralgorithmen vorhergesagte Peptid FMNL1-PP2 mit großer Wahrscheinlichkeit natürlich prozessiert und

präsentiert wird, da der T-Zellklon SK22 hoch FMNL1-PP2-spezifisch in Peptidbeladungsversuchen von HLA-A2-positiven T2-Zellen reagierte und gleichzeitig HLA-A2-positive Zellen nur dann lysierte, wenn sie FMNL1 endogen exprimierten. Ein endgültiger Nachweis steht jedoch auf Grund der Schwierigkeit der dazu notwendigen Versuche noch aus. Hierbei müsste in derselben Zellart nachgewiesen werden, dass die Zellen bei Vorhandensein oder Fehlen einer FMNL1-Expression unterschiedlich von SK22 erkannt werden. Hierzu könnte mit Hilfe von siRNS in FMNL1-exprimierenden Zellen die FMNL1-Expression herunterreguliert werden, oder die FMNL1-DNS könnte in Zellen transfiziert werden, die FMNL1 nicht exprimieren.

FMNL1 ist ein tumorassoziiertes Antigen, das in verschiedenen malignen Zellen überexprimiert wird und dessen Expression sich gleichzeitig in gesunden Zellen auf PBL und Gewebe, in denen sich hämatopoetische Zellen befinden, beschränkt (Krackhardt et al, 2002b; Schuster et al, 2007). Neben der erwünschten Tumorerkennung kann die erwartete und tatsächlich beobachtete Reaktivität des T-Zellklons SK22 gegen gesunde PBL, insbesondere B-Zellen, in der klinischen Anwendung des T-Zellrezeptors von SK22 zu unerwünschten Nebenwirkungen führen, sie scheint sich allerdings auf hämatopoetische Zellen zu beschränken. Im Rahmen einer beispielsweise haploidentischen Stammzelltransplantation, bei der das hämatopoetische System des Patienten von HLA-A2-negativen Spenderzellen ersetzt würde, ist FMNL1 ein hoch attraktives Tumorantigen, da diese gesunden HLA-A2-negativen hämatopoetischen Spenderzellen auf Grund der fehlenden HLA-A2-Expression kein Ziel einer SK22-vermittelten Zelllyse wären. Genauere Untersuchungen der Reaktivität des T-Zellrezeptors von SK22 gegen gesunde Zellen, beispielsweise im HLA-A2-transgenen Mausmodell, müssen hierzu noch folgen.

6.3.5 Kreuzreaktivität alloreaktiver T-Zellen

Zur Untersuchung der Kreuzreaktivität des T-Zellklons SK22 wurden 27 HLA-A*0201-negative LCL getestet. Alle neun eingesetzten HLA-A*02-Allelvarianten wurden von SK22 erkannt. Vier von 18 HLA-A2-negativen LCL wurden ebenfalls erkannt, je zwei dieser vier LCL hatten ein gemeinsames MHC-Klasse-I-Molekül: HLA-A*6802 bzw. HLA-A*3303. Die spezifische Reaktivität gegen HLA-A*3303 konnte unter Verwendung von HLA-A*3303 transfizierten C1R-Zellen bestätigt werden. Diese standen in Bezug auf HLA-A*6802 nicht zur Verfügung. MHC-Moleküle werden aufgrund struktureller Ähnlichkeiten in Superfamilien eingeteilt. Diese Einteilungen wurden mit Hilfe von Peptidbindungsversuchen oder mittels bioinformatischer Methoden erstellt, die die dreidimensionale Struktur der Bindungstasche der MHC-Moleküle mit einbeziehen und Peptidbindungs-Supermotive erstellen (del Guercio

et al, 1995; Doytchinova et al, 2004). Demnach wird neben den HLA-A2-Allelvarianten auch HLA-A*6802 zur HLA-A2-Superfamilie gezählt.

Es ist beschrieben, dass über 70 % der Peptide, die an HLA-A*0201 binden, mindestens an zwei weitere Mitglieder der A2-Superfamilie binden (Sidney et al, 2001). Des Weiteren wurde gezeigt, dass T-Zellen, die spezifisch für das auf HLA-A*0201 präsentierte Peptid MT_{27-35} des Antigens Melan-A/MART-1 waren, dieses Peptid auch im Kontext von sechs weiteren A2-Subtypen (HLA-A*0202, 0204, 0205, 0206, 0209 und 6901) erkannten (Fleischhauer et al, 1996). In der vorliegenen Arbeit wurden vier von neun LCL mit HLA-A2-Subtypen (HLA-A*0205, 0206, 0207 und 0210) von SK22 besser erkannt, wenn sie mit FMNL1-PP2 beladen waren, als unbeladene oder Flu-beladene Zellen. Dies deutet darauf hin, dass der T-Zellklon SK22 diese HLA-A2-Subtypen FMNL1-PP2-spezifisch erkannte. Für die anderen fünf LCL-Zelllinien ist es unklar, ob SK22 diese FMNL1-PP2 unabhängig erkannte, da jeweils nur eine LCL-Zelllinie mit dem jeweiligen HLA-A2-Subtyp zur Verfügung stand. Weiterführende Untersuchungen müssten erfolgen, um die Ergebnisse zu bestätigen.

HLA-A*3303 gehört zur A3-Superfamilie (Doytchinova et al, 2004). Andere Mitglieder der A3-Superfamilie, wie z. B. A*3301 (LCL14, LCL26, LCL27), A*0301 (LCL14, LCL19) und A3/A*31 (LCL25), die auf HLA-A2-negativen LCL exprimiert waren, wurden jedoch nicht erkannt. Das Supermotiv für die Peptidbindung an A3-Subtypen ist an Position neun Lysin oder Arginin, die beide basische Aminosäuren sind (Sidney et al, 1996). FMNL1-PP2 hat an der neunten Stelle jedoch das unpolare Leucin. Es ist daher unwahrscheinlich, dass FMNL1-PP2 an HLA-A*3303 bindet, weshalb wahrscheinlich ein anderes Peptid in diesem HLA-Kontext vom T-Zellklon erkannt wird. Die C1R-A*3303-Transfektante wurde in der Tat vom T-Zellklon SK22 nicht besser erkannt, wenn sie mit FMNL1-PP2 beladen war.

In der Literatur sind viele alloreaktive T-Zellen beschrieben, die eine Kreuzreaktivität zeigen. Der menschliche T-Zellklon JL12 beispielsweise erkennt zwei Peptide, die auf nah verwandten allo-HLA-Molekülen präsentiert werden, und ein auf Selbst-MHC-Klasse-I präsentiertes EBV-Epitop (Burrows et al, 1997). Der murine alloreaktive T-Zellklon 2C erkennt das Peptid QL9 auf allo-H-$2L^d$ und das Peptid dEV8 auf allo-H-$2k^{bm3}$. Zusätzlich erkennt er beide Peptide auf selbst-H-$2K^b$ und ein synthetisches Peptid SIYRYYGL auf selbst-H-$2K^b$ (Tallquist et al, 1996; Udaka et al, 1996). Es gibt weitere Berichte über T-Zellen, die unterschiedliche Peptide auf gleichen MHC-Klasse-I-Molekülen, gleiche Peptide auf unterschiedlichen MHC-Klasse-I-Molekülen oder unterschiedliche Peptide auf unterschiedlichen MHC-Klasse-I-Molekülen erkennen (Felix et al, 2007; Mandruzzato et al, 2000; Ueno et al, 2002).

Es wird postuliert, dass T-Zellrezeptor-Kreuzreaktivität eine generelle Eigenschaft von T-Zellen ist (Wucherpfennig, 2004). Bei der Positiv- und Negativselektion von T-Zellen im Thymus wird ein T-Zellrepertoire gebildet, das die jeweilige Kombination von selbst-MHC-Molekülen eines Individuums erkennt. Das Auftreten von Kreuzreaktivität gegen fremde MHC-Moleküle (Alloreaktivität), das beispielsweise in der Transplantatabstoßung und GvHD zu beobachten ist, zeigt, dass T-Zellen die Fähigkeit haben, zumindest zwei verschiedene MHC-Moleküle erkennen zu können. Die Häufigkeit alloreaktiver Zellen ist circa 1000 mal höher als die Frequenz von T-Zellen, die spezifisch für fremde Antigene sind (Suchin et al, 2001). Es wird geschätzt, dass 1 bis 10 % der T-Zellen alloreaktiv sind (Lindahl und Wilson, 1977). Es existieren verschiedene Modelle, die versuchen, Allo- und Kreuzreaktivität von T-Zellen zu erklären (Nikolich-Zugich, 2007). (1) Häufiger Bindungspartnerwechsel (Promiskuität): Der T-Zellrezeptor erkennt im Extremfall nur polymorphe Strukturen des MHC-Moleküls und bindet unabhängig vom Peptid. Dieses Modell ist allerdings eher selten (Whitelegg und Barber, 2004). (2) Degeneration: Ein flexibler T-Zellrezeptor passt sich an die Peptid- und MHC-Molekülstruktur an und bindet mit geringer Spezifität. Dies wird mit einer Umlagerung in der CDR3-Schlaufe erklärt, die bewirkt, dass sich der T-Zellrezeptor an strukturell verschiedene Peptide anpasst (Reiser et al, 2003). (3) Polyspezifität: Der T-Zellrezeptor reagiert hoch spezifisch mit einer geringen Anzahl von Peptid-MHC-Molekülen, unabhängig struktureller Ähnlichkeiten (Colf et al, 2007; Felix et al, 2007). Neben diesen drei Möglichkeiten wird die Kreuzreaktivität von T-Zellen auch mit molekularer Mimikri erklärt. Archbold und Kollegen begründeten die Kreuzreaktivität ihres untersuchten T-Zellrezeptors mit hoch fokussierter molekularer Mimikri, da entscheidende T-Zellrezeptor-Kontaktpunkte strukturelle Ähnlichkeiten bei zwei ansonsten unterschiedlichen Peptid-MHC-Molekülen aufwiesen (Archbold et al, 2006).

Für den T-Zellklon SK22 kann bislang nur spekuliert werden, welcher Mechanismus bei der Kreuzreaktivität eine Rolle spielt. Hierzu müssten die Peptide, die von den kreuzreaktiv erkannten MHC-Molekülen präsentiert werden, identifiziert und Strukturanalysen der TZR-MHC-Peptid-Moleküle durchgeführt werden.

6.4 T-Zellrezeptor-Transfer

Der T-Zellrezeptor-Transfer in sekundäre Zellen ist aus drei Gründen von großer Bedeutung: (1) Aufgrund der meist nur kurzen Lebensdauer von primären T-Zellen kann oft nur eine unzureichende Charakterisierung des T-Zellrezeptors in den ursprünglichen T-Zellen vorgenommen werden. (2) Die Reaktivität der ursprünglichen T-Zellen kann auf sekundäre Zellen übertragen und somit einem bestimmten T-Zellrezeptor zugeordnet werden

(Heemskerk et al, 2004; Johnson et al, 2006). (3) Der T-Zellrezeptor kann in sekundäre Zellen transduziert werden und mittels adoptivem T-Zelltransfer in Patienten zur Therapie eingesetzt werden (Morgan et al, 2006).

In der vorliegenden Arbeit konnte für den T-Zellrezeptor von SK22 nachgewiesen werden, dass die identifizierten αβ-TZR-Ketten für die spezifische Reaktivität des T-Zellklons verantwortlich waren. Dies zeigte sich zum einen in der Oberflächenfärbung. Nach retroviralem Transfer des TZR-SK22 waren Jurkat76-CD8α-Zellen zu großen Anteilen Multimer-FMNL1-PP2-positiv. Zum anderen konnte die Reaktivität des ursprünglichen T-Zellklons auf sekundäre Zellen übertragen werden. PBL, die mit dem TZR-SK22 transduziert worden waren, erkannten FMNL1-PP2-beladene T2-Zellen besser als unbeladene oder mit anderen Peptiden beladene T2-Zellen.

6.4.1 Drei T-Zellrezeptor-Vektoren im Vergleich

Es wurden drei Varianten mit unterschiedlicher T-Zellrezeptor-Insertion im Vektor pMP71G$_{PRE}$ für die TZR-Transduktion getestet: (1) die TZR-α- und β-Ketten in zwei individuellen Vektoren, (2) die TZR-α- und β-Kette auf einem gemeinsamen Vektor, die bei der Translation an einem P2A-Element getrennt werden und (3) ein Hybrid-T-Zellrezeptor, bei dem die humane konstante Region des T-Zellrezeptors durch den entsprechenden konstanten Teil eines Maus-T-Zellrezeptors ersetzt wurde, und der in diesem Fall in Kombination mit dem P2A-Element eingesetzt wurde.

Der Nachteil der ersten Variante ist, dass zwei Vektorpartikel dieselbe Zelle infizieren müssen, damit beide Ketten gemeinsam exprimiert werden können (Leisegang et al, 2008; Xue et al, 2005). Durch Klonierung der beiden Ketten in einen gemeinsamen Vektor sollte eine stöchiometrische Gleichverteilung der beiden Ketten erreicht werden. Die Trennung der beiden Genprodukte wurde durch Insertion eines „selbstschneidenden“ P2A-Elementes zwischen den beiden TZR-Ketten-Gensegmente ermöglicht und erfolgte durch einen ribosomalen Sprung während der Translation (Szymczak et al, 2004). Es konnte bereits gezeigt werden, dass das 21 Aminosäure lange P2A-Element, das am 5’ gelegenen Gen (hier β-Kette) hängen bleibt, die Funktionalität des T-Zellrezeptors aber nicht beeinflusst (Leisegang et al, 2008).

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte nach Transduktion in Jurkat76 und Jurkat76-CD8α kein Unterschied in der T-Zellrezeptor-Expression im Vergleich zwischen Einzelketten-Vektoren und P2A-gekoppelten T-Zellrezeptor-Ketten-Vektoren beobachtet werden. Dies könnte möglicherweise an der fehlenden Konkurrenz durch endogene T-Zellrezeptoren liegen, da die T-Zellrezeptor-Expression nicht so leicht gestört wird wie

unter Konkurrenz mit einem endogenen T-Zellrezeptor (Leisegang et al, 2008). In PBL wurden nach Transfer der P2A-Vektorkondition weniger Vβ14-positive Zellen gemessen als mit den Einzelkettenvektoren. Dies könnte jedoch auch an einer statistisch variierenden Transduktionseffizienz liegen. Neben der stöchiometrischen Gleichverteilung der Ketten in den Zielzellen ist die Verwendung von Vektoren, die für beide T-Zellrezeptor-Ketten kodieren, jedoch auch aus einem weiteren Grund gegenüber den Einzelkettenvektoren zu favorisieren: Das Risiko einer Mutagenese durch Insertion ins Genom der Wirtszelle ist deutlich verringert, wenn nur ein Gensegment inseriert (Baum et al, 2003). Ein mögliches Problem bei der Verwendung des viralen P2A-Elementes könnte dadurch entstehen, dass Peptide des P2A-Elementes durch Präsentation auf den transduzierten T-Zellen immunogen wirken und von den T-Zellen des Wirts-Immunsystem als fremd erkannt werden.

Durch den Austausch der konstanten Ketten des menschlichen T-Zellrezeptors mit den konstanten Bereichen eines T-Zellrezeptors aus der Maus sollte eine präferentielle Paarung der transgenen T-Zellrezeptor-Ketten auf der Zelloberfläche und eine verbesserte TZR/CD3-Stabilität gefördert werden. Dadurch sollte eine verbesserte Expression des transgenen T-Zellrezeptors ermöglicht und die Wahrscheinlichkeit für möglicherweise ungünstige Fehlpaarungen mit den endogenen T-Zellrezeptor-Ketten verringert werden (Cohen et al, 2006).

Der TZR-SK22 mit den konstanten Ketten aus der Maus zeigte in der Tat verbesserte Eigenschaften im Vergleich zum rein humanen T-Zellrezeptor. Jurkat76-Zellen, die mit dem TZR-SK22 mit den konstanten Ketten aus der Maus transduziert worden waren, waren auch ohne CD8-Expression in der Lage das FMNL1-PP2-Multimer zu binden (s. u.). Auch die T-Zellrezeptor-Expression konnte in Jurkat76 gesteigert werden. Obwohl wesentlich weniger PBL nach Transfer mit dem T-Zellrezeptor mit den konstanten Ketten aus der Maus Vβ14-positiv waren als PBL, die mit dem rein menschlichen T-Zellrezeptor transduziert worden waren, reagierten PBL, die mit dem T-Zellrezeptor mit den konstanten Ketten aus der Maus transduziert waren, stärker und spezifischer auf verschiedene Zielzellen, z. B. FMNL1-PP2-beladene T2-Zellen. Auch im T-Zellrezeptor-Kompetitionsversuch konnte sich der T-Zellrezeptor mit den konstanten Ketten aus der Maus gegen den TZR-D1 etwas besser durchsetzen als die rein humanen TZR-Konditionen. Es ist mehrfach beschrieben, dass T-Zellrezeptoren mit konstanten Ketten aus der Maus in menschlichen Zellen besser gegen endogene T-Zellrezeptoren konkurrieren können (Cohen et al, 2006; Hart et al, 2008; Sommermeyer et al, 2006). Vermutlich gab es mehr korrekt gepaarte transduzierte T-Zellrezeptor-Ketten in Zellen, die mit dem SK22-Rezeptor mit den konstanten Ketten aus der Maus transduziert worden waren, im Vergleich zu Zellen, die mit den rein humanen T-Zellrezeptor-Ketten transduziert worden waren. Auch unter Verwendung von

Maussequenzen könnte wie bei der Verwendung von P2A-Elementen das Risiko einer Immunogenität bestehen. Dieses Risiko könnte jedoch minimiert werden, indem die essentiellen Bausteine für die erfolgreichere Paarung der murinen Ketten in menschlichen Zellen identifiziert werden und nur diese Stellen im menschlichen T-Zellrezeptor ausgetauscht würden.

6.4.2 CD8-Abhängigkeit

CD8-Abhängigkeit in der T-Zellrezeptor-Expression wurde sowohl bei dem TZR-SK22 als auch bei dem Kontroll-TZR-D1 beobachtet. In Jurkat76-CD8α wurde eine wesentlich größere TZR-Expression gemessen als in Jurkat76. Im Unterschied zu D1 wurde bei TZR-SK22 auch eine CD8-Abhängigkeit in der Multimerbindung beobachtet. Bei dem T-Zellrezeptor-Transfer von SK22 konnten mit Ausnahme des TZR-SK22 mit den konstanten Ketten aus der Maus nur dann Multimer-positive Zellen detektiert werden, wenn CD8 exprimiert wurde.

Johnson und Kollegen zeigten, dass die Multimerbindung stark von der Affinität des T-Zellrezeptors abhängt. T-Zellrezeptoren mit unterschiedlicher Affinität wurden in Hinblick auf die CD8-Abhängigkeit miteinander verglichen. Hierbei wurden Multimere mit Mutationen verwendet, die zur Inhibition der Bindung an CD8 führten. T-Zellrezeptoren mit niedriger Affinität banden das Multimer nur, wenn CD8 ebenso an das Multimer binden konnte. Die Multimerbindung hoch affiner T-Zellrezeptoren waren hingegen CD8-unabhängig (Johnson et al, 2006). Die geringere Avidität des ursprünglichen T-Zellklons SK22 wurde somit möglicherweise auf die Zielzellen übertragen.

6.4.3 Durchsetzungsfähigkeit des TZR-SK22

Neben der Affinität des T-Zellrezeptors ist die relative Expressionsdichte auf der Zelloberfläche für die Funktionalität der T-Zellrezeptor-transduzierten T-Zellen ein entscheidender Faktor. Die Durchsetzungsfähigkeit des transduzierten TZR gegenüber dem endogenen TZR ist somit von großer Bedeutung für die erfolgreiche Expression des neu eingebrachten TZR (Heemskerk et al, 2007).

In einem Kompetitionsversuch in Jurkat76-CD8α-Zellen konnte gezeigt werden, dass der TZR-SK22 gegen den TZR-D1 nur schlecht konkurrieren konnte, wobei es hierbei keine Rolle spielte, ob der T-Zellrezeptor von D1 oder von SK22 ursprünglich in der Zelle war. Der TZR-SK22 mit den konstanten Ketten aus der Maus zeigte eine geringfügig bessere Durchsetzungsfähigkeit als die rein menschlichen TZR-SK22-Konditionen. Auch in Zellen mit natürlichem endogenen T-Zellrezeptor konnte der TZR-SK22 schlecht konkurrieren. Nach Transduktion in den T-Zellklon IVSB konnten erst nach Sortierung Multimer-FMNL1-PP2-positiver Zellen in größerer Menge detektiert werden. Bei einem Spender konnten in PBL

lediglich 9 % Multimer-FMNL1-PP2-spezifische Zellen detektiert werden. Bei einem anderen Spender waren keine FMNL1-PP2-Multimer-positiven Zellen detektierbar, obwohl eine erhöhte Vβ14-Expression und eine präferentielle Erkennung von FMNL1-PP2-beladenen T2-Zellen im Chrom-Freisetzungsversuch zu beobachten war. Auf Grund der gesteigerten Reaktivität gegen FMNL1-PP2-beladene T2-Zellen nach Transduktion des TZR-SK22 in PBL ist es jedoch sehr wahrscheinlich, dass die α- und β-Ketten des transduzierten TZR-SK22 in den PBL zusammengebaut worden waren. Für eine zytotoxische T-Zellantwort können bereits geringe Rezeptormengen auf der Zelloberfläche ausreichen (Sykulev et al, 1996). Ein Grund für die mangelnde Multimerfärbung könnte darin liegen, dass der Rezeptor in Konkurrenzsituation zu instabil war und in zu geringer Dichte auf der Zelle exprimiert wurde, was eine Mehrfachbindung des Multimers nicht erlaubte (Knabel et al, 2002; Matsui et al, 1994).

Bislang ist nicht klar, welche Eigenschaften eines T-Zellrezeptors dazu führen, dass er sich besser durchsetzen kann als andere. Unsere Ergebnisse und die von anderen Arbeitsgruppen (Sommermeyer et al, 2006) deuten darauf hin, dass die Regulation nicht auf Transkriptionsebene erfolgt, da die Rezeptoren in dem Kompetitionsversuch in Jurkat76-CD8α unter demselben retroviralen Promotor abgelesen wurden. Eine posttranskiptionelle Regulation ist daher wahrscheinlicher. Es wird postuliert, dass die Expressionsunterschiede durch die Affinität der α- und β-Ketten zueinander eine Rolle spielen und hierbei besonders die variablen Regionen für die Expressionsunterschiede verantwortlich sind, da es nur eine konstante α-Region und zwei verschiedene konstante β-Regionen für T-Zellrezeptoren gibt (Heemskerk et al, 2007). Auch in unseren Versuchen unterschieden sich die konstanten Regionen von TZR-D1 und SK22 nicht und konnten folglich nicht für die Expressionsunterschiede verantwortlich sein. Weiterhin werden auch die Faltungseffizienz und die Fähigkeit an den CD3-Komplex zu binden als mögliche Ursachen genannt (Heemskerk et al, 2007).

Der Einsatz von „starken“ (bzgl. Durchsetzungsfähigkeit) T-Zellrezeptoren ist aus mehreren Gründen wichtig: (1) Starke Rezeptoren können sich gegen endogene T-Zellrezeptoren durchsetzen und werden besser an der Zelloberfläche exprimiert. (2) Der endogene TZR könnte sogar weitestgehend verdrängt werden. (3) Gemischte T-Zellrezeptoren, die aus Ketten des endogenen und transduzierten T-Zellrezeptors bestehen, treten weniger häufig auf, was die Gefahr unkontrollierter Autoimmunität verhindert (Hart et al, 2008; Heemskerk et al, 2007; Sommermeyer et al, 2006).

Die Kompetitionsversuche in Jurkat76-CD8α und die mangelnde FMNL1-PP2-Multimerfärbung nach Transduktion des TZR-SK22 in PBL zeigen, dass der TZR-SK22 ein

„schwacher“ T-Zellrezeptor ist. Erst kürzlich konnten Hart und Kollegen nach einer Kombination von TZR-Modifikationen (P2A-Einbau, konstante Ketten aus der Maus und Codonoptimierung der Gensequenzen zur verbesserten Translation) einen LMP2-spezifischen TZR in PBL besser exprimieren (Hart et al, 2008). Um die Stärke des TZR-SK22 zu erhöhen, ist zusätzlich zum Einbau des P2A-Elementes und zum Austausch der konstanten Regionen mit Sequenzen aus der Maus eine Codonoptimierung zur verbesserten Translation vielversprechend. Des Weiteren könnten durch Punktmutationen Cysteine in die extrazellulären konstanten Regionen der T-Zellrezeptor-Ketten eingebaut werden, die durch zusätzliche Disulfidbrücken zwischen den T-Zellrezeptor-Ketten eine Erhöhung der Expression sowie eine korrekte Paarung bewirken können (Kuball et al, 2007). Zusätzlich wäre es von Vorteil, den TZR-SK22 in T-Zellen einzubringen, die einen schwächeren T-Zell-rezeptor haben als der TZR-SK22.

6.5 TZR-SK22 in der Therapie und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen tumorspezifischen T-Zellrezeptor zu finden, der als molekulares Werkzeug in Spenderzellen, die dem Patienten adoptiv transferiert werden, eingebracht werden kann. Diese genetisch veränderten T-Zellen sollten somit die Fähigkeit erhalten, Tumorzellen spezifisch zu erkennen und zu lysieren. In der vorliegenden Arbeit wurden allorestringierte, peptidspezifische, zytotoxische T-Zellen, darunter der T-Zellklon SK22, selektiert. Im Folgenden soll diskutiert werden, ob der T-Zellrezeptor des T-Zellklons SK22 in der Klinik eingesetzt werden kann und welche Schritte hierzu noch nötig wären.

Der allorestringierte T-Zellklon SK22 zeigte eine hohe Peptidspezifität gegen FMNL1-PP2 im Kontext von HLA-A2 und erkannte selektiv FMNL1-exprimierende HLA-A2-positive Zellen, darunter EBV-positive und negative Lymphomzelllinien, Nierenzellkarniomzellen und weniger stark auch CLL-Zellen. Erwartungsgemäß wurden auch gesunde FMNL1-exprimierende Zellen, PBL und insbesondere B-Zellen, erkannt. Da aber Zellen, die kein FMNL1 exprimierten, nicht erkannt wurden und die FMNL1-Expression vorwiegend auf Leukozyten bzw. Gewebe, in denen sich hämatopoetische Zellen befinden, beschränkt ist, ist bei einer klinischen Anwendung im Rahmen mit einer beispielsweise haploidentischen Stammzell-transplantation nur mit begrenzten Nebenwirkungen zu rechnen.

Zur weiteren Reduktion von potentiellen Nebenwirkungen ist eine genaue Charakterisierung der Reaktivität des TZR-SK22 vor dem Einsatz im Patienten allerdings von fundamentaler Bedeutung. (1) Eine natürliche Präsentation des vorhergesagten Peptides FMNL1-PP2 auf Zielzellen ist zwar sehr wahrscheinlich, der definitive Nachweis mittels Herauf- oder Herunterregulation der FMNL1-Expression in einer Zellart und der damit verbundenen

differentiellen Erkennung durch den TZR-SK22 ist noch zu erbringen. (2) Eine genaue Charakterisierung der Kreuzreaktivität von SK22, die gegen HLA-A2-Superfamilien-Mitglieder und HLA-A*3303 beobachtet wurde, ist zur Einschätzung des Reaktionspotentials des TZR-SK22 unerlässlich. Hierzu könnten Peptidbibliotheken zur Identifizierung der Peptide auf den kreuzreaktiv erkannten MHC-Molekülen im Zusammenhang mit einer breiten, systematischen Austestung der Erkennung verschiedener MHC-Moleküle eingesetzt werden. (3) Auf Grund der mangelnden Verfügbarkeit von gesunden Geweben ist die in vitro-Austestung der Reaktivität des TZR-SK22 gegen gesundes Gewebe sehr schwierig. Da das zum menschlichen FMNL1-PP2 homologe murine Peptid FRL-PP1 in Peptidbeladungsversuchen von SK22 erkannt wurde, könnte die Reaktivität gegen gesundes Gewebe in der Maus untersucht werden. Hierzu könnten murine T-Zellen mit dem TZR-SK22 transduziert und in HLA-A2-transgenen Mäusen in Hinblick auf die Reaktivität gegen gesundes Gewebe in vivo untersucht werden. Die natürliche Präsentation des Peptides FRL-PP1 auf Mauszellen könnte massenspektrometrisch oder indirekt über die differentielle Reaktivität des TZR-SK22 gegen FRL-exprimierende und nicht exprimierende HLA-A2-transgene Mauszellen überprüft werden.

Ein weiterer wichtiger Schritt in Richtung T-Zelltherapie ist der erfolgreiche Transfer des T-Zellrezeptors in Zielzellen. Erste Versuche zeigten, dass die Reaktivität des TZR aus dem ursprünglichen T-Zellklon auf Zielzellen übertragen werden konnte. Der TZR-Transfer muss jedoch noch erheblich verbessert werden, da der TZR-SK22 nur schwach durchsetzungsfähig gegenüber anderen T-Zellrezeptoren war und die Transduktionseffizienzen niedrig waren. Zusätzlich zum Austausch der konstanten Regionen mit Sequenzen aus der Maus könnte hier eine Codonoptimierung eine verbesserte Expression bewirken (Hart et al, 2008). Zusätzliche Disulfidbrücken könnten die TZR-Stabilität und eine korrekte Paarung der TZR-Ketten verbessern (Kuball et al, 2007). Auch die Wahl der Zielzelle ist von Bedeutung und müsste weiter untersucht werden. Prinzipielle Gefahren, die mit dem retroviralen TZR-Transfer zusammenhängen, müssen minimiert werden. Hierzu gehört das Risiko unkontrollierter Autoimmunität, die durch Fehlpaarungen des transgenen T-Zellrezeptoren mit dem endogenen T-Zellrezeptor auftreten können, das Risiko der Aktivierung von Onkogenen durch die TZR-Insertion in das Wirtsgenom sowie das Risiko der Immunogenität von P2A-Elementen und murinen Sequenzen. Daher ist es zur Begrenzung von potentiellen Schäden von großer Bedeutung, Wege zu finden, die adoptiv transferierten T-Zellen abschalten zu können (Weber und Fussenegger, 2006).

Durch Versuche in immundefizienten oder HLA-A2-transgenen Mäusen könnte eine anti-Tumorwirkung und die Autoimmunität von adoptiv transferierten T-Zellen untersucht werden.

Die Tumorreaktivität könnte durch Modifikationen im Bereich der CDR3-Regionen des T-Zellrezeptors verbessert werden (Chlewicki et al, 2005; Miller et al, 2007).

Beim Einsatz des TZR-SK22 im Patienten ist eine weitere Voraussetzungen zu erfüllen. Der T-Zellrezeptor kann auf Grund der Kreuzreaktivität gegen andere MHC-Moleküle nur nach sorgfältiger Auswahl in solchen Patienten zum Einsatz kommen, die HLA-A2-positiv sind und zusätzlich keine weiteren MHC-Moleküle exprimieren, die vom TZR-SK22 kreuzreaktiv erkannt werden. Da der TZR-SK22 auch HLA-A2-positive T-Zellen erkennt, kann der TZR nicht direkt in die Patienten-T-Zellen transduziert werden, da diese T-Zellen sich gegenseitig lysieren würden. Der TZR-SK22 sollte also in T-Zellen eines HLA-A2-negativen Spenders, der bzgl. des HLA-Genotyps ebenso sorgfältig ausgewählt werden muss, transduziert werden. Unter diesen Voraussetzungen ist es vorstellbar, die T-Zellen dem Patienten im Rahmen einer haploidentischen Stammzelltransplantation adoptiv zu transferieren.

7 Literaturverzeichnis

Alexander-Miller MA, Leggatt GR, and Berzofsky JA
Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic T lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy.
Proc Natl Acad Sci U S A 1996,93:4102-7.

Alexander RB, and Rosenberg SA
Long-term survival of adoptively transferred tumor-infiltrating lymphocytes in mice.
J Immunol 1990,145:1615-20.

Appleman LJ, and Boussiotis VA
T cell anergy and costimulation.
Immunol Rev 2003,192:161-80.

Archbold JK, Macdonald WA, Miles JJ, Brennan RM, Kjer-Nielsen L, McCluskey J, Burrows SR, and Rossjohn J
Alloreactivity between disparate cognate and allogeneic pMHC-I complexes is the result of highly focused, peptide-dependent structural mimicry.
J Biol Chem 2006,281:34324-32.

Arden B, Clark SP, Kabelitz D, and Mak TW
Human T-cell receptor variable gene segment families.
Immunogenetics 1995,42:455-500.

Barron L, Knoechel B, Lohr J, and Abbas AK
Cutting edge: contributions of apoptosis and anergy to systemic T cell tolerance.
J Immunol 2008,180:2762-6.

Barry M, and Bleackley RC
Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death.
Nat Rev Immunol 2002,2:401-9.

Baum C, Dullmann J, Li Z, Fehse B, Meyer J, Williams DA, and von Kalle C
Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells.
Blood 2003,101:2099-114.

Bendle GM, Holler A, Pang LK, Hsu S, Krampera M, Simpson E, and Stauss HJ
Induction of unresponsiveness limits tumor protection by adoptively transferred MDM2-specific cytotoxic T lymphocytes.
Cancer Res 2004,64:8052-6.

Billingham RE, Brent L, and Medawar PB
Actively acquired tolerance of foreign cells.
Nature 1953,172:603-6.

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

Brossart P, Wirths S, Brugger W, and Kanz L
Dendritic cells in cancer vaccines.
Exp Hematol 2001,29:1247-55.

Brusic V, van Endert P, Zeleznikow J, Daniel S, Hammer J, and Petrovsky N
A neural network model approach to the study of human TAP transporter.
In Silico Biol 1999,1:109-21.

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

Burnet FM, Fenner F, eds.
The Production of Antibodies
London Macmillan, 1949

Burrows SR, Silins SL, Khanna R, Burrows JM, Rischmueller M, McCluskey J, and Moss DJ
Cross-reactive memory T cells for Epstein-Barr virus augment the alloresponse to common human leukocyte antigens: degenerate recognition of major histocompatibility complex-bound peptide by T cells and its role in alloreactivity.
Eur J Immunol 1997,27:1726-36.

Caballero D, Garcia-Marco JA, Martino R, Mateos V, Ribera JM, Sarra J, Leon A, Sanz G, de la Serna J, Cabrera R, Gonzalez M, Sierra J, and San Miguel J
Allogeneic transplant with reduced intensity conditioning regimens may overcome the poor prognosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia with unmutated immunoglobulin variable heavy-chain gene and chromosomal abnormalities (11q- and 17p-).
Clin Cancer Res 2005,11:7757-63.

Celluzzi CM, Mayordomo JI, Storkus WJ, Lotze MT, and Falo LD, Jr.
Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity.
J Exp Med 1996,183:283-7.

Chapiro J, Claverol S, Piette F, Ma W, Stroobant V, Guillaume B, Gairin JE, Morel S, Burlet-Schiltz O, Monsarrat B, Boon T, and Van den Eynde BJ
Destructive cleavage of antigenic peptides either by the immunoproteasome or by the standard proteasome results in differential antigen presentation.
J Immunol 2006,176:1053-61.

Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Tureci O, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, and Old LJ
A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening.
Proc Natl Acad Sci U S A 1997,94:1914-8.

Chlewicki LK, Holler PD, Monti BC, Clutter MR, and Kranz DM
High-affinity, peptide-specific T cell receptors can be generated by mutations in CDR1, CDR2 or CDR3.
J Mol Biol 2005,346:223-39.

Clay TM, Custer MC, Sachs J, Hwu P, Rosenberg SA, and Nishimura MI
Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity.
J Immunol 1999,163:507-13.

Cohen CJ, Zhao Y, Zheng Z, Rosenberg SA, and Morgan RA
Enhanced antitumor activity of murine-human hybrid T-cell receptor (TCR) in human lymphocytes is associated with improved pairing and TCR/CD3 stability.
Cancer Res 2006,66:8878-86.

Colf LA, Bankovich AJ, Hanick NA, Bowerman NA, Jones LL, Kranz DM, and Garcia KC
How a single T cell receptor recognizes both self and foreign MHC.
Cell 2007,129:135-46.

Cullen SP, and Martin SJ
Mechanisms of granule-dependent killing.
Cell Death Differ 2008,15:251-62.

Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, and Zou W
Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival.
Nat Med 2004,10:942-9.

Davis MM, and Bjorkman PJ
T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition.
Nature 1988,334:395-402.

de Witte MA, Coccoris M, Wolkers MC, van den Boom MD, Mesman EM, Song JY, van der Valk M, Haanen JB, and Schumacher TN
Targeting self-antigens through allogeneic TCR gene transfer.
Blood 2006,108:870-7.

del Guercio MF, Sidney J, Hermanson G, Perez C, Grey HM, Kubo RT, and Sette A
Binding of a peptide antigen to multiple HLA alleles allows definition of an A2-like supertype.
J Immunol 1995,154:685-93.

Dembic Z, Haas W, Weiss S, McCubrey J, Kiefer H, von Boehmer H, and Steinmetz M
Transfer of specificity by murine alpha and beta T-cell receptor genes.
Nature 1986,320:232-8.

Doytchinova IA, Guan P, and Flower DR
Identifiying human MHC supertypes using bioinformatic methods.
J Immunol 2004,172:4314-23.

Dreger P, Brand R, Milligan D, Corradini P, Finke J, Lambertenghi Deliliers G, Martino R, Russell N, van Biezen A, Michallet M, and Niederwieser D
Reduced-intensity conditioning lowers treatment-related mortality of allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: a population-matched analysis.
Leukemia 2005,19:1029-33.

Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, Even J, and Rosenberg SA
Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients.
J Immunother 2003,26:332-42.

Dudley ME, Wunderlich J, Nishimura MI, Yu D, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Sherry R, Leitman SF, and Rosenberg SA
Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma.
J Immunother 2001,24:363-73.

Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry RM, Marincola FM, Leitman SF, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Nahvi A, Mavroukakis SA, White DE, and Rosenberg SA
A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma.
J Immunother 2002a,25:243-51.

Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, and Rosenberg SA
Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes.
Science 2002b,298:850-4.

Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Restifo NP, Royal RE, Kammula U, White DE, Mavroukakis SA, Rogers LJ, Gracia GJ, Jones SA, Mangiameli DP, Pelletier MM, Gea-Banacloche J, Robinson MR, Berman DM, Filie AC, Abati A, and Rosenberg SA
Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma.
J Clin Oncol 2005,23:2346-57.

Dunn GP, Old LJ, and Schreiber RD
The three Es of cancer immunoediting.
Annu Rev Immunol 2004,22:329-60.

Ehrlich P
Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung.
Ned. Tijdschr. Geneeskd. 1909, 5:273-290

Engels B, Cam H, Schuler T, Indraccolo S, Gladow M, Baum C, Blankenstein T, and Uckert W
Retroviral vectors for high-level transgene expression in T lymphocytes.
Hum Gene Ther 2003,14:1155-68.

Faix J, and Grosse R
Staying in shape with formins.
Dev Cell 2006,10:693-706.

Felix NJ, Donermeyer DL, Horvath S, Walters JJ, Gross ML, Suri A, and Allen PM
Alloreactive T cells respond specifically to multiple distinct peptide-MHC complexes.
Nat Immunol 2007,8:388-97.

Fisk B, Blevins TL, Wharton JT, and Ioannides CG
Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines.
J Exp Med 1995,181:2109-17.

Flamand V, Sornasse T, Thielemans K, Demanet C, Bakkus M, Bazin H, Tielemans F, Leo O, Urbain J, and Moser M
Murine dendritic cells pulsed in vitro with tumor antigen induce tumor resistance in vivo.
Eur J Immunol 1994,24:605-10.

Fleischhauer K, Tanzarella S, Wallny HJ, Bordignon C, and Traversari C
Multiple HLA-A alleles can present an immunodominant peptide of the human melanoma antigen Melan-A/MART-1 to a peptide-specific HLA-A*0201+ cytotoxic T cell line.
J Immunol 1996,157:787-97.

Folch G, and Lefranc MP
The human T cell receptor beta variable (TRBV) genes.
Exp Clin Immunogenet 2000,17:42-54.

Freund M
Thiemes Innere Medizin: TIM, Hämatologie/internistische Onkologie
Stuttgart, New York; *Thieme*, 1999

Friedlein G, El Hage F, Vergnon I, Richon C, Saulnier P, Lecluse Y, Caignard A, Boumsell L, Bismuth G, Chouaib S, and Mami-Chouaib F
Human CD5 protects circulating tumor antigen-specific CTL from tumor-mediated activation-induced cell death.
J Immunol 2007,178:6821-7.

Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoue F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, and Pages F
Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome.
Science 2006,313:1960-4.

Gao L, Bellantuono I, Elsasser A, Marley SB, Gordon MY, Goldman JM, and Stauss HJ
Selective elimination of leukemic CD34(+) progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT1.
Blood 2000,95:2198-203.

Gary-Gouy H, Bruhns P, Schmitt C, Dalloul A, Daeron M, and Bismuth G
The pseudo-immunoreceptor tyrosine-based activation motif of CD5 mediates its inhibitory action on B-cell receptor signaling.
J Biol Chem 2000,275:548-56.

Gary-Gouy H, Sainz-Perez A, Marteau JB, Marfaing-Koka A, Delic J, Merle-Beral H, Galanaud P, and Dalloul A
Natural phosphorylation of CD5 in chronic lymphocytic leukemia B cells and analysis of CD5-regulated genes in a B cell line suggest a role for CD5 in malignant phenotype.
J Immunol 2007,179:4335-44.

Gattinoni L, Klebanoff CA, Palmer DC, Wrzesinski C, Kerstann K, Yu Z, Finkelstein SE, Theoret MR, Rosenberg SA, and Restifo NP
Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells.
J Clin Invest 2005,115:1616-26.

Gavin MA, Gilbert MJ, Riddell SR, Greenberg PD, and Bevan MJ
Alkali hydrolysis of recombinant proteins allows for the rapid identification of class I MHC-restricted CTL epitopes.
J Immunol 1993,151:3971-80.

Gomez TS, Kumar K, Medeiros RB, Shimizu Y, Leibson PJ, and Billadeau DD
Formins regulate the actin-related protein 2/3 complex-independent polarization of the centrosome to the immunological synapse.
Immunity 2007,26:177-90.

Gorgun G, Holderried TA, Zahrieh D, Neuberg D, and Gribben JG
Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells.
J Clin Invest 2005,115:1797-805.

Gribben JG, Zahrieh D, Stephans K, Bartlett-Pandite L, Alyea EP, Fisher DC, Freedman AS, Mauch P, Schlossman R, Sequist LV, Soiffer RJ, Marshall B, Neuberg D, Ritz J, and Nadler LM
Autologous and allogeneic stem cell transplantations for poor-risk chronic lymphocytic leukemia.
Blood 2005,106:4389-96.

Hart DP, Xue SA, Thomas S, Cesco-Gaspere M, Tranter A, Willcox B, Lee SP, Steven N, Morris EC, and Stauss HJ
Retroviral transfer of a dominant TCR prevents surface expression of a large proportion of the endogenous TCR repertoire in human T cells.
Gene Ther 2008.

Heath WR, Hurd ME, Carbone FR, and Sherman LA
Peptide-dependent recognition of H-2Kb by alloreactive cytotoxic T lymphocytes.
Nature 1989,341:749-52.

Heemskerk MH, Hoogeboom M, Hagedoorn R, Kester MG, Willemze R, and Falkenburg JH
Reprogramming of virus-specific T cells into leukemia-reactive T cells using T cell receptor gene transfer.
J Exp Med 2004,199:885-94.

Heemskerk MH, Hagedoorn RS, van der Hoorn MA, van der Veken LT, Hoogeboom M, Kester MG, Willemze R, and Falkenburg JH
Efficiency of T-cell receptor expression in dual-specific T cells is controlled by the intrinsic qualities of the TCR chains within the TCR-CD3 complex.
Blood 2007,109:235-43.

Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B, and et al.
Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation.
Blood 1990,75:555-62.

Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D, and Levitsky H
Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens.
Science 1994,264:961-5.

Ibe S, Qin Z, Schuler T, Preiss S, and Blankenstein T
Tumor rejection by disturbing tumor stroma cell interactions.
J Exp Med 2001,194:1549-59.

Ishizuka J, Stewart-Jones GB, van der Merwe A, Bell JI, McMichael AJ, and Jones EY
The structural dynamics and energetics of an immunodominant T cell receptor are programmed by its Vbeta domain.
Immunity 2008,28:171-82.

Johnson LA, Heemskerk B, Powell DJ, Jr., Cohen CJ, Morgan RA, Dudley ME, Robbins PF, and Rosenberg SA
Gene transfer of tumor-reactive TCR confers both high avidity and tumor reactivity to nonreactive peripheral blood mononuclear cells and tumor-infiltrating lymphocytes.
J Immunol 2006,177:6548-59.

Kalil N, and Cheson BD
Chronic lymphocytic leukemia.
Oncologist 1999,4:352-69.

Keating MJ, O'Brien S, Lerner S, Koller C, Beran M, Robertson LE, Freireich EJ, Estey E, and Kantarjian H
Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy.
Blood 1998,92:1165-71.

Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, Lerner S, Plunkett W, Giles F, Andreeff M, Cortes J, Faderl S, Thomas D, Koller C, Wierda W, Detry MA, Lynn A, and Kantarjian H
Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia.
J Clin Oncol 2005,23:4079-88.

Kessels HW, Wolkers MC, van den Boom MD, van der Valk MA, and Schumacher TN
Immunotherapy through TCR gene transfer.
Nat Immunol 2001,2:957-61.

Kessler JH, and Melief CJ
Identification of T-cell epitopes for cancer immunotherapy.
Leukemia 2007,21:1859-74.

Kloetzel PM
The proteasome and MHC class I antigen processing.
Biochim Biophys Acta 2004,1695:225-33.

Knabel M, Franz TJ, Schiemann M, Wulf A, Villmow B, Schmidt B, Bernhard H, Wagner H, and Busch DH
Reversible MHC multimer staining for functional isolation of T-cell populations and effective adoptive transfer.
Nat Med 2002,8:631-7.

Kolb HJ, Schmid C, Barrett AJ, and Schendel DJ
Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras.
Blood 2004,103:767-76.

Krackhardt AM, Harig S, Witzens M, Broderick R, Barrett P, and Gribben JG
T-cell responses against chronic lymphocytic leukemia cells: implications for immunotherapy.
Blood 2002a,100:167-73.

Krackhardt AM, Witzens M, Harig S, Hodi FS, Zauls AJ, Chessia M, Barrett P, and Gribben JG
Identification of tumor-associated antigens in chronic lymphocytic leukemia by SEREX.
Blood 2002b,100:2123-31.

Krammer PH, Arnold R, and Lavrik IN
Life and death in peripheral T cells.
Nat Rev Immunol 2007,7:532-42.

Kuball J, Dossett ML, Wolfl M, Ho WY, Voss RH, Fowler C, and Greenberg PD
Facilitating matched pairing and expression of TCR chains introduced into human T cells.
Blood 2007,109:2331-8.

Kuttler C, Nussbaum AK, Dick TP, Rammensee HG, Schild H, and Hadeler KP
An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages.
J Mol Biol 2000,298:417-29.

Leisegang M, Engels B, Meyerhuber P, Kieback E, Sommermeyer D, Xue SA, Reuss S, Stauss H, and Uckert W
Enhanced functionality of T cell receptor-redirected T cells is defined by the transgene cassette.
J Mol Med 2008.

Lenardo M, Chan KM, Hornung F, McFarland H, Siegel R, Wang J, and Zheng L
Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment.
Annu Rev Immunol 1999,17:221-53.

Lenschow DJ, Walunas TL, and Bluestone JA
CD28/B7 system of T cell costimulation.
Annu Rev Immunol 1996,14:233-58.

Liao X, Li Y, Bonini C, Nair S, Gilboa E, Greenberg PD, and Yee C
Transfection of RNA encoding tumor antigens following maturation of dendritic cells leads to prolonged presentation of antigen and the generation of high-affinity tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes.
Mol Ther 2004,9:757-64.

Lieberman J
The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal.
Nat Rev Immunol 2003,3:361-70.

Lindahl KF, and Wilson DB
Histocompatibility antigen-activated cytotoxic T lymphocytes. II. Estimates of the frequency and specificity of precursors.
J Exp Med 1977,145:508-22.

Liu Y, and Janeway CA, Jr.
Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells.
Proc Natl Acad Sci U S A 1992,89:3845-9.

Lyman MA, Nugent CT, Marquardt KL, Biggs JA, Pamer EG, and Sherman LA
The fate of low affinity tumor-specific CD8+ T cells in tumor-bearing mice.
J Immunol 2005,174:2563-72.

Malissen B, and Schmitt-Verhulst AM
Transmembrane signalling through the T-cell-receptor-CD3 complex.
Curr Opin Immunol 1993,5:324-33.

Mandruzzato S, Stroobant V, Demotte N, and van der Bruggen P
A human CTL recognizes a caspase-8-derived peptide on autologous HLA-B*3503 molecules and two unrelated peptides on allogeneic HLA-B*3501 molecules.
J Immunol 2000,164:4130-4.

Matsui K, Boniface JJ, Steffner P, Reay PA, and Davis MM
Kinetics of T-cell receptor binding to peptide/I-Ek complexes: correlation of the dissociation rate with T-cell responsiveness.
Proc Natl Acad Sci U S A 1994,91:12862-6.

Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ, Zitvogel L, Celluzzi C, Falo LD, Melief CJ, Ildstad ST, Kast WM, Deleo AB, and et al.
Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity.
Nat Med 1995,1:1297-302.

McKee MD, Roszkowski JJ, and Nishimura MI
T cell avidity and tumor recognition: implications and therapeutic strategies.
J Transl Med 2005,3:35.

Miller PJ, Pazy Y, Conti B, Riddle D, Appella E, and Collins EJ
Single MHC mutation eliminates enthalpy associated with T cell receptor binding.
J Mol Biol 2007,373:315-27.

Morel S, Levy F, Burlet-Schiltz O, Brasseur F, Probst-Kepper M, Peitrequin AL, Monsarrat B, Van Velthoven R, Cerottini JC, Boon T, Gairin JE, and Van den Eynde BJ
Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells.
Immunity 2000,12:107-17.

Morgan DJ, Kreuwel HT, Fleck S, Levitsky HI, Pardoll DM, and Sherman LA
Activation of low avidity CTL specific for a self epitope results in tumor rejection but not autoimmunity.
J Immunol 1998,160:643-51.

Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, and Rosenberg SA
Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes.
Science 2006,314:126-9.

Morris EC, Bendle GM, and Stauss HJ
Prospects for immunotherapy of malignant disease.
Clin Exp Immunol 2003,131:1-7.

Mosse CA, Meadows L, Luckey CJ, Kittlesen DJ, Huczko EL, Slingluff CL, Shabanowitz J, Hunt DF, and Engelhard VH
The class I antigen-processing pathway for the membrane protein tyrosinase involves translation in the endoplasmic reticulum and processing in the cytosol.
J Exp Med 1998,187:37-48.

Murphey K, Travers P, Walport M
Janeway`s immunobiology
Garland Science, New York and London, 7th edition, 2008

Nikolich-Zugich J
High specificity, not degeneracy, allows T cell alloresponses.
Nat Immunol 2007,8:335-7.

Nussbaum AK, Kuttler C, Hadeler KP, Rammensee HG, and Schild H
PAProC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW.
Immunogenetics 2001,53:87-94.

Ochsenbein AF, Klenerman P, Karrer U, Ludewig B, Pericin M, Hengartner H, and Zinkernagel RM
Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance.
Proc Natl Acad Sci U S A 1999,96:2233-8.

Pamer E, and Cresswell P
Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing.
Annu Rev Immunol 1998,16:323-58.

Paneesha S, and Milligan DW
Stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukaemia.
Br J Haematol 2005,128:145-52.

Papadopoulos EB, Ladanyi M, Emanuel D, Mackinnon S, Boulad F, Carabasi MH, Castro-Malaspina H, Childs BH, Gillio AP, Small TN, and et al.
Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation.
N Engl J Med 1994,330:1185-91.

Parker KC, Bednarek MA, and Coligan JE
Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains.
J Immunol 1994,152:163-75.

Pavletic ZS, Arrowsmith ER, Bierman PJ, Goodman SA, Vose JM, Tarantolo SR, Stein RS, Bociek G, Greer JP, Wu CD, Kollath JP, Weisenburger DD, Kessinger A, Wolff SN, Armitage JO, and Bishop MR
Outcome of allogeneic stem cell transplantation for B cell chronic lymphocytic leukemia.
Bone Marrow Transplant 2000,25:717-22.

Perkins JG, Flynn JM, Howard RS, and Byrd JC
Frequency and type of serious infections in fludarabine-refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma: implications for clinical trials in this patient population.
Cancer 2002,94:2033-9.

Prasad VK, and Yang SY
Allele assignment for HLA-A, -B, and -C genes to the Tenth International Histocompatibility Workshop cell lines.
Tissue Antigens 1996,47:538-46.

Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, and Stevanovic S
SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs.
Immunogenetics 1999,50:213-9.

Ranheim EA, and Kipps TJ
Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal.
J Exp Med 1993,177:925-35.

Reiser JB, Darnault C, Gregoire C, Mosser T, Mazza G, Kearney A, van der Merwe PA, Fontecilla-Camps JC, Housset D, and Malissen B
CDR3 loop flexibility contributes to the degeneracy of TCR recognition.
Nat Immunol 2003,4:241-7.

Restifo NP, Marincola FM, Kawakami Y, Taubenberger J, Yannelli JR, and Rosenberg SA
Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy.
J Natl Cancer Inst 1996,88:100-8.

Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, and Greenberg PD
Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones.
Science 1992,257:238-41.

Rosenberg SA
A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens.
Immunity 1999,10:281-7.

Rosenberg SA, and Dudley ME
Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes.
Proc Natl Acad Sci U S A 2004,101 Suppl 2:14639-45.

Rothenfusser S, Buchwald A, Kock S, Ferrone S, and Fisch P
Missing HLA class I expression on Daudi cells unveils cytotoxic and proliferative responses of human gammadelta T lymphocytes.
Cell Immunol 2002,215:32-44.

Rozman C, and Montserrat E
Chronic lymphocytic leukemia.
N Engl J Med 1995,333:1052-7.

Rudolph MG, Stanfield RL, and Wilson IA
How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors.
Annu Rev Immunol 2006,24:419-66.

Sadovnikova E, and Stauss HJ
Peptide-specific cytotoxic T lymphocytes restricted by nonself major histocompatibility complex class I molecules: reagents for tumor immunotherapy.
Proc Natl Acad Sci U S A 1996,93:13114-8.

Sadovnikova E, Jopling LA, Soo KS, and Stauss HJ
Generation of human tumor-reactive cytotoxic T cells against peptides presented by non-self HLA class I molecules.
Eur J Immunol 1998,28:193-200.

Salter RD, and Cresswell P
Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid.
Embo J 1986,5:943-9.

Salter RD, Howell DN, and Cresswell P
Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids.
Immunogenetics 1985,21:235-46.

Schetelig J, Thiede C, Bornhauser M, Schwerdtfeger R, Kiehl M, Beyer J, Sayer HG, Kroger N, Hensel M, Scheffold C, Held TK, Hoffken K, Ho AD, Kienast J, Neubauer A, Zander AR, Fauser AA, Ehninger G, and Siegert W
Evidence of a graft-versus-leukemia effect in chronic lymphocytic leukemia after reduced-intensity conditioning and allogeneic stem-cell transplantation: the Cooperative German Transplant Study Group.
J Clin Oncol 2003,21:2747-53.

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, and Hume DA
Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions.
J Leukoc Biol 2004,75:163-89.

Schuster IG, Busch DH, Eppinger E, Kremmer E, Milosevic S, Hennard C, Kuttler C, Ellwart JW, Frankenberger B, Nossner E, Salat C, Bogner C, Borkhardt A, Kolb HJ, and Krackhardt AM
Allorestricted T cells with specificity for the FMNL1-derived peptide PP2 have potent antitumor activity against hematologic and other malignancies.
Blood 2007,110:2931-9.

Schwartz RH
A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy.
Science 1990,248:1349-56.

Serwold T, Gaw S, and Shastri N
ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules.
Nat Immunol 2001,2:644-51.

Seung S, Urban JL, and Schreiber H
A tumor escape variant that has lost one major histocompatibility complex class I restriction element induces specific CD8+ T cells to an antigen that no longer serves as a target.
J Exp Med 1993,178:933-40.

Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, and Schreiber RD
IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity.
Nature 2001,410:1107-11.

Shay JW, and Wright WE
Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase.
Carcinogenesis 2005,26:867-74.

Sherman LA, and Chattopadhyay S
The molecular basis of allorecognition.
Annu Rev Immunol 1993,11:385-402.

Sidney J, Southwood S, Mann DL, Fernandez-Vina MA, Newman MJ, and Sette A
Majority of peptides binding HLA-A*0201 with high affinity crossreact with other A2-supertype molecules.
Hum Immunol 2001,62:1200-16.

Sidney J, Grey HM, Southwood S, Celis E, Wentworth PA, del Guercio MF, Kubo RT, Chesnut RW, and Sette A
Definition of an HLA-A3-like supermotif demonstrates the overlapping peptide-binding repertoires of common HLA molecules.
Hum Immunol 1996,45:79-93.

Slifka MK, and Whitton JL
Functional avidity maturation of CD8(+) T cells without selection of higher affinity TCR.
Nat Immunol 2001,2:711-7.

Sommermeyer D, Neudorfer J, Weinhold M, Leisegang M, Engels B, Noessner E, Heemskerk MH, Charo J, Schendel DJ, Blankenstein T, Bernhard H, and Uckert W
Designer T cells by T cell receptor replacement.
Eur J Immunol 2006,36:3052-9.

Sorror ML, Maris MB, Sandmaier BM, Storer BE, Stuart MJ, Hegenbart U, Agura E, Chauncey TR, Leis J, Pulsipher M, McSweeney P, Radich JP, Bredeson C, Bruno B, Langston A, Loken MR, Al-Ali H, Blume KG, Storb R, and Maloney DG
Hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning for advanced chronic lymphocytic leukemia.
J Clin Oncol 2005,23:3819-29.

Stanislawski T, Voss RH, Lotz C, Sadovnikova E, Willemsen RA, Kuball J, Ruppert T, Bolhuis RL, Melief CJ, Huber C, Stauss HJ, and Theobald M
Circumventing tolerance to a human MDM2-derived tumor antigen by TCR gene transfer.
Nat Immunol 2001,2:962-70.

Starr TK, Jameson SC, and Hogquist KA
Positive and negative selection of T cells.
Annu Rev Immunol 2003,21:139-76.

Stauss HJ
Immunotherapy with CTLs restricted by nonself MHC.
Immunol Today 1999,20:180-3.

Steinle A, Reinhardt C, Jantzer P, and Schendel DJ
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 1995,181:503-13.

Stitz J, Buchholz CJ, Engelstadter M, Uckert W, Bloemer U, Schmitt I, and Cichutek K
Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1.
Virology 2000,273:16-20.

Street SE, Cretney E, and Smyth MJ
Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis.
Blood 2001,97:192-7.

Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E, Sayegh MH, Wells AD, and Turka LA
Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question.
J Immunol 2001,166:973-81.

Sykulev Y, Joo M, Vturina I, Tsomides TJ, and Eisen HN
Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response.
Immunity 1996,4:565-71.

Szymczak AL, Workman CJ, Wang Y, Vignali KM, Dilioglou S, Vanin EF, and Vignali DA
Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector.
Nat Biotechnol 2004,22:589-94.

Tallquist MD, Yun TJ, and Pease LR
A single T cell receptor recognizes structurally distinct MHC/peptide complexes with high specificity.
J Exp Med 1996,184:1017-26.

Tarakhovsky A, Kanner SB, Hombach J, Ledbetter JA, Muller W, Killeen N, and Rajewsky K
A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection.
Science 1995,269:535-7.

Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, Brocker EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, and Schuler G
Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma.
J Exp Med 1999,190:1669-78.

Toes RE, Nussbaum AK, Degermann S, Schirle M, Emmerich NP, Kraft M, Laplace C, Zwinderman A, Dick TP, Muller J, Schonfisch B, Schmid C, Fehling HJ, Stevanovic S, Rammensee HG, and Schild H
Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products.
J Exp Med 2001,194:1-12.

Traversari C, van der Bruggen P, Luescher IF, Lurquin C, Chomez P, Van Pel A, De Plaen E, Amar-Costesec A, and Boon T
A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E.
J Exp Med 1992,176:1453-7.

Udaka K, Wiesmuller KH, Kienle S, Jung G, and Walden P
Self-MHC-restricted peptides recognized by an alloreactive T lymphocyte clone.
J Immunol 1996,157:670-8.

Uebel S, and Tampe R
Specificity of the proteasome and the TAP transporter.
Curr Opin Immunol 1999,11:203-8.

Ueno T, Tomiyama H, and Takiguchi M
Single T cell receptor-mediated recognition of an identical HIV-derived peptide presented by multiple HLA class I molecules.
J Immunol 2002,169:4961-9.

Urban JL, and Schreiber H
Tumor antigens.
Annu Rev Immunol 1992,10:617-44.

Van den Hove LE, Van Gool SW, Vandenberghe P, Bakkus M, Thielemans K, Boogaerts MA, and Ceuppens JL
CD40 triggering of chronic lymphocytic leukemia B cells results in efficient alloantigen presentation and cytotoxic T lymphocyte induction by up-regulation of CD80 and CD86 costimulatory molecules.
Leukemia 1997,11:572-80.

van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, and Boon T
A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma.
Science 1991,254:1643-7.

van der Burg SH, Visseren MJ, Brandt RM, Kast WM, and Melief CJ
Immunogenicity of peptides bound to MHC class I molecules depends on the MHC-peptide complex stability.
J Immunol 1996,156:3308-14.

van Endert PM
Peptide selection for presentation by HLA class I: a role for the human transporter associated with antigen processing?
Immunol Res 1996,15:265-79.

van Lent AU, Nagasawa M, van Loenen MM, Schotte R, Schumacher TN, Heemskerk MH, Spits H, and Legrand N
Functional human antigen-specific T cells produced in vitro using retroviral T cell receptor transfer into hematopoietic progenitors.
J Immunol 2007,179:4959-68.

Vavylonis D, Kovar DR, O'Shaughnessy B, and Pollard TD
Model of formin-associated actin filament elongation.
Mol Cell 2006,21:455-66.

Watts TH
TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses.
Annu Rev Immunol 2005,23:23-68.

Weber W, and Fussenegger M
Pharmacologic transgene control systems for gene therapy.
J Gene Med 2006,8:535-56.

Whitelegg A, and Barber LD
The structural basis of T-cell allorecognition.
Tissue Antigens 2004,63:101-8.

Wiemann B, and Starnes CO
Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective.
Pharmacol Ther 1994,64:529-64.

Wierda W, O'Brien S, Wen S, Faderl S, Garcia-Manero G, Thomas D, Do KA, Cortes J, Koller C, Beran M, Ferrajoli A, Giles F, Lerner S, Albitar M, Kantarjian H, and Keating M
Chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab for relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia.
J Clin Oncol 2005,23:4070-8.

Willimsky G, and Blankenstein T
Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance.
Nature 2005,437:141-6.

Wolfel T, Van Pel A, Brichard V, Schneider J, Seliger B, Meyer zum Buschenfelde KH, and Boon T
Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes.
Eur J Immunol 1994,24:759-64.

Wucherpfennig KW
T cell receptor crossreactivity as a general property of T cell recognition.
Mol Immunol 2004,40:1009-17.

Xue SA, Gao L, Hart D, Gillmore R, Qasim W, Thrasher A, Apperley J, Engels B, Uckert W, Morris E, and Stauss H
Elimination of human leukemia cells in NOD/SCID mice by WT1-TCR gene-transduced human T cells.
Blood 2005,106:3062-7.

Yee C, Savage PA, Lee PP, Davis MM, and Greenberg PD
Isolation of high avidity melanoma-reactive CTL from heterogeneous populations using peptide-MHC tetramers.
J Immunol 1999,162:2227-34.

Yellin MJ, Sinning J, Covey LR, Sherman W, Lee JJ, Glickman-Nir E, Sippel KC, Rogers J, Cleary AM, Parker M, and et al.
T lymphocyte T cell-B cell-activating molecule/CD40-L molecules induce normal B cells or chronic lymphocytic leukemia B cells to express CD80 (B7/BB-1) and enhance their costimulatory activity.
J Immunol 1994,153:666-74.

Yu XZ, Martin PJ, and Anasetti C
CD28 signal enhances apoptosis of CD8 T cells after strong TCR ligation.
J Immunol 2003,170:3002-6.

Zeh HJ, 3rd, Perry-Lalley D, Dudley ME, Rosenberg SA, and Yang JC
High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy.
J Immunol 1999,162:989-94.

Zhao Y, Zheng Z, Robbins PF, Khong HT, Rosenberg SA, and Morgan RA
Primary human lymphocytes transduced with NY-ESO-1 antigen-specific TCR genes recognize and kill diverse human tumor cell lines.
J Immunol 2005,174:4415-23.

Zhou D, Srivastava R, Grummel V, Cepok S, Hartung HP, and Hemmer B
High throughput analysis of TCR-beta rearrangement and gene expression in single T cells.
Lab Invest 2006,86:314-21.

Zinkernagel RM, and Doherty PC
MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness.
Adv Immunol 1979,27:51-177.

8 Abkürzungen

AICD	activation induced cell death
Amp	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin
C	konstante Region (T-Zellrezeptor)
CD	cluster of differentiation
cDNS	complementary-DNA
CDR	complementarity-determining region
c_{end}	Endkonzentration
CMV	Cytomegalovirus
c_{stock}	Stockkonzentration
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4
D	„Diversity" Region (T-Zellrezeptor)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxinucleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
DZ	Dendritische Zellen
E. coli	Escherichia coli
E:T	Effektor zu Target (Zielzell)-Verhältnis
EBV	Epstein-Barr-Virus
eGFP	enhanced green fluorescence protein
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsporptionsversuch
ER	endoplasmatisches Retikulum
Fab	Antigenbindendes Fagment
FACS	fluorescence-activated cell sorting
Fc	Fragment crystallizable
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FSC	forward scatter
g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
GvL	Graft-versus-Leukemia
Gy	Gray
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HvG	Host-versus-Graft
HS	Humanserum
I.E.	internationale Einheiten

IFNγ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
J	„Joint" Region (T-Zell-Rezeptor)
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
MEM	modifiziertes Eagle-Medium
MHC	major histocompatibility complex
MRA	Mycoplasma-Removal Agent
mRNS	messenger-RNA
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
PBL	periphere Blutleukozyten
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
Pen	Penicillin
Pfu	Pyrococcus furiosus
PI	Propidiumjodid
PP	Peptid
RCC	renal cell carcinoma
rpm	rounds per minute
RPMI 1640	Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640
RT	Raumtemperatur
SSC	Seitwärtsstreuung („side scatter")
Strep	Streptomycin
TAA	tumorassoziertes Antigen
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAP	transporter associated with antigen processing
Taq	Thermus aquaticus
TIL	tumorinfiltrierende T-Lymphozyten
TNFα	Tumornekrosefaktor α
TSA	tumorspezifisches Antigen
TZR / TCR	T-Zellrezeptor
U	Unit, Einheit
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	variable Region (T-Zellrezeptor)
VLE	very low endotoxin

9 Danksagung

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Dr. Angela Krackhardt, die mir dieses Thema anvertraut und damit die Möglichkeit gegeben hat, an diesem äußerst spannenden Gebiet mitzuarbeiten. Sie hat mich in den letzten drei Jahren außerordentlich unterstützt und sich immer Zeit für Fragen aller Art genommen. Die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und ihre überaus positive Art haben mich sehr motiviert und mich in meiner Arbeit und auch persönlich enorm vorangebracht.

Bei Prof. Dolores Schendel möchte ich mich für ihre große Unterstützung bedanken und dafür, dass sie es mir ermöglicht hat, meine Doktorarbeit in ihrem Institut anzufertigen.

Prof. Elisabeth Weiss danke ich ganz herzlich, dass sie so spontan und hilfsbereit die Erstbegutachtung übernommen hat und mich bei der Promotion unterstützt.

Bei PD. Dr. Christine Falk bedanke ich mich für die Betreuung seitens der Universität, für ihr großes Interesse an meiner Arbeit und ihre außerordentliche Unterstützung.

Dem gesamten Krackhardt-Labor danke ich ganz besonders für die tolle Atmosphäre, die das tägliche Leben im Labor so angenehm gemacht hat. Ein großer Dank geht an Elfriede Eppinger für die Hilfestellung bei zahlreichen Versuchen, die vielen guten Ratschläge und Tipps. Bei Luise Weigand möchte ich mich ganz besonders bedanken, dass sie immer für mich da war, und bei Xiaoling Liang, Yanyan Han und Simone Gessendorfer für die enorm große Unterstützung im Labor, wann immer sie nötig war.

Ein ganz großes Dankeschön geht nach Berlin an Prof. Wolfgang Uckert und an sein Labor, insbesondere an Matthias Leisegang und Daniel Sommermeyer, die uns die Methode des retroviralen T-Zellrezeptor-Transfers beigebracht haben, Vektoren und Zellen zur Verfügung gestellt haben und immer für Fragen zur Verfügung standen.

Viele weitere Personen haben auf unterschiedliche Weise zu dieser Arbeit beigetragen, wofür ich sehr dankbar bin. Bei Prof. Dirk Busch, Martina Koffler und Anna Hochholzer möchte ich mich ganz herzlich für die Bereitstellung und Anfertigung von Multimeren bedanken, die erheblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Von Prof. Christoph Salat haben wir eine große Anzahl Blutproben von CLL-Patienten bekommen. Dr. Joachim Ellwart und Karin Nispel haben für uns zahlreiche Sortierungen am Durchflusszytometer durchgeführt. Dr. Elisabeth Kremmer und ihrem Labor danke ich für die Herstellung und zur Verfügungstellung zahlreicher Antikörper. Dr. Bernhard Frankenberger und Adam Slusarski haben mir bei der Durchführung der T-Zellrezeptoranalyse sehr geholfen. Dr. Christina Kuttler hat die Peptidanalyse durch PAProC II durchgeführt und war uns hierbei eine große

Hilfe. PD. Dr. Elfriede Nößner stand jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und hat uns zahlreiche Zelllinien für unsere Versuche zur Verfügung gestellt. Bei Anna Brandl bedanke ich mich für die vielen guten Tipps rund ums Labor. Bei Barbara Mosetter möchte ich mich ganz herzlich für die Einarbeitung in den Chrom-Freisetzungsversuch und Bioplex bedanken. Dr. Henriette Bendz danke ich für die Tipps zur Durchführung des Thymidin-Proliferations-versuchs und Dr. Susanne Wilde für die hilfreiche Einarbeitung in den ELISA und die In-vitro-Transkription. Markus Schmid verdanke ich das Gelingen eines wichtigen Versuches. Ein ganz herzliches Dankeschön möchte ich Dr. Joseph Mysliwietz sagen, der immer ein offenes Ohr für sämtliche Fragen zur Durchflusszytometrie und zum Arbeiten im Radioaktivbereich hatte.

Ganz besonders möchte mich bei Dr. Petra Skrablin bedanken, die mir in unheimlichem Tempo die Doktorarbeit korrigiert und viele gute Tipps gegeben hat.

Ich möchte mich beim gesamten IMI und bei den vielen namentlich nicht genannten Personen bedanken, die zur tollen Atmosphäre beigetragen haben, die das Leben im Labor unendlich verschönert hat.

Und was wäre ohne die Musik gewesen? Vielen Dank Maja und Andreas für die schönen, leider viel zu seltenen Musikabende und tollen Diskussionen, die dem Laborleben eine ganz besondere Komponente gegeben haben.

Meinen Eltern danke ich aus ganzen Herzen, die mich unterstützt haben, wo sie nur konnten, mitgefiebert haben und sehr großes Interesse an meiner Arbeit hatten. Ihr unerschütterlicher Glaube an mich hat mich immer wieder aufgebaut.

Ein ganz besonders großer Dank geht an meinen Mann Peter, der mir nicht nur beigebracht hat, wie man richtig mit Word und Excel umgeht, sondern mir über die ganzen letzten Jahre immer den Rücken freigehalten hat, wenn es eng wurde, eingekauft hat, mir liebevoll gekocht hat und mir die Kraft gegeben hat durchzuhalten.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Ingrid Schuster (geb. Igney)

geboren am 16.01.1980 in Hamburg

deutsch

Ausbildungsweg

1986 –1999	Grundschule und Gymnasium in Rosenheim Abitur
1999 – 2004	**Biologiestudium** an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg Fächer: Zellbiologie, Genetik, Immunbiologie, Anatomie Diplom Diplomarbeit in der Pathologie des Universitätsklinikum Freiburg „STAT-Signaltransduktion in Kolon- und Ovarialkarzinomen“
2005 –2008	**Dissertation** zum Dr. rer. nat. am Helmholtz Zentrum München – Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, Institut für Molekulare Immunologie Externe Promotion der Ludwig-Maximilians-Universität München, Fakultät für Biologie „Identifikation, Klonierung und retroviraler Transfer allorestringierter FMNL1-peptidspezifischer T-Zellrezeptoren für die Entwicklung adoptiver Immuntherapien gegen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome“

Praktika

08-09/2002	Ciba Spezialitätenchemie Grenzach GmbH Mikrobiologisches Praktikum: Prüfung der Hemmwirkung von Antimikrobika im Hemmhoftest und Suspensionstest
SS 2003	Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Freiburg Zellbiologisches Praktikum: Zelluläre Aufnahmemechanismen und zytotoxische Wirkung von clostridialen Toxinen

Publikationen

Lassmann S.*, **Schuster I**.*, Walch A., Gobel H., Jutting U., Makowiec F., Hopt U., Werner M.

STAT3 mRNA and protein expression in colorectal cancer: effects on STAT3-inducible targets linked to cell survival and proliferation.

J Clin Pathol, 2007; 60 (2): 173-179 *contributed equally

Schuster I.G., Busch D.H., Eppinger E., Kremmer E., Milosevic S., Hennard C., Kuttler C., Ellwart J.W., Frankenberger B., Noessner E., Salat C., Bogner C., Borkhardt A., Kolb H.J., Krackhardt A.M

Allorestricted T cells with specificity for the FMNL1-derived peptide PP2 have potent antitumor activity against hematologic and other malignancies.

Blood, Oct 2007; 110: 2931-2939

Patent

Identifizierung eines allorestringierten T-Zellrezeptors mit Spezifität gegen ein neues, natürlich präsentiertes Peptidepitop von KW13/FMNL1 (Europäisches Patentamt)

Anmerkung

Der in der vorliegenden Arbeit beschriebene T-Zellrezeptor SK22 wurde in den folgenden Patentanmeldungen als SC22 bezeichnet:

- prioritätsbegründende EP-Patentanmeldung

  Titel: Allorestricted peptide-specific T cells

  Veröffentlichungsnummer EP1870418

- internationale PCT-Patentanmeldung

  Titel: Allorestricted peptide-specific T cells

  Veröffentlichungsnummer WO 2007/147806

Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Die Arbeit wird hiermit erstmalig einer Prüfungskommission vorgelegt. Die Dissertation wurde von Prof. Dr. Dolores Schendel am Helmholtz Zentrum München – Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, Institut für Molekulare Immunologie geleitet, von Dr. Angela Krackhardt betreut und wird von Prof. Dr. Elisabeth Weiß vor der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität vertreten.

München, den 30.04.2008

_____

Ingrid Schuster