

Untersuchungen zur Lymphozytotoxizität  
gegen Tumoren  
in Nierenzellkarzinom-Patienten  
und HLA-kompatiblen gesunden Spendern

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes-Gutenberg-Universität  
Mainz

Sandra Isabell Kausche  
geb. am 23.03.1977 in Gifhorn

Mainz, 2007

Tag der mündlichen Prüfung: 06.09.2007

## ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mithilfe der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Sandra Isabell Kausche

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	1
1.1	Das Immunsystem.....	1
1.1.1	HLA-Moleküle, Peptidprozessierung und -präsentation .....	2
1.1.2	T-zellvermittelte Immunantwort .....	7
1.1.2.1	CD8 <sup>+</sup> zytotoxische T-Lymphozyten.....	8
1.1.2.2	CD4 <sup>+</sup> regulatorische T-Lymphozyten.....	9
1.1.2.3	Nicht-klassische T-Lymphozyten .....	11
1.2	Krebs und das Immunsystem.....	12
1.2.1	Definition von Krebs .....	12
1.2.2	Das Nierenzellkarzinom.....	13
1.2.3	Allogene Zelltherapie.....	14
1.2.4	Identifizierung und Klassifizierung von Tumorantigenen beim Nierenzellkarzinom .....	16
1.2.5	Antigenspezifische Immuntherapie.....	17
1.2.6	Antigenidentifizierung mithilfe von alloreaktiven T-Lymphozyten .....	18
1.3	Zielsetzung der Arbeit .....	19
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	20
2.1	Material.....	20
2.1.1	Geräte.....	20
2.1.2	Plastikwaren .....	21
2.1.3	Glaswaren .....	22
2.1.4	Chemikalien.....	22
2.1.5	Substanzen für die Zellkultur .....	22
2.1.6	Monoklonale Antikörper.....	23
2.1.6.1	HLA-allelspezifische monoklonale Antikörper.....	23
2.1.6.2	Antikörper zum Nachweis von Oberflächenantigenen in der Durchflusszytometrie .....	24
2.1.7	Zytokine .....	25
2.1.8	Enzyme.....	26
2.1.9	Kits.....	26
2.1.10	Zellkulturmedien .....	27
2.1.11	Puffer und Lösungen .....	27
2.1.12	Zelllinien und Blutlymphozyten .....	28
2.1.12.1	Blutlymphozyten von Patienten und Spendern.....	28

2.1.12.2	Nierenzellkarzinomlinien ELTHEM-RCC, MZ3114-RCC, MZ3126-RCC und MZ3603-RCC.....	28
2.1.12.3	EBV-transformierte B-Lymphozyten .....	29
2.1.12.4	Weitere Tumorzelllinien und nicht-maligne Zellen .....	29
2.1.12.4.1	Cos7-Zellen.....	30
2.1.12.4.2	K562-Zellen und HLA-Transfektanten.....	30
2.1.13	ELISpot-Experimente .....	31
2.1.14	Kokultur und intrazelluläre Perforin-Färbung.....	31
2.2	Methoden .....	32
2.2.1	Zellkultur und Primärkultur.....	32
2.2.1.1	Generierung neuer Tumorzelllinien aus Primärtumoren und Kultivierung von Tumorzelllinien .....	32
2.2.1.2	Isolation von peripheren mononukleären Blutlymphozyten .....	33
2.2.1.3	Generierung und Kultur von polyklonalen tumorreaktiven CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten .....	34
2.2.1.4	Generierung und Kultur von (mono-) klonalen tumorreaktiven CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten .....	34
2.2.1.5	Generierung und Kultur von EBV-transformierten lymphoblastoiden Zelllinien.....	35
2.2.1.6	Generierung und Kurzzeitkultur von PHA-aktivierten PBMC-Blasten.	35
2.2.1.7	Generierung und Kultur von tumorinfiltrierenden Lymphozyten .....	36
2.2.1.8	Kryokonservierung von Zellen .....	36
2.2.1.9	Positive Isolation von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	37
2.2.1.10	Isolation von naiven und „ <i>central memory</i> “ CD8 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> T-Zellen....	37
2.2.1.11	Depletion von regulatorischen T-Zellen .....	38
2.2.2	Testmethoden für die Funktionalität von T-Zellen .....	40
2.2.2.1	Interferon- $\gamma$ -ELISpot-Assay .....	40
2.2.2.1.1	ELISpot-Assay zur Frequenzanalyse von T-Zellen .....	42
2.2.2.1.2	ELISpot-Assay in Kreuzreaktivitätsstudien .....	43
2.2.2.1.3	ELISpot-Assay zur Bestimmung der HLA-Restriktion mittels Antikörperblockade (Blockadetest).....	43
2.2.2.1.4	Transiente Transfektion von Cos7-Zellen .....	45
2.2.2.2	Zytotoxizitätstest / radioaktiver <sup>51</sup> Cr-Freisetzungstest .....	46
2.2.2.3	Durchflusszytometrie zur phänotypischen Charakterisierung von T-Lymphozyten und Tumorzellen anhand von Oberflächenmarkern .....	47
2.2.2.3.1	Direkte FACS-Färbung von Oberflächenmolekülen.....	47
2.2.2.3.2	Indirekte FACS-Färbung von Oberflächenmolekülen .....	48

2.2.2.3.3	Beta-Mark-Färbung zur Charakterisierung der $\beta$ -Kette des T-Zellrezeptors von klonalen T-Zellpopulationen.....	48
2.2.2.4	Intrazelluläre Perforin-Färbung .....	49
2.2.2.5	Intrazelluläre Färbung des „ <i>Forkhead Box P3</i> “-Proteins .....	50
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>51</b>
3.1	Etablierung und Charakterisierung von Zelllinien aus Nierenzellkarzinomen und nicht-malignen Nierenzellen .....	51
3.2	Vorstellung der Nierenzellkarzinom-Modelle .....	52
3.2.1	Modell ELTHEM .....	52
3.2.1.1	Isolierung von HLA-A*0301-„ <i>Mismatch</i> “-reaktiven MLTC-„ <i>Responder</i> “-Lymphozyten aus einem serologisch HLA-identischen Fremdspender.....	53
3.2.2	Modell MZ3114.....	54
3.2.3	Modell MZ3126.....	55
3.2.4	Modell MZ3603.....	55
3.3	Vergleich der RCC-Reaktivität von autologen und allogenen T-Zellkulturen .....	56
3.3.1	Keine oder nur geringe Tumorreaktivität in autologen peripheren Blutlymphozyten und tumorinfiltrierenden Lymphozyten .....	56
3.3.2	Isolierung von RCC-reaktiven CD8 <sup>+</sup> CTL-Klonen aus HLA-identischen Geschwisterspendern .....	58
3.4	Identifizierung von HLA-identischen Geschwister-CTLs mit nicht-HLA-restringierter RCC-Reaktivität .....	62
3.4.1	Expression eines singulären T-Zellrezeptors durch die nicht-HLA-restringierten CTL-Klone .....	67
3.5	Tumorreaktive CTLs aus HLA-identischen Geschwisterspendern entstehen aus CD8 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> Vorläufer-T-Zellen .....	68
3.6	Regulatorische T-Zellen als möglicher immunsupprimierender Mechanismus in RCC-Patienten .....	71
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>73</b>
4.1	Generierung und Charakterisierung von Nierenzellkarzinom-Zelllinien .....	73
4.2	Die Generierung von RCC-reaktiven CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus Geschwisterspendern .....	74

---

4.3	Autologe und allogene tumorreaktive T-Zellkulturen im Vergleich .....	75
4.4	Klassische tumorreaktive T-Zellen .....	76
4.5	Nicht-klassische tumorreaktive T-Zellen .....	78
4.6	Allogene Stammzelltransplantation, GvT und GvHD .....	79
4.7	T regs als immunsupprimierende Zellen in RCC-Patienten .....	81
4.8	Ursprung der tumorreaktiven CTLs aus CD8 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> Vorläufer-T-Zellen .....	82
4.9	Ausblick .....	83
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>99</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	99
7.2	Liste der eigenen Veröffentlichungen .....	102

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 *Das Immunsystem*

Das Immunsystem dient dem menschlichen Organismus als Schutz vor Infektionen durch Pathogene wie z. B. Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Parasiten). Es hat außerdem die Fähigkeit, Tumorzellen zu bekämpfen, wenn diese durch Veränderung ihrer genetischen Eigenschaften ein verändertes Proteom ausbilden, welches von Immunzellen als „fremd“ erkannt wird. Während die vom Immunsystem detektierten fremden Strukturen Antigene genannt werden, stellen Autoantigene körpereigene Strukturen dar, die irrtümlicherweise erkannt werden. Bei den verschiedenen Abwehrreaktionen bedient sich das Immunsystem angeborener (natürlicher) und erworbener (adaptiver) Mechanismen [Parkin & Cohen, 2001].

Die ersten Schutzbarrieren des Immunsystems, die ein Infektionserreger überwinden muss, sind physikalischer und biochemischer Natur. Hierzu zählen z. B. die Haut, Schleimhäute und Enzyme. Eine zweite Reihe von Abwehrmechanismen stellt die natürliche und die erworbene Immunität dar.

Die natürliche Immunantwort beinhaltet zunächst zelluläre Komponenten wie Phagozyten (Makrophagen, dendritische Zellen), natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Helferzellen, die lösliche Entzündungsmediatoren freisetzen. Weiterhin zählen das Komplementsystem, Akute-Phase-Proteine und Zytokine hierzu. Die natürlichen Mechanismen zeichnen sich durch eine fehlende Spezifität aus, da sie sich nicht selektiv gegen bestimmte Antigene richten, und finden immer in unveränderter Intensität statt. Das liegt darin begründet, dass der natürlichen Immunität ein so genanntes immunologisches Gedächtnis fehlt [Delves & Roitt, 2000a; Delves & Roitt, 2000b].

Die erworbene Immunität hingegen schließt die antigenpräsentierenden Zellen (APC, engl. *antigen presenting cell*) und bestimmte Lymphozyten mit ein. Diese tragen dazu bei, dass die zellulären Komponenten der natürlichen Immunantwort effektiver zum Infektionsherd geleitet werden und dieselbe noch verstärken. Außerdem zeichnen sich diese Lymphozyten dadurch aus, dass sie ein „immunologisches Gedächtnis“ besitzen. Bei wiederholter Infektion wird also eine schnellere und verstärkte antigenabhängige Immunantwort ausgelöst, da die spezifischen Lymphozyten nach vorangegangenem Antigenkontakt in einer bestimmten Frequenz bereits im Blut vorliegen und eine verstärkte Proliferation schnell eingeleitet werden kann [Delves & Roitt, 2000a; Delves & Roitt, 2000b].



Die erworbene oder adaptive Immunantwort setzt sich aus einer humoralen und einer zellulären Komponente zusammen. Die humorale Immunantwort richtet sich gegen extrazelluläre Antigene und wird von den ausdifferenzierten B-Lymphozyten, den so genannten Plasmazellen, vermittelt, die lösliche Antikörpermoleküle produzieren.

Die zelluläre Immunantwort wird hauptsächlich von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL, engl. *cytotoxic T-lymphocytes*) exekutiert. Diese haben die Fähigkeit, virusinfizierte Zellen sowie Tumorzellen zu erkennen und zu bekämpfen. Im Gegensatz zu gesunden Zellen des gleichen Gewebes besitzen die betroffenen Zellen veränderte Proteinstrukturen, die nach intrazellulärer Prozessierung als Oligopeptide in Assoziation mit humanen Leukozytenantigenen (HLA, engl. *human leukocyte antigen*)-Molekülen auf der Zelloberfläche der Zielzellen präsentiert werden (siehe Abschnitt 1.1.1) [Rammensee, 1995]. Dadurch werden sie von den T-Zellen als „fremd“ erkannt (Abbildung 1.2). Wenn die von den T-Zellen erkannten Zielstrukturen (Antigene) bekannte tumorassoziierte Epitope darstellen, können diese für antigenspezifische Immuntherapien (zum Beispiel Vakzinierungen) eingesetzt werden [Sbai *et al*, 2001].

### 1.1.1 HLA-Moleküle, Peptidprozessierung und -präsentation

Die Funktionalität der zellulären Immunantwort ist abhängig von membranständigen Glykoproteinen auf der Zelloberfläche von Zielzellen. Diese sind für die Präsentation von Oligopeptiden aus extrazellulären bzw. zytosolischen Proteinen verantwortlich, so dass die Zielzellen durch T-Lymphozyten erkannt werden können. Diese Glykoproteine werden von den Genen des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes (MHC, engl. *major histocompatibility complex*) kodiert, der seinen Namen aufgrund seiner Rolle bei der Gewebeverträglichkeit von Transplantaten erhalten hat [Horton *et al*, 2004]. Beim Menschen werden diese Gene als humane Leukozytenantigene (HLA) bezeichnet, welche auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (6p21.3) liegen [Klein & Sato, 2000a; Klein & Sato, 2000b].

Es gibt zwei Arten von klassischen HLA-Molekülen, die sich aufgrund ihrer Struktur und Funktion unterscheiden. HLA-Klasse-I-Moleküle werden auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert, wohingegen HLA-Klasse-II-Moleküle in der Regel nur auf spezialisierten APCs wie B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen zu finden sind. HLA-Klasse-I-Moleküle bestehen aus zwei Polypeptidketten, die sich in vier Domänen unterteilen. Die 45 kDa  $\alpha$ -Kette, die auch als schwere Kette bezeichnet wird, untergliedert sich in drei extrazelluläre Domänen ( $\alpha$ 1-3) und umfasst außerdem noch eine Transmembranregion und einen kurzen zytoplasmatischen Teil. Die kleinere Kette, das

auf Chromosom 15 kodierte 12 kDa schwere  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2m$ ), stellt die vierte Domäne dar und ist nicht-kovalent mit der  $\alpha_3$ -Domäne der schweren Kette assoziiert. Die peptidbindende Grube wird aus den  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domänen gebildet [Janeway *et al*, 1999]. Im Unterschied zu HLA-Klasse-I-Molekülen setzen sich HLA-Klasse-II-Moleküle aus zwei nicht kovalent assoziierten schweren Polypeptidketten,  $\alpha$  (34 kDa) und  $\beta$  (29 kDa), zusammen, die beide neben jeweils zwei extrazellulären Domänen ( $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  bzw.  $\beta_1$  und  $\beta_2$ ) ebenfalls eine Transmembranregion und einen zytoplasmatischen Teil besitzen. Die peptidbindende Grube wird hier aus zwei Domänen unterschiedlicher Ketten zusammengesetzt ( $\alpha_1$  und  $\beta_1$ ), die nicht kovalent miteinander verbunden sind, und unterscheidet sich von der Klasse-I-Grube außerdem dadurch, dass sie an beiden Enden offen und damit zugänglich für größere Peptidfragmente ist [Janeway *et al*, 1999].

Die schweren Ketten der klassischen HLA-Moleküle ( $\alpha$ -Kette bei Klasse-I bzw.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette bei Klasse-II) werden beim Menschen von mehreren auf Chromosom 6 liegenden Gen-Loci kodiert, d. h. sie sind polygen. Im Falle von HLA-Klasse-I sind dies drei Loci (HLA-A, -B und -C), bei HLA-Klasse-II sind es sogar fünf Loci (HLA-DP, -DQ, -DR, -DM und -DO). Weiterhin liegen von jedem Locus ein väterlicher und ein mütterlicher Haplotyp vor (Diploidie).

Eine weitere bemerkenswerte Eigenschaft des kodierenden HLA-Genclusters ist ein außergewöhnlich starker Polymorphismus. Es sind mehr als hundert Allele pro HLA-Locus bekannt. Damit ist dies der am stärksten polymorphe menschliche Gencluster, der bisher identifiziert wurde [Janeway *et al*, 1999]. Im April 2003 kannte man beispielsweise 294 HLA-A-Allele, 540 HLA-B-Allele und 133 HLA-C-Allele. Im August 2006 waren schon 478 HLA-A-Allele, 805 HLA-B-Allele und 256 HLA-C-Allele identifiziert [<http://www.anthonynolan.com.HIG/>, release 2.14.1]. Die Kombination von Diploidie, Polygenie und Polymorphismus trägt zu einer sehr großen genetischen Variation bei, die das Auffinden von zwei Individuen mit komplett identischem HLA-Profil mitunter sehr erschwert. Die assoziierte leichte Kette  $\beta_2m$  hingegen ist einem solchen Polymorphismus nicht unterworfen.

Neben den klassischen HLA-Klasse-I-Molekülen HLA-A, -B und -C (Klasse-Ia) gibt es noch weitere Gene und Pseudogene, die für nicht-klassische HLA-Moleküle (Klasse-Ib) kodieren [O'Callaghan & Bell, 1998; Geraghty, 1993; Geraghty *et al*, 1992] und nur wenig polymorph sind. Diese sollen hier nur kurz erwähnt werden. HLA-E an sich ist nicht stabil auf der Zelloberfläche, sondern muss durch Signalpeptide anderer HLA-Moleküle stabilisiert werden [Garcia *et al*, 2002]. Anders als die klassischen HLA-Moleküle ist HLA-E hauptsächlich durch Bindung an inhibitorische Rezeptoren auf NK-Zellen an der Immunantwort beteiligt [Miller *et al*, 2003]. Weitere nicht-klassische HLA-Moleküle sind HLA-F, -G und -H. HLA-J stellt ein Pseudogen dar. Außerdem existieren noch die

stressinduzierten nicht-klassischen HLA-Ib-Moleküle MIC-A/MIC-B und ULBP1-4.

Wie bereits erwähnt, wird die längliche peptidbindende Grube durch die jeweiligen N-terminalen Domänen der schweren Ketten ( $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Domänen der HLA-Klasse-I-Moleküle bzw. die  $\alpha$ 1- und  $\beta$ 1-Domänen der HLA-Klasse-II-Moleküle) gebildet. Dabei wird deren Boden von einer  $\beta$ -Faltblattstruktur ausgebildet, die seitlich von zwei  $\alpha$ -helikalen Bereichen begrenzt wird. Die Peptidbindung erfolgt über nicht kovalente Wechselwirkungen in dem Bereich, in dem sich die verschiedenen HLA-Moleküle am stärksten unterscheiden [Hildebrand *et al*, 2002]. Die peptidbindende Grube eines jeden HLA-Allels besitzt eine ihm eigene räumliche und sterische Struktur, die nur Peptidliganden mit gewissen Aminosäuren, den so genannten Ankeraminosäuren, an den entsprechenden Positionen zur Bindung zulässt. Die Peptidliganden der HLA-Klasse-I-Moleküle werden auch mit ihren C- und N-Termini in der geschlossenen Grube gebunden, was die Liganden auf eine charakteristische Länge von meist neun bis elf Aminosäuren festlegt. Die peptidbindenden Gruben der HLA-Klasse-II-Moleküle sind hingegen an den Enden offen. Die C- und N-Termini der Liganden werden daher nicht in der Grube fixiert, wodurch sich für die Bindung dieser variablere Längen von neun bis 25 Aminosäuren ergeben.

Da die peptidbindenden Gruben der einzelnen, polymorphen HLA-Allele jeweils ganz charakteristische chemische Strukturen haben, müssen die verschiedenen Peptide, die an ein bestimmtes HLA-Molekül binden, dessen räumlichen Anforderungen entsprechen. Hieraus ergeben sich strukturelle Gemeinsamkeiten, aus denen so genannte Peptidmotive abgeleitet werden können, die die zu erfüllenden Eigenschaften der Peptidliganden beschreiben [Stevanovic & Jung, 1993]. Anhand der spezifischen Ankeraminosäuren konnten bereits Peptidmotive für viele HLA-Moleküle identifiziert werden.

Aufgrund der Diploidie, des starken Polymorphismus und der kodominanten Expression der Gene der schweren Ketten besitzen die meisten Menschen bis zu sechs verschiedene HLA-A-, -B- und -C-Moleküle. Damit erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass eine auf Populationsebene betrachtet überlebenssichernde Immunantwort ausgelöst werden kann, da ein ausreichender Teil der Bevölkerung die entsprechenden HLA-Moleküle besitzt, um Peptide aus einem beliebigen Pathogen präsentieren zu können. Als Konsequenz daraus beeinflusst das Auftreten bestimmter Infektionserreger lokal die Frequenzen bestimmter HLA-Allele. So wird HLA-B\*5301, welches ein Epitop aus einem Protein der leberresistenten Form des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* besonders effizient präsentiert, in 20-40 % der westafrikanischen Population exprimiert, in der kaukasischen Population hingegen nur in 1 % [Migot-Nabias *et al*, 2001].

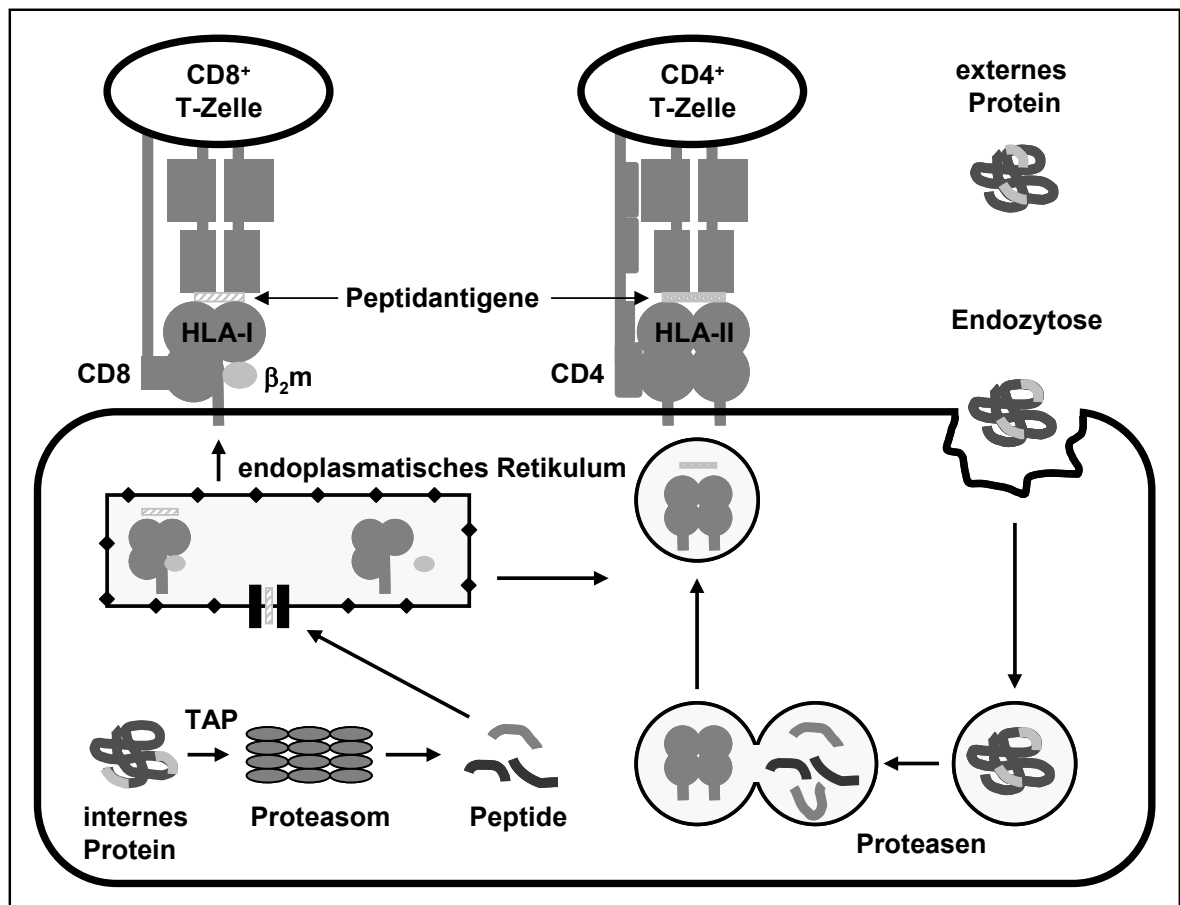
Aus der unterschiedlichen Herkunft der Peptidantigene ergeben sich auch unterschiedliche Wege, die zur Prozessierung der Peptide und Beladung der HLA-Klasse-I- und -Klasse-II-Moleküle mit denselben führen [Monaco, 1995]. Die Beladung von HLA-Klasse-I erfolgt mit Peptidliganden, die primär zytosolischen Ursprungs sind und durch intrazelluläre Proteolyse von Proteinen im Proteasomenkomplex entstehen. Im Falle von gesunden Zellen werden auf diese Weise „Selbst“-Peptide präsentiert, die den regulären zytosolischen Proteinbestand widerspiegeln. Bei krankhaft veränderten Zellen wie z. B. virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen werden auch virus- oder tumorspezifische Proteinfragmente zur Erkennung durch T-Zellen präsentiert.

Beim intrazellulären Proteinabbau fällt einem im Zytosol und in der Kernmatrix gelegenen Multienzymkomplex, dem so genannten Proteasom, eine große Bedeutung zu [Stoltze *et al.*, 1998]. Hier werden zellinterne Proteine in definierte Peptide zerlegt, die dann weiter prozessiert werden. Wie nachgewiesen werden konnte, wird durch die spezifische Hemmung des Proteasoms, beispielsweise durch Lactacystin, die HLA-Klasse-I-vermittelte Antigenpräsentation unterbunden [Fenteany *et al.*, 1995].

Das humane Proteasom besteht aus mehreren Untereinheiten, deren Kernstück die katalytisch aktive Komponente, das so genannte 20S-Proteasom, ist. Dieser Komplex ist von zylindrischer Struktur und besteht aus vier übereinander liegenden Ringen mit je sieben  $\alpha$ -Untereinheiten und sieben  $\beta$ -Untereinheiten [Tanaka *et al.*, 1992]. Von den insgesamt nur sechs proteolytisch aktiven Untereinheiten befinden sich jeweils drei in jedem der zwei Ringe im Zentrum des Zylinders [Janeway *et al.*, 1999]. Im Immunoproteasom, welches durch Interferon (IFN)- $\gamma$  induzierbar ist, werden die katalytisch aktiven  $\beta$ -Untereinheiten durch die Immununtereinheiten LMP2, LMP7 und MECL-1 ersetzt [Tanaka & Kasahara, 1998]. PA28, welches einen Aktivator des 20S-Proteasoms darstellt, kann ebenfalls durch IFN- $\gamma$  induziert werden und verbessert noch zusätzlich die Antigenprozessierung und -präsentation [Groettrup *et al.*, 1996]. Die enzymatisch aktiven Einheiten haben unterschiedliche Schnittspezifitäten, die primär nach hydrophoben und seltener nach sauren Aminosäuren spalten. Dadurch werden vorrangig potentielle HLA-Klasse-I-Liganden produziert, die die entsprechenden Ankeraminosäuren besitzen und C-terminal entweder hydrophobe oder basische Aminosäuren tragen, was die bisher bekannten Peptidmotiv-Anforderungen erfüllt.

Die Peptide, die durch proteasomale Spaltung von intrazellulären Proteinen entstehen, werden ATP-abhängig durch das heterodimere Transportprotein TAP („*transporter associated with antigen processing*“) in das endoplasmatische Retikulum (ER) befördert, wo sie an geeignete HLA-Klasse-I-Moleküle binden. Außerdem assoziiert im ER auch  $\beta_2m$  an die  $\alpha 3$ -Domäne des HLA-Klasse-I-Moleküls und bildet damit den trimeren Komplex aus Peptid, schwerer Kette und  $\beta_2m$  aus. Über den Golgi-Komplex und exozytotische Vesikel

gelangt dieser Komplex auf dem regulären Exozytoseweg für Membranproteine an die Zelloberfläche (Abbildung 1.1). Das gebundene Peptid besitzt eine tragende Rolle für die Stabilität von HLA-Molekülen an der Zelloberfläche, denn unbeladene dimere Komplexe aus schwerer Kette und  $\beta_2m$  zerfallen an der Oberfläche. Während das  $\beta_2m$  in diesem Fall rasch abdissoziiert, wird die schwere Kette wieder internalisiert [Simon *et al*, 2000].



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Antigenprozessierung.** Während HLA-Klasse-I-Liganden aus zellinternen Proteinen entstehen, werden HLA-Klasse-II-Liganden aus endozytierten extrazellulären Proteinen generiert. HLA-I = HLA-Klasse-I-Molekül; HLA-II = HLA-Klasse-II-Molekül;  $\beta_2m$  =  $\beta_2$ -Mikroglobulin; CD8, CD4 = kostimulatorische Moleküle; TAP = „*transporter associated with antigen processing*“.

HLA-Klasse-II-Moleküle hingegen werden mit aus extrazellulären Proteinen stammenden Fragmenten beladen, die durch Pinozytose oder Endozytose die endosomalen/lysosomalen Vesikel erreichen. Die Spaltung der Proteine in Peptide erfolgt hier durch eine Vielzahl an lysosomalen Proteasen, die durch die Ansäuerung der Vesikel aktiviert werden. Die im ER synthetisierten HLA-Klasse-II-Moleküle werden hier zunächst von der invarianten Kette (Ii) gebunden, die die Bindung von intrazellulären Peptiden verhindert und den Transport der HLA-Klasse-II-Moleküle über den Golgi-Apparat in ein ebenfalls endosomales Vesikel vermittelt. In diesem angesäuerten Kompartiment wird die invariante Kette durch die aktivierten Proteasen abgespalten. Dadurch wird die Beladung mit

Peptiden ermöglicht, die durch Vesikelfusion in Kontakt mit den HLA-Klasse-II-Molekülen kommen. Ähnlich wie bei der Klasse-I-Antigenprozessierung wird dann der trimere Komplex aus den zwei schweren Ketten und dem Peptid in Vesikeln an die Zelloberfläche gebracht (Abbildung 1.1).

### 1.1.2 T-zellvermittelte Immunantwort

Die Erkennung der antigenen Strukturen bei der zellulären erworbenen Immunantwort wird über den T-Zellrezeptor (TCR, engl. *T-cell receptor*)-Komplex vermittelt. Dieser besteht aus zwei unterschiedlichen Polypeptidketten, die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette genannt werden [Reiser *et al*, 2000]. Diese beiden Ketten beinhalten beide eine konstante ( $C\alpha$  und  $C\beta$ ) und eine variable ( $V\alpha$  und  $V\beta$ ) Domäne und sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Dieses Heterodimer bildet einen Komplex mit den CD3-Polypeptidketten  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  und  $\xi$ , die den TCR in der Zellmembran verankern (Transmembransegment) und einen zytoplasmatischen Anteil besitzen [Roitt *et al*, 1998]. Zusätzlich zum  $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor gibt es einen TCR mit  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketten, der seltener von T-Zellen exprimiert wird [Janeway *et al*, 1999].

T-Lymphozyten entwickeln sich wie B-Lymphozyten aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark. Im Gegensatz zu B-Lymphozyten müssen T-Lymphozyten jedoch für die Vollendung ihrer Maturation in den Thymus wandern. Hier werden sie gewissen Reifungs- und Selektionsprozessen unterzogen, die für die Funktionalität der spezifischen Immunantwort eines Organismus eine bedeutende Rolle spielen [Weninger *et al*, 2002]. Die so genannte positive Selektion beinhaltet die Selektion von ausschließlich solchen T-Zellen, die Peptide im Zusammenhang mit körpereigenen HLA-Molekülen („Selbst“-HLA) erkennen. Die negative Selektion hingegen führt zur Apoptose, dem induzierten Zelltod, der T-Zellen, die im Kontext mit „Selbst“-HLA solche Peptide erkennen, die auch auf gesunden Körperzellen präsentiert werden („Selbst“-Antigene). Außerdem können selbstreaktive T-Zellen in der Peripherie durch Anergie inaktiviert werden [Schwartz, 2003]. Diese Selektionsmechanismen gewährleisten auch die Inaktivierung solcher T-Zellen, die lokale, gewebespezifisch exprimierte Antigene erkennen. Autoimmunkrankheiten, bei denen körpereigene Antigene erkannt und bekämpft werden, stellen die Bedeutung der negativen Selektion besonders heraus.

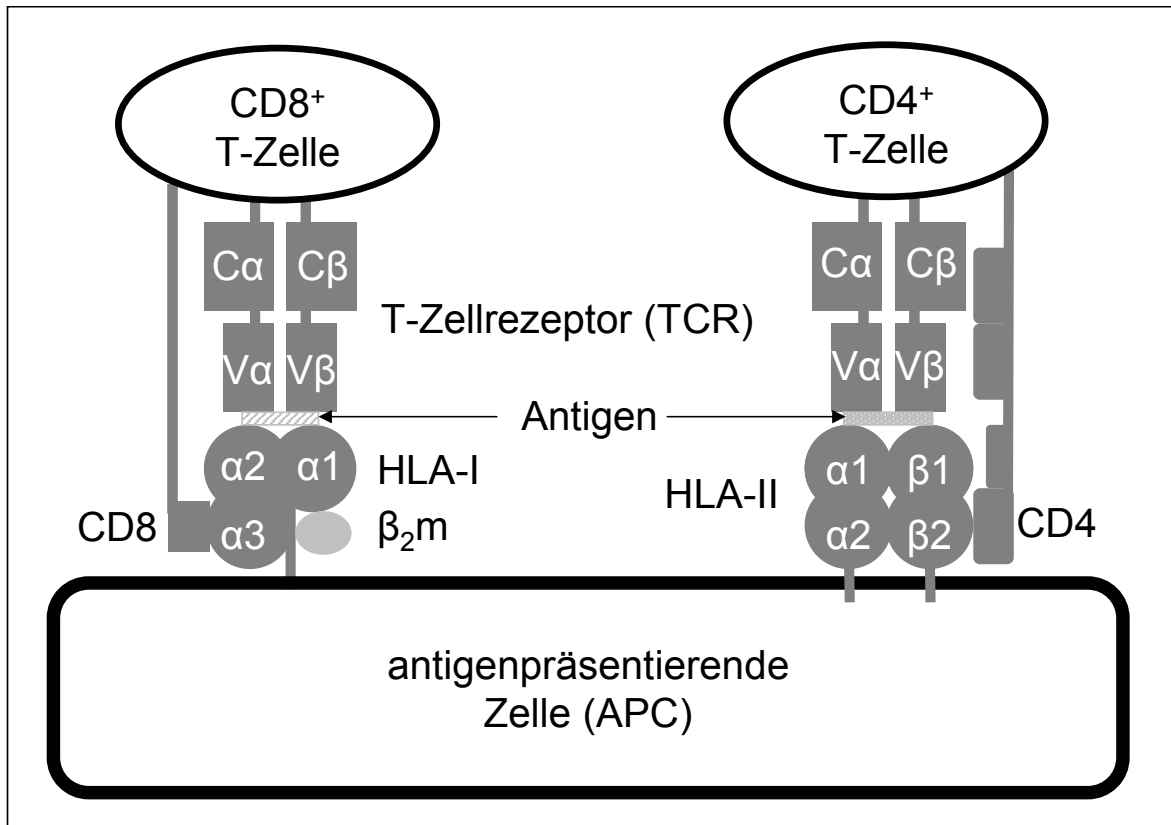
Bis zur Erkennung ihres zugehörigen Peptid-HLA-Komplexes zirkulieren die naiven T-Zellen durch den Körper. Auf ihrer Wanderung passieren sie die lymphatischen Gewebe, wie beispielsweise die Lymphknoten, wo eine hohe Dichte an antigenpräsentierenden Zellen (z. B. dendritische Zellen, DCs, engl. *dendritic cells*) vorliegt. Dendritische Zellen

werden auch professionelle APCs genannt, da sie große Mengen an kostimulatorischen Molekülen exprimieren, die für die Stimulation von naiven T-Zellen essentiell sind. Bei Ligandierung der Kostimulationsmoleküle auf den DCs mit den entsprechenden Rezeptoren auf den T-Zellen wird ein aktivierendes Signal ausgesendet und die Sekretion von Zytokinen eingeleitet. Bei der nun folgenden Differenzierung reifen zum einen  $CD4^+$  Helfer-T-Zellen (Th, engl. *T helper*) heran, die eine tragende Rolle bei der Regulation von spezifischen Immunantworten spielen. Inflammatorische T-Zellen (auch: Th1-Zellen) aktivieren durch die Produktion von  $IFN-\gamma$  Makrophagen, die nun befähigt sind, intravesikuläre Bakterien durch Phagozytose abzutöten. Helfer-T-Zellen (auch: Th2-Zellen) hingegen produzieren Interleukin-4 (IL-4), welches B-Lymphozyten zur Antikörperproduktion stimuliert, und sind damit bedeutsam für die humorale Immunantwort. Zum anderen reifen  $CD8^+$  T-Zellen zu zytotoxischen T-Lymphozyten aus, die ihre Zielzellen entweder durch sezernierte Moleküle wie Perforine und Granzyme oder über den rezeptorvermittelten Fas-Weg (CD95/CD95L) in Apoptose treiben [Delves & Roitt, 2000a; Delves & Roitt, 2000b].

Wie soeben beschrieben, unterteilen sich T-Zellen in zwei Hauptgruppen von Effektorzellen, nämlich die  $CD8^+$  (zytotoxischen) und  $CD4^+$  (Helfer-) T-Lymphozyten. Die Antigenpräsentation findet auf der Zelloberfläche der Zielzelle in Verbindung mit HLA-Klasse-I für  $CD8^+$  beziehungsweise mit HLA-Klasse-II für  $CD4^+$  T-Zellen statt.

### **1.1.2.1 $CD8^+$ zytotoxische T-Lymphozyten**

$CD8^+$  zytotoxische T-Lymphozyten erkennen ihre Antigene in Assoziation mit HLA-Klasse-I, wobei die Antigene intrazellulärer Herkunft sind. Die durch HLA-Klasse-I präsentierten Proteinfragmente können „Selbst“-Antigene sein, die den normalen Proteinbestand einer gesunden Zelle widerspiegeln, oder virus- oder tumorspezifische Antigene bei infizierten Zellen. Bei dieser Erkennung spielt neben dem TCR das kostimulatorische Molekül CD8 eine wichtige Rolle, denn es interagiert mit der  $\alpha 3$ -Domäne des HLA-Klasse-I-Moleküls auf der Zielzelle [Salter *et al*, 1990] (Abbildung 1.2). Aufgrund der Erkennung intrazellulär entstandener Peptide spielen  $CD8^+$  T-Zellen bei der Tumoreliminierung eine tragende Rolle. Auf sie wird daher später noch eingegangen (siehe Abschnitt 1.2.4).



**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Antigenerkennung von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten über HLA-Klasse-I und CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten über HLA-Klasse-II.** Das kostimulatorische Molekül der zytotoxischen T-Zellen CD8 bindet an die α3-Domäne des HLA-Klasse-I-Moleküls, während das kostimulatorische Molekül der Helfer-T-Zellen CD4 mit der β2-Domäne des HLA-Klasse-II-Moleküls interagiert. Die CD3-Ketten sind nicht eingezeichnet. HLA-I = HLA-Klasse-I-Molekül; HLA-II = HLA-Klasse-II-Molekül; β<sub>2</sub>m = β2-Mikroglobulin; Cα, Cβ = konstante Domänen des T-Zellrezeptors; Vα, Vβ = variable Domänen des T-Zellrezeptors; α1, α2, α3 = Bezeichnung der Domänen von HLA-Klasse-I; α1, α2, β1, β2 = Bezeichnung der Domänen von HLA-Klasse-II.

### 1.1.2.2 CD4<sup>+</sup> regulatorische T-Lymphozyten

Im Gegensatz zu den CD8-exprimierenden zytotoxischen T-Zellen erkennen die CD4<sup>+</sup> Helfer-T-Zellen Peptide, die extrazellulärer Herkunft sind, jedoch intrazellulär prozessiert wurden. Diese extrazellulären Peptidantigene stammen oft aus Bakterien oder Parasiten, die durch Endozytose oder Pinozytose in die Zelle aufgenommen worden sind, und werden von den Zielzellen über HLA-Klasse-II präsentiert und so von den CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt. Neben dem TCR ist auch hier ein kostimulatorisches Molekül beteiligt. CD4 bindet an die β2-Domäne von HLA-Klasse-II auf der Zielzelle [Leahy, 1995] (Abbildung 1.2).

Regulatorische T-Zellen (T regs) machen in gesunden Individuen einen Anteil von 5 bis 10 % von der Gesamtheit der peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus [Zou, 2006] und lassen sich in zwei Subgruppen unterteilen, die natürlich auftretenden (klassischen) und die induzierbaren (adaptiven) regulatorischen T-Zellen. Klassische regulatorische T-Zellen zeichnen sich durch die hohe konstitutive Expression von CD25 (IL-2-Rezeptor-α-Kette,



IL-2R $\alpha$ ) aus. Da die hoch regulierte CD25-Expression aber auch ein Kennzeichen für aktivierte CD8- und CD4-positive Effektor-T-Zellen ist, bietet sich der Transkriptionsfaktor FoxP3 („*Forkhead box P3*“) als ein verlässlicherer intrazellulärer Marker an. Dieser ist für die Entwicklung und Funktion von klassischen T regs unerlässlich [Zou, 2006] und findet sich außerdem fast ausschließlich in der CD25<sup>high</sup> Subpopulation der humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Da CD25 direkt mit dem Interleukin (IL)-2-Signalweg verknüpft ist, lässt die soeben erwähnte Tatsache darauf schließen, dass IL-2 insbesondere für regulatorische T-Zellen eine kritische Rolle spielt. So ist IL-2 in die Aufrechterhaltung der Expression von Genen involviert, die Zellwachstum und Stoffwechsel regulieren, wie z. B. FoxP3. Damit ist IL-2 für die Erhaltung der suppressorischen Fähigkeit und peripheren Homeostase von T regs unerlässlich [Fontenot *et al*, 2005].

Die natürlich auftretenden T regs entwickeln sich im Thymus direkt aus den CD4<sup>+</sup> T-Zellvorläufern und exprimieren von Beginn an FoxP3. Die induzierbaren T regs entstehen unter bestimmten Bedingungen (zum Beispiel suboptimale Antigenstimulation) aus konventionellen FoxP3-negativen Helfer-T-Zellen [Becker *et al*, 2006] und können dann in der Peripherie in FoxP3<sup>+</sup> natürliche T regs oder – je nach Zytokinmilieu – in IL-12-produzierende Th (engl. *T helper type*) 1-, IL-4-produzierende Th2- und TGF- $\beta$ -produzierende Th3- oder die IL-10-produzierenden Tr1-Zellen ausdifferenzieren [Taams *et al*, 2006]. Abhängig von Peptidaffinität, Expressionsniveau und Zytokinprofil kann das gleiche Peptidantigen damit offenbar sowohl CD4<sup>+</sup> Helfer-T-Zellen als auch regulatorische T-Zellen stimulieren. Bei der Regulation der supprimierenden Effekte von T regs spielen TLRs („*toll-like receptors*“) und ihre Liganden eine wichtige Rolle [Wang, 2006].

T regs stellen eine T-Zellpopulation dar, die die Funktion von Immuneffektoren der natürlichen wie auch der erworbenen Immunität unterdrücken und damit eine Immunantwort unterbinden kann. Auf diese Weise spielen sie zum einen eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung von immunologischer Toleranz gegen „Selbst“-Antigene zur Verhinderung von Autoimmunerkrankungen. Zum anderen tragen sie mit dieser Funktion auch zur Toleranz von bösartig verändertem „Selbst“-Gewebe bei, was als „tumorspezifische T-Zellenergie“ bezeichnet wird [Zhou *et al*, 2006]. Dadurch können Immunreaktionen gegen Tumoren beeinträchtigt oder gar unterbunden werden, was zum „*immune escape*“ von Tumoren führen kann [Becker *et al*, 2006; Zou, 2006]. So konnte beim Ovarialkarzinom eine direkte Verbindung zwischen T regs und beeinträchtigter tumorspezifischer T-Zellimmunität aufgezeigt werden [Curiel *et al*, 2004; Woo *et al*, 2002]. Zusätzlich wurde bei verschiedenen Tumorarten eine erhöhte Frequenz an CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T regs entweder im Tumor selbst oder im peripheren Blut von Tumorpatienten gefunden [Cesana *et al*, 2006; Wolf *et al*, 2003; Liyanage *et al*, 2002; Woo *et al*, 2002].

Tumoren haben die Fähigkeit, durch unterschiedliche Mechanismen gezielt die

Entwicklung von immunsupprimierenden T regs zu induzieren [Zhou *et al*, 2006]. Hierbei spielen die Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und TGF- $\beta$  oder Chemokinen wie CCL22 eine bedeutsame Rolle [Becker *et al*, 2006; Knutson *et al*, 2006; Zou, 2006]. Regulatorische T-Zellen besitzen mindestens zwei Eigenschaften, um die Überwachung durch das Immunsystem außer Kraft zu setzen und damit tumorspezifische Immunität zu unterbinden. Einerseits haben sie die Fähigkeit, Immunreaktionen gegen tumorspezifische Antigene in der Peripherie zu inhibieren, indem ausgeschüttete Suppressor-Zytokine Effektorzellen hemmen. Andererseits können sie tumorinfiltrierende Effektor-T-Zellen durch zellkontaktinduzierte Prozesse neutralisieren [Knutson *et al*, 2006; Zou, 2006]. Die oben erwähnten tumorinduzierten T regs zeigen ähnliche Eigenschaften wie die klassischen natürlich auftretenden T regs und nutzen *in vitro* vermutlich gleiche supprimierende Mechanismen [Zhou *et al*, 2006].

Sämtliche der beschriebenen Eigenschaften von T regs machen klar, dass diese Zellen mit ihren vielfältigen Mechanismen einen interessanten Ansatzpunkt für die Entwicklung von Tumor-Immuntherapien darstellen. Als Beispiel für einen solchen Ansatz sei an dieser Stelle eine selektive Depletion oder Inaktivierung dieser Zellen genannt, die mit der Induktion von funktionellen Effektor-Immunzellen und einer verbesserten tumorspezifischen Immunität einhergehen sollte.

### **1.1.2.3 Nicht-klassische T-Lymphozyten**

Neben den klassischen CD8-positiven T-Lymphozyten, die ihre „*Target*“-Zellen in Assoziation mit HLA-Klasse-I erkennen, existieren auch nicht-klassische T-Zellen, die Zielzellen über nicht-HLA-restringierte Erkennungsmechanismen lysieren. Zu diesen Zellen zählen die lymphokinaktivierten Killerzellen (LAK, engl. *lymphokine-activated killer cells*), zytokininduzierten Killerzellen (CIK, engl. *cytokine-induced killer cells*) und NK (engl. *natural killer*)-ähnlichen T-Zellen (NK-T-Zellen).

LAK-Zellen setzen sich sowohl aus CD3-negativen NK-Zellen als auch aus CD3-positiven T-Zellen zusammen und können aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs, engl. *peripheral blood mononuclear cells*) in Anwesenheit von hohen Dosen IL-2 generiert und angereichert werden. Sie haben die Eigenschaft, ihre Zielzellen über nicht-HLA-restringierte Mechanismen zu erkennen und zu lysieren und sind damit nicht spezifisch für einzelne Tumorentitäten. Sie zeichnen sich demzufolge auch dadurch aus, dass sie – ähnlich wie NK-Zellen – HLA-negative Zelllinien wie das NK-Zell-„*Target*“ K562 und Daudi erkennen und lysieren können, durch eine verstärkte Expression von HLA-Molekülen auf der Oberfläche der Zielzellen inhibiert und durch eine Blockade der HLA-Moleküle mittels

monoklonalen Antikörpern aktiviert werden [Falk *et al*, 2002]. Mit diesen Eigenschaften unterscheiden sich LAK-Zellen von klassischen T-Zellen, die ihre „*Target*“-Zellen über eine Interaktion des TCR mit peptidantigentragenden HLA-Molekülen erkennen und umgekehrt durch eine Blockade dieser Kontaktstelle in ihrer lytischen Kapazität gehemmt werden. Weiterhin unterscheiden sich diese Zellen von NK-Zellen darin, dass die von NK-Zellen bekannten inhibitorischen Rezeptoren (KIRs, engl. *killer inhibitory receptors*) auf LAK-Zellen offenbar nicht exprimiert werden [Falk *et al*, 2002].

CIK-Zellen stellen eine weitere Population von Immuneffektorzellen dar, die neben dem T-Zellmarker CD3 den NK-Zellmarker CD56 koexprimieren und eine nicht-HLA-restringierte Lyse ihrer Zielzellen aufweisen [Linn *et al*, 2002]. Damit einhergehend haben auch sie – wie die zuvor beschriebenen LAK-Zellen – die Fähigkeit, HLA-negative „*Targets*“ wie K562 zu erkennen und zu lysieren. Sie zeichnen sich weiterhin dadurch aus, dass sie eine höhere Zytotoxizität und eine stärkere Proliferation als LAK-Zellen zeigen [Wang *et al*, 2002; Marten *et al*, 2001]. Hierfür benötigen sie kein vorangegangenes „*Priming*“ durch wiederholten Antigenkontakt [Verneris *et al*, 2002]. Mit der Erkennung HLA-positiver Leukämie-Linien neben HLA-negativen „*Targets*“ und der Expression des T-Zellmarkers CD3 liegen klare Unterschiede im Vergleich zu reinen NK-Populationen vor. Offenbar beinhaltet eine CIK-Zellpopulation sowohl typische T-Zellen (CD3<sup>+</sup> CD56<sup>-</sup>) als auch NK-Zellen (CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>) und NK-ähnliche T-Zellen (CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>) [Linn *et al*, 2002; Marten *et al*, 2001].

Klassische NK-T-Zellen werden charakterisiert durch Expression einer einzelnen invarianten TCR  $\alpha$ -Kette (V $\alpha$ 14), Erkennung ihrer Antigene in Verbindung mit dem nicht-klassischen HLA-Molekül CD1 und Produktion von IL-4 und IFN- $\gamma$  nach Antigenstimulation. Diese Zellen tragen nur in seltenen Fällen den für zytotoxische T-Zellen typischen Marker CD8 [Verneris *et al*, 2002]. Es handelt sich bei diesem Zelltyp also eher um CD4-positive Helfer-T-Zellen als um CD8-positive CTLs.

## **1.2 Krebs und das Immunsystem**

### **1.2.1 Definition von Krebs**

Krebszellen zeichnen sich unter anderem dadurch aus, dass sie unkontrolliert proliferieren. Dieses unkontrollierte Wachstum unterscheidet sie von gesunden Zellen. Alle Zellen durchlaufen ab ihrer Entstehung bis zu ihrer ersten Teilung den Zellteilungszyklus (Mitose). Die einzelnen Phasen der Mitose sind bei gesunden Zellen

durch regulatorische Proteine streng kontrolliert, die entscheiden, ob und wann eine Zelle in die nächste Zellteilungsphase eintritt. Eine solche Kontrolle fehlt bei Krebszellen, weshalb diese als entartet bezeichnet werden.

Externe oder interne Einflüsse führen dazu, dass fortlaufend Mutationen an der DNA entstehen, die in der Regel durch Reparaturmechanismen der Zelle ausgeglichen werden. In manchen Fällen bleiben diese Mutationen jedoch unerkannt und werden bei der Mitose an die Tochterzellen weiter gegeben. Falls eine solche Mutation in der kodierenden DNA für eines der zellteilungsregulierenden Proteine auftritt, kann es zu einem fehlerhaften Ablauf der Mitose kommen, und die Zellteilung wird unkontrolliert vorangetrieben. Das Protein p53 gehört zu den am besten untersuchten Proteinen der Klasse der Tumorsuppressorgene [Kim & Deppert, 2003]. Es reguliert normalerweise die DNA-Reparaturmechanismen oder leitet den induzierten Zelltod, die Apoptose, ein. Bei etwa 50 % aller Tumoren ist das für p53 kodierende Gen durch Mutation geschädigt [Lutz & Nowakowska-Swirta, 2002]. Als weiteres Tumorsuppressorgen ist der VHL (von-Hippel-Lindau)-Genlocus bekannt. In bis zu 95 % der Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom liegt eine Veränderung dieses Genlocus vor, die zur Heraufregulation von Wachstumsfaktoren führt, die mit Angiogenese assoziiert sind, und so zum Tumorwachstum beiträgt [Motzer & Bukowski, 2006]. Onkogene wie zum Beispiel c-myc [Yamaguchi *et al*, 2003; Bouchard *et al*, 1998] hingegen regen den Zellteilungszyklus direkt an, was im Falle einer Überexpression ebenfalls das Auftreten von Krebs begünstigen kann.

### 1.2.2 Das Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom (RCC, engl. *renal cell carcinoma*) tritt bei 0,005 bis 0,01 % der Bevölkerung der westlichen Hemisphäre auf (5-10 Neuerkrankungen pro Jahr und 100.000 Einwohner) und stellt damit den häufigsten bösartigen Tumor der Niere dar [Chow *et al*, 1999]. Behandlungsansätze für Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom sind hauptsächlich deswegen limitiert, weil diese Tumorerkrankung weitgehend resistent gegenüber konventionellen Verfahren der Radiochemotherapie ist [Motzer *et al*, 1997]. Die Fünfjahresüberlebenschance liegt hierbei unter 5 % [Kath *et al*, 1999; Motzer *et al*, 1999]. Die erhöhte Inzidenz von Nierenzellkarzinomen unter immunsuppressiver Therapie nach Nierentransplantationen [Schmidt *et al*, 1995], das Auftreten spontaner Tumorremissionen in bis zu 6 % der Erkrankten [Gleave *et al*, 1998] und partielle oder vollständige Tumorremissionen nach Immuntherapien unter Gabe von IL-2 und IFN- $\alpha$  in 10 bis 25 % der behandelten Patienten [Fisher *et al*, 2000; Negrier *et al*,

1998; Rosenberg *et al*, 1994] führten zu der Auffassung, dass das Immunsystem bei der Bekämpfung von Nierenzellkarzinomen eine tragende Rolle spielt. Die Wirkungsweise von IL-2 und IFN- $\alpha$  bei einer solchen zytokinbasierten Immuntherapie ist hierbei nicht zytostatisch im klassischen Sinne. IL-2 ist ein Wachstumsfaktor für T-Lymphozyten [Lotze, 1992], wohingegen IFN- $\alpha$  einen anti-proliferativen Effekt besitzt und hauptsächlich zu einer verstärkten Expression der HLA-Moleküle auf den Tumorzellen und damit zu einer verbesserten Antigenpräsentation führt [Glaspy, 2002].

Die Feststellung, dass es sich beim Nierenzellkarzinom um einen immunogenen Tumor handelt, wird auch von einigen experimentellen Beobachtungen gestützt. Erstens werden Nierenzellkarzinome häufig von NK- und T-Lymphozyten infiltriert [Schleypen *et al*, 2003; Finke *et al*, 1990; Belldegrun *et al*, 1988]. Zweitens führt die Stimulation von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs, engl. *tumor-infiltrating lymphocytes*) mit autologen Tumorzellen häufig zur Generierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die eine HLA-Klasse-I-restringierte antitumorale Reaktivität zeigen [Schendel *et al*, 1993]. Drittens konnten mithilfe von aus Patientenblut oder Tumorgewebe expandierten CTLs oder TILs mehrere Peptidantigene des Nierenzellkarzinoms identifiziert werden (Abschnitt 1.2.4).

Da die Radiochemotherapie beim Nierenzellkarzinom weitgehend wirkungslos ist, müssen neue Therapieansätze entwickelt werden. Angeregt durch den Erfolg der IL-2- und IFN- $\alpha$ -basierten Immuntherapie wurde jüngst die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (allo-HSCT, engl. *allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*) oder auch allogene Zelltherapie als Therapieform etabliert.

### 1.2.3 Allogene Zelltherapie

Die allogene Blutstammzelltransplantation zielt darauf ab, die autologe Immuntoleranz gegenüber der bösartigen Erkrankung des Patienten zu brechen. Diese Behandlungsform begründet sich auf den so genannten Transplantat-gegen-Tumor (GvT, engl. *graft-versus-tumor*)-Effekt, der – ähnlich dem Transplantat-gegen-Leukämie (GvL, engl. *graft-versus-leukemia*)-Effekt – primär auf der antitumoralen Reaktivität von transplantierten allogenen Spender-T-Lymphozyten beruht [Horowitz *et al*, 1990]. Bei Patienten mit chemorefraktärer Leukämie wird die Behandlung durch allogene Blutstammzelltransplantation bereits seit mehr als 30 Jahren erfolgreich eingesetzt [Weiden *et al*, 1981] und kann die Leukämie-Erkrankung ausheilen. Viele Arbeitsgruppen beschäftigen sich bereits damit, diesen therapeutischen Ansatz auf solide Tumoren zu übertragen, wobei der Fokus auf den immunogenen Tumorentitäten liegt. So wurden nach vorangehender Konditionierung der Patienten durch eine Chemotherapie von reduzierter Intensität (Mini-Transplantation)

allogene Blutstammzellen und PBMCs eines verwandten oder unverwandten Spenders mit passendem Gewebetyp (HLA-Typ) transplantiert. Während die erzielten Ergebnisse beim bösartigen Melanom enttäuschend waren [Childs *et al*, 2002], wurden bei Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom Remissionsraten von 20 bis 50 % beobachtet [Bregni *et al*, 2002; Rini *et al*, 2002; Childs *et al*, 2000]. Die überwiegende Mehrheit der behandelten Patienten war hierbei refraktär gegenüber vorangegangener Zytokintherapie. Diese Tatsache führte zu der Hypothese, dass die Tumorregressionen durch allogene T-Lymphozyten vermittelt wurden und nicht durch die im Rahmen der Transplantationsprozedur erhöhten Zytokinspiegel erklärt werden können. Weitere klinische und experimentelle Beobachtungen bestätigen diese Hypothese: Der beschriebene GvT-Effekt trat häufig mit der akuten Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (GvHD, engl. *graft-versus-host disease*) auf. Die GvHD beruht auf einer unselektiven Generierung eines breiten Spektrums an alloreaktiven T-Zellen der unterschiedlichsten Spezifitäten und trägt in erheblichem Maße zu einer hohen Morbidität und Mortalität bei transplantierten Nierenzellkarzinom-Patienten bei. Die RCC-Remissionen traten vermehrt nach GvHD auf, als die medikamentöse Immunsuppression bereits reduziert wurde [Childs *et al*, 2000]. Außerdem wiesen die auf die Therapie ansprechenden RCC-Patienten einen vollständigen Spender-T-Zellchimärismus auf [Childs *et al*, 2000]. Klinisch beobachtete Tumorremissionen nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation waren in der Regel verbunden mit einer Vermehrung von IFN- $\gamma$ -produzierenden CD8-positiven T-Zellen im peripheren Blut der Patienten [Harlin *et al*, 2004]. Eine weitere Studie beschrieb die Isolierung von CD8<sup>+</sup> CTL-Klonen aus Posttransplantations-PBMCs, die Minor-Histokompatibilitätsantigene (Minor-H-Antigene) auf RCC-Zellen erkennen [Tykodi *et al*, 2004]. Nichtsdestotrotz konnten die genauen Effektormechanismen, die zur Tumorabstoßung nach allogener HSCT führten, bisher nicht identifiziert werden.

Optimal wäre es, wenn die allogene Zelltherapie beim Nierenzellkarzinom einen selektiven GvT-Effekt ohne GvHD induzieren würde. Dies setzt jedoch voraus, dass die von T-Lymphozyten erkannten Tumorantigene identifiziert werden. Mithilfe autologer tumorreaktiver T-Lymphozyten gelang es bisher selten, nierenzellkarzinomspezifische Zielantigene zu charakterisieren, da *in vitro* häufig kein stabiles Wachstum der T-Zellen beobachtet wird. Dies liegt möglicherweise darin begründet, dass das T-Zellrepertoire der Patienten durch immunsupprimierende Mechanismen des Tumors wie Toleranz und Anergisierung, aber auch durch vorangegangene therapeutische Maßnahmen kompromittiert ist [Uzzo *et al*, 1999; Faure *et al*, 1998; Reichert *et al*, 1998; Kolenko *et al*, 1997].

### 1.2.4 Identifizierung und Klassifizierung von Tumorantigenen beim Nierenzellkarzinom

Es konnten in einzelnen Fällen autologe CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus dem Blut oder dem Tumorgewebe von Nierenzellkarzinom-Patienten isoliert werden, die die Fähigkeit haben, autologe Tumorzellen in Assoziation mit HLA-Klasse-I-Molekülen zu erkennen [Schendel *et al*, 1997]. Allerdings wurden bisher im Vergleich zum Melanom nur wenige nierenzellkarzinomspezifische Antigene identifiziert.

Das erstbeschriebene RCC-Antigen wurde mit RAGE bezeichnet und ist ein strukturell nicht verändertes Tumorantigen, welches für mindestens zwei Epitope kodiert, die von autologen CTLs über HLA-B7 bzw. HLA-B8 erkannt werden [Flad *et al*, 1998; Gaugler *et al*, 1996]. RAGE ist in 2 % der Nierenzellkarzinome und 5 % der Melanome exprimiert [Gaugler *et al*, 1996]. Die Retina ist das einzige nicht-maligne Gewebe, welches RAGE-kodierende Gensequenzen enthält.

Neben CTLs, die ausschließlich mit autologen Tumorzellen reagieren, wurden bei früheren Untersuchungen auch CTLs isoliert, die zusätzlich HLA-kompatible allogene Nierenzellkarzinome [Schendel *et al*, 1993] und gesunde Nierenzellen [Jantzer & Schendel, 1998; Bernhard *et al*, 1994] lysieren. Daher wird vermutet, dass Nierenzellkarzinome auch Differenzierungsantigene exprimieren, die durch autologe T-Zellen erkannt werden können. Diese Zielstrukturen konnten bisher jedoch nicht identifiziert werden.

Weitere Peptidantigene wurden beim Nierenzellkarzinom beschrieben, deren Immunogenität in einer veränderten Transkription begründet liegt. Beispiele hierfür sind RU2 durch „*antisense*“-Transkription [Van den Eynde *et al*, 1999] und Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (M-CSF, engl. *macrophage-colony stimulating factor*) durch einen alternativen offenen Leserahmen [Probst-Kepper *et al*, 2001].

Ähnlich wie bei Mamma- und Ovarialkarzinomen wird auch bei Nierenzellkarzinomen das Onkogen HER-2/neu überexprimiert. In HER-2/neu wurden durch „Reverse Immunologie“-Verfahren Peptide identifiziert, mit denen aus PBMCs von Patienten und gesunden Spendern RCC-reaktive CTLs generiert werden können [Brossart *et al*, 1998]. Ein HLA-A\*0201-restringiertes T-Zellepitop aus dem in 85 % der Nierenzellkarzinome exprimierten Antigen G250 wurde ebenfalls über „Reverse Immunologie“ gefunden [Vissers *et al*, 1999].

Die Epitope, die durch expandierte autologe CTLs oder TILs definiert wurden, stammen entweder aus nicht-mutierten Proteinen (z. B. RAGE-1 [Gaugler *et al*, 1996]) oder aus punktmutierten (z. B. mutiertes HLA-A2-Molekül [Brandle *et al*, 1996] oder HSP70-2

[Gaudin *et al*, 1999]) oder alternativ prozessierten Genprodukten (z. B. M-CSF [Probst-Kepper *et al*, 2001] oder FGF-5 [Hanada *et al*, 2004]). Die Anwendung von Strategien der „Reversen Immunologie“ führte zur Vorhersage von HLA-Klasse-I- und -Klasse-II-bindenden Peptidpitopen aus Proteinen, die häufig in RCC-Tumoren exprimiert werden. Mehrere vorhergesagte Epitope wurden erfolgreich für die *in vitro* Stimulation von RCC-reaktiven CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen eingesetzt (G250 [Vissers *et al*, 2002; Vissers *et al*, 1999], PRAME [Kessler *et al*, 2001], MAGE-6 [Tatsumi *et al*, 2003b; Tatsumi *et al*, 2002], EphA2 [Tatsumi *et al*, 2003a]).

### 1.2.5 Antigen-spezifische Immuntherapie

Die Vakzinierung mit Tumorantigenen zielt auf die Induktion einer beständigen schützenden tumorspezifischen T-Zellantwort ab. Es existieren zwei grundlegende Formen der Vakzinierung [Sinkovics & Horvath, 2000]. Zum einen kann man für die Vakzinierung komplette Tumorzellen, Tumorlysate oder Hybridzellen aus Tumorzellen und dendritischen Zellen einsetzen. Dies hat den Vorteil, dass im Wesentlichen alle relevanten Tumorantigene enthalten sind. Ebenso ist die vorangehende Identifizierung von relevanten Tumorantigenen keine Voraussetzung. Auf der anderen Seite ist es auf diese Weise schwierig, mögliche therapeutische Effekte auf die Generierung von Immunität gegen bestimmte Tumorantigene zurückzuführen. Dies limitiert die Möglichkeit, die Tumorstoffe in ihrer Effektivität zu optimieren.

Im Gegensatz zur Impfung mit natürlichem Tumormaterial basieren antigen-spezifische Vakzinierungsstrategien auf molekular identifizierten Tumorantigenen in Form von Peptiden, Proteinen oder in genetischen Vektoren exprimierten Epitopen. Hierbei besteht die Möglichkeit, impfstoffinduzierte Immunantworten systematisch zu analysieren und mithilfe dieser Befunde eine Optimierung der Impfstrategie zu erreichen. Daher ist die Identifizierung von T-zelldefinierten Tumorantigenen von großer Bedeutung.

Klinische Phase-I-Studien zur Vakzinierung von Tumorpatienten mit T-Zellepitopen führten zu keinen ernsthaften Nebenwirkungen bei den geimpften Patienten. Signifikante Tumorregressionen wurden jedoch nur in einer Minderheit der an den Studien teilnehmenden Patienten beobachtet. Weiterhin wurde keine überzeugende Korrelation zwischen klinisch fassbaren Tumorrückbildungen und einer im Blut nachweisbaren Immunantwort gegen das Vakzineantigen reproduzierbar nachgewiesen.



### 1.2.6 Antigenidentifizierung mithilfe von alloreaktiven T-Lymphozyten

Tumorreaktive T-Zellen, die für die Identifizierung von Nierenzellkarzinom-Antigenen benötigt werden, wurden bisher aus PBMCs oder aus tumorinfiltrierenden Lymphozyten von Nierenzellkarzinom-Patienten isoliert [Bernhard *et al*, 1996; Bernhard *et al*, 1994; Schendel *et al*, 1993]. Verwendet man autologe T-Zellen zur Antigen suche, muss davon ausgegangen werden, dass die natürliche Vielfalt des T-Zellrepertoires durch den Einfluss des Tumors limitiert sein kann [Uzzo *et al*, 1999; Reichert *et al*, 1998; Kolenko *et al*, 1997]. Bei der Generierung von tumorreaktiven T-Zellen aus allogenen CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten von gesunden Spendern ist prinzipiell eine solche Beeinträchtigung nicht zu erwarten. Alloreaktive T-Zellen können auf ihren „*Target*“-Zellen Allopeptide in Verbindung mit „Fremd“-HLA-Komplexen erkennen [Moris *et al*, 2001; Rotzschke *et al*, 1991]. Es existieren auch alloreaktive T-Zellen, die gegen nicht mit Peptidliganden beladene „Fremd“-HLA-Moleküle reagieren [Smith *et al*, 1997]. Aufgrund ihres Erkennungsmusters gegenüber endogenen Allopeptiden können allo-HLA-restringierte T-Zellen in verschiedene Gruppen eingeteilt werden [Wang *et al*, 1998]. So können durch Stimulation mit tumorassoziierten Peptiden generierte alloreaktive CTLs ein hauptsächlich tumorspezifisches Reaktionsmuster aufweisen [Dolstra *et al*, 1999; Sadovnikova *et al*, 1998]. Alloreaktive T-Lymphozyten sollten demzufolge für immuntherapeutische Strategien zur Behandlung von Tumorkrankheiten anwendbar sein [Munz *et al*, 1999; Stauss, 1999]. Bei Leukämiepatienten sind alloreaktive T-Zellen wichtige Mediatoren der „*graft-versus-host*“ (GvH)-Erkrankung und des „*graft-versus-leukemia*“ (GvL)-Effekts nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation [Nash & Storb, 1996]. Daher spielt Alloreaktivität eine bedeutsame Rolle in der Transplantationsmedizin. Minor-Histokompatibilitätsantigene wurden als Zielstrukturen alloreaktiver T-Zellen bei der Transplantation von Stammzellen aus einem HLA-identischen Geschwisterspender identifiziert. Diese Peptidliganden leiten sich aus genetischen Polymorphismen zwischen Geschwistern ab und werden gewebespezifisch oder auch ubiquitär exprimiert [Goulmy, 1997b].

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Das Nierenzellkarzinom (RCC) zeigt eine weitgehende Resistenz gegenüber der konventionellen Radiochemotherapie. Mit der allogenen Blutstammzelltransplantation wurde jüngst eine Behandlungsform entwickelt, die signifikante Rückbildungen der Tumorerkrankung induzieren kann. Wesentliche Werkzeuge dieser Tumorremissionen sind alloreaktive T-Zellen des Stammzellspenders. In präklinischen Untersuchungen an autologen Blutlymphozyten von Nierenzellkarzinom-Patienten wurde in einzelnen Fällen gezeigt, dass CD8-positive tumorreaktive zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) *in vitro* generiert, jedoch nur unzureichend expandiert werden können. Dies liegt vermutlich an der tumorinduzierten Anergie und peripheren Toleranz antitumoraler Lymphozyten in Nierenzellkarzinom-Patienten begründet. Um diesen postulierten immunsuppressiven Mechanismus zu umgehen, sollten in der vorliegenden Arbeit erstmals Blutlymphozyten von allogenen HLA-identischen gesunden Geschwisterspendern für die *in vitro*-Generierung und Expansion von tumorreaktiven CTLs verwendet werden.

Grundlage für die Generierung und Charakterisierung von RCC-reaktiven T-Zellen ist die Verfügbarkeit von Nierenzellkarzinom-Zelllinien mit Langzeit-Wachstum *in vitro*. Stabil wachsende Tumorzelllinien können nur von einer Minderheit der Patienten gewonnen werden. In der vorliegenden Arbeit sollten Tumorzelllinien aus primärem Nierenzellkarzinom-Gewebe von Patienten generiert werden, deren Tumoren durch Nephrektomie entfernt werden mussten. Bei Patienten mit einer in Zellkultur stabil wachsenden RCC-Zelllinie und mit einem verfügbaren HLA-Klasse-I-identischen Geschwisterspender sollten *in vitro* das proliferative und tumorreaktive Potential autologer und allogener T-Lymphozyten vergleichend überprüft und analysiert werden. In insgesamt vier Patienten/Geschwisterspender-Paaren sollten in gemischten Lymphozyten-Tumorzell-Kulturen (MLTCs, engl. *mixed lymphocyte tumor cell culture*) Blutlymphozyten von Patienten und gesunden Geschwisterspendern mit den entsprechenden Tumorzellen stimuliert und tumorreaktive CTLs expandiert werden. Wenn möglich, sollten aus den Massenkulturen tumorreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellklone generiert und charakterisiert werden. Diese klonalen T-Zellen sollten auf ihre Reaktivität gegen RCC, gesunde Nierenzellen und hämatopoetische Zielzellen von Patient und Geschwisterspender getestet werden. Anhand der gewonnenen Ergebnisse sollten Rückschlüsse auf das tumorreaktive Potential von autologen und allogenen T-Zellen gezogen werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 *Material*

#### 2.1.1 Geräte

Autoklaven	KSG Sterilisatoren (Olching) Systec V-150, Systec GmbH (Wettenberg)
Automatic Gamma Counter <sup>137</sup> Cäsiumquelle	Cobra, Packard (Dreieich) Gammacell 2000, Molsgaard Medical (Ganlose, DK)
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Binder (Tuttlingen) Heraeus (Langenselbold)
Durchflusszytometer	EPICS ALTRA™ mit Software EXPO™, Beckman Coulter (Krefeld) FACSCanto™ mit Software FACSDiva™, BD Biosciences (Heidelberg) FACSCalibur™ mit Software Cell Quest Pro™, BD Biosciences (Heidelberg)
Eismaschine	UBE50/35, Ziegra (Isernhagen)
Feinwaage	Precisa, PAG OerlikanAG, (Zürich, CH)
Gefrierschrank -80 °C	Hera freeze, Heraeus/Kendro (Langenselbold)
Kühl- und Gefrierkombinationen 4 °C, -20 °C	Heraeus/Kendro (Langenselbold) Liebherr (Ochsenhausen) Bosch (Stuttgart)
Laser Scanning Mikroskop	LSM 510UV, Zeiss (Jena)
Magnetrührer mit Heizplatte	IKAMAG RET, Janke & Kunkel (Staufen)
Peristaltik-Pumpe (LKB-Pump P-1)	Pharmacia (Uppsala, S)
Phasenkontrastmikroskop für Zellkultur	Axiovert 25, Zeiss (Jena)
pH-Meter	GC842, Schott (Mainz)
Pipettierhilfe	PipetBoy, IBS Integra Biosciences, VWR (Darmstadt)
Pipetten 1-10 µl Pipette Pipetman 2-20µl, 20-200µl, 200-1000µl Mehrkanalpipetten 5-50µl, 25-200µl	Eppendorf (Hamburg) Gilson (Villiers-le-Bel, F) Dunn Labortechnik GmbH (Asbach)
Sterile Werkbank	Nuaire/Zapf-Instruments (Sarstedt) Antair BSK, Schrader (Göttingen)
Stickstoff-Kryo-Bank	XLC 1370, MVE Europe (Solingen) Air liquide Espace 331, Tec Lab (Königstein)

Stickstoff-Tank	Taylor-Wharton XL-180, Tec Lab (Königstein)
Vortex	MS2 Minishaker IKA®, IKA (Staufen)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Wasserdeionisierungsanlage	Milli-Q plus, Millipore (Eschborn) Purelab Classic ELGA, Elga-Berkefeld GmbH (Celle)
Zentrifugen	Rotixa/RP, Hettich (Tuttlingen) Megafuge 1.0R, Kendro-Heraeus (Langenselbold)

## 2.1.2 Plastikwaren

Bechergläser, Kunststoff	Vitlab (Seeheim-Jugenheim)
Einfrierboxen	Nalge Nunc (Wiesbaden)
Einfrier-Röhrchen	Cryotube, 1,8 ml, Nunc (Wiesbaden)
Einfrier-Röhrchenständer	Roth (Karlsruhe)
Einmalpipetten, steril 1, 2, 5, 10, 25 und 50 ml	Greiner (Nürtingen); Costar, Corning inc. (New York, USA)
Eisbad	Neolab (Heidelberg)
FACS-Röhrchen zur Durchflusszytometrie	Sarstedt (Nümbrecht); BD Falcon, BD Biosciences Europe (Erembodegem, B)
FACS-Röhrchenständer	Roth (Karlsruhe)
Gewebekulturplatten 24-, 48- und 96-Loch- Gewebekulturplatten	Greiner (Nürtingen)
LeucoSep-Röhrchen 50 ml	Greiner (Nürtingen)
Mikrotiterplatten	Flach-, Rund- und V-Bodenplatten im 96- Lochformat, Greiner (Nürtingen)
Petrischalen Ø 94 mm, 60 mm, 35 mm	Greiner (Nürtingen)
Pipettenspitzen	Starlab (Ahrensburg); ART1000, ART20E, ART10reach, MBP (San Diego, CA, USA); Biosphere Filter Tips, Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße (Eppis) 500, 1500 und 2000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Spritzen 10, 20 und 50 ml Einmalspritzen	Braun (Melsungen)
Sterilfilter	FP30/0,2 CA-S, FP30/0,45 CA-S, FP30/1,2 CA-S, Schleicher & Schuell (Dassel); Steritop™, Millipore (Eschborn); Sartolab™-P20, Sartorius (Göttingen)

Zellkulturflaschen 25, 80 und 175 cm <sup>2</sup> Kulturfläche	Greiner (Nürtingen)
Zellkultur-Röhrchen 15 ml und 50 ml	Greiner-Bio-One (Frickenhausen)
Zellkultur-Röhrchenständer	Roth (Karlsruhe)
Zytotox-Röhrchen 0,6 ml	Greiner-Bio-One (Frickenhausen)

### 2.1.3 Glaswaren

Duran-Glasflaschen 500, 1000, 2000 und 5000 ml	Schott (Mainz)
Zählkammern	Fuchs-Rosenthal, Schreck (Hofheim)

### 2.1.4 Chemikalien

AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol)-Tabletten	Sigma (Deisenhofen)
Albumin, bovine serum	Sigma (Deisenhofen)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Concanamycin A (CMA)	Calbiochem, Merck (Darmstadt)
N,N-Dimethylformamid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck (Darmstadt)
EDTA (Ethylendiamin-tetraessigsäure)	Sigma (Deisenhofen)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Formaldehyd	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	Fluka (Deisenhofen)
Lymphozyten-Separationsmedium	PAA (Pasching, A)
PBS (phosphate-buffered saline), flüssig	Gibco BRL (Karlsruhe)
PBS, Instamed-Pulver	Biochrom KG (Berlin)
PolyFect™ Transfektionsreagenz	Qiagen (Hilden)
Trypanblau	Merck (Darmstadt)
Tween20 (Detergens)	Merck-Schuchardt (Hohenbrunn)
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck (Darmstadt)

### 2.1.5 Substanzen für die Zellkultur

AIM-V™ Medium	Gibco BRL (Karlsruhe)
CSA (Cyclosporin A)	Apotheke des Klinikums

EGF (epidermaler Wachstumsfaktor)	Sigma (Deisenhofen)
FCS (fötales Kälberserum)	PAA (Pasching, A)
Fluconazol	Ratiopharm (Ulm)
Geneticin (G418)	Gibco BRL (Karlsruhe)
Gentamicin	Ratiopharm (Ulm)
HBSS	Gibco BRL (Karlsruhe)
Hydrokortison	Sigma (Deisenhofen)
Hygromycin B	Gibco BRL (Karlsruhe)
L-Glutamin	Gibco BRL (Karlsruhe)
Heparin (Liquemin)	Roche (Grenzach-Wyhlen)
Humanalbumin	Octapharm (Langenfeld)
Insulin	Sigma (Deisenhofen)
RPMI 1640, flüssig	Gibco BRL (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL (Karlsruhe)
PHA (Phytohämagglutinin)	Murex Biotech Ltd. (Kent, UK)
Transferrin (human)	Sigma (Deisenhofen)
Trypsin-EDTA	Gibco BRL (Karlsruhe)
X-VIVO15 T-Zellkulturmedium	Biowhittaker (Viersen, B)

HBSS wurde zur Tumoraufarbeitung mit 50 µg/ml Gentamicin und 40 µg/ml Fluconazol versetzt und wird im Folgenden als HBSS<sub>+AB/AM</sub> (AB = Antibiotikum → Gentamicin; AM = Antimykotikum → Fluconazol) bezeichnet.

Humanserum (HS) für die T-Zellkultur wurde aus dem Blut gesunder Spender durch Abserung in der Blutbank des Universitätsklinikums Mainz gewonnen. Das Serum von zehn bis zwanzig Spendern wurde gemischt und 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert. Die Lagerung bis zur Verwendung erfolgte bei -80 °C.

## 2.1.6 Monoklonale Antikörper

### 2.1.6.1 HLA-allelspezifische monoklonale Antikörper

Um durchflusszytometrische HLA-Quantifizierungen und HLA-Restriktionsuntersuchungen im <sup>51</sup>Cr-Zytotoxizitätstest oder IFN-γ-ELISpot-Assay durchzuführen, wurden in dieser Arbeit HLA-spezifische monoklonale Antikörper (mAk) verwendet. Diese sind murine Immunglobuline (IgG), die spezifisch bestimmte humane HLA-Moleküle erkennen und binden (Tabelle 2.1).

Für durchflusszytometrische Anwendungen wurden positiv auf Bindung getestete

Hybridomüberstände verwendet. Für HLA-Restriktionsuntersuchungen wurden dieselben Hybridomüberstände aufgereinigt (Konzentration 1-2 mg/ml), dialysiert und aliquotiert. Die Lagerung bis zur Verwendung erfolgte in PBS bei -20 °C.

Bezeichnung	Spezifität	Isotyp	Literatur
HB55	HLA-DR	IgG2a	[Lampson & Levy, 1980]
W6/32	HLA-Klasse-I	IgG2a	[Parham <i>et al</i> , 1979]
GAP.A3	HLA-A3	IgG2a	[Berger <i>et al</i> , 1982]
B1.23.2	HLA-B, HLA-C, HLA-Aw19-Subgr.	IgG2b	[Rebai & Malissen, 1983]
C7709A2	HLA-A24	IgG2a	[Ikeda <i>et al</i> , 1997]
MA2.1	HLA-A2, HLA-B17	IgG1	[Ways & Parham, 1983]
BB7.2	HLA-A2	IgG1	[Parham & Brodsky, 1981]
BB7.1	HLA-B7	IgG1	[Toubert <i>et al</i> , 1988]

**Tabelle 2.1: HLA-spezifische monoklonale Antikörper (mAK).** In dieser Tabelle dargestellt sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten HLA-spezifischen mAK mit Bezeichnung, Spezifität, Isotyp und Literaturnachweis.

### 2.1.6.2 Antikörper zum Nachweis von Oberflächenantigenen in der Durchflusszytometrie

Folgende Antikörper wurden für die Durchflusszytometrie verwendet (Tabelle 2.2):

Bezeichnung	Konjugation	Spezifität	Hersteller
goat-anti-mouse	○,●	Ziege-anti-Maus	*
Maus IgG1/IgG1	○/●	Isotypenkontrolle	*
Maus IgG1	■	Isotypenkontrolle	*
Maus IgG1	□	Isotypenkontrolle	*
Maus IgG1	□	Isotypenkontrolle	+
Maus IgG2a	□	Isotypenkontrolle	+
Ratten IgG2a	○	Isotypenkontrolle	+
CD3/CD4	○/●	anti CD3 und CD4	*
CD3/CD8	○/●	anti CD3 und CD8	*
CD3/CD16	○/●	anti CD3 und CD16	*
CD3/CD56	○/●	anti CD3 und CD56	*
CD3	○,●	anti CD3	*
CD4	○,●,■	anti CD4	*
CD8	○,●,■	anti CD8	*
CD16	●	anti CD16	*
CD56	●	anti CD56	*
CD45-RO	○	anti CD45-RO	*

CD45-RA	●	anti CD45-RA	*
CD57	○	anti CD57	+
EB6 = CD158a	●	anti p58.1 und p50.1	*
GL183 = CD158b	●	anti p58.2 und p50.2	*
KIRp70	●	anti KIRp70	*
CD94	○	anti CD94	*
NKG2D	●	anti NKG2D	*
CD1.d	□	anti CD1.d	**
CD1.d	□	anti CD1.d	#
CCR7	○	anti CCR7	~
CD25	●	anti CD25	*
CD69	●	anti CD69	*,+
CD27	●	anti CD27	*
CD28	●	anti CD28	*
CD62L	●	anti CD62L	*
HLA-DR	●	anti HLA-DR	*
CD122	○	anti CD122	*
CD161	●	anti CD161	*
TCR αβ	●,■	anti TCRαβ-Kette	*
TCR γδ	●,■	anti TCRγδ -Kette	*
Vβ2	●	anti TCR-Vβ2-Familie	*
Vβ12	●	anti TCR-Vβ12-Familie	*
Beta-Mark	○/●	anti TCR-Vβ-Familien	*
CD54	●	anti CD54	+
CD58	○	anti CD58	*
CD80	○	anti CD80	*
CD86	●	anti CD86	*

**Tabelle 2.2: Antikörper zum Nachweis von Oberflächenantigenen.** Gezeigt sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper zum Nachweis von Oberflächenantigenen auf Effektorzellen und Tumorzellen. Konjugationen: ○ = Fluoreszeinisothiocyanat (FITC); ● = Phycoerythrin (PE); ■ = Phycoerythrin kovalent gebunden an Cyanin 5.1 (PC5); □ = nicht konjugiert. Hersteller: \* = Coulter-Immunotech (Marseille, F); + = BD Pharmingen (Heidelberg); # = Cymbus Biotechnology, Chandlers (Ford, UK); ~ = R&D Systems (Wiesbaden); \*\* = Biozol (Eching).

## 2.1.7 Zytokine

Interleukin-2 (IL-2), Proleukin	Chiron Behring GmbH & Co (Marburg)
Interleukin-7 (IL-7)	R&D Systems (Wiesbaden)
Interleukin-12 (IL-12)	R&D Systems (Wiesbaden)
Interleukin-15 (IL-15)	R&D Systems (Wiesbaden)



### 2.1.8 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	Roche (Mannheim)
Collagenase Typ VIII	Sigma (Deisenhofen)
DNase Typ IV	Sigma (Deisenhofen)
Peroxidase	Qiagen (Hilden)

### 2.1.9 Kits

Beta Mark Kit	IO Test <sup>®</sup> Beta Mark TCR V beta Repertoire Kit (IM3497) Beckman Coulter (Marseille, F)
CD4 Multisort Kit, CD25 Positiv-Isolation	Pre-Separation Filters (130-041-407) MACS Separation LS Columns (130-042-401) CD4 MultiSort Kit, human (130-055-101) MACS Separation LD Columns (130-042-901) CD25 MicroBeads, human (130-090-445) Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch-Gladbach)
CD8 Positiv-Isolation	Pre-Separation Filters (130-041-407) MACS Separation MS Columns (130-042-201) CD8 MicroBeads, human (130-045-201) Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch-Gladbach)
CD8 T Cell Isolation Kit, CD62L Positiv-Isolation	Pre-Separation Filters (130-041-407) MACS Separation LS Columns (130-042-401) CD8 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II (130-091-154) MACS Separation MS Columns (130-042-201) anti-human CD62L-MicroBeads (130-091-758) Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch-Gladbach)
Dead Cell Removal Kit	Pre-Separation Filters (130-041-407) MACS Separation MS Columns (130-042-201) Dead Cell Removal MicroBeads 20 x Binding Buffer Stock Solution (130-090-101)

	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch-Gladbach)
intrazelluläres FoxP3 Färbekit	Fix/Perm-Concentrate (00-5123) Fix/Perm-Diluent (00-5223) 10 x Permeabilisierungspuffer (00-8333) NRS (normales Rattenserum) (24-5555) anti-human FoxP3 (PCH101) eBioscience, NatuTec (Frankfurt)
Vectastain® Elite Kit (Reagenzien A und B)	Vector Laboratories (Burlingame, USA)

### 2.1.10 Zellkulturmedien

Für die Zellkultur wurde RPMI 1640-Medium verwendet. Vor Gebrauch wurden 1 % Penicillin/Streptomycin und hitzeinaktiviertes FCS zu 10 % (Zellkulturmedium) bzw. zu 20 % (Primärkulturmedium) zugesetzt. RPMI 1640 ohne Penicillin/Streptomycin und Serum wird im Folgenden RPMI genannt, mit Penicillin/Streptomycin und 10 % Serum wird es als RPMI<sub>10 %</sub>, mit 20 % Serum als RPMI<sub>20 %</sub> bezeichnet.

In Transfektions-ELISpot-Assays (Abschnitt 2.2.2.1.4) wurde RPMI mit 10 % Serum ohne Zusatz von Antibiotika eingesetzt (RPMI<sub>10 %, ohne AB</sub>).

Für die T-Zellkultur wurde AIM-V™ Medium verwendet, welches für MLTCs mit 5 % Humanserum und für CTL-Klone mit 10 % HS ergänzt wurde (AIM-V<sub>5 %</sub> bzw. AIM-V<sub>10 %</sub>).

Alle Medien wurden bei 4°C gelagert.

Einfriermedium	X-VIVO15 bzw. AIM-V	
	Humanalbumin	8 %
	Heparin (Liquemin)	10 IU/ml

Für die Kryokonservierung wurde kurz vor der Verwendung DMSO zu 10 % frisch zugesetzt.

### 2.1.11 Puffer und Lösungen

Acetatpuffer für ELISpot-Assays	H <sub>2</sub> O	46,9 ml
	Essigsäure 0,2 N	4,6 ml
	Natriumacetat 0,2 N	11,0 ml
FACS-Puffer	PBS	500 ml
	0,5 % BSA	250 mg

MACS-Puffer	PBS 0,5 % BSA 2 mM EDTA	500 ml 250 mg
PBS 1x	Instamed PBS-Pulver H <sub>2</sub> O	95,5 g ad 10 L
Trypanblau (Stammlösung)	Trypanblau H <sub>2</sub> O	2,0 g ad 1 L
Trypanblau (Gebrauchslösung)	Trypanblau Stammlösung 150 mM NaCl	75 ml 25 ml

## 2.1.12 Zelllinien und Blutlymphozyten

### 2.1.12.1 Blutlymphozyten von Patienten und Spendern

In dieser Arbeit wurden mononukleäre Zellen des peripheren Bluts verwendet, welche von Patienten (autolog) und deren HLA-identischen Geschwistern (allogen SIB) gewonnen wurden. Im Modell ELTHEM standen zusätzlich PBMCs von drei nicht verwandten gematchten Spendern (allogen) zur Verfügung. In einigen Fällen wurden diese PBMCs aus Routine-Blutspenden der Transfusionszentrale des Universitätsklinikums Mainz gewonnen. Zunächst wurden aus einer 450 ml Vollblutspende so genannte Leukozytenfilme oder „*buffy coats*“ maschinell abgetrennt. Diese enthalten Leukozyten, aus denen durch Ficoll-Separation die Lymphozyten isoliert werden können.

### 2.1.12.2 Nierenzellkarzinomlinien ELTHEM-RCC, MZ3114-RCC, MZ3126-RCC und MZ3603-RCC

Bei diesen Nierenzellkarzinomlinien handelt es sich um *in vitro* stabil wachsende Tumorklinien, die aus den Primärtumoren der klarzelligen Nierenzellkarzinome der Patienten ELTHEM, MZ3114, MZ3126 und MZ3603 generiert wurden. Folgende Tabelle stellt die serologische HLA-Klasse-I-Typisierung der Tumorklinien dar:

<b>RCC-Linie</b>	<b>HLA-A</b>	<b>HLA-B</b>	<b>HLA-Cw</b>
<b>ELTHEM</b>	03, 24	07, 08	07
<b>MZ3114</b>	02	18, 27	02, 05
<b>MZ3126</b>	02, 11	50, 51	06, 15
<b>MZ3603</b>	26, 32	14, 38	08, 12

Tabelle 2.3: HLA-Klasse-I-Typen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Nierenzellkarzinomlinien.

### **2.1.12.3 EBV-transformierte B-Lymphozyten**

Wie in Abschnitt 2.2.1.5 beschrieben, handelt es sich hierbei um stabil in Suspension wachsende lymphoblastoide B-Zelllinien (LCL, engl. *lymphoblastoid cell line*), die durch Epstein-Barr-Virus (EBV) transformiert und immortalisiert wurden [Tatsumi, 1992].

ELTHEM-EBV, MZ3114-EBV und MZ3603-EBV sind die EBV-LCL-Zelllinien, die aus den Nierenzellkarzinom-Patienten ELTHEM, MZ3114 bzw. MZ3603 gewonnen wurden; ELTHEM SIB-EBV, MZ3114 SIB-EBV, MZ3603 SIB-EBV sind die EBV-LCLs der jeweils gematchten Geschwisterspender.

AK-EBV-LCL ist die EBV-LCL des gesunden Spenders AK.

### **2.1.12.4 Weitere Tumorzelllinien und nicht-maligne Zellen**

Alle Zelllinien, die für Kreuzreaktivitätsstudien verwendet wurden, waren HLA-Klasse-I-typisiert. Sie entstammten unterschiedlichen Tumorentitäten mit den folgenden Abkürzungen:

- RCC (engl. *renal cell carcinoma*) für Nierenzellkarzinomlinien;
- COC (engl. *colon carcinoma*) für Kolonkarzinomlinien;
- GBC (engl. *gallbladder carcinoma*) für Gallenblasenkarzinomlinien;
- PC (engl. *pancreatic carcinoma*) für Pankreaskarzinomlinien;
- HCC (engl. *hepatocellular carcinoma*) für hepatozelluläre Karzinomlinien;
- LC (engl. *lung cancer*) für Lungenkarzinomlinien;
- MEL (engl. *melanoma*) für Melanomlinien;
- NKC (engl. *nonmalignant kidney cells*) für nicht-maligne/normale Nierenzellen;
- AML (engl. *acute myeloid leukemia*) für akute myeloische Leukämiezellen;
- CML (engl. *chronic myeloid leukemia*) für chronische myeloische Leukämiezellen.

RCC- & LCL-Linien mit dem Index MZ und einer mit 1 beginnenden Zahl wurden von Prof. A. Knuth (Universität Zürich, CH), und dem Ludwig Institut für Krebsforschung (LICR, Zürich, CH), zur Verfügung gestellt [Bernhard *et al*, 1994]. Linien mit dem Index MZ und einer mit 3 beginnenden Zahl wurden in unserem Labor generiert. Die RCC-Zelllinie ELTHEM-RCC wurde von Dr. E. Ranieri (Universität Bari, Italien) bereitgestellt.

HCC und LC wurden von Dr. S. Strand und Dr. S. Horn (Universität Mainz) zur Verfügung

gestellt. MEL und PC wurden bereits beschrieben [Wolfel *et al*, 1993a; Wolfel *et al*, 1993b].

AML- und CML-Zellen mit einer zweistelligen MZ-Kodierung wurden von Herrn Prof. T. Wölfel (Universität Mainz) bereitgestellt. Solche mit einer dreistelligen MZ-Kodierung wurden von Frau Dipl.-Biol. E. Distler (Universität Mainz) zur Verfügung gestellt.

Folgende Zelllinien wurden für Kreuzreaktivitätsstudien verwendet:

MZ1257-RCC, MZ1257-LCL, MZ1851-RCC, MZ1846-RCC, MZ1879-RCC, MZ1774-RCC, MZ1940-RCC, MZ1973-RCC, MZ3049-RCC, MZ3212-RCC, MZ3212-LCL, FMKOT-RCC, Heardt-RCC, LB1047-RCC, MZ5-MEL, MZ7-MEL, MZ9-MEL, SK29-MEL, SK29-EBV, SK37-MEL, SK64-MEL, SK93-MEL, D05-MEL, D05-EBV, D14-MEL, D14-EBV, D41-MEL, D41-EBV, Hammes-COC, SK-CO1-COC, HT29-COC, MZ6-LC, MZ16-LC, MZ2-PC, MZ2-LCL, MZ15-LCL, MZ201-AML, MZ201-LCL, MZ25-CML, MZ51-CML, HepG2-HCC, MZ1-GBC, MZ1-EBV.

#### 2.1.12.4.1 *Cos7-Zellen*

Cos7-Zellen fanden in der vorliegenden Arbeit bei der transienten Transfektion mit Expressionsplasmiden in Transfektions-ELISpot-Assays Verwendung. Sie stammen aus der Grünen Meerkatze (*Ceropithecus aethiops*) und sind mit einem deletierten Genom des SV40-Virus transformierte fibroblastäre Nierenzellen. Durch die Transformation exprimieren sie konstitutiv das große T-Antigen dieses Polyomavirus, was die episomale Replikation von zirkulären Plasmiden, die einen SV40-DNA-Replikationsursprung tragen, ermöglicht.

#### 2.1.12.4.2 *K562-Zellen und HLA-Transfektanten*

K562 ist eine Zelllinie, die ursprünglich aus einem Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie stammt [Klein *et al*, 1976]. Sie zeichnet sich dadurch aus, dass sie keine HLA-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimiert. Daher findet sie als NK-Zell-„Target“ Verwendung [Kaplan & Callewaert, 1978].

Für die Charakterisierung der „Mismatch“-Reaktivität von einer der generierten T-Zelllinien (Abschnitt 3.2.1.1) wurde eine K562-Transfektante eingesetzt, die stabil mit HLA-A\*0301 transfiziert worden war. Diese K562-Transfektante wurde von Herrn Prof. T. Wölfel (Universität Mainz) zur Verfügung gestellt [Britten *et al*, 2002].

### 2.1.13 ELISpot-Experimente

Anti-hIFN- $\gamma$ -Antikörper #1-D1K (Maus-IgG)	Mabtech AB (Nacka, S)
Anti-hIFN- $\gamma$ -Antikörper #7-B6-1 (Maus-IgG), biotinyliert	Mabtech AB (Nacka, S)
ELISpot-Gerät Axio Imager M.1	Zeiss (Jena)
Klebefolie zum Ablösen der Nitrozellulosemembran	Millipore (Eschborn)
KS ELISpot-Software Version 4.9	Zeiss (Jena)
Multiscreen 96-well Filtration Plate (mit Nitrozellulosemembran)	Millipore (Eschborn)

#### Automatische Auswertung

Für die Auswertung der IFN- $\gamma$ -ELISpot-Experimente wurde ein automatisches Messverfahren (KS ELISpot-System Version 4.9 der Firma Zeiss, Jena) eingesetzt. Dieses Messverfahren bestand aus einem Auflichtmikroskop mit Motortisch und Autofokus. Der Motortisch konnte jede einzelne Testeinheit (TE) der ELISpot-Platte präzise ansteuern. Die vom Mikroskop erfassten Zytokinspots wurden von einer angeschlossenen Farbkamera aufgenommen und digitalisiert. Anschließend konnte das Ergebnis durch die KS ELISpot-Software ausgewertet werden [Herr *et al*, 1997].

### 2.1.14 Kokultur und intrazelluläre Perforin-Färbung

Anti-hPerforin-Antikörper #5G9 (Maus-IgG2b)	Biocarta (Hamburg)
Anti-Maus IgG (Ziege-anti-Maus), Cy3-gekoppelt	Dianova (Hamburg)
Höchstfarbstoff 33342	Invitrogen (Karlsruhe)
Kammer-Objektträger („Chamberslide“)	BD Biosciences (Heidelberg)
Laser-Scanning-Mikroskop	LSM 510UV, Zeiss (Jena)

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur und Primärkultur**

Die Kultur eukaryontischer Zellen erfolgte nach Standardmethoden (Lindl, Zell- und Gewebekultur, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag). Es werden hier nur Besonderheiten und Abweichungen der Standardprotokolle aufgeführt. Alle Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen bearbeitet, d. h. an einem sterilen Arbeitsplatz unter Verwendung steriler Materialien. Sämtliche Zelllinien wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert.

#### **2.2.1.1 Generierung neuer Tumorzelllinien aus Primärtumoren und Kultivierung von Tumorzelllinien**

Grundvoraussetzung für die Bearbeitung neuer Modellsysteme sind stabil in Zellkultur wachsende Nierenzellkarzinom-Zelllinien. Diese wurden aus Primärtumoren von Nierenzellkarzinomen generiert, indem das frisch entnommene Tumorgewebe zunächst durch wiederholten Mediumwechsel in kaltem HBSS<sub>+AB/AM</sub> gespült wurde, bis der Überstand klar war. Zusätzlich wurde ein Stück Gewebe der zugehörigen nicht-malignen Niere analog behandelt, um nicht-maligne Nierenzellen zu generieren, die als Kontrollzellen in Experimenten dienten. Nach den Spülschritten wurde das Tumor- und Nieren-Material in jeweils eine Petrischale überführt und zunächst makroskopisch beurteilt. Nekrotische Areale, Binde- und Fett-Gewebe wurden entfernt und je nach Größe des Tumor- und Nieren-Materials mehrere kleine Stückchen (ca. 0,5 cm<sup>3</sup>) in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das restliche Gewebe wurde mit zwei Skalpellens durch gegenläufige Schneidebewegungen so lange zerkleinert, bis es mit einer 25 ml-Pipette aufgenommen werden konnte. Ein kleiner Teil des zerkleinerten Materials wurde als unverdauter Ansatz in eine kleine Zellkulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) gegeben, während der restliche Ansatz in ein 50 ml-Röhrchen überführt und die Petrischale mit etwa der Hälfte eines Enzymgemisches (HBSS<sub>+AB/AM</sub> supplementiert mit 560 µg/ml Collagenase Typ VIII und 26 µg/ml DNase Typ IV) ausgespült und ebenfalls in das Röhrchen gegeben wurde. Dieser Ansatz wurde bei 38 °C im Wasserbad für 15 min inkubiert, wobei alle 3 min das Röhrchen geschwenkt wurde, um einen nahezu gleichmäßigen Verdau zu gewährleisten. Dann wurde das restliche Enzymgemisch hinzu pipettiert, wobei die Gesamtmenge (max. 50 ml) abhängig von der Menge des Materials war. Nach dem Verdauungsschritt wurde die Einzelzellsuspension mit den restlichen Stückchen bei 1000 rpm 3 min zentrifugiert, der Überstand gesammelt und das Pellet mit den Stückchen über ein 70 µm Zellsieb

gegeben, um diese herauszufiltern und weitere Zellen aus den Stückchen zu lösen. Der Überstand wurde in drei weiteren Schritten abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min) und durch Dekantieren gesammelt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen. Die Pellets wurden in PBS zusammengeführt und dreimal gewaschen (Zentrifugation bei 1500 rpm, 5 min, und anschließendes Verwerfen des Überstandes), bevor die Zellen in Primärkulturmedium (RPMI<sub>20</sub> %) aufgenommen und gezählt wurden. Jeweils  $2,5 \times 10^6$  Zellen wurden in kleine Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) ausgesät, die restlichen Zellen kryokonserviert.

Die neuen Primärkulturzelllinien und alle anderen bereits stabil in Zellkultur und adhärent wachsenden Tumorzelllinien wurden je nach Expansionszustand in liegenden Zellkulturflaschen unterschiedlicher Größen (25, 80, 175 cm<sup>2</sup>) in RPMI<sub>10</sub> % (Zellkulturlinien) bzw. in RPMI<sub>20</sub> % (Primärkulturlinien) kultiviert. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden sie zwischen zweimal wöchentlich und einmal in zwei Monaten subkultiviert. Dazu wurden die Zellen zum Lösen vom Boden der Zellkulturflasche für 5 Minuten bei 37 °C mit Trypsin-EDTA (0,05 %) inkubiert und anschließend durch Spülen mit RPMI in Suspension gebracht. Nach Zentrifugation wurden sie je nach Bedarf mit einer Dichte von ca.  $1 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> wieder ausgesät oder kryokonserviert. Nach jedem Ablösen der Zellen („Passagieren“) wurde die Zellkultur-Passage um eins erhöht.

Stabil in Zellkultur wachsende Primärkulturzelllinien wurden ab Passage 15 bis 20 parallel zur Kultivierung in Primärkulturmedium auch in Zellkulturmedium kultiviert, um das Wachstum in 20 % mit dem Wachstum in 10 % FCS zu vergleichen. Das vergleichende Wachstum in den unterschiedlichen FCS-Konzentrationen wurde einige Wochen protokolliert und dann, sollten keine gravierenden Unterschiede in den Zellzahlen aufgetreten sein, komplett auf Zellkulturmedium umgestellt.

### **2.2.1.2 Isolation von peripheren mononukleären Blutlymphozyten**

Aus peripherem Blut oder „buffy coats“ wurden die PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dazu wurden LeucoSep-Röhrchen mit 15 ml Lymphozyten-Separationsmedium beladen, das Medium unter die Fritte zentrifugiert und dann bis zu 30 ml Blut auf die Fritte der Röhrchen pipettiert. Nach Zentrifugation bei  $1000 \times g$  (15 min bei Raumtemperatur) ohne Bremse befanden sich die Blutlymphozyten in der Interphase oberhalb des Lymphozyten-Separationsmediums und konnten mit einer Pipette vorsichtig abgenommen werden. Danach wurden sie zweimal mit RPMI gewaschen, bevor sie gezählt und in 20 bis  $50 \times 10^6$ -Portionen kryokonserviert wurden. Im Fall einer anschließenden Isolation von Lymphozyten-Subpopulationen wurden die Zellen



direkt mit dem gekühlten Isolationspuffer (MACS-Puffer) gewaschen.

### **2.2.1.3 Generierung und Kultur von polyklonalen tumorreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten**

Polyklonale T-Zellkulturen wurden angesetzt, indem entweder PBMCs oder positiv isolierte CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten mit letal bestrahlten (100 Gray, Gy) Tumorzellen in gemischten Lymphozyten-Tumorzell-Kulturen (MLTCs) kokultiviert wurden. Dazu wurden pro Kultureinheit (KE) einer 24-Loch-Platte  $2 \times 10^6$  Lymphozyten mit  $1 \times 10^5$  bestrahlten Tumorzellen in 2 ml AIM-V<sub>5</sub>% zusammen gegeben. Am dritten Tag nach dieser primären Stimulation der T-Zellen wurden jeder KE entweder 250 IU/ml rhIL-2 (MZ3114, MZ3126, MZ3603) oder 150 IU/ml rhIL-2 und 5 ng/ml rhIL-7 (ELTHEM) zugesetzt. Am siebten Tag folgte die erste Restimulation und im wöchentlichen Abstand weitere. Für die Restimulationen wurden  $1 \times 10^6$  Lymphozyten erneut mit  $1 \times 10^5$  bestrahlten Tumorzellen in 2 ml AIM-V<sub>5</sub>% unter direkter Zugabe der jeweiligen Zytokine kokultiviert. Bei Erkennung von Antigenen auf der Oberfläche der Zielzellen sezernieren CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterschiedliche Zytokine, die auf der einen Seite die Zielzellen lysieren oder aber T-Zellen zur Proliferation stimulieren können. Bei sehr gutem Wachstum der Zellen wurden diese nach wenigen Tagen nach Restimulation gesplittet, wobei sie jeweils von einer auf zwei KE aufgeteilt wurden und jede KE mit frischem Medium ohne Zytokine aufgefüllt wurde. Ab Kulturtag 14 bis 21 (ab der 2.-3. Restimulation) wurden die T-Zellen auf ihre Funktionalität in IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assays und Zytotoxizitätstests (Abschnitte 2.2.2.1 und 2.2.2.2) getestet. Dadurch konnte die Tumorreaktivität ermittelt und mögliche unspezifische Reaktivitäten gegen hämatopoetische Zielzellen des Patienten ausgeschlossen werden. Mittels Blockade der HLA-Moleküle auf den Zielzellen durch monoklonale Antikörper konnten die HLA-Restriktionen der MLTCs festgestellt werden. Diese waren möglicherweise auf mehrere HLA-Allele aufgeteilt, da MLTCs polyklonale Populationen mit unterschiedlichen T-Zellspezifitäten darstellen.

### **2.2.1.4 Generierung und Kultur von (mono-) klonalen tumorreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten**

Um klonale T-Lymphozyten-Kulturen mit distinkter Restriktion zu generieren, wurden Einzelzellsuspensionen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der MLTC durch ein Grenzverdünnungsverfahren („LD (*limiting dilution*) cloning“ [Schawaller *et al*, 1980]) so verdünnt, dass sich theoretisch nur noch 0,3, eine, drei oder zehn Zellen pro KE einer 96 Loch-

Rundbodenplatte befanden. Diese wurden dann unabhängig voneinander mit bestrahlten Tumorzellen des jeweiligen Nierenzellkarzinoms restimuliert. Außerdem wurden den Kulturen AK-EBV-LCL als „Feeder“-Zellen zugesetzt. Bei Erkennung eines Antigens auf den Tumorzellen und damit einhergehend guter Proliferation wurden die Zellen in die jeweils nächst größere KE überführt (48 Loch, 24 Loch). Nach weiteren wöchentlichen Restimulationen konnten die klonalen zytotoxischen T-Lymphozyten in 24 Loch-Platten kultiviert und weiter expandiert werden. Die CTL-Klone wurden wie die MLTCs zu  $1 \times 10^6$  ausgesät, jedoch mit  $5 \times 10^4$  bestrahlten Tumorzellen und  $2 \times 10^5$  AK-EBV-LCL-Zellen in 2 ml AIM-V<sub>10 %</sub> inklusive 250 IU/ml rhIL-2 pro KE stimuliert. Auch hier erfolgte bei guter Proliferation die Subkultivierung durch Splitten.

### **2.2.1.5 Generierung und Kultur von EBV-transformierten lymphoblastoiden Zelllinien**

EBV-transformierte lymphoblastoide Zelllinien [Tatsumi, 1992] dienen als hämatopoetische Kontroll-Zielzellen („Target“-Zellen) bei der funktionellen Testung von tumorreaktiven CTL-Populationen. Um diese EBV-immortalisierten B-Zelllinien herzustellen, wurden  $1 \times 10^7$  PBMCs in einem 15 ml Zellkultur-Röhrchen mit 500 µl EBV-Überstand versetzt und vier bis fünf Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 4,5 ml RPMI mit 20 % FCS und 1 µg/ml Cyclosporin A (CSA) hinzu gegeben, um die Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten zu unterbinden. Nach weiteren 20 Stunden Inkubation wurde das CSA heraus gewaschen, die Zellen wieder in 5 ml RPMI<sub>20 %</sub> aufgenommen und in eine kleine Zellkulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) überführt. Durch Mediumzugabe wurden die Zellen auf eine Zelldichte von  $4 \times 10^5$  Zellen pro Milliliter eingestellt. Bei weiterhin konstanter Proliferation wurde das Medium von 20 % FCS auf 10 % FCS umgestellt und von da an zweimal wöchentlich gezählt, wenn ihre Dichte etwa  $1 \times 10^6$  Zellen/ml erreicht hatte.

### **2.2.1.6 Generierung und Kurzzeitkultur von PHA-aktivierten PBMC-Blasten**

Eine Alternative zu lymphoblastoiden Zelllinien als hämatopoetische Kontrollzellen sind phytohämagglutininaktivierte PBMC (PHA)-Blasten [Porzsolt & Heimpel, 1984]. PHA stammt aus der roten Kidneybohne (*Phaseolus vulgaris*) und ist ein Mitogen, welches Lymphozyten zum Wachstum stimuliert. PHA-Blasten wurden generiert, indem  $2 \times 10^6$  PBMCs mit 250 IU/ml IL-2 und 1 µg/ml PHA in AIM-V<sub>5 %</sub> in 24-Loch-Gewebekulturplatten

stimuliert wurden. Sobald die Blasten eine gute Proliferation zeigten, wurden sie durch Aufteilen auf die doppelte Anzahl an KE subkultiviert und in der Regel zwischen Tag 8 und Tag 14 in Experimenten verwendet.

### **2.2.1.7 Generierung und Kultur von tumorinfiltrierenden Lymphozyten**

Tumorinfiltrierende Lymphozyten wurden aus Nierentumorpräparationen generiert, die direkt nach dem Verdauungsschritt mit Collagenase und DNase in AIM-V<sub>10</sub>% in 24-Loch-Gewebekulturplatten mit Fluconazol (40 µg/ml), 1000 IU/ml IL-2 und 5 ng/ml IL-7 ausgesät wurden. Bei Bedarf wurde das Medium gewechselt und auch die Zytokine noch einmal anteilig hinzu gegeben, die Zellen ausgewaschen und unter anteiliger Zytokinzugabe in neue Gewebekulturplatten umgesetzt oder aber bei guter Proliferation der Inhalt der KE auf jeweils die doppelte Anzahl aufgeteilt. Aufgrund der vielen enthaltenen Tumorzellen mussten die Kulturen des Öfteren umgesetzt werden, um reine Lymphozytenkulturen zu erhalten. Von diesem Zeitpunkt an wurden die TIL-Kulturen wie MLTCs behandelt und einmal wöchentlich unter Zytokin- und Stimulatorzell-Zugabe restimuliert (Abschnitt 2.2.1.3).

### **2.2.1.8 Kryokonservierung von Zellen**

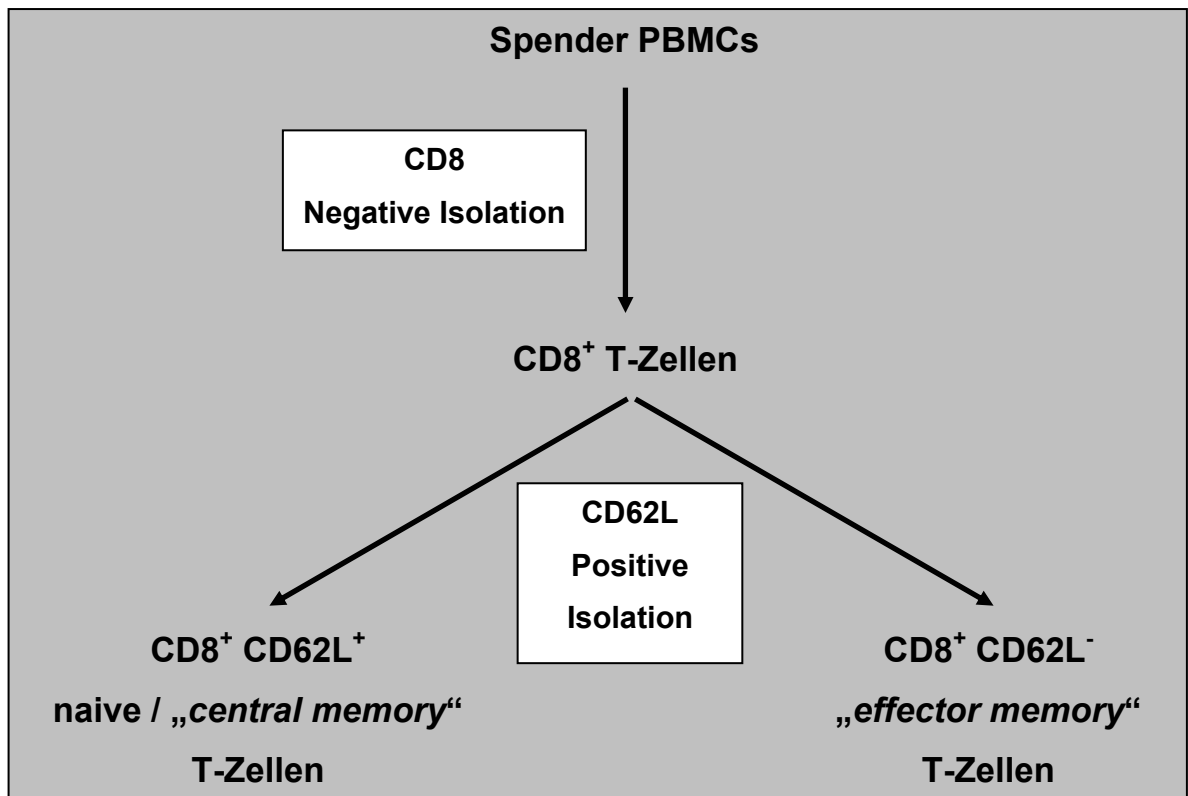
Vorerst nicht mehr in Kultur benötigte oder zu expandierende Zellen wurden für die Langzeitaufbewahrung kryokonserviert. Dazu wurden diese gezählt, abzentrifugiert und in dem gewünschten Volumen an Kryokonservierungsmedium, das zuvor mit 10 % DMSO versetzt wurde, aufgenommen. Die Zellen wurden auf die entsprechende Anzahl an Einfrier-Röhrchen (1 ml Volumen pro Röhrchen) verteilt und diese in Kryokonservierungsboxen gestellt, die durch eine Ummantelung aus Isopropanol ein kontrolliertes Abkühlen von 1 °C pro Minute gewährleisten. Das Abkühlen erfolgte zunächst in einem -80 °C-Gefrierschrank, bevor die Röhrchen dann zur Langzeitlagerung in die Stickstoffbank überführt wurden. Die pro Einfrier-Röhrchen einzufrierenden Zellzahlen betragen in der Regel für T- und Tumor-Zellen zwischen 2 und 5 x 10<sup>6</sup>, für Suspensionszelllinien zwischen 6 und 12 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Milliliter Einfriermedium.

### **2.2.1.9 Positive Isolation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Für die positive Isolation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden die PBMCs mit CD8-MicroBeads (nach Protokoll: CD8-MicroBeads, Miltenyi Biotec) inkubiert. Die MicroBeads bestehen aus kleinen magnetischen Metallkügelchen, die an murine  $\alpha$ -human CD8-Antikörper gekoppelt sind und somit ausschließlich an humane CD8<sup>+</sup> Lymphozyten binden. Die an die MicroBeads gebundenen Zellen wurden über eine magnetisch geladene Separationssäule (je nach Zellzahl: MS- oder LS-MACS („*magnetically activated cell sorting*“) Separation Columns, Miltenyi Biotec) gegeben und auf der Säule gehalten. CD8-negative Zellen wurden nicht an die Säule gebunden und als CD8-Negativfraktion aufgefangen. Nach Entmagnetisierung der Separationssäule wurden die CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten mit einem Stempel von der Säule eluiert und durch mehrmaliges Waschen weitgehend von ungebundenen MicroBeads getrennt.

### **2.2.1.10 Isolation von naiven und „central memory“ CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> T-Zellen**

Um naive und „central memory“ CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu isolieren und deren proliferative und tumorreaktive Kapazität im Vergleich zu „effector memory“ CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu überprüfen, wurden diese Zellen auf der Basis ihrer CD62L (L-Selektin)-Expression separiert. CD62L ist ein „*homing receptor*“, der von naiven und „central memory“-T-Zellen exprimiert wird [Weninger *et al*, 2002]. Zunächst wurden aus PBMCs CD8<sup>+</sup> T-Zellen isoliert, allerdings nicht, wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, über die positive Selektion, sondern über eine negative Isolationstechnik (nach Protokoll: CD8<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II, Miltenyi Biotec). Hierbei wurde ein Gemisch aus biotinkonjugierten monoklonalen Antikörpern verwendet, welche gegen CD4, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR  $\gamma/\delta$  und CD235a (Glykophorin A) gerichtet waren. Nach Zugabe von Anti-Biotin-Beads und Depletion der magnetisch markierten nicht-CD8-Zellen über LS-Säulen resultierte eine nicht magnetisch markierte CD8<sup>+</sup>-Fraktion (Durchlauf) und eine magnetisch markierte Fraktion, die alle anderen Zellen enthielt (CD4<sup>+</sup> T-Zellen,  $\gamma/\delta$  T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, Granulozyten und Erythrozyten). Die CD8<sup>+</sup>-Fraktion wurde daraufhin mit CD62L-Microbeads (nach Protokoll: CD62L-MicroBeads, Miltenyi Biotec) inkubiert und über MS-Säulen separiert. Dies ergab eine CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>-Fraktion und eine CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup>-Fraktion, aus denen jeweils – wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben – MLTCs angesetzt wurden.



**Schema 2.1:** Isolation von  $CD8^+ CD62L^+$  naiven / „central memory“ T-Zellen. Naive und „central memory“-T-Zellen wurden nach einer vorangehenden Negativ-Isolation von CD8-positiven T-Zellen auf der Basis ihrer CD62L-Expression positiv isoliert.

### 2.2.1.11 Depletion von regulatorischen T-Zellen

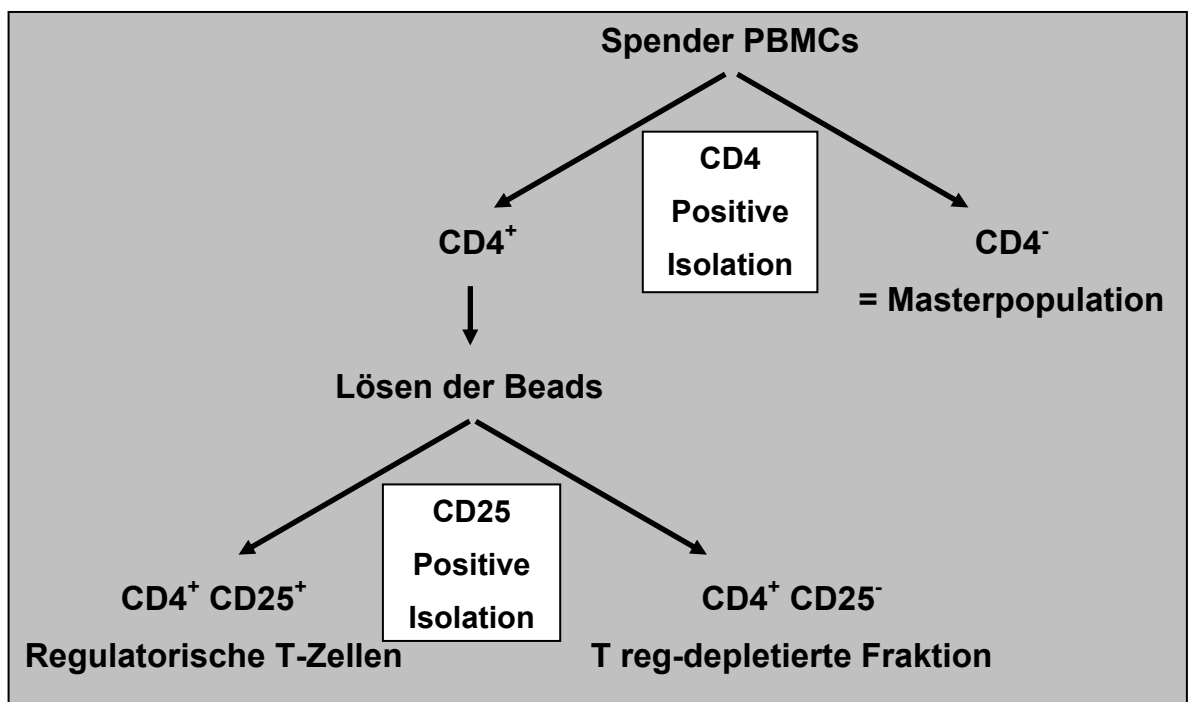
$CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$  regulatorische T-Zellen (T regs) können einen immun-supprimierenden Einfluss auf tumorreaktive T-Lymphozyten in Tumorpatienten ausüben [Wolf *et al*, 2003; Liyanage *et al*, 2002; Woo *et al*, 2002]. Daher sollten regulatorische T-Zellen aus MLTC-Ansätzen entfernt werden, um dann die Proliferation und Tumorreaktivität vergleichend zu überprüfen. Zunächst wurde ein Protokoll zur *in vitro*-Depletion von T regs etabliert. Dieses ist in Schema 2.2 dargestellt.

Für die Depletion wurde zunächst eine positive Anreicherung von  $CD4^+$  T-Zellen über CD4-MicroBeads (nach Protokoll: CD4 MultiSort Kit, Miltenyi Biotec) und mithilfe von LS-Säulen (Miltenyi Biotec) durchgeführt. Die daraus resultierenden positiven und negativen Fraktionen wurden aufgefangen. Die CD4-positiven T-Zellen wurden mittels des „Release“-Reagenz von den gebundenen CD4-MicroBeads gelöst und die Löse-Reaktion mit einem Stop-Reagenz beendet. Mit einem zweiten Isolationsschritt sollten  $CD4^+ CD25^+$  T-Zellen positiv isoliert werden. Dazu wurden die CD4-positiven Zellen nun mit CD25-MicroBeads (nach Protokoll: CD25-MicroBeads, Miltenyi Biotec) inkubiert. Die hieraus resultierende Positivfraktion enthielt  $CD4^+ CD25^+$  doppelt positive T-Zellen und wurde als

T reg-Fraktion bezeichnet. In der Negativfraktion waren  $CD4^+ CD25^-$  T-Zellen enthalten. Diese wurde als T reg-depletierte Fraktion benannt. Die Negativfraktion des ersten Isolationsschrittes (CD4-negative T-Zellen) wurde als Masterpopulation verwendet und mit entweder  $CD4^+ CD25^+$  T-Zellen (MLTC-Ansatz mit T regs) versetzt oder aber mit  $CD4^+ CD25^-$  T-Zellen (MLTC-Ansatz ohne T regs). Die folgenden Ansätze wurden gestartet:

- $1,5 \times 10^6$  CD4-negative Masterpopulation mit  $0,5 \times 10^6$   $CD4^+ CD25^+$  T reg-Zellen (MLTC-Ansatz mit T regs);
- $1,5 \times 10^6$  CD4-negative Masterpopulation mit  $0,5 \times 10^6$   $CD4^+ CD25^-$  T-Zellen (MLTC-Ansatz ohne T regs);
- $2 \times 10^6$  PBMCs (regulärer MLTC-Ansatz).

Die unterschiedlichen MLTC-Ansätze wurden – wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben – restimuliert und ab Tag 21 auf immunologische Funktionalität getestet.

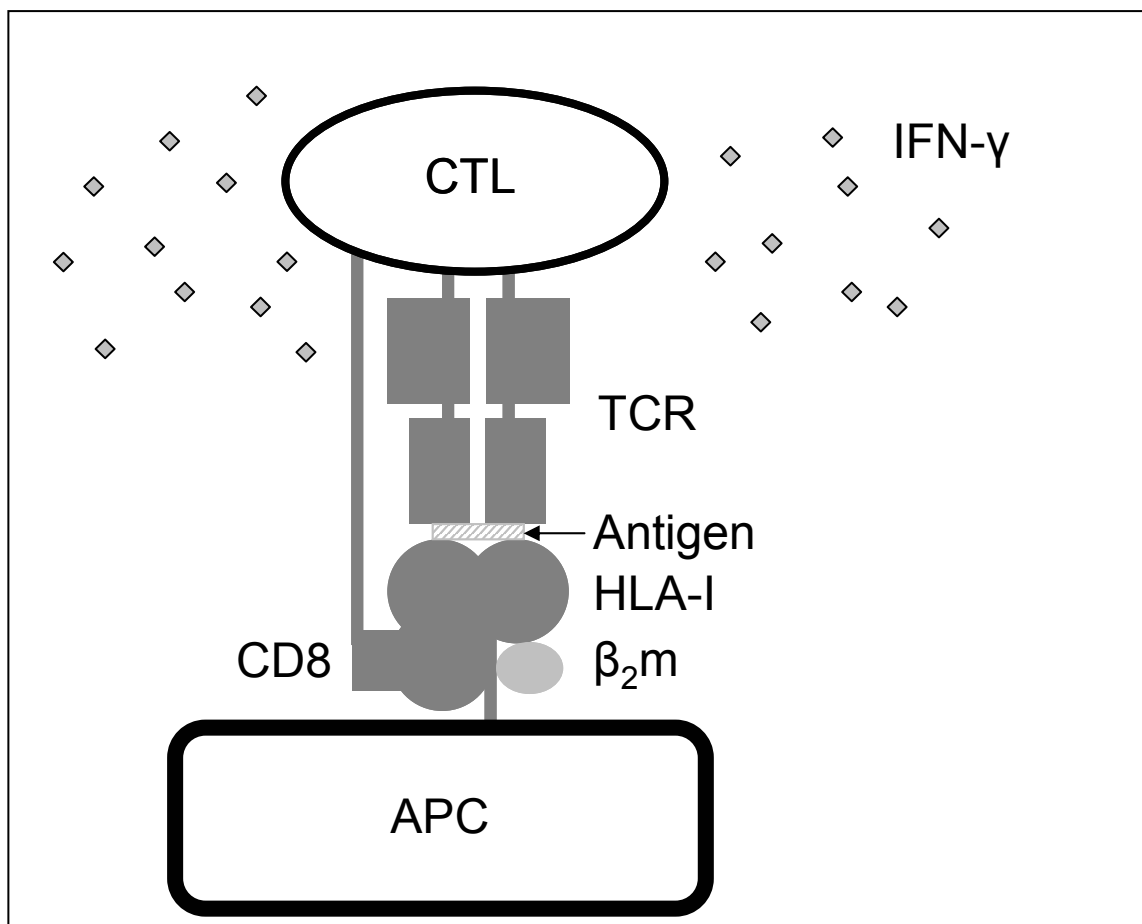


**Schema 2.2: Depletion von  $CD4^+ CD25^+$  regulatorischen T-Zellen (T regs).** Nach einer positiven Anreicherung von CD4-positiven T-Zellen wurde diese Fraktion über CD25 positiv isoliert. Die aus dem zweiten Isolationsschritt resultierende CD25-Negativfraktion stellte die T reg-depletierte Fraktion dar.

## 2.2.2 Testmethoden für die Funktionalität von T-Zellen

### 2.2.2.1 Interferon- $\gamma$ -ELISpot-Assay

Der Interferon- $\gamma$ -ELISpot (*enzyme-linked immunosorbent spot*)-Assay dient dem Nachweis von IFN- $\gamma$ -sezernierenden T-Zellen auf Einzelzellebene (Abbildung 2.1). Dazu wird ein monoklonaler Antikörper gegen humanes IFN- $\gamma$  eingesetzt, der mit dem konstanten Teil seiner schweren Kette an eine Nitrozellulose- oder Nylonmembran gebunden wird. Mit seinem variablen Bereich bindet er IFN- $\gamma$ , welches T-Lymphozyten nach Antigenerkennung freisetzen. Um gebundenes Zytokin mit einer Farbreaktion nachweisen zu können, wird nach Abwaschen der Zellen ein Zweitantikörper hinzu gegeben, der ein zum Erstantikörper differierendes IFN- $\gamma$ -Epitop erkennt und an Biotin gekoppelt ist. Die Färbereaktion wird über die subsequente Zugabe von Streptavidin, Peroxidase und ein Peroxidasesubstrat ausgelöst und kennzeichnet die Orte der Zytokinfreisetzung auf der Membran (Abbildung 2.2).

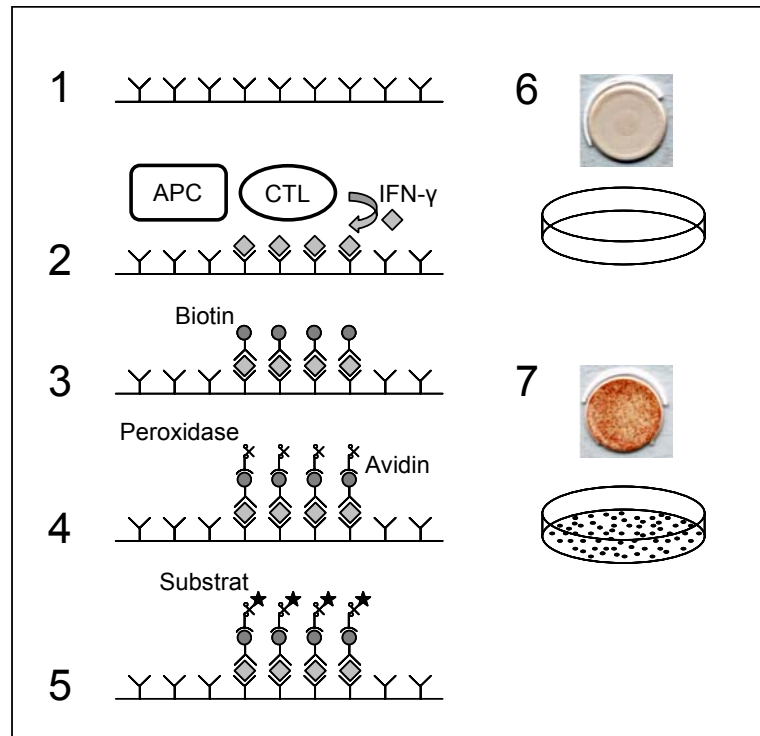


**Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Antigenerkennung.** Die CD8<sup>+</sup> T-Zelle erkennt über den T-Zellrezeptor ihr Antigen auf der Zielzelle und sezerniert verschiedene Zytokine (u. a. IFN- $\gamma$ ). APC = antigenpräsentierende Zelle; CD8 = kostimulatorisches Molekül CD8; CTL = CD8-positive T-Zelle; HLA-I = HLA-Klasse-I-Molekül; IFN- $\gamma$  = Gamma-Interferon; TCR = T-Zellrezeptor.

Die ELISpot-Platte (96-Loch Mikrotiterplatte mit Boden aus Nitrozellulosemembran) wurde mit dem anti-IFN- $\gamma$ -Primärantikörper (60  $\mu$ l/TE, 10  $\mu$ g/ml in PBS) beschichtet und entweder am Vorabend des Testtages über Nacht bei 4 °C oder am Testtag selbst für zwei Stunden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> aufbewahrt. Ungebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und freie Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran durch serumhaltiges Medium (100  $\mu$ l/TE) abgesättigt. Bei Transfektionsexperimenten wurden die Zielzellen nach der Antikörperbeschichtung direkt in serumhaltigem Medium in die TE gegeben.

Die Zielzellen und Effektorzellen wurden in einem Volumen von 100  $\mu$ l RPMI<sub>10%</sub> in die TE pipettiert. Dabei wurden die Zielzellen meist mit  $5 \times 10^4$  Zellen/TE eingesetzt. Als Effektorzellen wurden PBMCs mit  $1 \times 10^5$  oder mehrfach stimulierte CTLs am vierten oder fünften Tag nach Restimulation mit zwischen  $5 \times 10^3$  und  $5 \times 10^4$  Zellen/TE verwendet. Der Test wurde nach 20 Stunden Inkubation im Brutschrank entwickelt. Dazu wurden zunächst die Zellen mit PBS/0,05 % Tween20 von der Membran gewaschen, was sechsmal wiederholt wurde. Nach diesen Waschschritten wurde der biotinylierte Sekundärantikörper mit einem Volumen von 60  $\mu$ l/TE und einer Konzentration von 2  $\mu$ g/ml in PBS/0,5 % BSA in die TE pipettiert und für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde wieder sechsmalig mit PBS/0,05 % Tween20 gewaschen, bevor der Avidin-Peroxidase-Komplex zu 100  $\mu$ l/TE zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert wurde. Der Komplex wurde bereits 30 min zuvor angesetzt, indem pro ELISpot-Platte 10 ml PBS/0,1 % Tween20 mit einem Tropfen Reagenz A und einem Tropfen Reagenz B aus dem Vectastain® Elite Kit (Vector Laboratories) versetzt wurden. Nach diesem Schritt wurde erneut mit PBS/0,05 % Tween20 gewaschen (dreimalig) und im Anschluss dreimal mit PBS, bevor durch Zugabe der Substratlösung zu 100  $\mu$ l/TE das Entwickeln gestartet wurde. Die Substratlösung bestand aus einer AEC (3-Amino-2-Ethyl-Carbazol)-Tablette, die in 2,5 ml Dimethylformamid gelöst und mit Acetatpuffer auf 50 ml aufgefüllt wurde. Um mögliche Feststoffe zu beseitigen, wurde diese Lösung über einen 0,45  $\mu$ m-Filter gegeben. Kurz vor Gebrauch wurde das benötigte Volumen an Substratlösung mit 0,5  $\mu$ l Wasserstoffperoxid pro Milliliter AEC versetzt, wobei das Wasserstoffperoxid hier als Katalysator der Reaktion fungierte. Nach 5 bis 15 min konnte die Reaktion durch Spülen mit fließendem Leitungswasser abgestoppt werden. Nach vollständiger Trocknung der Nitrozellulosemembran erfolgte die automatisierte und standardisierte Zählung der entstandenen IFN- $\gamma$ -Spots.

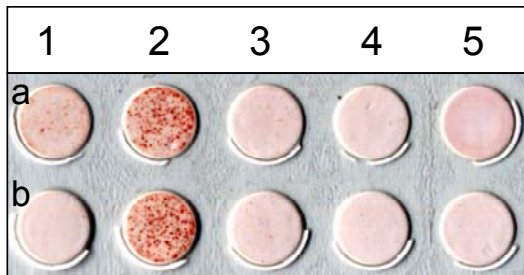




**Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assays.** APC = antigenpräsentierende Zelle; CTL = CD8<sup>+</sup> T-Zelle; IFN- $\gamma$  = Gamma-Interferon. **1:** Die Nitrozellulosemembran wird mit anti-hIFN- $\gamma$ -Primärantikörper belegt. **2:** Koinkubation von APC und CTL führt bei Antigenerkennung zur IFN- $\gamma$ -Sekretion. **3:** Zugabe des biotinylierten Sekundärantikörpers gegen IFN- $\gamma$ . **4:** Anlagerung der Avidin-Peroxidase-Komplexe an Biotin. **5:** Zugabe von AEC führt zur Umsetzung des Substrates durch die Peroxidase. **6:** Beispiel einer fehlenden Erkennung. Die T-Zellen sezernieren kein durch die Antikörper nachweisbares IFN- $\gamma$ . **7:** Beispiel einer positiven Erkennung. Nach Antigenerkennung sekretieren die CTL IFN- $\gamma$ , welches durch die Antikörper nachgewiesen werden kann. Jede IFN- $\gamma$ -sezernierende Zelle erzeugt einen IFN- $\gamma$ -Spot.

### 2.2.2.1.1 ELISpot-Assay zur Frequenzanalyse von T-Zellen

Mit dem IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay war es möglich, einzelne IFN- $\gamma$ -sezernierende T-Zellen nachzuweisen. Daher wurde nach erfolgreicher Generierung und Expansion von polyklonalen MLTCs oder monoklonalen CTLs deren Reaktivität gegen die Stimulatorzellen getestet, um die Frequenz der T-Zellen zu ermitteln, die auf Antigenkontakt mit IFN- $\gamma$ -Ausschüttung reagieren. In allen Modellsystemen standen neben den Tumorzelllinien entweder EBV-transformierte B-Zelllinien oder PHA-aktivierte PBMC-Blasten zur Verfügung, die als weitere Zelllinie des Patienten in den Test mit einbezogen werden konnte, um auch nicht-stimulatorzellspezifische Reaktivitäten nachweisen zu können. Als weitere Zielzelle wurde im Test das NK-Zell-„Target“ K562 eingesetzt. Diese Zelllinie trägt keine HLA-Moleküle auf ihrer Oberfläche und diente daher dem Ausschluss von nicht-HLA-restringierten Reaktivitäten. In Abbildung 2.3 ist veranschaulichend ein typisches Ergebnis einer solchen Frequenzanalyse dargestellt.



**Abbildung 2.3: Beispiel eines 20h IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assays.** Frequenzanalyse am Beispiel der CD62L(*high*)<sup>+</sup>-Fraktion im Modellsystem MZ3126 an Tag 39 der Kultur mit  $2 \times 10^4$  T-Zellen/TE. Bestimmung erfolgte in Doppelwerten (untereinander). **1a:** Positivkontrolle. Reaktivität gegen PHA. **1b:** Negativkontrolle. Spontanfreisetzung an IFN- $\gamma$  ohne Zielzellen. **2:** Reaktivität gegen die Tumorlinie MZ3126-RCC. **3:** Reaktivität gegen die NKC. **4:** Reaktivität gegen PHA-Blasten. **5:** Reaktivität gegen das NK-Zell-„Target“ K562.

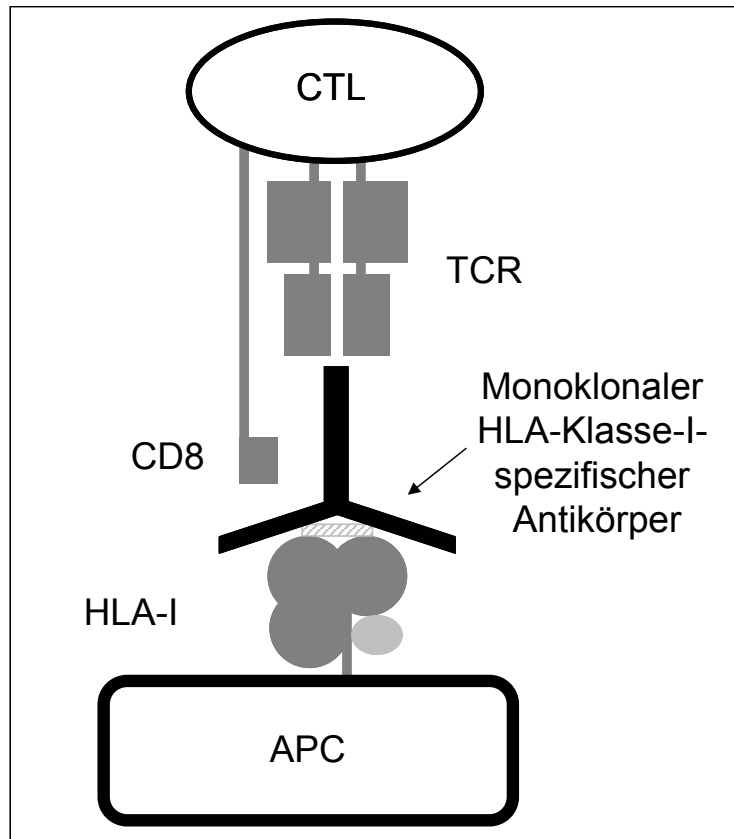
### 2.2.2.1.2 *ELISpot-Assay in Kreuzreaktivitätsstudien*

Neben der Frequenzanalyse besteht mit Kreuzreaktivitätsstudien die Möglichkeit, generierte T-Zellkulturen weiter zu charakterisieren. Dabei wurde die Reaktivität der T-Zellen gegen ein breites Spektrum anderer Zelllinien getestet. Das Ergebnis erlaubte im Wesentlichen folgende Rückschlüsse:

1. Wurden Zelllinien erkannt, die ein (oder mehrere) gemeinsame(s) HLA-Klasse-I-Molekül(e) besitzen, so konnte man die HLA-Restriktion der T-Zellkultur einengen oder sogar auf ein bestimmtes HLA-Molekül festlegen.
2. Wurden Zelllinien erkannt, die zu bestimmten Tumorentitäten oder Gewebetypen gehören, so konnte man das Expressionsmuster des Antigens bestimmen.

### 2.2.2.1.3 *ELISpot-Assay zur Bestimmung der HLA-Restriktion mittels Antikörperblockade (Blockadetest)*

Klassische T-Zellen erkennen ihr Antigen nur in Verbindung mit den HLA-Molekülen, über die das Peptid präsentiert wird. Diese HLA-restringierte Reaktivität kann durch monoklonale HLA-spezifische Antikörper blockiert werden, die die jeweiligen HLA-Moleküle auf der Oberfläche der Zielzellen maskieren, so dass die T-Zelle ihr Antigen nicht mehr erkennen kann. Das Prinzip ist in Abbildung 2.4 illustriert.



**Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der HLA-Blockade durch HLA-allelspezifische monoklonale Antikörper.** Die Erkennung des Antigens durch die T-Zelle wird durch den Antikörper unterbunden, und die Zytokinsekretion bleibt aus. APC = antigenpräsentierende Zelle; CD8 = kostimulatorisches Molekül CD8; CTL = CD8-positive T-Zelle; HLA-I = HLA-Klasse-I-Molekül; TCR = T-Zellrezeptor.

Der Einsatz unterschiedlicher HLA-allelspezifischer Antikörper in der HLA-Blockade dient der Ermittlung des HLA-Restriktionselements der getesteten T-Zellen. Nur wenige der zahlreichen monoklonalen Antikörper (Abschnitt 2.1.6.1) sind für Blockade-Experimente geeignet, da sie nicht nur das HLA-Allel bzw. eine HLA-Allelgruppe spezifisch erkennen müssen, sondern dieses auch so abschirmen müssen, dass die Erkennung des HLA-Peptid-Komplexes durch die T-Zelle nicht mehr möglich ist. Folgende HLA-spezifischen Blockade-Antikörper wurden verwendet:

- W6/32. Dieser Antikörper erkennt eine räumliche Struktur, die allen HLA-Klasse-I-Proteinen gemein ist, die mit  $\beta_2m$  assoziieren. Darunter zählen alle klassischen HLA-Klasse-Ia-Moleküle (HLA-A, -B, -C) und einige der nicht klassischen HLA-Klasse-Ib-Moleküle (HLA-E, -J und vermutlich auch HLA-G und -F). Alle klassisch HLA-restringierten  $CD8^+$  T-Zellen sollten durch diesen Antikörper blockiert werden. Die nicht-klassischen HLA-Klasse-I-Moleküle HLA-H und MIC-A werden vermutlich nicht durch W6/32 gebunden. Die Konzentration von W6/32 im Blockadetest betrug zwischen 50 und 100  $\mu\text{g/ml}$ .
- B123.2. Dieser Antikörper erkennt und blockiert ein gemeinsames Epitop aller

HLA-B- und -Cw-Allele sowie die HLA-Aw19-Subgruppe der HLA-A-Allele. Der aufgereinigte Antikörper wurde in Konzentrationen zwischen 50 und 100 µg/ml zur Blockade eingesetzt.

- GAP-A3. Der Antikörper erkennt und blockiert allelspezifisch HLA-A3. Die im Blockadetest verwendete Konzentration betrug 100 µg/ml.
- MA2.1/PA2.1. Diese Antikörper erkennen und blockieren HLA-A2. Beide Antikörper wurden in Konzentrationen zwischen 100 und 150 µg/ml verwendet.
- C7709A2. Dieser Antikörper ist gegen HLA-A24 gerichtet und wurde in Experimenten mit Verdünnungen von murinem Aszites von 1:10 bis 1:70 eingesetzt.
- HB55. Dieser Antikörper erkennt und blockiert spezifisch HLA-DR-Komplexe. Er wurde als Isotypkontrolle mit einer Konzentration zwischen 50 und 100 µg/ml in den Tests eingesetzt.

#### 2.2.2.1.4 *Transiente Transfektion von Cos7-Zellen*

Im ELTHEM-Modell gab es abgesehen von einem HLA-identischen Geschwisterspender und zwei HLA-identischen Fremdspendern auch einen nicht komplett HLA-identischen Fremdspender. Dieser wies ein einzelnes suballelisches „*Mismatch*“ auf, welches sich auf HLA-A3 befand (HLA\*A302 statt HLA\*A301). Um die Tumorreaktivität der MLTC ELTHEM allogene IV charakterisieren zu können, wurden Plasmide mit den Tumor-HLA-kodierenden cDNA-Klonen transient in Cos7-Zellen transfiziert. Mittels des IFN-γ-ELISpot-Assays konnte nachgewiesen werden, ob die Reaktivität der MLTC-„*Responder*“-Lymphozyten gegen ein tumorspezifisches Antigen oder aber gegen das HLA-A3 Molekül des Tumors gerichtet war.

Die transiente Transfektion von Cos7-Zellen mit HLA-kodierender cDNA wurde mithilfe des PolyFect®-Reagenz (Qiagen, Hilden) direkt in den antikörperbeschichteten ELISpot-Platten (wie unter Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben) durchgeführt. Dazu wurden die Zielzellen mit  $2 \times 10^4$ /TE in 120 µl RPMI<sub>10%, ohne AB</sub> vorgelegt. Durch das im Medium vorhandene FCS wurden gleichzeitig die freien Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran blockiert. Das Transfektionsreagenz wurde zusammen mit den Plasmiden mit der zu transfizierenden HLA-cDNA in 30 µl RPMI in einer Rundboden-Mikrotiterplatte folgendermaßen vorbereitet (pro TE):

- 10 µl RPMI inklusive der jeweiligen HLA-cDNA (100-200 ng)
- 20 µl RPMI inklusive 0,5 bzw. 1,0 µl PolyFect (bei Cos7-Zellen)

Die zwei Ansätze (HLA-cDNA mit Medium und die PolyFect-Verdünnung) wurden zusammen pipettiert, gut gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. In dieser Zeit bildeten sich Komplexe aus so genannten aktivierten Dendrimeren und der cDNA aus. Das Gesamtvolumen von 30 µl Transfektionslösung wurde zu den 120 µl Zielzellen gegeben (150 µl pro TE) und noch einmal gut gemischt. Dieser Ansatz wurde dann für 24 Stunden inkubiert, damit die entsprechenden Proteine synthetisiert werden konnten. Am nächsten Tag wurde das Medium vorsichtig abpipettiert und 100 µl Medium vorgelegt. Die entsprechenden HLA-restringierten T-Zellen wurden daraufhin in einem Volumen von 100 µl hinzu gegeben. Der Test wurde nun weitere 20 Stunden inkubiert und schließlich entwickelt. Zum Nachweis der Transfektionseffizienz wurde als Kontrolle eine bekannte antigenkodierende cDNA transfiziert und ein entsprechender HLA-restringierter und antigenspezifischer CTL zur Erkennung eingesetzt. Diese Kontrollsysteme wurden von Herrn Prof. T. Wölfel (Universität Mainz) zur Verfügung gestellt.

### **2.2.2.2 Zytotoxizitätstest / radioaktiver <sup>51</sup>Cr-Freisetzungstest**

Bei Antigenkontakt lysieren zytotoxische T-Zellen ihre Zielzellen mithilfe von unterschiedlichen Effektormechanismen. Durch den radioaktiven <sup>51</sup>Cr-Freisetzungstest oder Zytotoxizitätstest können diese Zell-Zell-Interaktionen nachgewiesen und quantifiziert werden [Stulting & Berke, 1973]. Dazu wurden die Zielzellen für 90 Minuten mit 100 µCi Na<sub>2</sub>(<sup>51</sup>Cr)O<sub>4</sub> (Amersham Buchler, Braunschweig) im Brutschrank inkubiert. Hierbei inkorporieren die Zellen das radioaktive Chromsalz und halten es aktiv in der Zelle. Nach vier Waschschritten mit RPMI<sub>10%</sub> wurden die Zielzellen – je nach Test oder Zielzelle – auf 1000 bis 2000 Zielzellen in 80 µl pro TE eingestellt und dann mit T-Zellen in verschiedenen Effektor/Zielzell-Verhältnissen (E/T, engl. *effector-to-target*) zwischen 1:1 und 90:1 oder 0,7:1 und 60:1 in Testeinheiten einer 96-Loch-Spitzboden-Mikrotiterplatte eingesetzt. Das Gesamt-Reaktionsvolumen betrug 160 µl. Der Test wurde zwischen vier und sechs Stunden im Brutschrank inkubiert und durch Zentrifugation der Testplatten beendet. Pro TE wurden 80 µl des Überstandes abgenommen und in Zytotox-Röhrchen überführt. Diese konnten dann in einem Gamma-Counter (Pharmacia) auf freigesetztes Chrom überprüft werden. Der Überstand chromierter Zellen, die mit einem maximal lysierenden Detergens (Tween20 in einer 1 %-igen Lösung) inkubiert wurden, diente als Positivkontrolle (entspricht der Maximal-Lyse). Um die spontane Chromfreisetzung der Zielzellen (entspricht der Minimal-Lyse) zu ermitteln, wurden die Zielzellen anstatt mit den T-Zellen mit PBS inkubiert. Die folgende Formel diente der Berechnung der zytolytischen Aktivität der T-Zellen bzw. der spezifischen Lyse eines T-Zellklons:

$$\frac{\text{experimentelle } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}}{\text{maximale } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}} \times 100$$

Zytotoxizitätstests wurden am fünften oder sechsten Tag nach Restimulation der T-Zellen durchgeführt. Alle Testansätze wurden als Doppelwerte pipettiert.

### **2.2.2.3 Durchflusszytometrie zur phänotypischen Charakterisierung von T-Lymphozyten und Tumorzellen anhand von Oberflächenmarkern**

Verschiedene Zellpopulationen können anhand der selektiven Expression bestimmter Oberflächenmoleküle in FACS („*fluorescence-activated cell sorting*“)-Färbungen charakterisiert werden. Dazu wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf Expression unterschiedlicher CD („*cluster of differentiation*“)-Antigene überprüft. Diese Oberflächenstrukturen sind in unterschiedlichem Maße und unterschiedlicher Zusammensetzung auf verschiedenen Zelltypen exprimiert [Hoffman *et al*, 1980]. In dieser Arbeit wurden sowohl Lymphozyten als auch Tumorzelllinien durch diese phänotypischen Untersuchungen näher charakterisiert, indem spezifische monoklonale Antikörper für bestimmte Oberflächenmoleküle und HLA-Allele eingesetzt wurden. Diese Maus- oder Rattenantikörper (IgG) waren gegen die jeweiligen humanen Moleküle gerichtet und waren entweder direkt an einen Fluoreszenzfarbstoff (FITC, PE oder PC5) gekoppelt (direkte Färbung) oder mussten mit einem farbstoffkonjugierten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus oder Ziege-anti-Ratte) nachgewiesen werden (indirekte Färbung). Durch Verwendung der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe war die Untersuchung von bis zu drei Oberflächenmolekülen in einem Ansatz gewährleistet. Im Durchflusszytometer wurden die Fluoreszenzfarbstoffe durch Laserlicht unterschiedlicher Wellenlänge angeregt und emittierten Licht eines entsprechenden Spektrums, welches detektierbar war. Positive Zellen konnten so identifiziert und quantitativ ausgezählt werden. Üblicherweise wurden  $1 \times 10^4$  vitale Zellen pro Versuchsansatz im Durchflusszytometer gemessen.

#### **2.2.2.3.1 Direkte FACS-Färbung von Oberflächenmolekülen**

Die benötigte Menge der zu untersuchenden Zellen ( $1 \times 10^5$  bis  $2 \times 10^5$  pro Versuchsansatz) wurde abzentrifugiert, in FACS-Puffer aufgenommen und auf die entsprechende Anzahl an FACS-Röhrchen verteilt. Nach erneuter Zentrifugation wurden

die Zellen resuspendiert und für die direkte Färbung 5-20  $\mu\text{l}$  eines direkt an einen Fluoreszenzfarbstoff gebundenen Antikörpers zugegeben und 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen, und schließlich mit 500  $\mu\text{l}$  1 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert.

#### 2.2.2.3.2 *Indirekte FACS-Färbung von Oberflächenmolekülen*

Für die indirekte Färbung wurden 50  $\mu\text{l}$  eines unkonjugierten Primärantikörpers (1 bis 100  $\mu\text{g/ml}$ ) hinzu gegeben und 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Dieser Antikörper war im Regelfall ein monoklonaler Mausantikörper, in seltenen Fällen ein Rattenantikörper, der gegen das entsprechende humane Molekül gerichtet war. Nach der Inkubation mit dem Erstantikörper folgte ein Waschschriff mit FACS-Puffer, und die Zellen wurden dann mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus oder Ziege-anti-Ratte) gegen gefärbt und wieder 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Auch diese Zellen wurden nach einem weiteren Waschschriff mit 1 % PFA fixiert und konnten dann innerhalb eines Zeitraumes von bis zu sieben Tagen nach Fixierung am Durchflusszytometer analysiert werden.

#### 2.2.2.3.3 *Beta-Mark-Färbung zur Charakterisierung der $\beta$ -Kette des T-Zellrezeptors von klonalen T-Zellpopulationen*

Eine Beta-Mark-Färbung ist eine direkte FACS-Färbung, bei der die direkt an Fluoreszenzfarbstoffe gebundenen monoklonalen Antikörper spezifisch an Epitope der unterschiedlichen TCR-V $\beta$ -Ketten binden. Dabei befanden sich je drei Antikörper in einem von insgesamt acht Teströhrchen (Röhrchen A-H), die entweder FITC oder PE oder beide Farbstoffe gebunden hatten, d. h. insgesamt konnten 24 Beta-Mark-Ketten durch diese Methode abgedeckt werden. Die Aufteilung der im Beta-Mark-Kit (Abschnitt 2.1.9) enthaltenen Antikörper ist in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Wie bei einer normalen FACS-Färbung wurden die zu untersuchenden Zellen ( $2 \times 10^5$  pro Versuchsansatz) abzentrifugiert, einmal in FACS-Puffer gewaschen, dekantiert und mit dem entsprechenden Antikörper-Mix versetzt. Es wurden 10  $\mu\text{l}$  an Antikörper-Mix pro Versuchsansatz verwendet und mit CD8-PC5 kogefärbt, damit die prozentuale Expression von CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit dem entsprechenden T-Zellrezeptor bestimmt werden konnte. Diese Färbung wurde im Gegensatz zur normalen direkten Färbung nicht bei 4 °C durchgeführt sondern 15 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden auch hier – wie oben beschrieben – gewaschen und fixiert.

	<b><i>FITC</i></b>	<b><i>PE</i></b>	<b><i>FITC/PE</i></b>
<b><i>Röhrchen A</i></b>	V $\beta$ 3	V $\beta$ 5.3	V $\beta$ 7.1
<b><i>Röhrchen B</i></b>	V $\beta$ 16	V $\beta$ 9	V $\beta$ 17
<b><i>Röhrchen C</i></b>	V $\beta$ 20	V $\beta$ 18	V $\beta$ 5.1
<b><i>Röhrchen D</i></b>	V $\beta$ 8	V $\beta$ 13.1	V $\beta$ 13.6
<b><i>Röhrchen E</i></b>	V $\beta$ 12	V $\beta$ 5.2	V $\beta$ 2
<b><i>Röhrchen F</i></b>	V $\beta$ 21.3	V $\beta$ 23	V $\beta$ 1
<b><i>Röhrchen G</i></b>	V $\beta$ 14	V $\beta$ 11	V $\beta$ 22
<b><i>Röhrchen H</i></b>	V $\beta$ 7.2	V $\beta$ 13.2	V $\beta$ 4

**Tabelle 2.4: TCR V $\beta$  Repertoire Kit.** In jedem Antikörper-Röhrchen waren drei Antikörper gegen verschiedene  $\beta$ -Ketten des TCR enthalten. Diese waren entweder an FITC, PE oder an FITC und PE gekoppelt.

Die Überprüfung der Oberflächenexpression von HLA-Molekülen auf Tumorzellen erfolgte mit nicht-konjugierten anti-HLA-Antikörpern, die mit fluoreszenzmarkiertem Ziege-anti-Maus-Antikörper angefärbt wurden. Der Nachweis von kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86) und Adhäsionsmolekülen (CD54, CD58) auf Tumorzellen erfolgte mittels direkter FACS-Färbung. T-Zellpopulationen wurden mithilfe von direkten FACS-Färbungen auf quantitative Expression von CD3 (T-zellspezifisches Oberflächenmolekül), CD4 und CD8 und auf qualitative Expression des TCR ( $\alpha\beta$ -Ketten bzw.  $\gamma\delta$ -Ketten) überprüft. Untersuchungen auf CD45RA, CD45RO, CD62L und CCR7 lieferten Hinweise auf den Differenzierungszustand der T-Zellen (naive oder differenzierte Gedächtnis-T-Zellen), und Färbungen auf die Oberflächenmoleküle CD16, CD56, CD57, CD28, CD94, CD25, CD69, CD158a und CD158b dienten der Unterscheidung der T-Zellen von NK- oder NK-T-Zellen.

#### **2.2.2.4 Intrazelluläre Perforin-Färbung**

Um intrazelluläres Perforin in den Effektorzellen nachweisen zu können, wurde eine Kokultur von T-Zellen mit ihren Stimulator-RCC-Zellen angelegt. Dazu wurden die „*Target*“-Zellen in ein „*Chamberslide*“ (Kammer-Objektträger) ausgesät und über Nacht zum Adhärenz inkubiert. Die Effektoren wurden am zweiten Tag in unterschiedlichen E/T-Verhältnissen (3/1, 5/1, 10/1) zu den „*Target*“-Zellen in das „*Chamberslide*“ gegeben und für drei Minuten bei 300 rpm zentrifugiert, um das Absinken der Effektoren zu beschleunigen. Effektoren und „*Target*“-Zellen wurden gemeinsam eine halbe Stunde bei 37 °C inkubiert, um zu gewährleisten, dass die Effektoren ihre „*Targets*“ finden und an sie binden können. Dann wurde das Medium vorsichtig abpipettiert und pro Kammer



200 µl -20 °C kaltes Methanol:Aceton (v:v 1:1) zugegeben. Nach 30 Sekunden wurde vorsichtig das Methanol:Aceton abgenommen und die restliche Flüssigkeit abgedampft. Die Zellen waren hiermit fixiert und konnten nun im nächsten Schritt blockiert werden, indem 3 % BSA in PBS/0,1 % Tween („*Blockingsolution*“) in die Kammern zugegeben, 30 Minuten bei Raumtemperatur auf den Zellen belassen und dann vorsichtig abgenommen wurde. Der primäre Perforin-Antikörper (200 µg/ml) wurde in „*Blockingsolution*“ 1:50 verdünnt und in 100 µl pro Kammer hinzu pipettiert. Nach Inkubation der Zellen mit dem primären Antikörper über eine Stunde bei Raumtemperatur wurde dreimal mit PBS/0,1 % Tween gewaschen. Die restliche Flüssigkeit wurde abpipettiert und der an einen roten Fluoreszenzfarbstoff (Cy3) gekoppelte sekundäre Antikörper (Ziege-anti-Maus; 1,4 mg/ml) in „*Blockingsolution*“ 1:200 verdünnt. In den gleichen Ansatz wurde auch der blaue Kernkontrastierungsfarbstoff (Höchst) in einer Konzentration von 1 µg/ml zugegeben und alles zusammen in 100 µl auf die Zellen gegeben. Nach Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur wurde wieder dreimal mit PBS/0,1 % Tween gewaschen und die Zellen in jeweils 300 µl PBS aufgenommen. In dieser Form waren die „*Chamberslides*“ zwei Wochen haltbar und konnten mikroskopisch analysiert werden.

#### **2.2.2.5 Intrazelluläre Färbung des „*Forkhead Box P3*“-Proteins**

„*Forkhead Box P3*“ (FoxP3) gilt als ein spezifischer Marker von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen. Es ist ein 49-55 kDa großes Protein, welches zur Familie der „*Forkhead/winged helix*“-Transkriptionsregulatoren gehört. Für die intrazelluläre Färbung dieses Proteins mittels eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers mussten die Zellen permeabilisiert werden. Sollten parallel auch Oberflächenmoleküle gefärbt werden (Kofärbung), so wurde zunächst ein normales FACS gefärbt (Abschnitt 2.2.2.3), bevor dann nach einem Waschschrift in FACS-Puffer die Permeabilisierung mit einer Fixierungs/Permeabilisierungslösung folgte. Diese wurde eine Stunde bei 4 °C durchgeführt. Nach einem Waschschrift in FACS-Puffer und weiteren zwei Waschschriften in einfach konzentriertem (1 x) Permeabilisierungspuffer wurde ein Blockierungsschritt vollzogen, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Dieser erfolgte für 15 Minuten bei 4 °C in 2 %-igem normalem Rattenserum (NRS) in 1 x Permeabilisierungspuffer. Daraufhin wurde direkt der FITC-markierte FoxP3-Antikörper mit 20 µl pro Testansatz hinzu gegeben. Die Färbung wurde 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert und anschließend durch zwei Waschschriften in 1 x Permeabilisierungspuffer abgestoppt. Die Ansätze wurden nicht fixiert, sondern in jeweils 500 µl FACS-Puffer aufgenommen und direkt im Anschluss am Durchflusszytometer analysiert.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 ***Etablierung und Charakterisierung von Zelllinien aus Nierenzellkarzinomen und nicht-malignen Nierenzellen***

In Zusammenarbeit mit der Urologischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Mainz (Frau Dr. Walburgis Brenner; Herr PD Dr. Sebastian Melchior) erhielten wir von Nierenzellkarzinom-Patienten, die sich einer Tumornephrektomie unterzogen, Gewebematerial von Tumor und angrenzender nicht-maligner Niere. Insgesamt handelte es sich hierbei um 65 Patienten, die ihre Einverständniserklärung zur Teilnahme an dieser von der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz approbierten Studie gegeben hatten. Primärtumorgewebe von 65 Patienten und angrenzendes gesundes Nierengewebe von 56 Patienten wurde zu Einzelzellsuspensionen prozessiert und in Primärkulturen angelegt. Bei 18 Nierenzellkarzinomen gelang die Kultivierung von mehr als 15 Passagen, was allgemein als stabiles *in vitro*-Wachstum bei Tumorzelllinien angesehen wird. Damit lag die Erfolgsquote für die Generierung von RCC-Zelllinien bei 27,7 %. Die zugehörigen nicht-malignen Nierenzellen (NKC, engl. *non-malignant kidney cells*) konnten in allen Fällen bis zu einem Maximum von circa sieben Zellkultur-Passagen expandiert werden. Die RCC-Zelllinien und NKCs wurden umfassend charakterisiert, indem sie histologisch, zytogenetisch (V. Bayer, Institut für Humangenetik, Mainz) und durchflusszytometrisch analysiert sowie HLA-typisiert (Dr. B. Thiele, Institut für Immunologie und Genetik, Kaiserslautern) wurden. Das Ergebnis der Charakterisierung der für diese Arbeit wichtigsten RCC- und NKC-Zelllinien ist in Tabelle 3.1 dargestellt. Die darin aufgeführten RCC-Zelllinien hatten eine klarzellige Histologie und wiesen zytogenetisch komplexe chromosomale Aberrationen auf, die typischerweise in dieser Tumorentität auftreten, wohingegen die nicht-malignen Nierenzellen den erwarteten normalen Genotyp zeigten. In der durchflusszytometrischen Analyse fiel auf, dass das Expressionsniveau von HLA-Klasse-I-Molekülen auf RCCs höher war als in den korrespondierenden NKCs der Patienten. Adhäsionsmoleküle wurden sowohl von RCCs als auch von NKCs exprimiert, wobei die Expression von CD58 (LFA-3, „*lymphocyte function-associated antigen-3*“) vergleichbar war. CD54 (ICAM-1, „*intercellular adhesion molecule-1*“) hingegen war auf NKCs stärker exprimiert als auf RCCs. HLA-Klasse-II und die kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) wurden weder auf den Nierenzellen noch auf den Tumorzellen exprimiert.

Modell	Histologie		Zytogenetik	HLA-Klasse-I	Durchflusszytometrie (MFI)					
					HLA I	HLA II	CD54	CD58	CD80	CD86
<b>MZ3126</b>	RCC	klarzellig	+7,-13,-15,-17,-22, +m1,+m2,+m3	A*0205/1101 B*5001/5101	173,6	0	87	45	0	0
	NKC	normal	normal	Cw*0602/1502	124,6	0	217,9	25	0	3
<b>MZ3114</b>	RCC	klarzellig	XXYY,-8,-9,-10,-11,-13, -18,+20,+m2	A*0201/0201 B*1801/2702	217,5	0	124,7	36	1	2
	NKC	normal	normal	Cw*0202/0501	67	0	533	39	8	9
<b>ELTHEM</b>	RCC	klarzellig	+der(1)(1;Y)(q;q),+2,+der(2)(q-), +der(3)(p-),+4,+add(6)(q+),+7,+8, +der(10)(q-),+12,+16,+21,+m4	A*0301/2402 B*0702/0801	96	1	18	48	10	7
	NKC	normal	normal	Cw*0702/0702	74	0	63	52	2	1

**Tabelle 3.1: Charakterisierung der Nierenzellkarzinomlinien und nicht-malignen Nierenzellen der Patienten MZ3114, MZ3126 und ELTHEM.** Dargestellt sind die Ergebnisse der Nierenzellkarzinomlinien und der zugehörigen nicht-malignen Nierenzellen aus drei Tumormodellen. Während die RCC-Zelllinien komplexe zytogenetische Aberrationen aufwiesen, zeigten die korrespondierenden NKCs den erwarteten normalen Genotyp. MFI = „mean fluorescence index“; NKc = nicht-maligne Nierenzellen; RCC = Nierenzellkarzinom-Tumorzellen.

### 3.2 Vorstellung der Nierenzellkarzinom-Modelle

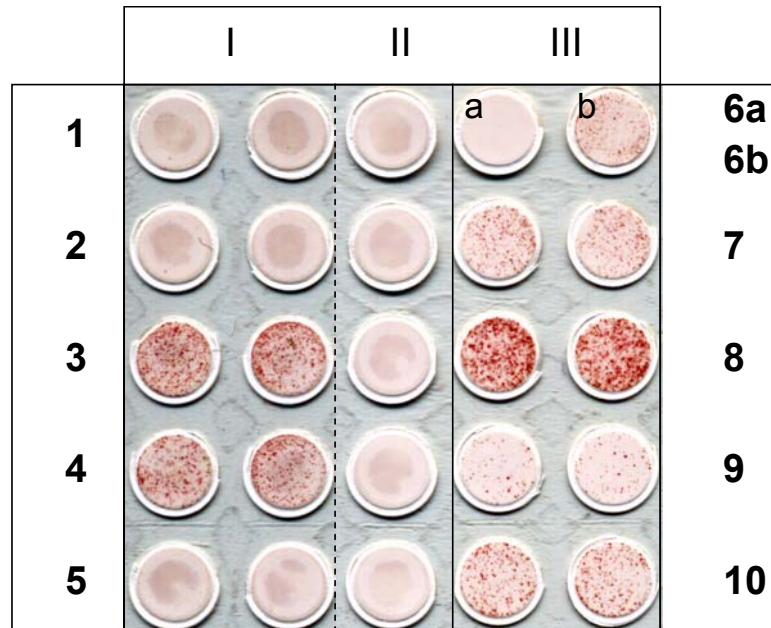
Im Folgenden werden die vier Modellsysteme vorgestellt, die in der vorliegenden Arbeit eingehend charakterisiert wurden. In sämtlichen Modellen war ein Geschwisterspender mit komplett übereinstimmendem HLA-Typ vorhanden. In drei von vier Modellen (MZ3114, MZ3126, MZ3603) wurden die Tumorzelllinien in unserem Labor aus Primärtumoren von Nierenzellkarzinom-Patienten aus der Mainzer Universitätsklinik generiert. Ebenfalls wurden PBMCs aus dem Blut der jeweiligen Patienten und deren HLA-identischen Geschwistern isoliert. Das vierte Modell (ELTHEM) wurde an der Universität von Bari, Italien, in Kooperation mit Frau Dr. Elena Ranieri (Department of Nephrology) generiert.

#### 3.2.1 Modell ELTHEM

Im Modell ELTHEM waren neben PBMCs des Patienten auch PBMCs von einem verwandten und drei nicht verwandten Spendern mit serologisch identischem HLA-Typ verfügbar. Der Geschwisterspender und zwei der nicht verwandten Spender stammten ebenfalls aus Italien, wohingegen der dritte unverwandte HLA-identische Spender in der Mainzer Blutbank gefunden wurde. In der hochauflösenden genomischen HLA-Typisierung wies ein unverwandter Spender ein suballelisches „Mismatch“ für HLA-A3 auf (Patient: A\*0301; Spender: A\*0302), während die anderen unverwandten Spender auch im suballelen Bereich mit dem Patienten komplett übereinstimmten.

### **3.2.1.1 Isolierung von HLA-A\*0301-„Mismatch“-reaktiven MLTC-„Responder“-Lymphozyten aus einem serologisch HLA-identischen Fremdspender**

Im ELTHEM-Modell wurden aus PBMCs der vier gesunden HLA-identischen Spender allogene gemischte Lymphozyten-Tumorzell-Kulturen (MLTCs) angesetzt. Während die MLTC des Fremdspenders BC aufgrund schlechter Proliferation nicht untersucht werden konnte und die des zweiten Fremdspenders VA HLA-restringierte „Responder“-Lymphozyten mit nur schwachem Wachstumsverhalten hervorbrachte, zeigte die MLTC des dritten Fremdspenders IV eine überdurchschnittlich gute Proliferation. Diese übertraf sogar die hervorragende proliferative Kapazität der allogenen Geschwister-MLTC des gleichen Modells. Die „Responder“-Lymphozyten der MLTC-IV erkannten im IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay ELTHEM-RCC-Zellen und wiesen in HLA-Antikörper-Blockade-Experimenten eine Restriktion über HLA-A3 auf. Diese Reaktivität war an Tag 27 der MLTC nachweisbar. Da die genotypische HLA-Typisierung ein „Mismatch“ im suballelischen Bereich von HLA-A3 (Patient: A\*0301; Spender: A\*0302) ergab, wurden weitere Experimente durchgeführt, die klären sollten, inwiefern diese MLTC dieses suballelische „Mismatch“ erkannte. Ein IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay, in dem eine K562-Transfektante als Zielzelle eingesetzt wurde, die HLA-A\*0301 exprimierte, lieferte einen ersten Hinweis auf die mögliche „Mismatch“-Reaktivität der MLTC, da diese Transfektante deutlich erkannt wurde. Daher wurde ein Transfektions-ELISpot-Assay durchgeführt, in dem Cos7-Zellen transient mit HLA-A\*0301 transfiziert und im ELISpot als „Target“-Zellen eingesetzt wurden. Als Kontrollen wurden die jeweiligen Zellen in Testmedium ausgesät, um eine Hintergrundaktivität von Effektoren und Zielzellen auszuschließen. Außerdem wurden die T-Zellen gegen nicht transfizierte und gegen „mock“-, d.h. mit leerem Vektor, transfizierte Cos7-Zellen eingesetzt, um eine Reaktivität gegen die Rezipientenzellen sowie gegen den Transfektionsvektor nachzuweisen. Als weitere Kontrolle wurden HLA-Klasse-I-cDNAs aus unterschiedlichen Modellen (HLA-A\*0301 aus MZ1257-RCC und MZ7-MEL; HLA-B7 aus MZ1257-RCC) verwendet, um auch hier eine unspezifische Reaktivität detektieren zu können.



**Abbildung 3.1: Transfektions-ELISpot-Assay zum Nachweis einer HLA-A\*0301-„Mismatch“-Reaktivität von MLTC-„Responder“-Lymphozyten des Fremdspenders IV im Modell ELTHEM-RCC.** 1: Reaktivität gegen das Transfektions-„Target“ Cos7. 2: Reaktivität gegen „mock“-transfizierte Cos7-Zellen. 3: Reaktivität gegen Cos7 + HLA-A\*0301 aus Modell MZ1257-RCC. 4: Reaktivität gegen Cos7 + HLA-A\*0301 aus Modell MZ7-MEL. 5: Reaktivität gegen Cos7 + HLA-B7 aus Modell MZ1257-RCC. 6a: Negativkontrolle. IFN- $\gamma$ -Spontanfreisetzung der T-Zellen ohne Zielzellen. 6b: Positivkontrolle. IFN- $\gamma$ -Freisetzung der T-Zellen nach Stimulation mit PHA. 7: Reaktivität gegen Tumorzelllinie ELTHEM-RCC. 8: Reaktivität gegen ELTHEM-LCLs. 9: Reaktivität gegen Parentalzelllinie K562. 10: Reaktivität gegen stabile K562-A\*0301 Transfektante. I & II: Transfektions-ELISpot; I: Effektorzellen eingesetzt gegen oben genannte Zielzellen; II: Negativkontrolle. Spontanfreisetzung der Transfektionszielzellen Cos7 an IFN- $\gamma$  ohne Effektoren. III: ELISpot zum Nachweis der Reaktivität, Effektorzellen mit Zielzellen wie oben beschrieben.

Der Transfektions-ELISpot-Assay bestätigte die Vermutung, dass MLTC-IV-„Responder“-Lymphozyten präferentiell gegen das HLA-A\*0301-„Mismatch“ gerichtet waren (Abbildung 3.1). Es war keine Reaktivität gegen nicht transfizierte, „mock“- und B7-transfizierte Cos7-Zellen (Abbildung 3.1, 1, 2 und 5) nachweisbar. Die Stärke der mit HLA-A\*0301 transient transfizierten Cos7-Zellen detektierten Anti-HLA-A\*0301-„Mismatch“-Reaktivität (Abbildung 3.1, 3 und 4) war mit der Reaktivität gegen die Stimulator-RCC-Zelllinie und die stabile K562-A\*0301-Transfektante vergleichbar (Abbildung 3.1, 7 und 10).

### 3.2.2 Modell MZ3114

Das Modell MZ3114 wurde mithilfe der in Mainz generierten Tumorzelllinie MZ3114-RCC aufgebaut. Es standen sowohl PBMCs des Patienten als auch allogene PBMCs eines Bruders mit identischem HLA-Typ zur Verfügung. Zusätzlich wurden in diesem Modell tumorinfiltrierende Lymphozyten aus der Einzelzellsuspension des zerkleinerten Tumormaterials nach dem Verdauungsschritt isoliert.

### 3.2.3 Modell MZ3126

Die Tumorzelllinie MZ3126-RCC wurde ebenfalls in Mainz aus Primärtumorgewebe isoliert. Leider verstarb die Patientin MZ3126 sehr rasch nach Operation, so dass in diesem Modell keine autologen PBMCs zur Verfügung standen. Die allogenen PBMCs aus dem Blut der Schwester mit dem gleichen HLA-Typ konnten jedoch den Funktionalitätsuntersuchungen unterzogen werden. Als autologe „Responder“-Lymphozyten waren TILs der Patientin MZ3126 verfügbar.

### 3.2.4 Modell MZ3603

Im Modell MZ3603, welches aus der in Mainz generierten Tumorzelllinie MZ3603-RCC hervorging, gab es ebenfalls autologe PBMCs sowie HLA-identische Geschwister-PBMCs, die in vergleichenden Funktionalitätsexperimenten eingesetzt werden konnten. Auch hier waren zusätzlich TILs der Patientin MZ3603 verfügbar.

In Tabelle 3.2 sind alle Modelle inklusive der verfügbaren PBMC-Spender sowie deren HLA-Typen zusammengefasst.

Modell	HLA-A	HLA-B	HLA-Cw
ELTHEM autolog	*0301, *2402	*0702, *0801	*0702, *0702
ELTHEM SIB	*0301, *2402	*0702, *0801	*0702, *0702
ELTHEM Spender IV	*0302, *2402	*0702, *0801	*0702, *0702
ELTHEM Spender VA	*0301, *2402	*0702, *0801	*0702, *0702
ELTHEM Spender BC	*0301, *2402	*0702, *0801	*0702, *0702
MZ3126 autolog	*0205, *1101	*5001, *5101	*0602, *1502
MZ3126 SIB	*0205, *1101	*5001, *5101	*0602, *1502
MZ3114 autolog	*0201	*1801, *2702	*0202, *0501
MZ3114 SIB	*0201	*1801, *2702	*0202, *0501
MZ3603 autolog	26, 32	14, 38	08, 12
MZ3603 SIB	26, 32	14, 38	08, 12

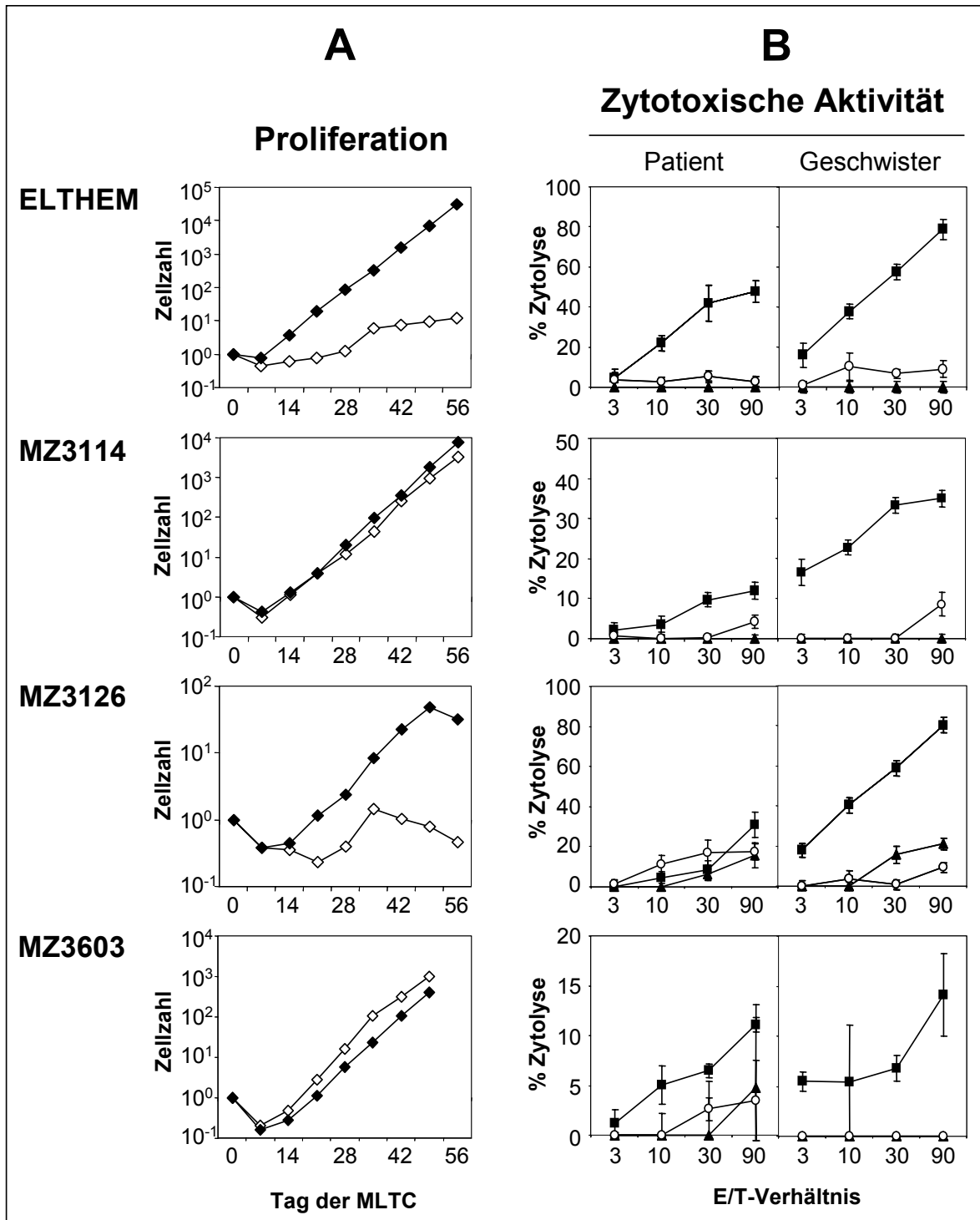
**Tabelle 3.2: HLA-Typen der RCC-Patienten und allogenen PBMC-Spender.** Die Tabelle fasst die HLA-Klasse-I-Typen aller Patienten und aller verfügbaren verwandten und unverwandten Spender bezüglich des Klasse-I-HLA-Typs zusammen. SIB = Geschwister.

### **3.3 Vergleich der RCC-Reaktivität von autologen und allogenen T-Zellkulturen**

In den vier uns zur Verfügung stehenden Nierenzellkarzinom-Modellen wurden sowohl autologe (aus den PBMCs des Patienten; bei MZ3126: TILs des Patienten) als auch allogene (aus den PBMCs von allogenen verwandten oder unverwandten Spendern mit übereinstimmendem HLA-Klasse-I-Typ) MLTC-Kulturen angesetzt, um nach wöchentlicher Stimulation mit den autologen Tumorzellen die Funktionalität der expandierenden Lymphozyten zu überprüfen und zu vergleichen.

#### **3.3.1 Keine oder nur geringe Tumorreaktivität in autologen peripheren Blutlymphozyten und tumorinfiltrierenden Lymphozyten**

In den vier RCC-Patienten bereits existierende Antitumor-Immunität wurde analysiert, indem tumorinfiltrierende Lymphozyten aus drei der vier Modelle (Ausnahme: ELTHEM) in Kultur genommen wurden. In allen Fällen konnten die TILs gut expandiert werden. Allerdings zeigten diese in IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assays und Zytotoxizitätstests keine relevante Erkennung der autologen RCC-Zelllinien, mit denen sie stimuliert worden waren. Außerdem wurden autologe PBMCs aus dem Blut der RCC-Patienten mit der entsprechenden Tumorzelllinie stimuliert und in Form von MLTCs kultiviert. Die hieraus resultierenden autologen MLTC-Effektoren waren CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die in Zytotoxizitäts- (Abbildung 3.2, B) und IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assays (Daten nicht gezeigt) geringe oder keine Reaktivität gegen die Stimulator-Tumorzelllinie zeigten. Einzig im ELTHEM-RCC-Modell zeigte die autologe MLTC signifikante Tumorreaktivität (Abbildung 3.2, B). Allerdings schlugen alle Versuche fehl, diese T-Zellkulturen zu klonieren und *in vitro* zu expandieren.



**Abbildung 3.2: Stärkere Tumorreaktivität in HLA-identischen Geschwister-PBMCs im Vergleich zu autologen Patienten-PBMCs.** MLTCs wurden aus PBMCs der Patienten ELTHEM, MZ3114 und MZ3603 bzw. aus TILs der Patientin MZ3126 sowie aus PBMCs der HLA-identischen Geschwisterspender angesetzt. Wöchentlich wurden als Stimulatorzellen die korrespondierenden Tumorzellen zugegeben. Gezeigt sind repräsentative Daten von mehreren Experimenten. **A:** Hier gezeigt sind die Proliferationskurven aus den wöchentlichen Zellzahlen von autologen Patienten- (◇) und allogenen Geschwister-MLTCs (◆). **B:** Autologe und allogene MLTC-Effektoren wurden zwischen Tag 45 und Tag 55 der Kultur parallel auf zytolytische Aktivität in Zytotoxizitätstests überprüft. Die eingesetzten Zielzellen waren die Patienten-Tumorzelllinien (■), autologe LCL-Zelllinien (MZ3114, ELTHEM, MZ3603) oder PHA-Blasten (MZ3126) als Zielzellen hämatopoetischer Herkunft (▲) und das NK-„Target“ K562 (○). E/T = Effektor-zu-„Target“-Verhältnis; Zytolyse = lytische Aktivität von MLTC-„Responder“-Lymphozyten.



### 3.3.2 Isolierung von RCC-reaktiven CD8<sup>+</sup> CTL-Klonen aus HLA-identischen Geschwisterspendern

Parallel zu den autologen MLTC-Ansätzen wurden auch die entsprechenden allogenen MLTCs aus den HLA-identischen Geschwisterspendern kultiviert und auf primäre zelluläre Immunantworten gegen den Tumor untersucht. Nach zwei bis drei wöchentlichen Stimulationen mit den Nierenzellkarzinom-Tumorzellen konnte in neun unabhängigen Ansätzen eine starke Proliferation der allogenen MLTC-„Responder“-Populationen beobachtet werden. Die Zellen wurden wöchentlich für die Restimulation gezählt und mit den Proliferationsfaktoren der entsprechenden autologen Massenkulturen verglichen. Die Zellzahlen der allogenen MLTCs lagen in der Regel höher als die der autologen MLTCs (Abbildung 3.2, A). Die einzige Ausnahme stellte das Modell MZ3603 dar, in welchem die autologe MLTC einen kleinen Vorteil in der Proliferation gegenüber der allogenen MLTC zeigte. Eine antigenunspezifische zytokininduzierte Proliferation konnte ausgeschlossen werden, da die Proliferation der allogenen MLTC-Kulturen von der Stimulation mit Tumorzellen abhängig war. Die reaktiven Lymphozyten waren ausschließlich zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen, wohingegen eine Expansion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder NK-Zellen nicht beobachtet wurde. Die allogenen MLTC-Populationen erkannten fast ausnahmslos die entsprechenden RCC-Zellen in Zytotoxizitätstests (Abbildung 3.2, B). Wieder stellt das Modell MZ3603 hier eine Ausnahme dar, da die Tumorzellen sowohl von den autologen MLTC-Kulturen als auch von den allogenen MLTCs nur schwach (<20 %) lysiert wurden. Im Vergleich zu den autologen MLTC-Populationen lagen die Tumorlysen in der Regel bei den allogenen MLTCs signifikant höher. Außerdem zeigten diese nur geringe oder gar keine Reaktivitäten gegen B-lymphoblastoide Zelllinien oder PHA-Blasten des jeweiligen Patienten als hämatopoetische Zielzellen (Abbildung 3.2, B). Auch das NK-Zell-„Target“ K562 wurde nicht erkannt. Signifikante Kreuzreaktivität gegen die nicht-malignen Nierenzellen des Patienten wurde nur im ELTHEM-Modell beobachtet (Daten nicht gezeigt).

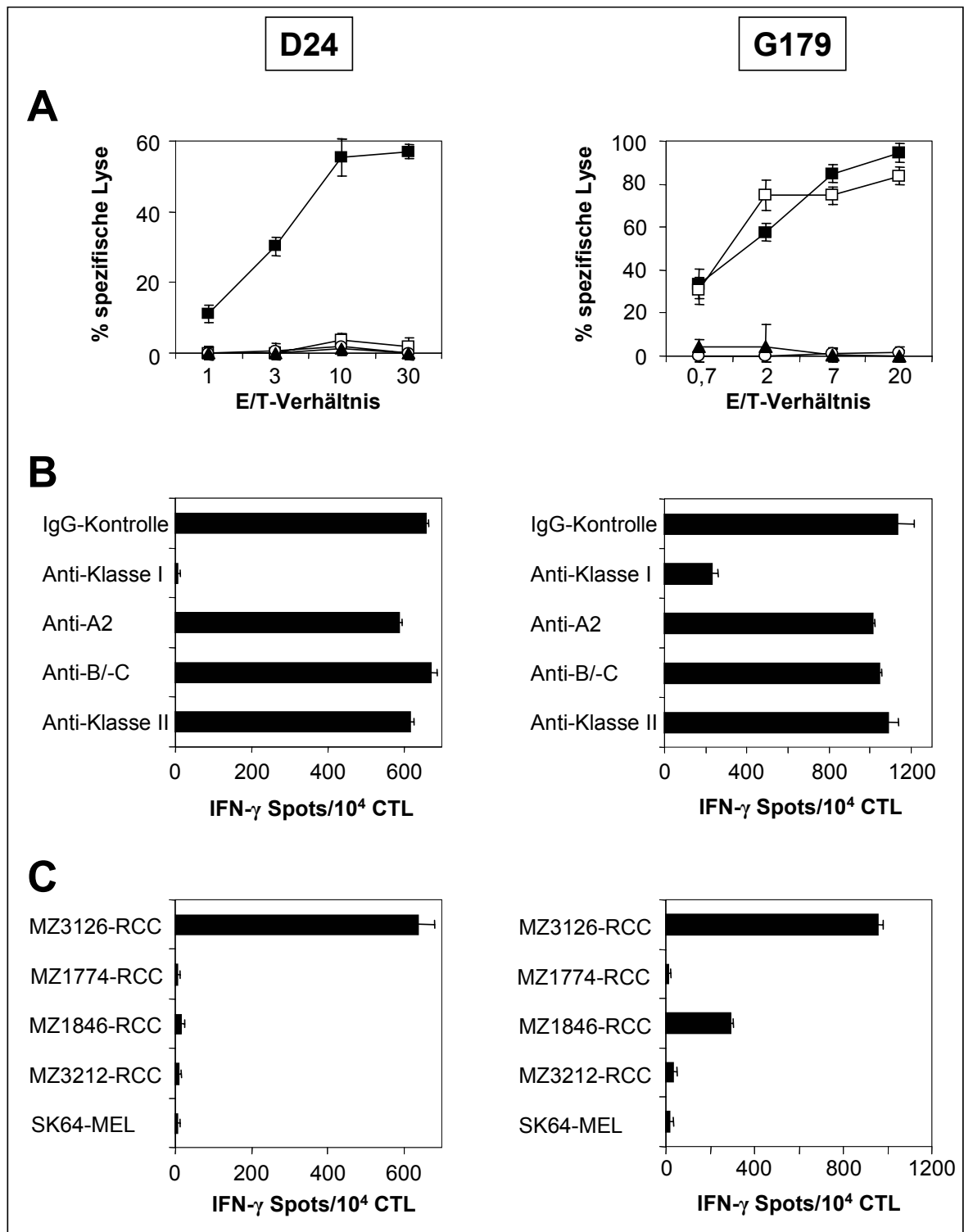
Die MLTC-„Responder“-Populationen von drei der vier verschiedenen Geschwisterspender wurden über das Grenzverdünnungsverfahren („LD cloning“) kloniert, um die einzelnen in der Massenkultur vorhandenen T-Zellspezifitäten analysieren zu können. Die MLTC-Populationen im Modell MZ3603 wurden aufgrund der schlechten Tumorreaktivität nicht kloniert. Zunächst wurden 5000 KE über das Grenzverdünnungsverfahren ausgesät, von denen sich mehr als 400 tumorreaktive CD8<sup>+</sup> CTLs isolieren ließen. Von diesen waren 65 CTL-Klone so weit expandierbar, dass sie detailliert charakterisiert werden konnten. Dies beinhaltete die Analyse der phänotypischen Merkmale in der Durchflusszytometrie, von MHC-Restriktionselementen durch Antikörper-Blockaden und

die Überprüfung von möglichen Kreuzreaktivitäten gegen nicht-maligne Nierenzellen und hämatopoetische Zelllinien des Patienten sowie allogene RCC-Zelllinien und Tumorzelllinien anderen Ursprungs, die in einem oder mehreren HLA-Allelen mit dem HLA-Typ des Patienten übereinstimmten. Als Tumor-Zielzellen anderen Ursprungs wurden stabile Zelllinien eingesetzt, die aus Melanomen, Brust-, Kolon-, Lungen-, Pankreas-, Gallenblasen- und hepatozellulären Karzinomen generiert worden waren.

Der durchflusszytometrische Phänotyp der RCC-reaktiven allogenen Geschwister-CTL-Klone war CD27<sup>-</sup>, CD45RO<sup>+</sup>, CD62L<sup>-</sup>, CD25<sup>+</sup> und CD69<sup>+</sup>, was dem Phänotyp von aktivierten reifen „*effector memory*“-T-Zellen entspricht (Tabelle 3.3). Der Großteil an CTL-Klonen erkannte ausschließlich die ursprüngliche RCC-Zelllinie und reagierte nicht mit den Patienten-Nierenzellen, hämatopoetischen Zielzellen und anderen Tumorzelllinien (Abbildung 3.3, repräsentativer Klon D24), was auf tumorassoziierte oder gar tumorspezifische Antigene als erkannte Peptidstrukturen hinwies. Ein beachtlicher Anteil an CTL-Klonen erkannte zusätzlich die nicht-malignen Nierenzellen des Patienten (Abbildung 3.3, repräsentativer Klon G179), der somit offenbar gegen nierenassoziierte oder nieren spezifische Minor-Histokompatibilitätsantigene gerichtet war. Nur ein Bruchteil der CTL-Klone reagierte mit hämatopoetischen Zielzellen aus dem Patienten oder weiteren allogenen Tumorzelllinien. Die insgesamt beobachteten MHC-Restriktionselemente der CTL-Klone schlossen HLA-A2, -A3, -A11, -A24 und -B7 ein. Eine Übersicht über alle erhaltenen HLA-restringierten und RCC-reaktiven CTL-Klone findet sich in Tabelle 3.4.

Antigen	<u>MZ3126</u>		<u>ELTHEM</u>	
	D24	E111	27B11	41A8
CD3	100	97	96	91
CD8	98	96	94	91
CD4	1	0	0	1
αβ TCR	94	93	90	90
γδ TCR	1	0	0	0
CD16	0	4	64	23
CD56	5	13	63	13
CD57	2	6	54	73
CD94	0	0	10 <sup>low</sup>	16 <sup>low</sup>
NKG2D	46	89	61	76
KIR2DL/S1	0	0	1	0
KIR2DL/S2	0	1	2	2
KIR3DL1	0	1	1	0
ILT2/LIR-1	6	58	43	88
CD62L	0	0	0	0
CD45RA	1	36 <sup>low</sup>	64 <sup>low</sup>	29 <sup>low</sup>
CD45RO	99	53	97	98
CD44	100	92	79	99
CCR7	14 <sup>low</sup>	32 <sup>low</sup>	58	48
CD27	0	0	0	0
CD28	16 <sup>low</sup>	2	41 <sup>low</sup>	16 <sup>low</sup>
CD25	100	63	99	67
CD69	95	80	65	74
CD95	100	n.d.	98	99
HLA-DR	98	82	93	89

**Tabelle 3.3: Durchflusszytometrische Analyse von repräsentativen RCC-reaktiven CTL-Klonen aus Geschwisterspendern.** Die gezeigten CTL-Klone wurden aus HLA-identischen Geschwisterspendern der Patienten MZ3126 (D24, E111) und ELTHEM (27B11, 41A8) isoliert. Gezeigt sind die Prozentsätze der T-Zellen, die sich mit FITC- oder PE-markierten Antikörpern anfärben ließen.



**Abbildung 3.3: HLA-restringierte RCC-reaktive CTL-Klone aus gesunden Geschwisterspendern.** Die repräsentativen CTL-Klone D24 und G179 wurden aus einer allogenen MLTC kloniert, die aus PBMCs des gesunden Geschwisterspenders und der MZ3126-Tumorzelllinie angesetzt worden war. **A:** Die Reaktivität der CTL-Klone wurde im Zytotoxizitätstest gegen MZ3126-RCC (■), MZ3126-NKC (□), MZ3126-PHA-Blasten (▲) und K562 (○) getestet. E/T = Effektor-zu-„Target“. **B:** Einfluss von Anti-HLA monoklonalen Antikörpern auf die Erkennung von MZ3126-RCC im IFN-γ-ELISpot-Assay. Der HLA-Klasse-I-Typ von MZ3126-RCC ist A2/11, B50/51, Cw6. Die CTLs zeigten eine HLA-Restriktion über HLA-A11. Ein HLA-A11-Antikörper war nicht verfügbar. **C:** Kreuzreaktivität gegen verschiedene HLA-A11-positive Zelllinien wurde im IFN-γ-ELISpot-Assay analysiert. In A2- oder B/C-Allelen übereinstimmende Zelllinien wurden nicht erkannt. MEL = Melanom; spezifische Lyse = lytische Aktivität von klassischen CTL-Klonen.

Geschwister CTL-Klone mit Reaktivität gegen

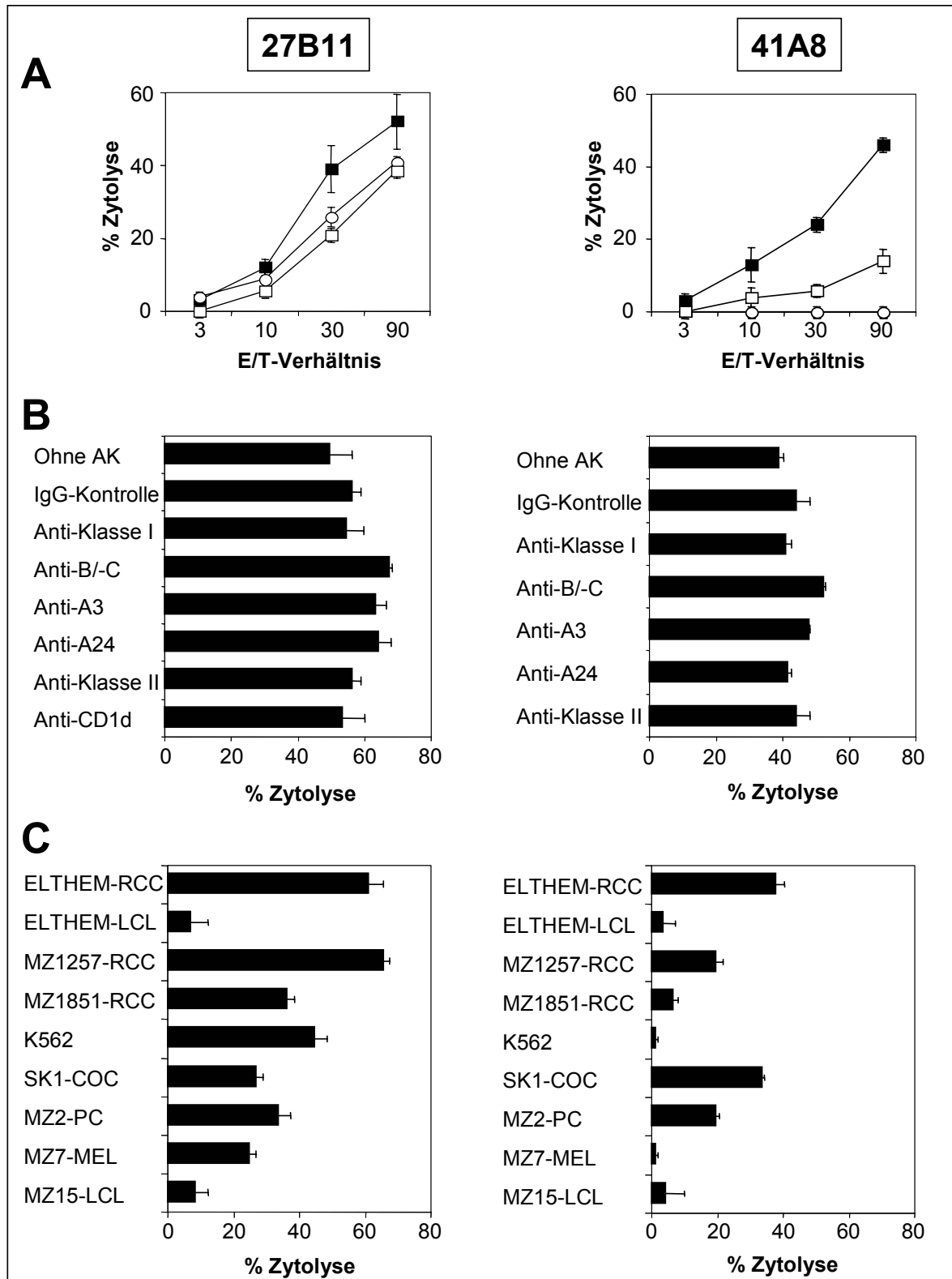
<b>Reakt.</b> <b>Modell</b>	<b>ausschl.</b> <b>auto-RCC</b>	<b>auto-RCC</b> <b>auto-NKC</b>	<b>auto-RCC</b> <b>auto-LCL/PHA-B</b>	<b>auto-RCC</b> <b>allo-RCC</b>	<b>auto-RCC</b> <b>allo-Tumoren</b>
<b>ELTHEM</b>	11 Klone (11 A24)	3 Klone (2 A24, 1 A3)	2 Klone (2 B7)	1 Klon (1 A3)	0
<b>MZ3114</b>	4 Klone (2 A2, 2 ND)	5 Klone (1 A2, 4 ND)	3 Klone (1 B/C, 2 ND)	0	1 Klon (1 A2)
<b>MZ3126</b>	21 Klone (16 A11, 3 A2, 2 ND)	10 Klone (8 A11, 1 A2, 1 B/C)	3 Klone (3 A2)	1 Klon (1 A11)	0

**Tabelle 3.4. Zusammenfassung aller HLA-Klasse-I-restringierten CD8<sup>+</sup> CTL-Klone aus gesunden Geschwisterspendern in den Nierenzellkarzinom-Modellen ELTHEM, MZ3114 und MZ3126.** Aufgeführt für jedes System ist die Anzahl an expandierten und charakterisierten CTL-Klonen, die anhand ihres Kreuzreaktivitätsmusters und ihrer HLA-Klasse-I-Restriktionselemente zusammengefasst wurden. allo = allogene; auto = autologer Patient; LCL = lymphoblastoide Zelllinie; NKC = primäre nicht-maligne Nierenzellen; PHA-B = phytohämagglutininaktivierte PBMC-Blasten; A2 = HLA-A2; A3 = HLA-A3; A11 = HLA-A11; A24 = HLA-A24; B7 = HLA-B7; B/C = gemeinsames HLA-B/C-Allel; ND = nicht feststellbar.

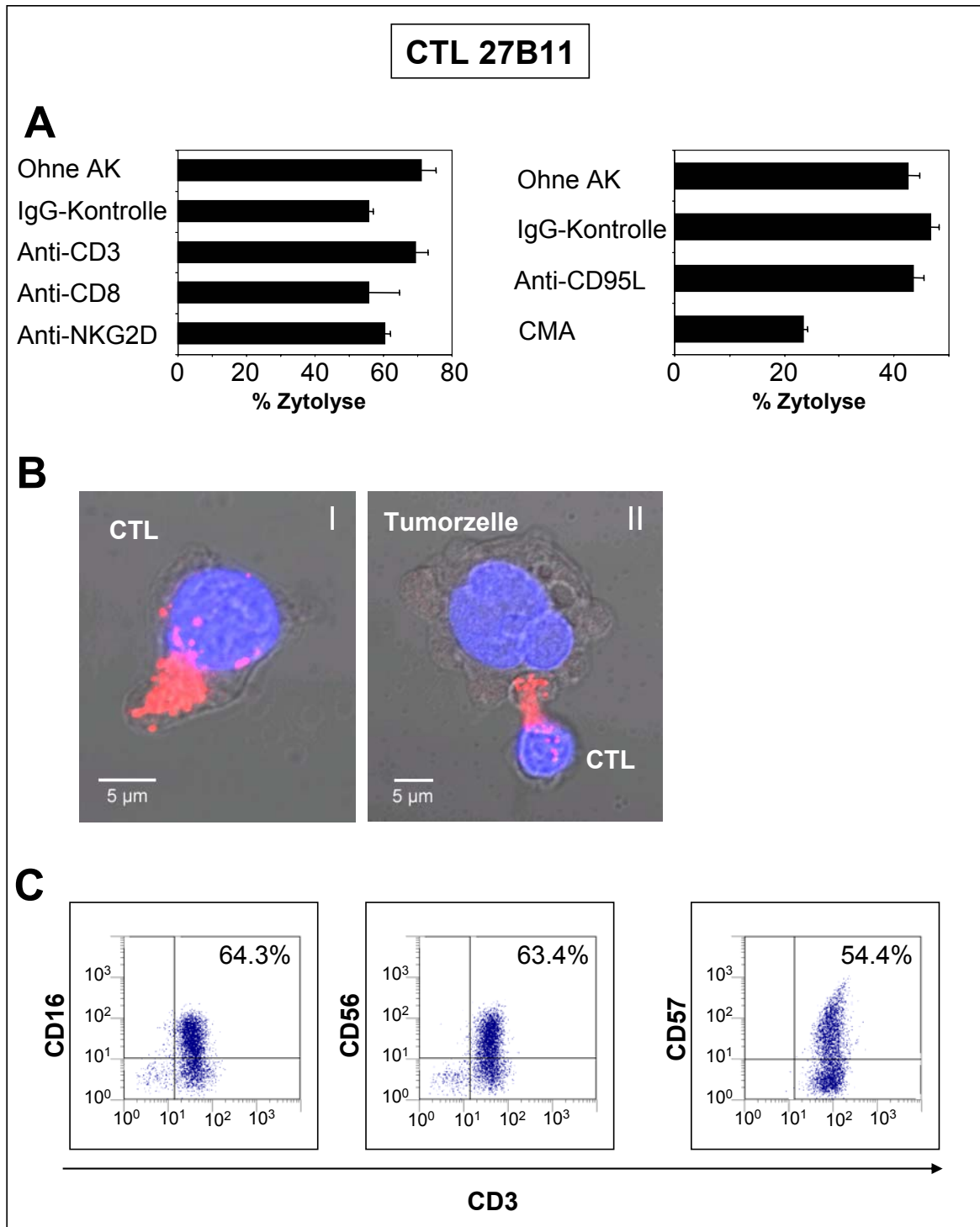
### **3.4 Identifizierung von HLA-identischen Geschwister-CTLs mit nicht-HLA-restringierter RCC-Reaktivität**

Im ELTHEM-Modell zeigten die allogenen Geschwister-MLTC-Populationen eine außergewöhnlich hohe antigenabhängige *in vitro*-Proliferation (Abbildung 3.2). Nach Klonierung mittels des Grenzverdünnungsverfahrens in anfangs 2000 KE wurden mehr als 200 CD8<sup>+</sup> CTL-Klone erhalten, die viel schneller expandierbar waren als die meisten HLA-restringierten Geschwister-CTLs. Zwanzig dieser CTL-Klone wurden detailliert charakterisiert. In Zytotoxizitätstests erkannten diese CTLs die ELTHEM-RCC-Linie und außerdem in einem geringeren Maße auch die nicht-malignen Nierenzellen der Patienten (Abbildung 3.4, repräsentative CTL-Klone 27B11 und 41A8). ELTHEM-LCLs oder LCLs anderer Individuen wurden nicht erkannt, wie in Kreuzreaktivitätsuntersuchungen gezeigt werden konnte. Interessanterweise reagierte ein Teil der CTL-Klone auch gegen das NK-Zell-„Target“ K562. Diese NK-artige Reaktivität war allerdings nicht so stark ausgeprägt

wie die Reaktivität gegen die Tumorzelllinie (Abbildung 3.4, CTL 27B11). Andere CTLs wiesen diese Kreuzerkennung von K562 nicht auf (Abbildung 3.4, CTL 41A8). Zusätzlich wurden viele Zielzellen aus unterschiedlichen Tumorentitäten (RCC und Nicht-RCC) erkannt, von denen einige mit der ELTHEM-RCC-Linie in keinem einzigen HLA-Allel übereinstimmten (Abbildung 3.4, C). Dieses Ergebnis der Kreuzreaktivität ließ auf einen nicht-HLA-restringierten Erkennungsmechanismus dieser CTLs schließen. Dies konnte in Zytotoxizitätstests durch Blockade-Experimente mit monoklonalen Antikörpern gegen unterschiedliche Oberflächenmoleküle auf den Zielzellen und den Effektorzellen bestätigt werden (Abbildung 3.4, B). Hierfür wurden Antikörper gegen HLA-Klasse-I und das nicht-klassische MHC-Molekül CD1d auf den Zielzellen (Abbildung 3.4, B) und Antikörper gegen CD3, CD8, den NK-zellaktivierenden Rezeptor NKG2D und den Fas-Liganden (CD95L) auf den Effektorzellen (Abbildung 3.5, A) im Testmedium eingesetzt. Die zytolytische antitumorale Aktivität der CTLs konnte durch die Zugabe dieser Antikörper nicht blockiert werden (Abbildung 3.5, A). Der einzige Wirkstoff, der eine Blockade der Tumorlyse bewirken konnte, war Concanamycin A, welches ein Inhibitor der vesikelvermittelten Sekretion von zytotoxischen Granulae ist (Abbildung 3.5, A). Dass die ELTHEM-CTLs tatsächlich große Mengen an Perforin produzierten, konnte durch eine stimulierende Kokultur von RCC-Zellen mit den CTLs und einer anschließenden Anfärbung von intrazellulärem Perforin durch einen an einen Fluoreszenzfarbstoff gebundenen monoklonalen Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 3.5, B).



**Abbildung 3.4: CTLs aus dem HLA-identischen Geschwister des ELTHEM-RCC-Patienten mit nicht-HLA-restringierter RCC-Reaktivität.** CTL-Klone 27B11 und 41A8 wurden aus einer ELTHEM-Geschwister-MLTC an Tag 27 bzw. Tag 41 kloniert. Die CTL-vermittelte zytolytische Aktivität wurde im Zytotoxizitätstest überprüft. **A:** Als Zielzellen wurden ELTHEM-RCC (■), ELTHEM-NKC (□) und K562 (○) eingesetzt. **B:** RCC-Zytotoxizität war durch monoklonale Antikörper gegen HLA-Klasse-I-Allele nicht blockierbar. Der HLA-Typ von ELTHEM-RCC ist HLA-A3/24; -B7/8; -Cw7. **C:** Zielzellen waren unterschiedliche Zelllinien, von denen einige in keinem einzigen HLA-Allel mit ELTHEM-RCC übereinstimmen. Das E/T-Verhältnis war 60/1. COC = Kolonkarzinom; PC = Pankreaskarzinom; Zytolyse = lytische Aktivität von nicht-klassischen CTL-Klonen.



**Abbildung 3.5: T-zellrezeptorunabhängige RCC-Lyse durch die nicht-HLA-restringierten ELTHEM-CTLs.** Der repräsentative CTL-Klon 27B11 wurde aus der Geschwister-MLTC des Modells ELTHEM isoliert. **A:** Die Reaktivität des CTL 27B11 gegen ELTHEM-RCC wurde bei einem E/T-Verhältnis von 60/1 im Zytotoxizitätstest überprüft. Das Testmedium enthielt Antikörper gegen Oberflächenantigene, die von den CTL-Effektoren exprimiert werden, oder Concanamycin A (CMA). **B:** Nach einer 30 Minuten-Inkubation des ELTHEM-CTL 27B11 mit den ELTHEM-Tumorzellen wurden die Zellkerne mit dem Höchst-Farbstoff (blau) und Perforin mit einem an einen Fluoreszenzfarbstoff (rot) gekoppelten monoklonalen Antikörper nachgewiesen. **I:** CTL 27B11; **II:** CTL 27B11 attackiert Tumorzelle. Die Bilder wurden mit einem Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen. **C:** CTL-Klon 27B11 wurde durchflusszytometrisch auf Oberflächenexpression von CD3, CD16, CD56 und CD57 analysiert. Zytolyse = lytische Aktivität von nicht-klassischen CTL-Klonen.



Für die weitergehende Charakterisierung dieser CTL-Klone wurden durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt. In Tabelle 3.3 ist das Ergebnis dieser Untersuchungen dargestellt. Interessanterweise exprimierten diese CTL-Klone aus dem ELTHEM-Modell zusätzlich zu CD3 und CD8 auch die NK-zellassozierten Oberflächenmoleküle CD16, CD56, CD57 (Abbildung 3.5, C) und CD94<sup>low</sup> (Tabelle 3.3). Im Vergleich zu HLA-Klasse-I-restringierten CTL-Klonen aus den anderen Modellen zeigten sie außerdem eine erhöhte Expression von CCR7.

Da diese CTL-Klone im IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay kein IFN- $\gamma$  sezernierten, wurde in Kooperation mit Frau PD Dr. Christine Falk (Institut für Molekulare Immunologie, Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit – GSF, München) eine Multiplex-PCR-Analyse durchgeführt, um das Spektrum der produzierten Zytokine zu analysieren. Nach Stimulation mit RCC-Tumorzellen sezernierten die ELTHEM-CTL-Klone IL-6, IL-8 und MIP-1 $\beta$ , allerdings nicht IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, MCP-1, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, G-CSF und TNF- $\alpha$  (Tabelle 3.5).

Diese Ergebnisse zeigten, dass einige der aus Geschwister-PBMCs des ELTHEM-RCC-Patienten isolierten CTL-Klone eine bisher nicht beschriebene Population von nicht-HLA-restringierten zytotoxischen T-Zellen definieren, die mehrere phänotypische und funktionelle Ähnlichkeiten zu NK-Zellen aufweisen.

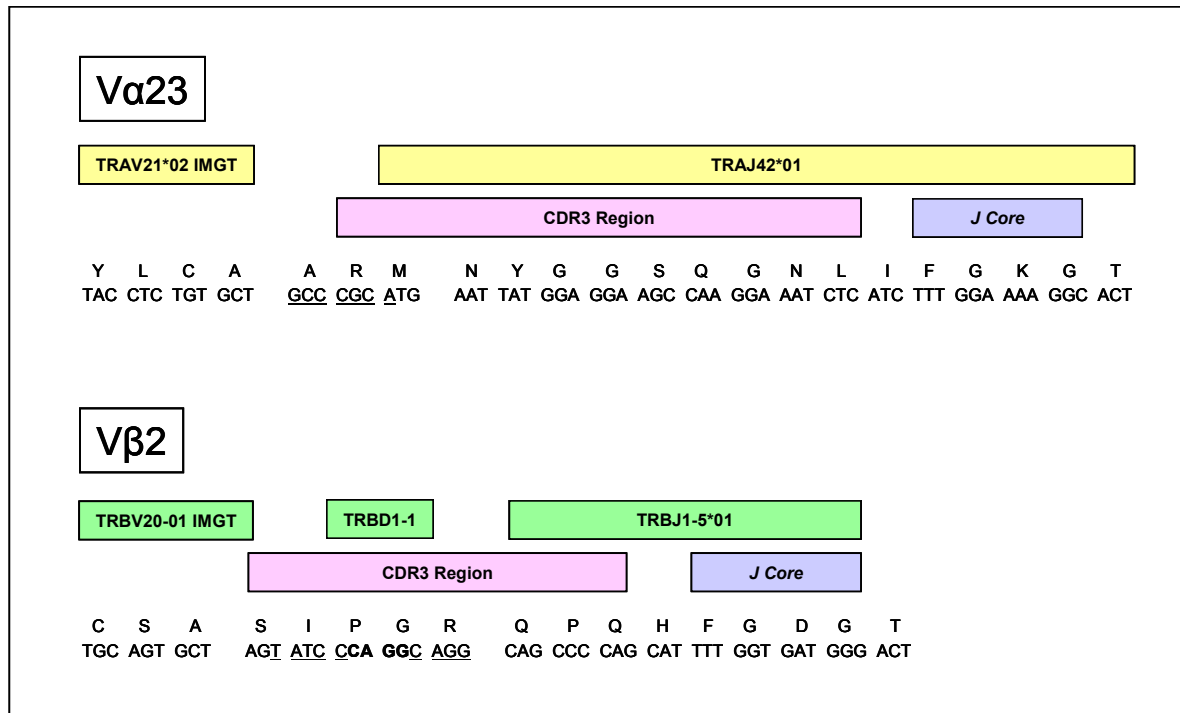
	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	GM-CSF	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$	MIP-1 $\beta$	IL-5	IL-13
27C26 allein	OOB <	OOB <	1,41	228,79	50,74	OOB <	10,66	1,39	4184,9	0,24	2,56
27C26 + ELTHEM-RCC	OOB <	OOB <	1966,3	6947,1	58,91	6,7	19,58	1,71	6570,2	0,24	3,06
27C26 + MZ1257-RCC	0,01	OOB <	2662,5	2849,8	56,85	30,76	17,24	2,02	3934,7	0,23	2,9
27C26 + K562	OOB <	OOB <	50,01	333,06	60,33	0,07	14,02	1,5	4602,8	0,24	3,3
27C26 + ELTHEM-LCL auto	OOB <	OOB <	1,94	320,84	104,44	1,52	17,24	2,98	6493,2	0,24	4,87
27B11 allein	OOB <	OOB <	53,18	605,35	341,98	3,16	186,3	5,27	13997	0,24	1,7
27B11 + ELTHEM-RCC	OOB <	0,01	4480,7	5930,8	308,83	8,55	145,81	5,82	10453	0,23	1,7
27B11 + MZ1257-RCC	OOB <	OOB <	2399	1783,6	357,62	20,35	157,94	5,71	6698,9	0,23	2,39
27B11 + K562	OOB <	OOB <	119,15	678,41	343	6,7	182,74	5,82	10790	0,23	2,14
27B11 + ELTHEM-LCL auto	OOB <	OOB <	61,71	719,18	439,42	4,9	181,72	8,94	11688	0,21	3,22
ELTHEM-RCC allein	OOB <	OOB <	478,21	3010,6	OOB <	1,52	OOB <	0,08	OOB <	0,18	OOB <
MZ1257-RCC allein	OOB <	OOB <	2479	8345,5	OOB <	57,12	0,72	0,17	OOB <	0,2	OOB <
K562	OOB <	OOB <	51,42	29,9	OOB <	0,07	OOB <	OOB <	0,92	0,18	OOB <
ELTHEM-LCL auto allein	OOB <	OOB <	OOB <	9,29	46,32	0,07	OOB <	2,02	883,85	0,2	OOB <

**Tabelle 3.5: Multiplex-PCR-Analyse des Zytokinspektrums nicht-HLA-restringierter allogener CTLs.** Die nicht-HLA-restringierten Geschwister-CTL-Klone aus dem ELTHEM-RCC-Modell sezernieren IL-6, IL-8 und MIP-1 $\beta$  nach Stimulation mit ELTHEM-RCC. OOB = „out of range“.

### 3.4.1 Expression eines singulären T-Zellrezeptors durch die nicht-HLA-restringierten CTL-Klone

Um den T-Zellrezeptor (TCR, engl. *T cell receptor*) dieser interessanten CTL-Klone zu identifizieren, der den Blockade-Experimenten zufolge offensichtlich nicht an der Erkennung der Zielzellen beteiligt ist, wurden zunächst so genannte Beta-Mark-Färbungen durchgeführt, bei denen die  $\beta$ -Ketten des TCR mit fluorochromgekoppelten monoklonalen Antikörpern angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert wurden. Aus diesen Untersuchungen kristallisierte sich zunächst der TCR V $\beta$ 12 als der T-Zellrezeptor der beiden getesteten CTL-Klone 27B11 und 27C26 heraus. Parallel dazu wurde ebenfalls in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. Christine Falk, München, der TCR der CTL-Klone 27B11 und 27C26 und noch von zwei weiteren nicht-HLA-restringierten T-Zellklonen 41A8 und 41C17 genotypisch bestimmt. Diese vier CTLs stammten aus zwei unabhängigen Klonierungen. Zwei der CTLs lysierten K562, während die beiden anderen CTLs K562 nicht erkannten (Abbildung 3.4). Auf der Nukleotid-Ebene exprimierten alle CTL-Klone den identischen TCR, der aus dem V $\alpha$ 23 (TRAV21\*02)-Gensegment in Kombination mit TRAJ42\*01 und dem V $\beta$ 2 (TRBV20\*01)-Gensegment in Kombination mit TRBD1\*01 und TRBJ1-5\*01 (Abbildung 3.6) besteht. Weiterhin war dieser invariante TCR mit individuellen N-Regionen innerhalb der CDR3-Region verbunden. Dieses Ergebnis der genotypischen Untersuchung widersprach dem Ergebnis der durchflusszytometrischen Färbung der  $\beta$ -Ketten, welches V $\beta$ 12 anstelle V $\beta$ 2 ergab. Vermutlich war jedoch die genotypische Untersuchung die verlässlichere. Auf der Suche nach dem Fehler wurden die Beta-Mark-Färbungen auch mit einem neuen Beta-Mark-Kit wiederholt, ergaben aber immer noch V $\beta$ 12 als  $\beta$ -Kette des T-Zellrezeptors. Allerdings stellte sich im Gespräch mit dem kommerziellen Hersteller des Beta-Mark-Kits heraus, dass tatsächlich das PE-Signal zu schwach war, um anstelle eines fälschlicherweise positiven Signals im FITC-Kanal (V $\beta$ 12) das richtig positive Signal im überlagerten FITC- und PE-Kanal (V $\beta$ 2) zu zeigen (siehe Tabelle 2.4).

Zusammenfassend exprimierten diese vier nicht-HLA-restringierten T-Zellklone aus Geschwister-PBMCs des ELTHEM-Modells, unabhängig von ihrem die HLA-Klasse-I-negative Zelllinie K562 betreffenden Kreuzreaktivitätsmuster, denselben T-Zellrezeptor, bestehend aus V $\alpha$ 23 und V $\beta$ 2.



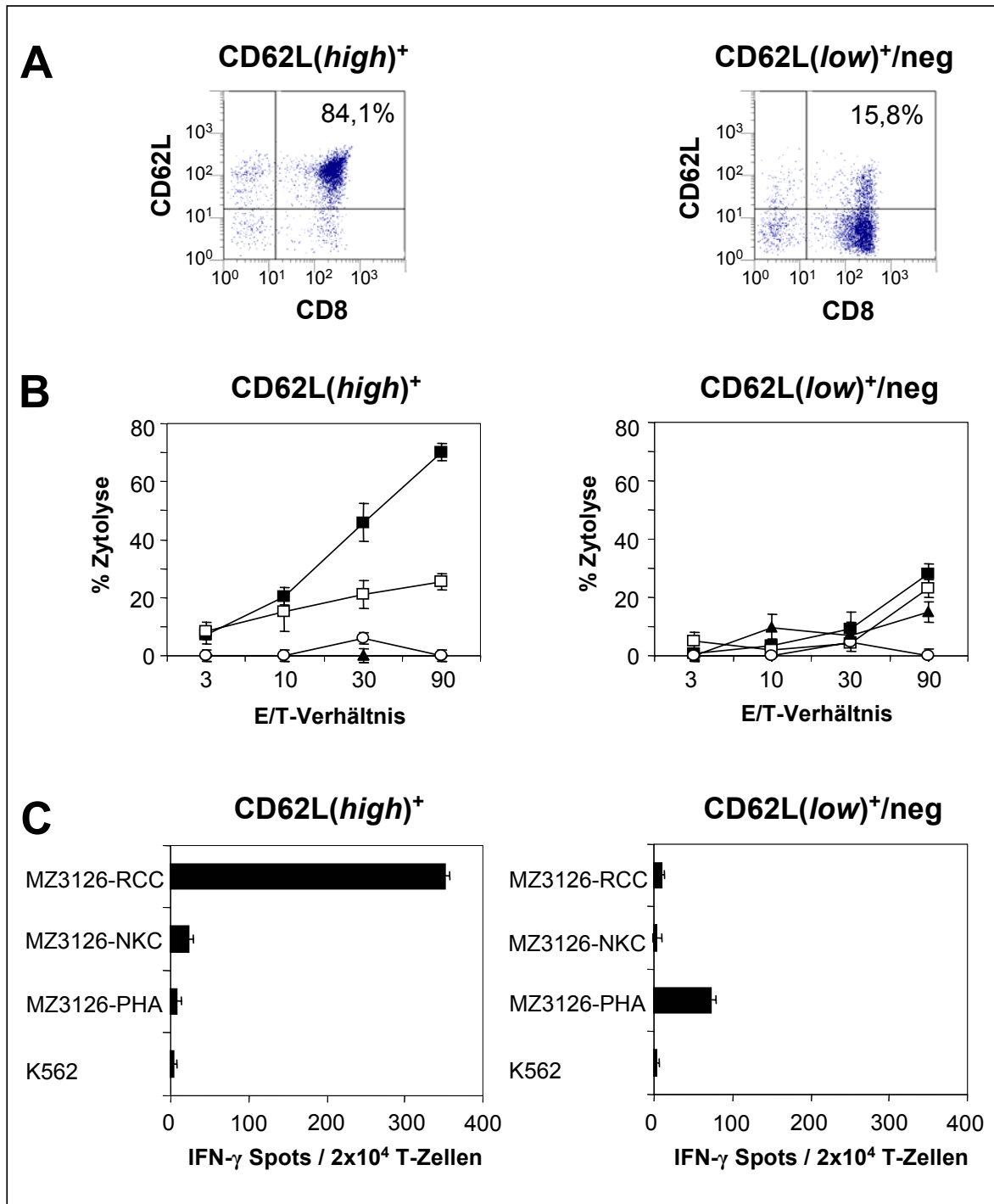
**Abbildung 3.6: Sequenz des T-Zellrezeptors der nicht-HLA-restringierten RCC-reaktiven ELTHEM-CTL-Klone.** Vier Geschwister-CTLs aus dem ELTHEM-RCC-Modell, 27B11, 27C26, 41A8 und 41C17, wurden auf die Gensequenz ihres T-Zellrezeptors analysiert. Alle vier Klone, die aus zwei unterschiedlichen Klonierungsexperimenten stammen, zeigen identische TCR Vα23- und TCR Vβ2-Kettensequenzen, die aus TRAV21\*02 bis AJ42\*01 und TRBV20-1 bis BD1-1 bis BJ1-5\*01 Rearrangements bestehen. Zusätzliche N-Region-Nukleotide wurden unterstrichen; CDR3- und VDJ-Regionen wurden als Kästchen dargestellt.

### 3.5 Tumorreaktive CTLs aus HLA-identischen Geschwisterspendern entstehen aus CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> Vorläufer-T-Zellen

Die Geschwisterspender in unseren Tumormodellen waren gesunde Individuen und sollten demzufolge noch nie zuvor Kontakt mit Nierenzellkarzinom-Antigenen gehabt haben. Um zu überprüfen, ob die RCC-reaktiven Geschwister-CTLs von naiven oder „memory“-T-Zellvorläufern abstammen, wurden *ex vivo* isolierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit von ihren CD62L-Expressionen immunmagnetisch aufgetrennt. Nach der Separation wurde eine nahezu reine CD62L(*high*)<sup>+</sup> Population erhalten (Abbildung 3.7), die CCR7, CD27 und CD28 koexprimierte (Daten nicht gezeigt). Diese Fraktion beinhaltete dementsprechend CD8<sup>+</sup> naive und „central memory“-T-Zellen [Klebanoff et al, 2005]. Die CD62L-depletierte Fraktion enthielt noch wenige CD62L(*low*)<sup>+</sup> Zellen und exprimierte weder CCR7, CD27 noch CD28, was dem Phänotyp von CD8<sup>+</sup> „effector memory“-T-Zellen entspricht. Nach Stimulation beider Subpopulationen mit den entsprechenden HLA-identischen Tumorzellen in Form von MLTCs wurde eine etwa doppelt so starke Proliferation in der CD62L(*high*)<sup>+</sup>-Population beobachtet verglichen mit

der CD62L(*low*)<sup>+</sup>/negativen Population (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wiesen die CD8<sup>+</sup> CD62L(*high*)<sup>+</sup> T-Lymphozyten eine höhere Tumorreaktivität auf, wie sowohl in Zytotoxizitätstests als auch in IFN- $\gamma$ -ELISpot-Experimenten nachgewiesen wurde (Abbildung 3.7). Die CD62L-Expression der MLTC-„*Responder*“-Lymphozyten wurde während der ersten zwei Wochen der Kultur herunter reguliert (Daten nicht gezeigt).

Diese Beobachtungen zeigten, dass sich die RCC-reaktiven CTLs in HLA-identischen gesunden Geschwisterspendern aus dem CD8<sup>+</sup> CD62L(*high*)<sup>+</sup> Kompartiment entwickeln, das sowohl naive als auch „*central memory*“-T-Lymphozyten beinhaltet.



**Abbildung 3.7: Tumorreaktive Geschwister-CTLs stammen aus dem CD8<sup>+</sup> CD62L(*high*)<sup>+</sup>-Kompartiment ab.** **A:** Durch Negativ-Isolation angereicherte CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus MZ3126 Geschwister-PBMCs wurden in einem zweiten Schritt auf CD62L positiv isoliert. Die resultierenden Fraktionen wurden CD62L(*high*)<sup>+</sup> bzw. CD62L(*low*)<sup>+</sup>/neg bezeichnet. **B:** CD62L(*high*)<sup>+</sup>- und CD62L(*low*)<sup>+</sup>/neg-Fraktionen wurden in allogenen MLTCs wöchentlich mit dem HLA-identischen MZ3126-RCC-Tumorzellen stimuliert und an Tag 40 auf zytolytische Aktivität gegen MZ3126-RCC (■), MZ3126-NKC (□), MZ3126-PHA-Blasten (▲) und K562 (○) in Zytotoxizitätstests überprüft. **C:** An Tag 39 wurde die Spezifität der MLTC-„Responder“-Lymphozyten im IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assay getestet. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse aus drei unterschiedlichen Experimenten. Zytolyse = lytische Aktivität von MLTC-„Responder“-Lymphozyten.

### **3.6 Regulatorische T-Zellen als möglicher immunsupprimierender Mechanismus in RCC-Patienten**

Als Erklärung für die stärkere Proliferation und Tumorreaktivität der allogenen CTLs aus HLA-identischen gesunden Geschwisterspendern im Vergleich zu autologen Patienten-CTLs kommen immunsupprimierende Mechanismen in Frage, die in Nierenzellkarzinom-Patienten als Folge des Tumorbefalls aktiviert sein könnten. Daher wurde peripheres Blut und Tumorgewebe der RCC-Patienten auf die Präsenz von immunsuppressiven  $CD4^+$   $CD25^+$   $FoxP3^+$  regulatorischen T-Zellen (T regs) untersucht und die Ergebnisse mit peripherem Blut der zugehörigen Geschwisterspender verglichen.

Um Unterschiede in der Frequenz von  $CD4^+$   $CD25^+$  T regs im Tumorgewebe und im peripheren Blut gesunder Individuen und RCC-Patienten festzustellen, wurden PBMCs von Patienten und Geschwisterspendern sowie TILs der Patienten (sofern verfügbar) intrazellulär auf FoxP3 gefärbt (Abschnitt 2.2.2.5). FoxP3 ist ein Transkriptionsfaktor und gehört zu der „Forkhead-Box“-Proteinfamilie. FoxP3 ist das einzige bisher beschriebene Molekül, welches als spezifischer Marker für regulatorische T-Zellen herangezogen werden kann. Wie bereits erwähnt, waren im ELTHEM-Modell keine TILs und im MZ3126-Modell keine autologen PBMCs verfügbar. Sämtliche sonst vorhandenen Proben von TILs und PBMCs wurden auf die Frequenz von  $FoxP3^+$  T regs in der Gesamtheit aller  $CD4^+$   $CD25^+$  T-Zellen untersucht. Im ELTHEM-Modell waren die T regs in den allogenen PBMCs (6,8 %) leicht erhöht gegenüber denen in den autologen PBMCs (6,0 %). Im Modell MZ3114 war in den TILs der höchste Anteil an T regs vorhanden (8,9 %). Auch das autologe Blut enthielt noch eine höhere Frequenz von T regs (7,1 %) verglichen mit dem allogenen Blut (5,0 %) des gesunden Geschwisterspenders. Kein Unterschied in der T reg-Frequenz wurde hingegen zwischen autologen TILs (8,7 %) und allogenen gesunden PBMCs (8,5 %) im Modell MZ3126 beobachtet. Das Modell MZ3603 verhielt sich ähnlich wie das Modell MZ3114, indem die Frequenz an T regs von den allogenen PBMCs (8,7 %) über die autologen PBMCs (9,5 %) zu den TILs hin (11,7 %) zunahm. Jedoch liegen alle der gemessenen Werte wenigstens annähernd in dem in der Literatur angegebenen normalen Bereich von 5 bis 10 % Anteil von T regs in der Gesamtheit der  $CD4^+$  T-Zellen [Zou, 2006].

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der FoxP3-Färbungen keine konsistent erhöhte Frequenz der T regs im Blut oder Tumorgewebe der Patienten verglichen mit den gesunden Spendern (Tabelle 3.6). Damit lieferte der bekanntermaßen immunsuppressive Effekt der T regs keine Erklärung für die verbesserten proliferativen und zytolytischen

Eigenschaften der allogenen tumorreaktiven CTLs gegenüber denen der autologen CTLs.

<b>Modell</b>		<b>% FoxP3 / CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></b>	<b>% CD25 / CD4<sup>+</sup></b>	<b>% CD4<sup>+</sup> / PBMC</b>	<b>% CD8<sup>+</sup> / PBMC</b>
<b>ELTHEM</b>	<i>auto-PBMCs</i>	6	28,2	30,1	19,7
	<i>allo-PBMCs</i>	6,8	15,1	46,5	23,9
<b>MZ3114</b>	<i>TILs</i>	8,9	7,6	47,3	19,3
	<i>auto-PBMCs</i>	7,1	24,8	42,2	19,3
	<i>allo-PBMCs</i>	5	8,4	50	n.t.
<b>MZ3126</b>	<i>TILs</i>	8,7	11,7	36,8	45,5
	<i>allo-PBMCs</i>	8,5	52,2	52,3	18,5
<b>MZ3603</b>	<i>TILs</i>	11,7	3,7	27,8	73,9
	<i>auto-PBMCs</i>	9,5	30,3	37	45,6
	<i>allo-PBMCs</i>	8,7	17,1	52,6	22,7

**Tabelle 3.6: Frequenz der FoxP3-positiven regulatorischen T-Zellen in der Gesamtheit aller CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen im Tumorgewebe und im peripheren Blut von Nierenzellkarzinom-Patienten und gesunden Spendern.** Die zweite Spalte gibt den Anteil der CD25-positiven Zellen in der Gesamtheit der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die dritte Spalte den Anteil an CD4-positiven T-Zellen in PBMCs und die vierte Spalte den Anteil an CD8-positiven T-Zellen in PBMCs wider. *auto-PBMCs* = Patienten-PBMCs; *allo-PBMCs* = allogene PBMCs des gesunden Geschwisterspenders; *TILs* = tumorinfiltrierende Lymphozyten; n.t. nicht getestet.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 **Generierung und Charakterisierung von Nierenzellkarzinom-Zelllinien**

Grundlage für immuntherapeutische Untersuchungen an Nierenzellkarzinomen sind zunächst konstant in Zellkultur wachsende Nierenzellkarzinom-Zelllinien. Aus den Primärtumoren von ca. 28 % der an der Studie teilnehmenden Patienten konnten Zelllinien generiert werden, die über Zellkultur-Passage 15 hinaus in Langzeit-Zellkultur expandiert werden konnten. Diese Zelllinien wurden HLA-typisiert und durch histologische und zytogenetische Methoden charakterisiert, um die maligne Herkunft der Zellen zu bestätigen. Zytogenetisch wiesen die Tumorzelllinien für RCC typische Aberrationen auf [Gunawan *et al*, 2001].

Im Rahmen der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Nierenzellkarzinom-Zelllinien wurde festgestellt, dass HLA-Klasse-I auf den Tumorzelllinien stärker exprimiert wurde als auf den entsprechenden autologen nicht-malignen Nierenzellen. Tumorzellen entwickeln bestimmte Mechanismen, um der Immunerkennung des Wirtsorganismus zu entkommen bzw. um eine Immunantwort zu hemmen („*immune escape mechanisms*“) [Kim *et al*, 2007]. Dazu zählen beispielsweise die Herunterregulation von HLA-Klasse-I [Bubenik, 2004; Bubenik, 2003; Garcia-Lora *et al*, 2003], von Adhäsions- [Wittig *et al*, 1997; Piali *et al*, 1995] und Kostimulationsmolekülen [Fujiwara *et al*, 2004] sowie die Produktion von inhibierenden Zytokinen [Kirkbride & Blobe, 2003; Beck *et al*, 2001]. Daher hätte erwartet werden können, dass die HLA-Moleküle auf den Tumorzellen schwächer exprimiert werden. Zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkennen ihre Zielzellen bekanntermaßen über Peptide, die im Zusammenhang mit HLA-Klasse-I auf der Zelloberfläche der Zielzellen präsentiert werden. Je stärker HLA-Klasse-I auf der Zelloberfläche exprimiert wird, desto besser müsste diese antigenpräsentierende Zelle, in diesem Falle die Tumorzelle, von den CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannt werden. Hier muss also ein anderer Mechanismus vorliegen, der es dem individuellen Tumor ermöglicht hatte, der Immunüberwachung zu entkommen. Einer dieser Mechanismen könnte die schwächere Expression des Adhäsionsmoleküls CD54 (ICAM-1) sein, welches der Ligand für den panlymphozytären Marker LFA-1 (CD11a) ist. Adhäsionsmoleküle (auch akzessorische Moleküle genannt) tragen zu einer besseren Interaktion von Lymphozyten mit ihren Zielzellen bei. Die durchflusszytometrischen Analysen der in dieser Arbeit untersuchten Modelle ergaben tatsächlich ein niedrigeres Expressionsniveau von CD54 bei RCCs im Vergleich zu NKC. Dies könnte ein Hinweis auf einen „*immune escape*“-Mechanismus



der Tumorzellen sein [Wittig *et al*, 1997; Piali *et al*, 1995]. Im Unterschied zu CD54 wurde CD58 vergleichbar stark auf malignen und nicht-malignen Nierenzellen exprimiert. Die Kostimulationsmoleküle CD80 und CD86 und HLA-Klasse-II wurden weder von den Tumorzellen noch von den entsprechenden nicht-malignen Nierenzellen exprimiert. Um die Immunogenität der Tumorzellen zu erhöhen, könnte man CD80 und/oder CD86 stabil transfizieren [Jung *et al*, 1999].

Ein weiterer möglicher „*immune escape*“-Mechanismus, der in dieser Arbeit überprüft wurde, wird durch regulatorische T-Zellen vermittelt, deren Wirkung immunsupprimierender Art ist. Die Diskussion der gewonnenen T reg-Daten erfolgt in Abschnitt 4.7.

## **4.2 Die Generierung von RCC-reaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Geschwisterspendern**

Nach HLA-Typisierung der Nierenzellkarzinom-Patienten und der zugehörigen Geschwister wurde in vier (MZ3114, MZ3126, MZ3603 und ELTHEM) von 18 Fällen (entspricht 22 %) ein komplett übereinstimmender HLA-Typ des Patienten mit einem der typisierten Geschwister gefunden. Im Hinblick auf eine Immuntherapie beim Nierenzellkarzinom mittels adoptiven T-Zelltransfers ist ein übereinstimmender HLA-Typ unabdingbar, um Alloreaktivitäten der transferierten Spenderzellen gegen mögliche HLA-„*Mismatches*“ zu vermeiden. Durch die genetische Ähnlichkeit von verwandten HLA-identischen Spendern ergeben sich klare Vorteile in der klinischen Anwendung. So wird beim Transfer von T-Zellen eines verwandten Spenders in weit weniger Fällen das Auftreten einer Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (GvHD) beobachtet als beim Transfer von T-Zellen eines unverwandten Spenders [Goulmy, 1997a].

Nicht fraktionierte HLA-identische Geschwister-PBMCs bzw. zusätzlich auch Fremdspender-PBMCs im ELTHEM-Modell wurden in allogenen MLTCs mit den entsprechenden RCC-Tumorzellen stimuliert. Interessanterweise waren die expandierten „*Responder*“-Lymphozyten allesamt CD8<sup>+</sup> T-Zellen, wohingegen tumorreaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder NK-Zellen nicht beobachtet wurden. Dass keine CD4-Antitumor-Immunantworten generiert werden konnten, mag durch die fehlende Expression von HLA-Klasse-II auf den RCC-Zellen unter basalen Bedingungen erklärbar sein (Tabelle 3.1, Abschnitt 3.1). Obwohl eine Vorbehandlung der RCC-Zellen mit IFN- $\gamma$  HLA-Klasse-II induziert [Schendel *et al*, 2000], konnten keine CD4-medierte Immunantworten mit IFN- $\gamma$ -vorbehandelten RCC-Zellen als MLTC-Stimulatorzellen beobachtet werden (Daten nicht

gezeigt). Wie zuvor beschrieben wurde, können tumorreaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen effizient expandiert werden, wenn professionelle APCs wie z. B. dendritische Zellen als Stimulatorzellen verwendet werden, die zuvor mit apoptotischen oder nekrotischen Tumorpräparationen beladen wurden [Montagna *et al*, 2004; Kurokawa *et al*, 2001; Herr *et al*, 2000].

Trotz serologischer Übereinstimmung der HLA-A, -B und -Cw-Allele konnte in der hochauflösenden Genotypisierung zwischen dem Nierenzellkarzinom-Patienten ELTHEM und dem gesunden Fremdspender IV ein „Mismatch“ auf dem HLA-A3-Locus nachgewiesen werden. Dieses „Mismatch“ führte in der T-Zellkultur zu einer dominanten Reaktivität, die gegen das vom Tumor disparat exprimierte HLA-A\*0301 gerichtet war. Die reaktiven T-Zellen erkannten in diesem Falle kein tumorassoziiertes Antigen, das über das HLA-A3-Molekül präsentiert wurde, sondern Allopeptide im Kontext mit HLA-A\*0301. In Reaktivitätstests fiel auf, dass autologe ELTHEM-LCL-Zellen stärker erkannt wurden als die zur Stimulation verwendeten ELTHEM-RCC-Zellen. LCL-Zelllinien sind Abkömmlinge von B-Lymphozyten und weisen eine hohe Expression von HLA-Klasse-I auf der Zelloberfläche auf [Voltz *et al*, 1989]. Folglich war auch HLA-A3 stärker auf den LCL als auf den RCC exprimiert (Daten nicht gezeigt). Dadurch kann die deutlich stärkere Reaktivität gegen die LCL-Zellen erklärt werden.

### **4.3 Autologe und allogene tumorreaktive T-Zellkulturen im Vergleich**

Vor kurzem wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass RCC-reaktive CTL-Klone aus unverwandten gesunden Spendern isoliert werden können, die für HLA-Klasse-I vollständig identisch mit einer zuvor generierten RCC-Zelllinie waren [Dorrschuck *et al*, 2004]. Nach erfolgreicher Etablierung von neuen *in vitro* stabil wachsenden RCC-Zelllinien in einer repräsentativen Patientenkohorte wurden diese Studien in der vorliegenden Arbeit auf gesunde Geschwisterspender mit identischem HLA-Typ für Klasse-I und Klasse-II ausgeweitet. Außerdem wurden autologe Patienten-PBMCs und TILs in die Analysen miteinbezogen, sofern diese verfügbar waren. Die hierbei erzielten Ergebnisse liefern klare Hinweise, dass RCC-reaktive CTL-Klone *in vitro* aus naiven HLA-identischen Geschwisterspendern generiert werden können. Der direkte Vergleich der aus allogenen PBMCs angesetzten mit den aus autologen Patienten-PBMCs und TILs angesetzten T-Zellkulturen zeigte, dass die allogenen Geschwister-PBMCs in drei aus vier Fällen eine erhöhte und durch CD8-positive T-Zellen vermittelte Tumorreaktivität

aufwiesen [Kausche *et al*, 2006]. In den CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten der Patienten konnte demgegenüber keine oder nur schwache Tumorreaktivität beobachtet werden. Im Einklang mit diesen Ergebnissen wurde berichtet, dass autologe tumorreaktive T-Zellen aus dem peripheren Blut von lediglich einer Minderheit von Tumorpatienten isoliert werden können. Diese Patienten waren zumeist Melanompatienten mit einem günstigen Krankheitsverlauf unter Immuntherapie [Coulie *et al*, 1999; Herr *et al*, 1994; Wolfel *et al*, 1993a].

Die isolierten Geschwister-CTL-Klone erkannten keine bekannten HLA-Klasse-I-assoziierten RCC-Peptid-Epitope [Hanada *et al*, 2004; Tatsumi *et al*, 2003a; Kessler *et al*, 2001; Probst-Kepper *et al*, 2001; Gaudin *et al*, 1999; Vissers *et al*, 1999; Brossart *et al*, 1998; Brandle *et al*, 1996; Gaugler *et al*, 1996]. Daher war es nicht möglich, das autologe T-Zellrepertoire auf Anergie oder Deletion von definierten antitumoralen Spezifitäten zu analysieren.

#### **4.4 Klassische tumorreaktive T-Zellen**

Aufgrund der schwachen oder fehlenden Tumorreaktivität der autologen PBMCs war es in den drei Modellen ELTHEM-, MZ3114- und MZ3126-RCC nur im allogenen System möglich, durch Klonierung die einzelnen in den Kulturen vorhandenen T-Zellspezifitäten zu analysieren. Mithilfe von Blockade-Experimenten konnten die HLA-Restriktionselemente der CTL-Klone bestimmt werden. Anhand des Blockadeverhaltens und des Kreuzreaktivitätsmusters wurden sechs Gruppen von CTL-Klonen definiert (Tabelle 3.4):

1. Ausschließliche HLA-Klasse-I-restringierte Reaktivität gegen autologe RCC-Zellen;
2. HLA-Klasse-I-restringierte Reaktivität gegen autologe RCC- und autologe NKC-Zellen;
3. HLA-Klasse-I-restringierte Reaktivität gegen autologe RCC- und autologe hämatopoetische Zellen;
4. HLA-Klasse-I-restringierte Reaktivität gegen autologe und allogene RCC-Zellen;
5. HLA-Klasse-I-restringierte Reaktivität gegen autologe RCC-Zellen und allogene Tumorzellen aus anderen Gewebeentitäten;
6. Nicht-klassische HLA-unabhängige Reaktivität gegen unterschiedliche Tumorentitäten (Abschnitt 4.5).

Gruppe 1. Der Großteil der expandierten und charakterisierten CTL-Klone konnte dieser Gruppe zugeordnet werden. Die Zielstrukturen, die von diesen CTLs erkannt werden, sind vermutlich RCC-spezifische Antigene, die individuell auf dem autologen Tumor exprimiert werden. Solche Antigene haben den Vorteil, dass sie möglicherweise einen GvT-Effekt mit einhergehender Tumorregression hervorrufen können, der nicht mit dem Auftreten einer GvHD assoziiert wäre [Childs *et al*, 2000].

Gruppe 2. Die zweitgrößte Gruppe von CTL-Klonen beinhaltete jene, die sowohl die autologen Tumor- als auch die autologen nicht-malignen Nierenzellen erkannten. Bei den hier detektierten Zielstrukturen handelt es sich mutmaßlich um Nierendifferenzierungsantigene oder nierenassoziierte Minor-Histokompatibilitätsantigene. Die letztgenannte Antigengruppe findet ihr Korrelat in einem Polymorphismus zwischen Tumorpatient und Geschwisterspender. Ein Transfer von CTLs einer solchen Spezifität birgt die Gefahr einer Autoimmunerkrankung, die gegen normales Nierengewebe gerichtet ist. Allerdings sind klinisch fassbare Abstoßungsreaktionen gegen Nierengewebe in allo-HSCT-Studien bei Nierenzellkarzinom-Patienten nicht beschrieben worden [Bregni *et al*, 2002; Rini *et al*, 2002; Childs *et al*, 2000].

Gruppe 3. In diese Gruppe wurden solche RCC-reaktiven CTLs eingeteilt, die mit hämatopoetischen Zellen des RCC-Patienten kreuzreagierten. Der adoptive Transfer dieser CTLs könnte ebenfalls einen GvT-Effekt induzieren, beinhaltet jedoch das Risiko einer GvHD, da die erkannten Zielstrukturen offenbar von unterschiedlichen Gewebetypen exprimiert werden. Beispiele hierfür sind CTLs, die gegen ubiquitär exprimierte Minor-Histokompatibilitätsantigene gerichtet sind [Riddell *et al*, 2002; Simpson *et al*, 2001].

Gruppe 4. In diese Gruppe fielen die CTLs, die in den Funktionalitätsstudien sowohl autologe als auch allogene Nierenzellkarzinom-Zelllinien erkannten. Diese CTLs schienen Zielstrukturen zu erkennen, die entweder selektiv auf malignen Nierenzellen exprimiert werden oder aber auf diesen überexprimiert vorliegen. Die zugehörigen Antigene sind dabei jedoch nicht für einen einzelnen Tumorpatienten spezifisch. Allogene CTLs, die diese Antigene erkennen, wären möglicherweise geeignet, als Spender-Lymphozyten-Infusionen (DLI, engl. *donor lymphocyte infusions*) in einer Vielzahl von Patienten einen Tumorrückgang hervorzurufen, der wahrscheinlich nicht von einem unerwünschten GvHD-Effekt begleitet wird.

Gruppe 5. Die CTLs dieser Gruppe erkannten neben dem autologen RCC eine Vielzahl weiterer allogener Tumoren unterschiedlicher Entität. Die zugehörigen Antigene sind dabei auf unterschiedlichen epithelialen Tumoren vorhanden und nicht auf Nierenzellkarzinome beschränkt. Ein adoptiver Transfer dieser CTLs, die ein in unterschiedlichen Tumorentitäten auftretendes Antigen erkennen, könnte in Patienten der

entsprechenden Tumorentitäten selektiv einen GvT-Effekt auslösen. Die Gefahr des Auftretens einer GvH-Erkrankung ist als gering einzustufen, da diese Antigene nur auf maligne veränderten Zellen aufzutreten scheinen, nicht jedoch auf gesunden Nierenzellen. Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass die Expression dieser Antigene auf epithelialen nicht-malignen Geweben mangels verfügbarer Zelllinien nicht getestet werden konnte.

#### **4.5 Nicht-klassische tumorreaktive T-Zellen**

Im ELTHEM-Modell wurde gezeigt, dass die allogene antitumorale Immunantwort *in vitro* von CTLs dominiert werden kann, die ihre Zielzellen über nicht-HLA-restringierte und TCR-unabhängige Mechanismen erkennen. Ähnliche CTLs wurden auch aus Nierenzellkarzinom-Patienten isoliert [Lionello *et al*, 2007]. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen allogenen CTLs lysierten in Zytotoxizitätstests Zelllinien aus verschiedenen epithelialen Tumorentitäten, jedoch nicht die zugehörigen LCL-Zelllinien. Sie erkannten zum Teil auch das HLA-negative NK-Zell-„Target“ K562 und exprimierten die NK-zellassozierten Marker CD16, CD56, CD57 und CD94<sup>low</sup> in Verbindung mit CD3. Diese CTLs waren mit monoklonalen Antikörpern gegen HLA-Klasse-I- und -II-Moleküle sowie gegen CD3 und CD8 nicht in ihrer Funktionalität blockierbar, was auf eine TCR-unabhängige Erkennung ihrer Zielzellen schließen lässt. Auch blockierende Antikörper gegen das nicht-klassische HLA-Molekül CD1d, gegen den NK-aktivierenden Rezeptor NKG2D und gegen den Fas-Liganden führten nicht zu einer Inhibierung der Reaktivität. Es konnte jedoch eine Blockade mit Concanamycin A erreicht und somit ein perforinmediierter Lysemechanismus nachgewiesen werden [Kataoka *et al*, 1996]. Da in IFN- $\gamma$ -ELISpot-Experimenten keine Sekretion von IFN- $\gamma$  beobachtet werden konnte, wurde eine Multiplex-PCR-Analyse auf das freigesetzte Zytokinspektrum dieser Zellen durchgeführt. Das Ergebnis zeigte, dass diese CTLs nach Stimulation mit Tumorzellen IL-6, IL-8 und MIP-1 $\beta$  produzierten.

Unwahrscheinlich war es, dass es sich bei den nicht-klassischen Effektorzellen dieser Gruppe um NK-Zellen handelte, da diese weder CD3 exprimieren noch HLA-Klasse-I-positive Zielzellen lysieren. Vielmehr stellen HLA-Moleküle auf den Zielzellen die Liganden für inhibierende Rezeptoren (KIRs) auf den NK-Zellen dar [Ugolini & Vivier, 2000; Maenaka *et al*, 1999]. Neben klassischen T-Zellen und NK-Zellen existieren jedoch einige Mischpopulationen, deren Übergänge bisher nicht klar definiert sind: Erstens LAK-Zellen, zweitens CIK-Zellen und drittens klassische NK-T-Zellen.

1. LAK-Zellen stellen durch hohe Zytokinkonzentrationen induzierte Mischpopulationen aus NK- und nicht-HLA-restringierten T-Zellen dar, die die Fähigkeit haben, eine Vielfalt von Tumorzellen und HLA-Klasse-I-negativen Zellen zu lysieren [Falk *et al*, 2002]. Durch eine verstärkte Expression von HLA-Molekülen auf den „Target“-Zellen, z. B. durch Zugabe von IFN- $\gamma$ , wird die Reaktivität der LAK-Zellen gehemmt. Die im ELTHEM-Modell isolierten nicht-klassischen T-Zellen sind sicherlich keine LAK-Zellen, da die IFN- $\gamma$ -Vorbehandlung der Zielzellen nicht zu einer relevanten Blockade der Reaktivität führte und im Umkehrschluss bei Blockade der HLA-Moleküle durch monoklonale Antikörper kein Anstieg der lytischen Aktivität beobachtet werden konnte.
2. CIK-Zellen können aus T-Zellen generiert werden, indem PBMCs *in vitro* mit hohen Zytokinkonzentrationen antigenunabhängig stimuliert werden. Sie werden dadurch charakterisiert, dass ihre Reaktivität durch monoklonale Antikörper gegen HLA-Klasse-I, HLA-Klasse-II, CD3, CD4 und CD8 – ähnlich wie bei den hier beschriebenen T-Zellen – nicht beeinflusst wird [Verneris *et al*, 2002]. CIK-Zellen wachsen in zytokinhaltigem Medium auch ohne die Zugabe von Stimulatorzellen, was einen klaren Unterscheid zu den in dieser Arbeit isolierten Zellen darstellt, die antigenabhängiges Wachstum zeigten.
3. Klassische NK-T-Zellen exprimieren eine einzelne invariante TCR  $\alpha$ -Kette (V $\alpha$ 14), erkennen ihre Antigene über das nicht-klassische HLA-Molekül CD1, produzieren nach Antigenstimulation IL-4 und IFN- $\gamma$  und sind nur in seltenen Fällen CD8-positiv [Verneris *et al*, 2002]. Die allogenen ELTHEM-CTLs waren hingegen sämtlich CD8<sup>+</sup>, exprimierten den unikalen TCR V $\alpha$ 23 V $\beta$ 2, konnten über monoklonale Antikörper gegen CD1d nicht in ihrer Reaktivität blockiert werden und produzierten weder IL-4 noch IFN- $\gamma$ . Es handelt sich bei den hier beschriebenen T-Zellen also auch nicht um klassische NK-T-Zellen. Vielmehr ist davon auszugehen, dass eine neue Art von nicht-klassischen tumorreaktiven CTLs isoliert wurde. Weiterführende Arbeiten sind notwendig, um die Spezifität und die potentielle klinische Anwendbarkeit dieser Kategorie von tumorreaktiven Effektorzellen aufzuklären.

#### **4.6 Allogene Stammzelltransplantation, GvT und GvHD**

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass allogene Geschwister-PBMCs wegen ihrer stärkeren antitumoralen Reaktivität im Vergleich zu autologen PBMCs sehr gutes Ausgangsmaterial für die *in vitro*-Generierung von tumorreaktiven CTLs darstellen. Allerdings könnte die Wirksamkeit von allogenen tumorreaktiven CTLs *in vivo* durch das immunsuppressive Milieu eingeschränkt sein, das in Tumorpatienten vorhanden ist [Zou, 2006]. Klinische Studien an Patienten mit metastasiertem Melanom haben gezeigt, dass eine

vorbereitende lymphozytendepletierende Chemotherapie die antitumorale Wirksamkeit von adoptiv transferierten autologen TILs verstärkt [Dudley *et al*, 2005]. Dabei entfaltet die Chemotherapie ihre Wirkung möglicherweise durch die *in situ*-Depletion von regulatorischen T-Zellen und schafft damit die Möglichkeit der Besiedelung der lymphoiden Kompartimente sowie des Tumorgewebes mit tumorreaktiven T-Zellen in Folge eines zytokinmedierten homeostatischen Mechanismus.

Auch wenn die Kombination aus chemotherapeutischer Konditionierung und autologer TIL-Infusion die Rate von klinischen Melanom-Remissionen erhöht hat, resultierte sie ebenfalls in einer erhöhten Inzidenz von Vitiligo und Uveitis in Folge von Autoimmunreaktionen gegen Melanozyten [Dudley *et al*, 2005]. Diese Beobachtung unterstreicht den starken Zusammenhang, der zwischen den immunologischen Mechanismen von Tumorregression und Autoimmunreaktionen gegen normales Gewebe besteht. Eine Übertragung dieser Erkenntnis auf RCC-Patienten würde bedeuten, dass eine adoptive T-Zelltherapie Autoimmunreaktionen gegen gesundes Nierengewebe auslösen könnte. Allerdings wurde bei RCC-Patienten, die in früheren zytokin- oder zellbasierten Immuntherapien Tumorremissionen entwickelten, kein signifikanter Anstieg der Inzidenz einer autoimmunen Nephritis beobachtet [Rosenberg *et al*, 1989]. Interessanterweise zeigte ein beträchtlicher Anteil der in unserer Studie isolierten RCC-reaktiven Geschwister-CTL-Klone eine Kreuzreaktivität mit nicht-malignen Nierenzellen des Patienten. Möglicherweise stellen die Antigene, die sowohl von den normalen als auch von den malignen Nierenzellen exprimiert werden, nicht alterierte Nierendifferenzierungsantigene dar. Alternativ könnten diese Antigene auch polymorph zwischen Spender und Tumorpatient sein. Die letztere Antigen-Kategorie würde Minor-Histokompatibilitätsantigene einschließen, die starke Transplantat-gegen-Wirt- und Transplantat-gegen-Leukämie-Reaktionen in Leukämie-Patienten auslösen können [Nash & Storb, 1996]. Der adoptive Transfer von Geschwister-CTLs, die nierenexprimierte Antigene erkennen, beinhaltet das Risiko, die Immuntoleranz gegenüber gesundem Nierengewebe zu brechen. Da – wie oben erwähnt – bei der Niere in früheren Transplantationsstudien [Bregni *et al*, 2002; Rini *et al*, 2002; Childs *et al*, 2000] keine vermehrt nachweisbaren klinischen Symptome einer immunmedierten Schädigung auftraten, bleibt die *in vivo*-Relevanz von nierengewebsreaktiven CTLs schwer abschätzbar.

Eine weitere mögliche Komplikation bei der *in vivo*-Applikation von CTLs, die aus Geschwisterspendern generiert wurden, ist die GvHD, die durch kontaminierende alloreaktive T-Zellen vermittelt wird. Da RCC-Patienten, die nach allogener Transplantation eine GvHD entwickelten, eine höhere Rate von Tumorremissionen zeigten [Childs *et al*, 2000], scheint die Induktion von Alloreaktivität *in vivo* tolerierbar,

wenn nicht sogar erstrebenswert zu sein. Allerdings traten in einzelnen Tumorpatienten, die eine allogene Transplantation [Childs *et al*, 2000] oder Spender-Lymphozyten-Infusionen [Porter *et al*, 1999] erhielten, schwere und refraktäre Formen der GvHD auf, die zu signifikanter Morbidität und Mortalität führten. Eine ausreichende klinische Wirksamkeit in Verbindung mit moderater oder fehlender GvHD könnte möglicherweise durch den Transfer von kurzzeitkultivierten oligoklonalen Spender-T-Zelllinien erreicht werden. Jedenfalls wurde über eine solchermaßen günstige Nutzen/Risiko-Relation in klinischen Studien zum adoptiven Transfer von virusreaktiven Spender-T-Zellen bei Zytomegalie- und Epstein-Barr-Virusinfektionen nach allogener HSCT berichtet [Einsele *et al*, 2002; Rooney *et al*, 1998]. Eine wiederholte *in vitro*-Stimulation mit RCC-Zellen hätte den Vorteil, dass tumorreaktive T-Zellvorläufer expandiert werden können, die nur in geringer Frequenz in naiven PBMCs vorkommen. Die verbleibenden alloreaktiven T-Zellen könnten *in vitro* durch eine immunmagnetische Depletionsstrategie entfernt werden, dessen Angriffspunkt das aktivierungsinduzierte T-Zellantigen CD137 ist [Wehler *et al*, 2006]. Im Falle einer schweren autoimmunen Nierenkrankheit nach Geschwister-CTL-Transfer könnten primäre Patienten-Nierenzellen als allogene antigenpräsentierende Zellen während des Depletionsschrittes integriert werden. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, können diese nicht-malignen Nierenzellen ohne großen Aufwand und sehr zuverlässig aus benachbartem normalem Nierengewebe von Tumor-Nephrektomie-Präparaten isoliert und durch Kurzzeit-Zellkultur expandiert werden.

Die PBMCs von Geschwisterspendern enthielten außerdem CTL-Vorläufer, die keine Kreuzreaktivität mit nicht-malignen Nierenzellen aufwiesen (Tabelle 3.4). Die Natur der von diesen CTLs erkannten Antigene dürfte von größtem Interesse sein, denn sie könnten mögliche Zielstrukturen von RCC-Remissionen sein, die in Abwesenheit von GvHD beobachtet wurden (Childs *et al*, 2000). Für den Fall, dass diese Antigene nicht in normalem Gewebe exprimiert werden, wären sie ideale Kandidaten-Antigene für Tumor-Immuntherapien.

#### **4.7 T regs als immunsupprimierende Zellen in RCC-Patienten**

Die beeindruckend effiziente Generierung und Expansion RCC-reaktiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus gesunden Geschwisterspendern könnte dadurch erklärt werden, dass in allogenen gesunden Spendern die immunsupprimierenden Mechanismen fehlen, die die Funktion von tumorreaktiven Immunzellen in Krebspatienten behindern. Beeinträchtigte



antitumorale Immunantworten in Tumorpatienten wurden im Hinblick auf antigen-präsentierende Zellen [Yang & Carbone, 2004], Effektor-T-Zellen [Biswas *et al*, 2006] und regulatorische T-Zellen (T regs) [Zou, 2006] beschrieben. Neuere Untersuchungen haben sich auf CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen konzentriert, die die Fähigkeit haben, die Funktionalität von tumorreaktiven T-Zellen in vielen humanen Tumorentitäten zu unterdrücken [Dannull *et al*, 2005; Curiel *et al*, 2004; Wang *et al*, 2004; Woo *et al*, 2002]. Es wurde außerdem bereits beschrieben, dass T regs im peripheren Blut von Nierenzellkarzinom-Patienten in einer erhöhten Frequenz vorliegen [Griffiths *et al*, 2007]. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit in autologen PBMCs und TIL-Präparationen der RCC-Patienten der Anteil an CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T reg-Zellen bestimmt. Diese Ergebnisse wurden mit denen von PBMCs aus HLA-identischen gesunden Geschwisterspendern verglichen. Der Anteil an T reg-Zellen reichte von 5,0 bis 11,7 % der gesamten CD4-positiven T-Zellen, was nahezu im in der Literatur beschriebenen Normbereich von 5 bis 10 % liegt [Zou, 2006], und zeigte keinen konsistenten und statistisch relevanten Anstieg in den peripheren Blutzellen der Patienten im Vergleich zu den gesunden Spendern (Tabelle 3.6). Auch in den TILs lagen keine relevant erhöhten T reg-Frequenzen vor. Insgesamt geben die vergleichenden Daten zur Frequenz von regulatorischen T-Zellen in autologem und allogenen peripheren Blut und tumorinfiltrierenden Lymphozyten also keinen Hinweis auf einen T reg-vermittelten immunsupprimierenden Mechanismus in Nierenzellkarzinom-Patienten. Da es sich um ein sehr kleines Untersuchungskollektiv handelt, sollte dieses Ergebnis in weiteren Geschwisterspender/RCC-Modellen überprüft werden.

#### **4.8 Ursprung der tumorreaktiven CTLs aus CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> Vorläufer-T-Zellen**

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen *in vitro*-Studien zeigen, dass tumorreaktive CTLs in gesunden HLA-identischen Geschwisterspendern aus der CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> Subpopulation abstammen, die naive Vorläufer- und „*central memory*“-T-Lymphozyten enthält. CD62L und CCR7 sind an der Migration von T-Zellen zu den sekundären Lymphorganen („*homing*“) beteiligt [Weninger *et al*, 2002]. Beide Moleküle werden auf reifen CD8<sup>+</sup> „*central memory*“-T-Zellen herunter reguliert. Aufgrund ihrer erhöhten proliferativen und migratorischen Fähigkeiten scheinen CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> naive und „*central memory*“-T-Zellen eine überlegene Antitumor-Immunität im Vergleich zu CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup> „*effector memory*“-T-Zellen zu vermitteln, was auch in adoptiven Transfer-

Studien in Maus-Modellen gezeigt werden konnte [Gattinoni *et al*, 2005]. Die wahrscheinlichste Erklärung für unsere *in vitro*-Befunde ist, dass CD62L(*high*)<sup>+</sup> naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen von professionellen APCs aktiviert wurden, die zuvor Tumorzellmaterial aufgenommen und in den HLA-Klasse-I-Weg prozessiert haben („*cross presentation*“). Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass die RCC-reaktiven CTLs sich auch aus CD62L(*low*)<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> „*central memory*“-T-Zellen entwickelt haben, die Antigene erkennen, die ähnlich oder identisch mit denen sind, die vom Nierenzellkarzinom präsentiert werden [Moudgil & Sercarz, 1994].

## 4.9 **Ausblick**

Die hier beschriebenen Daten unterstützen die *in vitro*-Generierung von tumorreaktiven CD8<sup>+</sup> CTLs aus HLA-identischen Geschwisterspender-PBMCs. Mit dieser Vorgehensweise konnte ein breites Spektrum an Effektorzellen mit unterschiedlichen Kreuzreaktivitäten isoliert und expandiert werden. Der Hauptanteil der CTLs erkannte ausschließlich die Stimulator-Tumorzelllinie, was für die Erkennung von spezifischen Tumorantigenen spricht. Diese Zielstrukturen sind im Hinblick auf eine mögliche Immuntherapie durch Vakzination oder adoptiven Zelltransfer für Patienten mit Nierenzellkarzinom sicherlich die interessantesten Epitope. Ein Teil der CTLs erkannte neben der autologen Tumorzelllinie auch die autologen nicht-malignen Nierenzellen, wobei es sich vermutlich um nierenassoziierte oder Minor-Histokompatibilitätsantigene handelt. Weitere CTLs erkannten Antigene, die in verschiedenen Nierenzellkarzinomen exprimiert werden. Außerdem wurden CTLs mit einem Erkennungsmuster isoliert, welches sowohl Nierenzellkarzinome als auch andere solide Tumore beinhaltet. Eine andere Gruppe von CTLs erkannte Antigene, die sowohl auf RCC als auch auf hämatopoetischen Zellen auftreten. Neben klassischen CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CTLs mit unterschiedlichen HLA-Restriktionselementen (HLA-A2, -A3, -A11, -A24, -B7) wurden außerdem nicht-HLA-restringierte T-Zellen mit dem unikalen T-Zellrezeptor V $\alpha$ 23 V $\beta$ 2 isoliert, die ein breites Spektrum an Tumorzellen und HLA-negativen Zelllinien lysierten. Da Geschwisterspender offenbar eine interindividuell unterschiedliche Fähigkeit aufweisen, bestimmte antitumorale Effektor-Zelltypen zu generieren, sollten die autologen Tumorzellen des Patienten als Stimulatorzellen in *in vitro*-Protokolle implementiert werden. Eine solche Strategie garantiert, dass das volle Spektrum potentiell relevanter Antigene und immunstimulatorischer Zielstrukturen für die Ausbildung der Immunantwort genutzt wird [Lennerz *et al*, 2005].

Eine Herausforderung wird zukünftig darin bestehen, *in vitro*-Methoden zu entwickeln, die

eine noch effektivere Expansion von Nierenzellkarzinomlinien ermöglichen, da diese Tumorlinien eine Voraussetzung für die *in vitro*-Expansion tumorreaktiver T-Zellen sind. Alternativ könnten auch RCC-Einzelzellsuspensionen oder professionelle antigen-präsentierende Zellen, die zuvor mit apoptotischen oder nekrotischen Tumorzell-Präparationen beladen wurden, als Stimulatorzellen eingesetzt werden. Letztlich bietet sich der adoptive Transfer von tumorreaktiven CTLs aus Geschwisterspendern alleine oder in Kombination mit der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation in RCC-Patienten an. Solche translationalen Studien könnten die Frage beantworten, ob eine allogene Zelltherapie auf der Basis der individuell aus Spender/Patienten-Paaren gewonnenen Lymphozyten- und Tumorzell-Proben durchführbar ist und ob damit eine signifikante GvT-Reaktion jenseits der schweren GvHD erreicht werden kann.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Blutlymphozyten, die aus allogenen, serologisch HLA (humanes Leukozytenantigen)-identischen gesunden Geschwisterspendern von Nierenzellkarzinom (RCC, engl. *renal cell carcinoma*)-Patienten isoliert wurden, auf ihre antitumorale Reaktivität *in vitro* untersucht. Dazu war die vorangehende Generierung von stabil *in vitro* wachsenden Tumorzelllinien der Patienten zwingende Voraussetzung. Insgesamt wurden aus primärem Tumorgewebe von 65 Nierenzellkarzinom-Patienten Tumorzellen isoliert und daraus Zellkulturen angelegt. In 28 % der Fälle gelang es, eine konstant in Zellkultur wachsende Tumorzelllinie zu etablieren. Daneben wurden aus 56 Tumorpatienten auch die aus dem angrenzenden Nierengewebe gewonnenen nicht-malignen Nierenzellen über wenige Zellkultur-Passagen expandiert. In vier Patienten mit stabil *in vitro* wachsender Tumorzelllinie war ein allogener HLA-identischer Geschwisterspender verfügbar. In diesen Modellsystemen wurden in gemischten Lymphozyten-Tumorzell-Kulturen (MLTCs, engl. *mixed lymphocyte tumor cell cultures*) die Blutlymphozyten der Patienten und der gesunden Geschwisterspender mit der jeweiligen Nierenzellkarzinom-Zelllinie stimuliert und tumorreaktive CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs, engl. *cytotoxic T-lymphocytes*) generiert. Wenn möglich wurden aus den so gewonnenen „Responder“-Massenkulturen CD8<sup>+</sup> T-Zellklone isoliert und hinsichtlich ihrer Funktionalität in IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assays und <sup>51</sup>Chrom-Zytotoxizitätstests untersucht. Durch Blockade der HLA-Moleküle mit monoklonalen Antikörpern wurden die HLA-Restriktionselemente sowie weitere an der Erkennung beteiligte Oberflächenmoleküle analysiert. Kreuzreaktivitätsuntersuchungen mit einem breiten Zielzell-„Panel“ gaben Aufschluss über die Reaktivität der CTLs gegen RCC, nicht-maligne Nierenzellen, hämatopoetische Zielzellen von Patient und Geschwisterspender und weitere Tumorzelllinien aus Nierenzellkarzinomen und anderen Tumorentitäten.

Interessanterweise zeigten die Geschwister-MLTC-„Responder“-Lymphozyten im Vergleich zu den autologen MLTC-„Responder“-Lymphozyten eine stärkere Proliferation und Zytotoxizität nach Stimulation mit Tumorzellen. Die allogenen tumorreaktiven „Responder“-Lymphozyten entstammten der CD8<sup>+</sup> CD62L(*high*)<sup>+</sup> Subpopulation, die naive Vorläufer- und „central memory“-T-Zellen enthält. Im Gegensatz zu autologen MLTC-Lymphozyten und tumorinfiltrierenden Lymphozyten konnte aus nahezu allen allogenen MLTCs mithilfe des Grenzverdünnungsverfahrens ein breites Spektrum an tumorreaktiven CTL-Klonen expandiert werden. Diese lysierten entweder ausschließlich die autologe RCC-Zelllinie oder kreuzreagierten mit autologen nicht-malignen Nierenzellen. Eine Minderheit der CTL-Klone erkannte außerdem hämatopoetische Zellen des Patienten oder allogene Tumorzellen. Als HLA-Restriktionselemente der allogenen tumorreaktiven

CD8<sup>+</sup> CTL-Klone wurden HLA-A2, -A3, -A11, -A24 und -B7 identifiziert. Weiterhin wurden in einem Modellsystem bisher unbekannte, stark proliferierende CD3<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> CTL-Klone mit nicht-HLA-restringierter Tumorreaktivität isoliert.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit erstmals, dass allogene Blutlymphozyten von HLA-identischen gesunden Geschwistern eine Vielfalt von tumorreaktiven CD8<sup>+</sup> CTL-Klonen enthalten. Im direkten Vergleich mit autologen Blutlymphozyten der betroffenen Patienten besitzen allogene Blutlymphozyten der Geschwister eine stärkere proliferative und zytotoxische Tumorreaktivität. Die Ergebnisse dieser Arbeit ermutigen weitere Bemühungen, tumorreaktive T-Zellen aus dem Blut von HLA-identischen gesunden Geschwisterspendern *in vitro* zu generieren. Solche T-Zellen wären in zweierlei Hinsicht von Interesse: Zum einen ermöglichen sie die Identifizierung der Zielantigene, die von T-Zellen aus gesunden Individuen auf Tumoren erkannt werden und als Zielstrukturen von antigenspezifischen Immuntherapien (z. B. Vakzination) dienen könnten. Zum anderen könnten diese T-Zellen möglicherweise für eine adoptive Immuntherapie der betroffenen Tumorpatienten verwendet werden.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Beck,C., Schreiber,H., & Rowley,D. (2001) **Role of TGF-beta in immune-evasion of cancer.** *Microsc.Res.Tech.*, **52**, 387-395.
2. Becker,C., Stoll,S., Bopp,T., Schmitt,E., & Jonuleit,H. (2006) **Regulatory T cells: present facts and future hopes.** *Med.Microbiol.Immunol.(Berl)*.
3. Beldegrun,A., Muul,L.M., & Rosenberg,S.A. (1988) **Interleukin 2 expanded tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell cancer: isolation, characterization, and antitumor activity.** *Cancer Res.*, **48**, 206-214.
4. Berger,A.E., Davis,J.E., & Cresswell,P. (1982) **Monoclonal antibody to HLA-A3.** *Hybridoma*, **1**, 87-90.
5. Bernhard,H., Jager,E., Maeurer,M.J., Meyer zum Buschenfelde,K.H., & Knuth,A. (1996) **Tumor associated antigens in human renal cell carcinoma: MHC restricted recognition by cytotoxic T lymphocytes.** *Tissue Antigens*, **48**, 22-31.
6. Bernhard,H., Karbach,J., Wolfel,T., Busch,P., Storkel,S., Stockle,M., Wolfel,C., Seliger,B., Huber,C., Meyer zum Buschenfelde,K.H., & . (1994) **Cellular immune response to human renal-cell carcinomas: definition of a common antigen recognized by HLA-A2-restricted cytotoxic T-lymphocyte (CTL) clones.** *Int.J.Cancer*, **59**, 837-842.
7. Biswas,K., Richmond,A., Rayman,P., Biswas,S., Thornton,M., Sa,G., Das,T., Zhang,R., Chahlavi,A., Tannenbaum,C.S., Novick,A., Bukowski,R., & Finke,J.H. (2006) **GM2 expression in renal cell carcinoma: potential role in tumor-induced T-cell dysfunction.** *Cancer Res.*, **66**, 6816-6825.
8. Bouchard,C., Staller,P., & Eilers,M. (1998) **Control of cell proliferation by Myc.** *Trends Cell Biol.*, **8**, 202-206.
9. Brandle,D., Bresseur,F., Weynants,P., Boon,T., & Van den,E.B. (1996) **A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma.** *J.Exp.Med.*, **183**, 2501-2508.
10. Bregni,M., Doderio,A., Peccatori,J., Pescarollo,A., Bernardi,M., Sassi,I., Voena,C., Zaniboni,A., Bordignon,C., & Corradini,P. (2002) **Nonmyeloablative conditioning followed by hematopoietic cell allografting and donor lymphocyte infusions for patients with metastatic renal and breast cancer.** *Blood*, **99**, 4234-4236.
11. Britten,C.M., Meyer,R.G., Kreer,T., Drexler,I., Wolfel,T., & Herr,W. (2002) **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*, **259**, 95-110.
12. Brossart,P., Stuhler,G., Flad,T., Stevanovic,S., Rammensee,H.G., Kanz,L., & Brugger,W. (1998) **Her-2/neu-derived peptides are tumor-associated antigens expressed by human renal cell and colon carcinoma lines and are recognized by in vitro induced specific cytotoxic T lymphocytes.** *Cancer Res.*, **58**, 732-736.
13. Bubenik,J. (2003) **Tumour MHC class I downregulation and immunotherapy (Review).** *Oncol.Rep.*, **10**, 2005-2008.
14. Bubenik,J. (2004) **MHC class I down-regulation: tumour escape from immune surveillance? (review).** *Int.J.Oncol.*, **25**, 487-491.

15. Cesana,G.C., DeRaffele,G., Cohen,S., Moroziewicz,D., Mitcham,J., Stoutenburg,J., Cheung,K., Hesdorffer,C., Kim-Schulze,S., & Kaufman,H.L. (2006) **Characterization of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma.** *J.Clin.Oncol.*, **24**, 1169-1177.
16. Childs,R., Bradstock,K., Gottlieb,D., & et al. (2002) **Non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation (NST) for metastatic melanoma: nondurable chemotherapy responses without clinically meaningful graft-vs-tumor (GVT) effects.** *Blood*, **100**, 429a.
17. Childs,R., Chernoff,A., Contentin,N., Bahceci,E., Schrupp,D., Leitman,S., Read,E.J., Tisdale,J., Dunbar,C., Linehan,W.M., Young,N.S., & Barrett,A.J. (2000) **Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation.** *N.Engl.J.Med.*, **343**, 750-758.
18. Chow,W.H., Devesa,S.S., Warren,J.L., & Fraumeni,J.F., Jr. (1999) **Rising incidence of renal cell cancer in the United States.** *JAMA*, **281**, 1628-1631.
19. Coulie,P.G., Ikeda,H., Baurain,J.F., & Chiari,R. (1999) **Antitumor immunity at work in a melanoma patient.** *Adv.Cancer Res.*, **76**, 213-242.
20. Curiel,T.J., Coukos,G., Zou,L., Alvarez,X., Cheng,P., Mottram,P., Evdemon-Hogan,M., Conejo-Garcia,J.R., Zhang,L., Burow,M., Zhu,Y., Wei,S., Kryczek,I., Daniel,B., Gordon,A., Myers,L., Lackner,A., Disis,M.L., Knutson,K.L., Chen,L., & Zou,W. (2004) **Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival.** *Nat.Med.*, **10**, 942-949.
21. Dannull,J., Su,Z., Rizzieri,D., Yang,B.K., Coleman,D., Yancey,D., Zhang,A., Dahm,P., Chao,N., Gilboa,E., & Vieweg,J. (2005) **Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells.** *J.Clin.Invest*, **115**, 3623-3633.
22. Delves,P.J. & Roitt,I.M. (2000a) **The immune system. First of two parts.** *N.Engl.J.Med.*, **343**, 37-49.
23. Delves,P.J. & Roitt,I.M. (2000b) **The immune system. Second of two parts.** *N.Engl.J.Med.*, **343**, 108-117.
24. Dolstra,H., Fredrix,H., Maas,F., Coulie,P.G., Brasseur,F., Mensink,E., Adema,G.J., de Witte,T.M., Figdor,C.G., & van de Wiel-van Kemenade (1999) **A human minor histocompatibility antigen specific for B cell acute lymphoblastic leukemia.** *J.Exp.Med.*, **189**, 301-308.
25. Dorrschuck,A., Schmidt,A., Schnurer,E., Gluckmann,M., Albrecht,C., Wolfel,C., Lennerz,V., Lifke,A., Di Natale,C., Ranieri,E., Gesualdo,L., Huber,C., Karas,M., Wolfel,T., & Herr,W. (2004) **CD8+ cytotoxic T lymphocytes isolated from allogeneic healthy donors recognize HLA class Ia/Ib-associated renal carcinoma antigens with ubiquitous or restricted tissue expression.** *Blood*, **104**, 2591-2599.
26. Dudley,M.E., Wunderlich,J.R., Yang,J.C., Sherry,R.M., Topalian,S.L., Restifo,N.P., Royal,R.E., Kammula,U., White,D.E., Mavroukakis,S.A., Rogers,L.J., Gracia,G.J., Jones,S.A., Mangiameli,D.P., Pelletier,M.M., Gea-Banacloche,J., Robinson,M.R., Berman,D.M., Filie,A.C., Abati,A., & Rosenberg,S.A. (2005) **Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma.** *J.Clin.Oncol.*, **23**, 2346-2357.
27. Einsele,H., Roosnek,E., Rufer,N., Sinzger,C., Riegler,S., Loffler,J., Grigoleit,U., Moris,A., Rammensee,H.G., Kanz,L., Kleihauer,A., Frank,F., Jahn,G., & Hebart,H. (2002) **Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy.** *Blood*, **99**, 3916-3922.

28. Falk,C.S., Noessner,E., Weiss,E.H., & Schendel,D.J. (2002) **Retaliation against tumor cells showing aberrant HLA expression using lymphokine activated killer-derived T cells.** *Cancer Res.*, **62**, 480-487.
29. Faure,F., Even,J., & Kourilsky,P. (1998) **Tumor-specific immune response: current in vitro analyses may not reflect the in vivo immune status.** *Crit Rev.Immunol.*, **18**, 77-86.
30. Fenteany,G., Standaert,R.F., Lane,W.S., Choi,S., Corey,E.J., & Schreiber,S.L. (1995) **Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin.** *Science*, **268**, 726-731.
31. Finke,J.H., Rayman,P., Alexander,J., Edinger,M., Tubbs,R.R., Connelly,R., Pontes,E., & Bukowski,R. (1990) **Characterization of the cytolytic activity of CD4+ and CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell carcinoma.** *Cancer Res.*, **50**, 2363-2370.
32. Fisher,R.I., Rosenberg,S.A., & Fyfe,G. (2000) **Long-term survival update for high-dose recombinant interleukin-2 in patients with renal cell carcinoma.** *Cancer J.Sci.Am.*, **6 Suppl 1**, S55-S57.
33. Flad,T., Spengler,B., Kalbacher,H., Brossart,P., Baier,D., Kaufmann,R., Bold,P., Metzger,S., Bluggel,M., Meyer,H.E., Kurz,B., & Muller,C.A. (1998) **Direct identification of major histocompatibility complex class I-bound tumor-associated peptide antigens of a renal carcinoma cell line by a novel mass spectrometric method.** *Cancer Res.*, **58**, 5803-5811.
34. Fontenot,J.D., Rasmussen,J.P., Gavin,M.A., & Rudensky,A.Y. (2005) **A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells.** *Nat.Immunol.*, **6**, 1142-1151.
35. Fujiwara,K., Higashi,T., Nouse,K., Nakatsukasa,H., Kobayashi,Y., Uemura,M., Nakamura,S., Sato,S., Hanafusa,T., Yumoto,Y., Naito,I., & Shiratori,Y. (2004) **Decreased expression of B7 costimulatory molecules and major histocompatibility complex class-I in human hepatocellular carcinoma.** *J.Gastroenterol.Hepatol.*, **19**, 1121-1127.
36. Garcia,P., Llano,M., de Heredia,A.B., Willberg,C.B., Caparros,E., Aparicio,P., Braud,V.M., & Lopez-Botet,M. (2002) **Human T cell receptor-mediated recognition of HLA-E.** *Eur.J.Immunol.*, **32**, 936-944.
37. Garcia-Lora,A., Algarra,I., & Garrido,F. (2003) **MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape.** *J.Cell Physiol*, **195**, 346-355.
38. Gattinoni,L., Klebanoff,C.A., Palmer,D.C., Wrzesinski,C., Kerstann,K., Yu,Z., Finkelstein,S.E., Theoret,M.R., Rosenberg,S.A., & Restifo,N.P. (2005) **Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells.** *J.Clin.Invest*, **115**, 1616-1626.
39. Gaudin,C., Kremer,F., Angevin,E., Scott,V., & Triebel,F. (1999) **A hsp70-2 mutation recognized by CTL on a human renal cell carcinoma.** *J.Immunol.*, **162**, 1730-1738.
40. Gaugler,B., Brouwenstijn,N., Vantomme,V., Szikora,J.P., Van der Spek,C.W., Patard,J.J., Boon,T., Schrier,P., & Van den Eynde,B.J. (1996) **A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma.** *Immunogenetics*, **44**, 323-330.
41. Geraghty,D.E. (1993) **Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes.** *Curr.Opin.Immunol.*, **5**, 3-7.
42. Geraghty,D.E., Koller,B.H., Hansen,J.A., & Orr,H.T. (1992) **The HLA class I gene family includes at least six genes and twelve pseudogenes and gene fragments.** *J.Immunol.*, **149**, 1934-1946.



43. Glaspy,J.A. (2002) **Therapeutic options in the management of renal cell carcinoma.** *Semin.Oncol.*, **29**, 41-46.
44. Gleave,M.E., Elhilali,M., Fradet,Y., Davis,I., Venner,P., Saad,F., Klotz,L.H., Moore,M.J., Paton,V., & Bajamonde,A. (1998) **Interferon gamma-1b compared with placebo in metastatic renal-cell carcinoma.** Canadian Urologic Oncology Group. *N.Engl.J.Med.*, **338**, 1265-1271.
45. Goulmy,E. (1997a) **Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy.** *Immunol.Rev.*, **157**, 125-140.
46. Goulmy,E. (1997b) **Minor histocompatibility antigens: from T cell recognition to peptide identification.** *Hum.Immunol.*, **54**, 8-14.
47. Griffiths,R.W., Elkord,E., Gilham,D.E., Ramani,V., Clarke,N., Stern,P.L., & Hawkins,R.E. (2007) **Frequency of regulatory T cells in renal cell carcinoma patients and investigation of correlation with survival.** *Cancer Immunol.Immunother.*
48. Groettrup,M., Soza,A., Eggers,M., Kuehn,L., Dick,T.P., Schild,H., Rammensee,H.G., Koszinowski,U.H., & Kloetzel,P.M. (1996) **A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation.** *Nature*, **381**, 166-168.
49. Gunawan,B., Huber,W., Holtrup,M., von Heydebreck,A., Efferth,T., Poustka,A., Ringert,R.H., Jakse,G., & Fuzesi,L. (2001) **Prognostic impacts of cytogenetic findings in clear cell renal cell carcinoma: gain of 5q31-qter predicts a distinct clinical phenotype with favorable prognosis.** *Cancer Res.*, **61**, 7731-7738.
50. Hanada,K., Yewdell,J.W., & Yang,J.C. (2004) **Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing.** *Nature*, **427**, 252-256.
51. Harlin,H., Artz,A.S., Mahowald,M., Rini,B.I., Zimmerman,T., Vogelzang,N.J., & Gajewski,T.F. (2004) **Clinical responses following nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation for renal cell carcinoma are associated with expansion of CD8+ IFN-gamma-producing T cells.** *Bone Marrow Transplant.*, **33**, 491-497.
52. Herr,W., Linn,B., Leister,N., Wandel,E., Meyer zum Buschenfelde,K.H., & Wolfel,T. (1997) **The use of computer-assisted video image analysis for the quantification of CD8+ T lymphocytes producing tumor necrosis factor alpha spots in response to peptide antigens.** *J.Immunol.Methods*, **203**, 141-152.
53. Herr,W., Ranieri,E., Olson,W., Zarour,H., Gesualdo,L., & Storkus,W.J. (2000) **Mature dendritic cells pulsed with freeze-thaw cell lysates define an effective in vitro vaccine designed to elicit EBV-specific CD4(+) and CD8(+) T lymphocyte responses.** *Blood*, **96**, 1857-1864.
54. Herr,W., Wolfel,T., Heike,M., Meyer zum Buschenfelde,K.H., & Knuth,A. (1994) **Frequency analysis of tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes in peripheral blood of a melanoma patient vaccinated with autologous tumor cells.** *Cancer Immunol.Immunother.*, **39**, 93-99.
55. Hildebrand,W.H., Turnquist,H.R., Prilliman,K.R., Hickman,H.D., Schenk,E.L., McIlhane,M.M., & Solheim,J.C. (2002) **HLA class I polymorphism has a dual impact on ligand binding and chaperone interaction.** *Hum.Immunol.*, **63**, 248-255.
56. Hoffman,R.A., Kung,P.C., Hansen,W.P., & Goldstein,G. (1980) **Simple and rapid measurement of human T lymphocytes and their subclasses in peripheral blood.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **77**, 4914-4917.
57. Horowitz,M.M., Gale,R.P., Sondel,P.M., Goldman,J.M., Kersey,J., Kolb,H.J., Rimm,A.A., Ringden,O., Rozman,C., Speck,B., & . (1990) **Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation.** *Blood*, **75**, 555-562.

58. Horton,R., Wilming,L., Rand,V., Lovering,R.C., Bruford,E.A., Khodiyar,V.K., Lush,M.J., Povey,S., Talbot,C.C., Jr., Wright,M.W., Wain,H.M., Trowsdale,J., Ziegler,A., & Beck,S. (2004) **Gene map of the extended human MHC.** *Nat.Rev.Genet.*, **5**, 889-899.
59. Ikeda,H., Lethe,B., Lehmann,F., van Baren,N., Baurain,J.F., de Smet,C., Chambost,H., Vitale,M., Moretta,A., Boon,T., & Coulie,P.G. (1997) **Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor.** *Immunity.*, **6**, 199-208.
60. Janeway,C.A.Jr., Travers,P., Walport,M., & Capra J.D. (1999) **Immunobiology: the immune system in health and disease**, 4 edn, Garland, London, 4th edition.
61. Jantzer,P. & Schendel,D.J. (1998) **Human renal cell carcinoma antigen-specific CTLs: antigen-driven selection and long-term persistence in vivo.** *Cancer Res.*, **58**, 3078-3086.
62. Jung,D., Hilmes,C., Knuth,A., Jaeger,E., Huber,C., & Seliger,B. (1999) **Gene transfer of the Co-stimulatory molecules B7-1 and B7-2 enhances the immunogenicity of human renal cell carcinoma to a different extent.** *Scand.J.Immunol.*, **50**, 242-249.
63. Kaplan,J. & Callewaert,D.M. (1978) **Expression of human T-lymphocyte antigens by natural killer cells.** *J.Natl.Cancer Inst.*, **60**, 961-964.
64. Kataoka,T., Shinohara,N., Takayama,H., Takaku,K., Kondo,S., Yonehara,S., & Nagai,K. (1996) **Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation of contribution of perforin- and Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity.** *J.Immunol.*, **156**, 3678-3686.
65. Kath,R., Schlichter,A., & Höffken,K. (1999) **Nierenzellkarzinom.** Kompendium internistische Onkologie (ed. by H. J. Schmoll, K. Höffken, & K. Possinger), pp. 1755-1804.
66. Kausche,S., Wehler,T., Schnurer,E., Lennerz,V., Brenner,W., Melchior,S., Grone,M., Nonn,M., Strand,S., Meyer,R., Ranieri,E., Huber,C., Falk,C.S., & Herr,W. (2006) **Superior antitumor in vitro responses of allogeneic matched sibling compared with autologous patient CD8+ T cells.** *Cancer Res.*, **66**, 11447-11454.
67. Kessler,J.H., Beekman,N.J., Bres-Vloemans,S.A., Verdijk,P., van Veelen,P.A., Kloosterman-Joosten,A.M., Vissers,D.C., ten Bosch,G.J., Kester,M.G., Sijts,A., Wouter,D.J., Ossendorp,F., Offringa,R., & Melief,C.J. (2001) **Efficient identification of novel HLA-A(\*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis.** *J.Exp.Med.*, **193**, 73-88.
68. Kim,E. & Deppert,W. (2003) **The complex interactions of p53 with target DNA: we learn as we go.** *Biochem.Cell Biol.*, **81**, 141-150.
69. Kim,R., Emi,M., & Tanabe,K. (2007) **Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape.** *Immunology*, **121**, 1-14.
70. Kirkbride,K.C. & Blobe,G.C. (2003) **Inhibiting the TGF-beta signalling pathway as a means of cancer immunotherapy.** *Expert.Opin.Biol.Ther.*, **3**, 251-261.
71. Klebanoff,C.A., Gattinoni,L., Torabi-Parizi,P., Kerstann,K., Cardones,A.R., Finkelstein,S.E., Palmer,D.C., Antony,P.A., Hwang,S.T., Rosenberg,S.A., Waldmann,T.A., & Restifo,N.P. (2005) **Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **102**, 9571-9576.
72. Klein,E., Ben Bassat,H., Neumann,H., Ralph,P., Zeuthen,J., Polliack,A., & Vanky,F. (1976) **Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia.** *Int.J.Cancer*, **18**, 421-431.

73. Klein,J. & Sato,A. (2000a) **The HLA system. First of two parts.** *N.Engl.J.Med.*, **343**, 702-709.
74. Klein,J. & Sato,A. (2000b) **The HLA system. Second of two parts.** *N.Engl.J.Med.*, **343**, 782-786.
75. Knutson,K.L., Disis,M.L., & Salazar,L.G. (2006) **CD4 regulatory T cells in human cancer pathogenesis.** *Cancer Immunol.Immunother.*
76. Kolenko,V., Wang,Q., Riedy,M.C., O'Shea,J., Ritz,J., Cathcart,M.K., Rayman,P., Tubbs,R., Edinger,M., Novick,A., Bukowski,R., & Finke,J. (1997) **Tumor-induced suppression of T lymphocyte proliferation coincides with inhibition of Jak3 expression and IL-2 receptor signaling: role of soluble products from human renal cell carcinomas.** *J.Immunol.*, **159**, 3057-3067.
77. Kurokawa,T., Oelke,M., & Mackensen,A. (2001) **Induction and clonal expansion of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes from renal cell carcinoma patients after stimulation with autologous dendritic cells loaded with tumor cells.** *Int.J.Cancer*, **91**, 749-756.
78. Lampson,L.A. & Levy,R. (1980) **Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line.** *J.Immunol.*, **125**, 293-299.
79. Leahy,D.J. (1995) **A structural view of CD4 and CD8.** *FASEB J.*, **9**, 17-25.
80. Lennerz,V., Fatho,M., Gentilini,C., Frye,R.A., Lifke,A., Ferel,D., Wolfel,C., Huber,C., & Wolfel,T. (2005) **The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **102**, 16013-16018.
81. Linn,Y.C., Lau,L.C., & Hui,K.M. (2002) **Generation of cytokine-induced killer cells from leukaemic samples with in vitro cytotoxicity against autologous and allogeneic leukaemic blasts.** *Br.J.Haematol.*, **116**, 78-86.
82. Lionello,I., Mangia,P., Gattinoni,L., Pende,D., Cippone,A., Sensi,M., Rigatti,P., & Traversari,C. (2007) **CD8(+) T lymphocytes isolated from renal cancer patients recognize tumour cells through an HLA- and TCR/CD3-independent pathway.** *Cancer Immunol.Immunother.*, **56**, 1065-1076.
83. Liyanage,U.K., Moore,T.T., Joo,H.G., Tanaka,Y., Herrmann,V., Doherty,G., Drebin,J.A., Strasberg,S.M., Eberlein,T.J., Goedegebuure,P.S., & Linehan,D.C. (2002) **Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma.** *J.Immunol.*, **169**, 2756-2761.
84. Lotze,M.T. (1992) **T-cell growth factors and the treatment of patients with cancer.** *Clin.Immunol.Immunopathol.*, **62**, S47-S54.
85. Lutz,W. & Nowakowska-Swirta,E. (2002) **Gene p53 mutations, protein p53, and anti-p53 antibodies as biomarkers of cancer process.** *Int.J.Occup.Med.Environ.Health*, **15**, 209-218.
86. Maenaka,K., Juji,T., Nakayama,T., Wyer,J.R., Gao,G.F., Maenaka,T., Zaccai,N.R., Kikuchi,A., Yabe,T., Tokunaga,K., Tadokoro,K., Stuart,D.I., Jones,E.Y., & van der Merwe,P.A. (1999) **Killer cell immunoglobulin receptors and T cell receptors bind peptide-major histocompatibility complex class I with distinct thermodynamic and kinetic properties.** *J.Biol.Chem.*, **274**, 28329-28334.
87. Marten,A., Renoth,S., Lilienfeld-Toal,M., Buttgerit,P., Schakowski,F., Glasmacher,A., Sauerbruch,T., & Schmidt-Wolf,I.G. (2001) **Enhanced lytic activity of cytokine-induced killer cells against multiple myeloma cells after co-culture with idiotype-pulsed dendritic cells.** *Haematologica*, **86**, 1029-1037.

88. Migot-Nabias,F., Luty,A.J., Minh,T.N., Fajardy,I., Tamouza,R., Marzais,F., Charron,D., Danze,P.M., Renaut,A., & Deloron,P. (2001) **HLA alleles in relation to specific immunity to liver stage antigen-1 from plasmodium falciparum in Gabon.** *Genes Immun.*, **2**, 4-10.
89. Miller,J.D., Weber,D.A., Ibegbu,C., Pohl,J., Altman,J.D., & Jensen,P.E. (2003) **Analysis of HLA-E peptide-binding specificity and contact residues in bound peptide required for recognition by CD94/NKG2.** *J.Immunol.*, **171**, 1369-1375.
90. Monaco,J.J. (1995) **Pathways for the processing and presentation of antigens to T cells.** *J.Leukoc.Biol.*, **57**, 543-547.
91. Montagna,D., Schiavo,R., Gibelli,N., Pedrazzoli,P., Tonelli,R., Pagani,S., Assirelli,E., Locatelli,F., Pession,A., Fregoni,V., Montini,E., Da Prada,G.A., Siena,S., & Maccario,R. (2004) **Ex vivo generation and expansion of anti-tumor cytotoxic T-cell lines derived from patients or their HLA-identical sibling.** *Int.J.Cancer*, **110**, 76-86.
92. Moris,A., Teichgraber,V., Gauthier,L., Buhring,H.J., & Rammensee,H.G. (2001) **Cutting edge: characterization of allorestricted and peptide-selective alloreactive T cells using HLA-tetramer selection.** *J.Immunol.*, **166**, 4818-4821.
93. Motzer,R.J. & Bukowski,R.M. (2006) **Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma.** *J.Clin.Oncol.*, **24**, 5601-5608.
94. Motzer,R.J., Mazumdar,M., Bacik,J., Berg,W., Amsterdam,A., & Ferrara,J. (1999) **Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma.** *J.Clin.Oncol.*, **17**, 2530-2540.
95. Motzer,R.J., Russo,P., Nanus,D.M., & Berg,W.J. (1997) **Renal cell carcinoma.** *Curr.Probl.Cancer*, **21**, 185-232.
96. Moudgil,K.D. & Sercarz,E.E. (1994) **The T cell repertoire against cryptic self determinants and its involvement in autoimmunity and cancer.** *Clin.Immunol.Immunopathol.*, **73**, 283-289.
97. Munz,C., Obst,R., Osen,W., Stevanovic,S., & Rammensee,H.G. (1999) **Alloreactivity as a source of high avidity peptide-specific human CTL.** *J.Immunol.*, **162**, 25-34.
98. Nash,R.A. & Storb,R. (1996) **Graft-versus-host effect after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: GVHD and GVL.** *Curr.Opin.Immunol.*, **8**, 674-680.
99. Negrier,S., Escudier,B., Lasset,C., Douillard,J.Y., Savary,J., Chevreau,C., Ravaud,A., Mercatello,A., Peny,J., Mousseau,M., Philip,T., & Tursz,T. (1998) **Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. Groupe Francais d'Immunotherapie.** *N.Engl.J.Med.*, **338**, 1272-1278.
100. O'Callaghan,C.A. & Bell,J.I. (1998) **Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G.** *Immunol.Rev.*, **163**, 129-138.
101. Parham,P., Barnstable,C.J., & Bodmer,W.F. (1979) **Use of a monoclonal antibody (W6/32) in structural studies of HLA-A,B,C, antigens.** *J.Immunol.*, **123**, 342-349.
102. Parham,P. & Brodsky,F.M. (1981) **Partial purification and some properties of BB7.2. A cytotoxic monoclonal antibody with specificity for HLA-A2 and a variant of HLA-A28.** *Hum.Immunol.*, **3**, 277-299.
103. Parkin,J. & Cohen,B. (2001) **An overview of the immune system.** *Lancet*, **357**, 1777-1789.

104. Piali,L., Fichtel,A., Terpe,H.J., Imhof,B.A., & Gisler,R.H. (1995) **Endothelial vascular cell adhesion molecule 1 expression is suppressed by melanoma and carcinoma.** *J.Exp.Med.*, **181**, 811-816.
105. Porter,D.L., Connors,J.M., Van Deerlin,V.M., Duffy,K.M., McGarigle,C., Saidman,S.L., Leonard,D.G., & Antin,J.H. (1999) **Graft-versus-tumor induction with donor leukocyte infusions as primary therapy for patients with malignancies.** *J.Clin.Oncol.*, **17**, 1234.
106. Porzsozt,F. & Heimpel,H. (1984) **The relationship of lytic effects against autologous and allogeneic PHA blasts induced in human mixed lymphocyte cultures.** *Immunol.Lett.*, **8**, 33-38.
107. Probst-Kepper,M., Stroobant,V., Kridel,R., Gaugler,B., Landry,C., Brasseur,F., Cosyns,J.P., Weynand,B., Boon,T., & Van den Eynde,B.J. (2001) **An alternative open reading frame of the human macrophage colony-stimulating factor gene is independently translated and codes for an antigenic peptide of 14 amino acids recognized by tumor-infiltrating CD8 T lymphocytes.** *J.Exp.Med.*, **193**, 1189-1198.
108. Rammensee,H.G. (1995) **Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules.** *Curr.Opin.Immunol.*, **7**, 85-96.
109. Rebai,N. & Malissen,B. (1983) **Structural and genetic analyses of HLA class I molecules using monoclonal xenoantibodies.** *Tissue Antigens*, **22**, 107-117.
110. Reichert,T.E., Rabinowich,H., Johnson,J.T., & Whiteside,T.L. (1998) **Mechanisms responsible for signaling and functional defects.** *J.Immunother.*, **21**, 295-306.
111. Reiser,J.B., Darnault,C., Guimezanes,A., Gregoire,C., Mosser,T., Schmitt-Verhulst,A.M., Fontecilla-Camps,J.C., Malissen,B., Housset,D., & Mazza,G. (2000) **Crystal structure of a T cell receptor bound to an allogeneic MHC molecule.** *Nat.Immunol.*, **1**, 291-297.
112. Riddell,S.R., Murata,M., Bryant,S., & Warren,E.H. (2002) **Minor histocompatibility antigens--targets of graft versus leukemia responses.** *Int.J.Hematol.*, **76 Suppl 2**, 155-161.
113. Rini,B.I., Zimmerman,T., Stadler,W.M., Gajewski,T.F., & Vogelzang,N.J. (2002) **Allogeneic stem-cell transplantation of renal cell cancer after nonmyeloablative chemotherapy: feasibility, engraftment, and clinical results.** *J.Clin.Oncol.*, **20**, 2017-2024.
114. Roitt,I., Brostoff,J., & Male,D. (1998) *Immunology*, 5 edn, Mosby, London.
115. Rooney,C.M., Smith,C.A., Ng,C.Y., Loftin,S.K., Sixbey,J.W., Gan,Y., Srivastava,D.K., Bowman,L.C., Krance,R.A., Brenner,M.K., & Heslop,H.E. (1998) **Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients.** *Blood*, **92**, 1549-1555.
116. Rosenberg,S.A., Lotze,M.T., Yang,J.C., Aebersold,P.M., Linehan,W.M., Seipp,C.A., & White,D.E. (1989) **Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients.** *Ann.Surg.*, **210**, 474-484.
117. Rosenberg,S.A., Yang,J.C., Topalian,S.L., Schwartzentruber,D.J., Weber,J.S., Parkinson,D.R., Seipp,C.A., Einhorn,J.H., & White,D.E. (1994) **Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2.** *JAMA*, **271**, 907-913.
118. Rotzschke,O., Falk,K., Faath,S., & Rammensee,H.G. (1991) **On the nature of peptides involved in T cell alloreactivity.** *J.Exp.Med.*, **174**, 1059-1071.
119. Sadovnikova,E., Jopling,L.A., Soo,K.S., & Stauss,H.J. (1998) **Generation of human tumor-reactive cytotoxic T cells against peptides presented by non-self HLA class I molecules.** *Eur.J.Immunol.*, **28**, 193-200.

120. Salter,R.D., Benjamin,R.J., Wesley,P.K., Buxton,S.E., Garrett,T.P., Clayberger,C., Krensky,A.M., Norment,A.M., Littman,D.R., & Parham,P. (1990) **A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the alpha 3 domain of HLA-A2.** *Nature*, **345**, 41-46.
121. Sbaji,H., Mehta,A., & DeGroot,A.S. (2001) **Use of T cell epitopes for vaccine development.** *Curr.Drug Targets.Infect.Disord.*, **1**, 303-313.
122. Schawaller,R., Rollinghoff,M., & Wagner,H. (1980) **Fine specificity and cytolytic activity of continuously growing alloreactive cytotoxic T lymphocyte clones.** *Scand.J.Immunol.*, **11**, 449-453.
123. Schendel,D.J., Falk,C.S., Nossner,E., Maget,B., Kressenstein,S., Urlinger,S., Tampe,R., & Gansbacher,B. (2000) **Gene transfer of human interferon gamma complementary DNA into a renal cell carcinoma line enhances MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition but suppresses non-MHC-restricted effector cell activity.** *Gene Ther.*, **7**, 950-959.
124. Schendel,D.J., Gansbacher,B., Oberneder,R., Kriegmair,M., Hofstetter,A., Riethmuller,G., & Segurado,O.G. (1993) **Tumor-specific lysis of human renal cell carcinomas by tumor-infiltrating lymphocytes. I. HLA-A2-restricted recognition of autologous and allogeneic tumor lines.** *J.Immunol.*, **151**, 4209-4220.
125. Schendel,D.J., Oberneder,R., Falk,C.S., Jantzer,P., Kressenstein,S., Maget,B., Hofstetter,A., Riethmuller,G., & Nossner,E. (1997) **Cellular and molecular analyses of major histocompatibility complex (MHC) restricted and non-MHC-restricted effector cells recognizing renal cell carcinomas: problems and perspectives for immunotherapy.** *J.Mol.Med.*, **75**, 400-413.
126. Schleypen,J.S., Von Geldern,M., Weiss,E.H., Kotzias,N., Rohrmann,K., Schendel,D.J., Falk,C.S., & Pohla,H. (2003) **Renal cell carcinoma-infiltrating natural killer cells express differential repertoires of activating and inhibitory receptors and are inhibited by specific HLA class I allotypes.** *Int.J.Cancer*, **106**, 905-912.
127. Schmidt,R., Stippel,D., Krings,F., & Pollok,M. (1995) **Malignancies of the genito-urinary system following renal transplantation.** *Br.J.Urol.*, **75**, 572-577.
128. Schwartz,R.H. (2003) **T cell anergy.** *Annu.Rev.Immunol.*, **21**, 305-334.
129. Simon,A., Dosztanyi,Z., Rajnavolgyi,E., & Simon,I. (2000) **Function-related regulation of the stability of MHC proteins.** *Biophys.J.*, **79**, 2305-2313.
130. Simpson,E., Scott,D., James,E., Lombardi,G., Cwynarski,K., Dazzi,F., Millrain,J.M., & Dyson,P.J. (2001) **Minor H antigens: genes and peptides.** *Eur.J.Immunogenet.*, **28**, 505-513.
131. Sinkovics,J.G. & Horvath,J.C. (2000) **Vaccination against human cancers (review).** *Int.J.Oncol.*, **16**, 81-96.
132. Smith,P.A., Brunmark,A., Jackson,M.R., & Potter,T.A. (1997) **Peptide-independent recognition by alloreactive cytotoxic T lymphocytes (CTL).** *J.Exp.Med.*, **185**, 1023-1033.
133. Stauss,H.J. (1999) **Immunotherapy with CTLs restricted by nonself MHC.** *Immunol.Today*, **20**, 180-183.
134. Stevanovic,S. & Jung,G. (1993) **Multiple sequence analysis: pool sequencing of synthetic and natural peptide libraries.** *Anal.Biochem.*, **212**, 212-220.

135. Stoltze,L., Dick,T.P., Deeg,M., Pommerl,B., Rammensee,H.G., & Schild,H. (1998) **Generation of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein cytotoxic T lymphocyte epitope requires proteasome-dependent and -independent proteolytic activities.** *Eur.J.Immunol.*, **28**, 4029-4036.
136. Stulting,R.D. & Berke,G. (1973) **The use of <sup>51</sup>Cr release as a measure of lymphocyte-mediated cytotoxicity in vitro.** *Cell Immunol.*, **9**, 474-476.
137. Taams,L.S., Palmer,D.B., Akbar,A.N., Robinson,D.S., Brown,Z., & Hawrylowicz,C.M. (2006) **Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation.** *Immunology*, **118**, 1-9.
138. Tanaka,K. & Kasahara,M. (1998) **The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28.** *Immunol.Rev.*, **163**, 161-176.
139. Tanaka,K., Tamura,T., Yoshimura,T., & Ichihara,A. (1992) **Proteasomes: protein and gene structures.** *New Biol.*, **4**, 173-187.
140. Tatsumi,E. (1992) **Epstein-Barr virus (EBV) and human hematopoietic cell lines: a review.** *Hum.Cell*, **5**, 79-86.
141. Tatsumi,T., Herrem,C.J., Olson,W.C., Finke,J.H., Bukowski,R.M., Kinch,M.S., Ranieri,E., & Storkus,W.J. (2003a) **Disease stage variation in CD4+ and CD8+ T-cell reactivity to the receptor tyrosine kinase EphA2 in patients with renal cell carcinoma.** *Cancer Res.*, **63**, 4481-4489.
142. Tatsumi,T., Kierstead,L.S., Ranieri,E., Gesualdo,L., Schena,F.P., Finke,J.H., Bukowski,R.M., Brusic,V., Sidney,J., Sette,A., Logan,T.F., Kasamon,Y.L., Slingluff,C.L., Jr., Kirkwood,J.M., & Storkus,W.J. (2003b) **MAGE-6 encodes HLA-DRbeta1\*0401-presented epitopes recognized by CD4+ T cells from patients with melanoma or renal cell carcinoma.** *Clin.Cancer Res.*, **9**, 947-954.
143. Tatsumi,T., Kierstead,L.S., Ranieri,E., Gesualdo,L., Schena,F.P., Finke,J.H., Bukowski,R.M., Mueller-Berghaus,J., Kirkwood,J.M., Kwok,W.W., & Storkus,W.J. (2002) **Disease-associated bias in T helper type 1 (Th1)/Th2 CD4(+) T cell responses against MAGE-6 in HLA-DRB10401(+) patients with renal cell carcinoma or melanoma.** *J.Exp.Med.*, **196**, 619-628.
144. Toubert,A., Raffoux,C., Boretto,J., Sire,J., Sodoyer,R., Thureau,S.R., Amor,B., Colombani,J., Lemonnier,F.A., & Jordan,B.R. (1988) **Epitope mapping of HLA-B27 and HLA-B7 antigens by using intradomain recombinants.** *J.Immunol.*, **141**, 2503-2509.
145. Tykodi,S.S., Warren,E.H., Thompson,J.A., Riddell,S.R., Childs,R.W., Otterud,B.E., Leppert,M.F., Storb,R., & Sandmaier,B.M. (2004) **Allogeneic hematopoietic cell transplantation for metastatic renal cell carcinoma after nonmyeloablative conditioning: toxicity, clinical response, and immunological response to minor histocompatibility antigens.** *Clin.Cancer Res.*, **10**, 7799-7811.
146. Ugolini,S. & Vivier,E. (2000) **Regulation of T cell function by NK cell receptors for classical MHC class I molecules.** *Curr.Opin.Immunol.*, **12**, 295-300.
147. Uzzo,R.G., Rayman,P., Kolenko,V., Clark,P.E., Bloom,T., Ward,A.M., Molto,L., Tannenbaum,C., Worford,L.J., Bukowski,R., Tubbs,R., Hsi,E.D., Bander,N.H., Novick,A.C., & Finke,J.H. (1999) **Mechanisms of apoptosis in T cells from patients with renal cell carcinoma.** *Clin.Cancer Res.*, **5**, 1219-1229.
148. Van den Eynde,B.J., Gaugler,B., Probst-Kepper,M., Michaux,L., Devuyst,O., Lorge,F., Weynants,P., & Boon,T. (1999) **A new antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human kidney tumor results from reverse strand transcription.** *J.Exp.Med.*, **190**, 1793-1800.

149. Verneris,M.R., Baker,J., Edinger,M., & Negrin,R.S. (2002) **Studies of ex vivo activated and expanded CD8+ NK-T cells in humans and mice.** *J.Clin.Immunol.*, **22**, 131-136.
150. Vissers,J.L., De Vries,I.J., Engelen,L.P., Scharenborg,N.M., Molkenboer,J., Figdor,C.G., Oosterwijk,E., & Adema,G.J. (2002) **Renal cell carcinoma-associated antigen G250 encodes a naturally processed epitope presented by human leukocyte antigen-DR molecules to CD4(+) T lymphocytes.** *Int.J.Cancer*, **100**, 441-444.
151. Vissers,J.L., De Vries,I.J., Schreurs,M.W., Engelen,L.P., Oosterwijk,E., Figdor,C.G., & Adema,G.J. (1999) **The renal cell carcinoma-associated antigen G250 encodes a human leukocyte antigen (HLA)-A2.1-restricted epitope recognized by cytotoxic T lymphocytes.** *Cancer Res.*, **59**, 5554-5559.
152. Voltz,R., Jilg,W., & Wolf,H. (1989) **Modification of HLA expression as a possible factor in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma.** *Haematol.Blood Transfus.*, **32**, 289-292.
153. Wang,F.S., Liu,M.X., Zhang,B., Shi,M., Lei,Z.Y., Sun,W.B., Du,Q.Y., & Chen,J.M. (2002) **Antitumor activities of human autologous cytokine-induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo.** *World J.Gastroenterol.*, **8**, 464-468.
154. Wang,H.Y., Lee,D.A., Peng,G., Guo,Z., Li,Y., Kiniwa,Y., Shevach,E.M., & Wang,R.F. (2004) **Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy.** *Immunity.*, **20**, 107-118.
155. Wang,R.F. (2006) **Regulatory T cells and toll-like receptors in cancer therapy.** *Cancer Res.*, **66**, 4987-4990.
156. Wang,W., Man,S., Gulden,P.H., Hunt,D.F., & Engelhard,V.H. (1998) **Class I-restricted alloreactive cytotoxic T lymphocytes recognize a complex array of specific MHC-associated peptides.** *J.Immunol.*, **160**, 1091-1097.
157. Ways,J.P. & Parham,P. (1983) **The binding of monoclonal antibodies to cell-surface molecules. A quantitative analysis with immunoglobulin G against two alloantigenic determinants of the human transplantation antigen HLA-A2.** *Biochem.J.*, **216**, 423-432.
158. Wehler,T.C., Nonn,M., Brandt,B., Britten,C.M., Grone,M., Todorova,M., Link,I., Khan,S.A., Meyer,R.G., Huber,C., Hartwig,U.F., & Herr,W. (2006) **Targeting the activation-induced antigen CD137 can selectively deplete alloreactive T cells from anti-leukemic and anti-tumor donor T-cell lines.** *Blood*.
159. Weiden,P.L., Sullivan,K.M., Flournoy,N., Storb,R., & Thomas,E.D. (1981) **Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation.** *N.Engl.J.Med.*, **304**, 1529-1533.
160. Weninger,W., Manjunath,N., & von Andrian,U.H. (2002) **Migration and differentiation of CD8+ T cells.** *Immunol.Rev.*, **186**, 221-233.
161. Wittig,B.M., Treichel,U., Blaheta,R., Schreiter,T., Schwarting,A., Meyer zum Buschenfelde,K.H., & Mayet,W. (1997) **Soluble E-selectin enhances intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in human tumor cell lines.** *Exp.Cell Res.*, **237**, 364-370.
162. Wolf,A.M., Wolf,D., Steurer,M., Gastl,G., Gunsilius,E., & Grubeck-Loebenstein,B. (2003) **Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients.** *Clin.Cancer Res.*, **9**, 606-612.
163. Wolfel,T., Hauer,M., Klehmann,E., Brichard,V., Ackermann,B., Knuth,A., Boon,T., & Meyer zum Buschenfelde,K.H. (1993a) **Analysis of antigens recognized on human melanoma cells by A2-restricted cytolytic T lymphocytes (CTL).** *Int.J.Cancer*, **55**, 237-244.



164. Wolfel,T., Herr,W., Coulie,P., Schmitt,U., Meyer zum Buschenfelde,K.H., & Knuth,A. (1993b) **Lysis of human pancreatic adenocarcinoma cells by autologous HLA-class I-restricted cytolytic T-lymphocyte (CTL) clones.** *Int.J.Cancer*, **54**, 636-644.
165. Woo,E.Y., Yeh,H., Chu,C.S., Schlienger,K., Carroll,R.G., Riley,J.L., Kaiser,L.R., & June,C.H. (2002) **Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation.** *J.Immunol.*, **168**, 4272-4276.
166. Yamaguchi,S., Yoshihiro,S., Matsuyama,H., Nagao,K., Fukunaga,K., Matsumoto,H., Matsuda,K., Oba,K., & Naito,K. (2003) **The allelic loss of chromosome 3p25 with c-myc gain is related to the development of clear-cell renal cell carcinoma.** *Clin.Genet.*, **63**, 184-191.
167. Yang,L. & Carbone,D.P. (2004) **Tumor-host immune interactions and dendritic cell dysfunction.** *Adv.Cancer Res.*, **92**, 13-27.
168. Zhou,G., Drake,C.G., & Levitsky,H.I. (2006) **Amplification of tumor-specific regulatory T cells following therapeutic cancer vaccines.** *Blood*, **107**, 628-636.
169. Zou,W. (2006) **Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy.** *Nat.Rev.Immunol.*, **6**, 295-307.

## 7 ANHANG

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
AB	<u>A</u> ntibiotikum (Gentamicin)
AEC	3- <u>A</u> mino-2- <u>E</u> thyl- <u>C</u> arbazol
AK	<u>A</u> ntikörper
AM	<u>A</u> ntimykotikum (Fluconazol)
AML	<u>a</u> kute <u>m</u> yeloische <u>L</u> eukämie
APC	antigenpräsentierende Zelle (engl. <i>antigen presenting cell</i> )
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i> )
β <sub>2</sub> m	β2-Mikroglobulin
CCL	„chemokine ( <u>C</u> - <u>C</u> motif) <u>l</u> igand“
CD	„cluster of differentiation“
CIK	zytokininduzierte Killerzelle (engl. <i>cytokine-induced killer cell</i> )
CML	<u>c</u> hronische <u>m</u> yeloische <u>L</u> eukämie
COC	Kolonkarzinom (engl. <i>colon carcinoma</i> )
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cr	Chrom
CSA	<u>C</u> yclosporin <u>A</u>
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten (engl. <i>cytotoxic T lymphocyte</i> )
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DC	Dendritische Zelle (engl. <i>dendritic cell</i> )
DLI	Spender-Lymphozyten-Infusion (engl. <i>donor lymphocyte infusion</i> )
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
EBV	<u>E</u> pstein- <u>B</u> arr- <u>V</u> irus
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraacetat
ELISpot-Assay	„enzyme-linked immunosorbent <u>s</u> pot-assay“
ER	endoplasmatisches <u>R</u> etikulum
E/T	Effektor-zu-Zielzellen-Verhältnis (engl. <i>effector-to-target ratio</i> )
FACS	„fluorescence-activated <u>c</u> ell <u>s</u> orting“
FCS	fötales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i> )
FITC	<u>F</u> luoreszeini <u>s</u> o <u>t</u> hiocyanat
FoxP3	„ <u>F</u> orkhead <u>b</u> ox <u>p</u> rotein <u>3</u> “
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (bei Zentrifugationen)

GvH	Transplantat-gegen-Wirt (engl. <i>graft-versus-host</i> )
GvHD	Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (engl. <i>graft-versus-host disease</i> )
GvL	Transplantat-gegen-Leukämie (engl. <i>graft-versus-leukemia</i> )
GvT	Transplantat-gegen-Tumor (engl. <i>graft-versus-tumor</i> )
Gy	Gray
h	Stunde
HBSS	„ <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i> “
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HLA	humanes Leukozytenantigen
HS	Humanserum
HSA	Humanserumalbumin
ICAM	„ <i>intercellular adhesion molecule</i> “
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KE	Kultureinheit
kDa	Kilo-Dalton
KIR	„ <i>killer inhibitory receptor</i> “
l	Liter
LAK	lymphokinaktivierte Killerzellen (engl. <i>lymphokine-activated killer cells</i> )
LC	Lungenkarzinom (engl. <i>lung carcinoma</i> )
LCL	lymphoblastoide Zelllinie (engl. <i>lymphoblastoid cell line</i> )
LFA	„ <i>lymphocyte function-associated antigen</i> “
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
μCi	μ-Curie
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
m	milli (10 <sup>-3</sup> )
MACS	„ <i>magnetically activated cell sorting</i> “
mAK	monoklonaler Antikörper
MEL	Melanom (engl. <i>melanoma</i> )
MFI	„ <i>mean fluorescence index</i> “
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex (engl. <i>major histocompatibility complex</i> )
MIC	„ <i>major histocompatibility complex class I chain-related</i> “
min	Minute
ml	Milliliter
MLTC	Gemischte Lymphozyten-Tumorzell-Kultur (engl. <i>mixed lymphocyte tumor cell culture</i> )
NKC	Gesunde Nierenzellen (engl. <i>non-malignant kidney cell</i> )
NK-T-Zelle	NK-ähnliche T-Zelle (engl. <i>NK-like T cell</i> )
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle (engl. <i>natural killer cell</i> )

---

NRS	<u>n</u> ormales <u>R</u> attens <u>e</u> rum
N-Terminus	Amino-Terminus
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (engl. <i>p</i> eripheral <i>b</i> lood <i>m</i> ononuclear <i>c</i> ells)
PBS	Phosphat gepufferte Saline (engl. <i>p</i> hosphate <i>b</i> uffered <i>s</i> aline)
PC	Pankreaskarzinom (engl. <i>p</i> ancreatic <i>c</i> arcinoma)
PC5 (PE-Cy5)	<u>P</u> hycoerythrin kovalent gebunden an <u>C</u> yanin <u>5</u> .1
PE	<u>P</u> hyco <u>e</u> rythrin
pH	<u>p</u> otentia <u>h</u> ydrogenii
PHA	<u>P</u> hyto <u>h</u> ä <u>m</u> agglutinin
RCC	Nierenzellkarzinom (engl. <i>r</i> enal <i>c</i> ell <i>c</i> arcinoma)
rhIL	rekombinantes humanes Interleukin (engl. <i>r</i> ecombinant <i>h</i> uman <i>i</i> nterleukin)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>r</i> ounds <i>p</i> er <i>m</i> inute)
RPMI	„ <u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute“
Std.	Stunde
TAP	„ <u>t</u> ransporter associated with <u>a</u> ntigen <u>p</u> rocessing“
TCR	T-Zellrezeptor (engl. <i>T</i> cell <i>r</i> eceptor)
TE	<u>T</u> esteinheit
TGF	Tumor-Wachstumsfaktor (engl. <i>t</i> umor <i>g</i> rowth <i>f</i> actor)
Th	Helfer-T-Zellen (engl. <i>T</i> <i>h</i> elper cells)
T regs	regulatorische T-Zellen
ULBP	„ <u>U</u> L-16 <u>b</u> inding <u>p</u> rotein“

## 7.2 Liste der eigenen Veröffentlichungen

### Poster und Vorträge:

**Kausche, S.**, Wehler, T. C., Schnürer, E., Gröne, M., Brenner, W., Melchior, S., Huber, C., Falk, C., Herr, W.

Renal cell carcinoma (RCC)-reactive cytotoxic T-lymphocyte (CTL) clones can be expanded from naïve HLA-identical siblings in vitro.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO), Hannover, 01.-05.10.2005.

**Kausche, S.**, Wehler, T. C., Schnürer, E., Lennerz, V., Brenner, W., Melchior, S., Strand, S., Gröne, M., Meyer, R., Huber, C., Falk, C. S., Herr, W.

Superior anti-tumour CD8<sup>+</sup> T-cell responses in vitro using allogeneic compared to autologous patient lymphocytes.

Tagung der ‚European Group of Blood and Bone Marrow Transplantation‘ (EBMT), Hamburg, 19.-22.3.2006.

**Kausche, S.**, Wehler, T. C., Schnürer, E., Lennerz, V., Brenner, W., Melchior, S., Strand, S., Gröne, M., Meyer, R., Huber, C., Falk, C. S., Herr, W.

Superior anti-tumour CD8<sup>+</sup> T cell responses in vitro using allogeneic healthy sibling compared to autologous patient lymphocytes.

4. Jährliche Tagung der ‚Association for Immunotherapy of Cancer‘ (CIMT), Mainz, 04.-05.05.2006.

**Kausche, S.**, Wehler, T. C., Schnürer, E., Lennerz, V., Brenner, W., Melchior, S., Strand, S., Gröne, M., Meyer, R., Huber, C., Falk, C. S., Herr, W.

Superior anti-tumour CD8<sup>+</sup> T cell responses in vitro using allogeneic healthy sibling compared to autologous patient lymphocytes.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO), Leipzig, 04.-08.11.2006.

**Kausche, S.**, Wehler, T. C., Schnürer, E., Lennerz, V., Brenner, W., Melchior, S., Gröne, M., Nonn, M., Strand, S., Meyer, R., Ranieri, E., Huber, C., Falk, C. S., Herr, W.

Superior antitumor in vitro responses of allogeneic matched sibling compared with autologous patient CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes.

BMT Tandem Meetings (ASBMT), Keystone, Colorado, 08.-12.02.2007.

**Kausche, S.**, Wehler, T. C., Schnürer, E., Lennerz, V., Brenner, W., Melchior, S., Gröne, M., Nonn, M., Strand, S., Meyer, R., Ranieri, E., Huber, C., Falk, C. S., Herr, W.

Superior antitumor in vitro responses of allogeneic matched sibling compared with autologous patient CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes.

51. Jahreskongress der Saarländisch-Pfälzischen InternistenGesellschaft e. V. (SPIG), Neustadt an der Weinstraße, 22.-24.02.2007.

### Artikel:

Hofmann, S., Gluckmann, M., **Kausche, S.**, Schmidt, A., Corvey, C., Lichtenfels, R., Huber, C., Albrecht, C., Karas, M., Herr, W. (2005).

Rapid and sensitive identification of major histocompatibility complex class-I associated tumor peptides by nanoLC MALDI MS/MS.

*Mol. Cell Proteomics*, **4**, 1888-1897.

**Kausche, S.**, Wehler, T., Schnurer, E., Lennerz, V., Brenner, W., Melchior, S., Grone, M., Nonn, M., Strand, S., Meyer, R., Ranieri, E., Huber, C., Falk, C.S., Herr, W. (2006).

Superior antitumor in vitro responses of allogeneic matched sibling compared with autologous patient CD8<sup>+</sup> T cells.

*Cancer Research*, **66**, 11447-11454.