

Identifizierung von T-Zell-erkannten Nierenzellkarzinom-Antigenen

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

Mark Gröne
geb. in Rheine

Mainz, 2007

1. EINLEITUNG	1
1.1 Tumor und Immunsystem	1
1.1.1 Definition des Begriffs „Tumor“.....	1
1.1.2 Das Nierenzellkarzinom	2
1.2 Das Immunsystem	4
1.3 HLA-Moleküle	6
1.4 Prozessierung und Präsentation von Peptidantigenen	10
1.5 T-Zell-vermittelte Immunantwort	13
1.6 Antigen-spezifische Immuntherapie.....	16
1.7 Methoden der Antigenidentifizierung.....	17
1.7.1 Extraktion und Identifizierung natürlicher HLA-Liganden.....	17
1.7.2 cDNA-Expressionsklonierung.....	18
1.7.3 SEREX (<i>serological analysis of recombinant cDNA-expression libraries</i>).....	18
1.7.4 Theoretische Vorhersage von HLA-Liganden	19
1.8 Klassifizierung von Tumorantigenen	19
1.9 Identifizierung von Nierenzellkarzinom-Antigenen mit Hilfe alloreaktiver T-Zellen.....	21
1.10 Zielsetzung der Arbeit	22
2. MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 Material	24
2.1.1 Geräte	24
2.1.2 Plastikwaren	26
2.1.3 Glaswaren	27

2.1.4	Chemikalien.....	28
2.1.5	Substanzen für die Zellkultur.....	30
2.1.6	Zytokine.....	31
2.1.7	Molekulargewichtsmarker.....	31
2.1.8	Kits	31
2.1.9	Zellkulturmedien	31
2.1.10	Puffer für biochemische Präparationen	32
2.1.11	Allgemeine Puffer und Lösungen	33
2.1.12	Monoklonale Antikörper.....	34
2.1.12.1	Antikörper zum Nachweis von Oberflächenantigenen in der Durchfluß- zytometrie.....	34
2.1.12.2	Antikörper zum Nachweis von Oberflächenantigenen in der Durchfluß- zytometrie.....	35
2.1.13	Blutlymphozyten und Zelllinien.....	36
2.1.14	Synthetische Peptide.....	38
2.1.15	ELISPOT-Experimente.....	39
2.2	Methoden	40
2.2.1	Zellkultur.....	40
2.2.2	Isolation CD8 ⁺ T-Lymphozyten aus <i>Buffy Coats</i>	41
2.2.3	Generierung tumorreaktiver CD8 ⁺ T-Lymphozyten durch allogene MLTC	41
2.2.4	Klonierung von tumorreaktiven CD8 ⁺ T-Lymphozyten.....	42
2.2.5	Zytotoxizitätstest.....	43
2.2.5.1	Zytotoxizitätstest zum Nachweis von Tumorreaktivität	43
2.2.5.2	Zytotoxizitätstest zum <i>Screenen</i> der HPLC-Fractionen	44
2.2.6	Gamma-Interferon-ELISPOT-Assay.....	45
2.2.6.1	ELISPOT-Assay zur Bestimmung der HLA-Restriktion mittels Anti- körperblockade (Blockadetest).....	47
2.2.6.2	Transiente Transfektion von COS-7-Zellen und 293T-Zellen im ELISPOT- Assay.....	49
2.2.6.3	Peptiderkennung im ELISPOT-Assay.....	50

2.2.7	Durchflußzytometrie zur phänotypischen Charakterisierung von zellulären Oberflächenmarkern.....	50
2.2.8	Biochemische Aufreinigung und Auftrennung natürlich prozessierter Tumorantigene	51
2.2.8.1	Affinitätschromatographie der HLA-Komplexe und Aufreinigung der natürlichen HLA-Liganden.....	52
2.2.8.2	Auftrennung der HLA-Liganden mittels RP-HPLC.....	54
2.2.9	Sequenzierung von Kandidaten-Epitopen in der Massenspektrometrie	55
2.2.10	SDS-PAGE zur Bestimmung der durch Immunchromatographie aufgereinigten Mengen an HLA-Klasse-I-Molekülen.....	56
3	ERGEBNISSE.....	57
3.1	MHC-Klasse-Ia-Genotypisierung von Effektor- und Stimulatorzellen der allogenen MLTC	57
3.2	Generierung von tumorreaktiven CD8⁺ T-Zellpopulationen durch allogene MLTC	58
3.2.1	Charakterisierung der MLTC 1851-5.....	59
3.2.2	Charakterisierung der aus MLTC 1851-5 generierten klonalen CTL	60
3.2.3	Detaillierte Untersuchungen zur Spezifität des HLA-B/C- restringierten CTL-Klons A4.....	64
3.2.4	Detaillierte Untersuchungen zur Spezifität des HLA-B/C- restringierten CTL-Klons E77	68
3.3	Biochemische Aufreinigung der von den CTL-Klonen erkannten Peptidantigene	73
3.3.1	Immunchromatographie	73
3.3.2	Nachweis aufgereinigter HLA-Moleküle mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	75
3.3.3	Auftrennung der natürlichen Peptidliganden mittels „reverse phase“ HPLC....	76
3.3.4	Zytotoxizitätstest mit den HPLC-Fraktionen	78

3.3.4.1	<i>Screening</i> der HLA-B/C-assoziierten natürlichen RCC-Peptide mit dem CTL-Klon A4	79
3.3.4.2	<i>Screening</i> der HLA-B/C-assoziierten natürlichen RCC-Peptide mit dem CTL-Klon E77	81
3.4	Massenspektrometrische Bestimmung der natürlichen HLA-B7-assoziierten Peptidliganden	82
4	DISKUSSION	91
4.1	HLA-Klasse-I-Übereinstimmung zwischen gesundem Spender und Nierenzellkarzinompatient.....	91
4.2	Kultivierung tumorreaktiver T-Zellpopulationen mit Interleukin-2 und Interleukin-7.....	95
4.3	Generierung tumorreaktiver CD8 ⁺ T-Zellen aus PBMC des gesunden Spenders.....	96
4.4	Charakterisierung MZ1851-RCC-reaktiver CD8 ⁺ -T-Zellklone des gesunden Spenders.....	97
4.5	Biochemisch-massenspektrometrische Identifizierung der Nierenzellkarzinomantigene	102
4.5.1	Immunchromatographie	102
4.5.2	HPLC und Massenspektrometrie.....	103
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	106
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	108
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	124
7.1	Der Einbuchstabencode der Aminosäuren.....	126

1. Einleitung

1.1 Tumor und Immunsystem

1.1.1 Definition des Begriffs „Tumor“

Im allgemeinen Sprachgebrauch stellt der Begriff „Tumor“ einen Sammelbegriff dar, welcher eine Vielzahl von Krankheiten beschreibt, bei denen Körperzellen unkontrolliert proliferieren und gesundes Gewebe verdrängen oder zerstören können. Bei Tumorerkrankungen kommt es demnach zu einer Störung des genetisch regulierten Gleichgewichts zwischen Zellwachstum und dem programmierten Zelltod, welcher als Apoptose bezeichnet wird. Verschiedene externe und interne Ursachen führen dabei zu einem veränderten Zellteilungszyklus (Mitose), bei dem regulierende Signale der Mitose entweder nicht erkannt oder nicht ausgeführt werden, da der hierfür benötigte genetische Code defekt ist.

Das p53-Protein stellt eines der am besten charakterisierten Proteine aus der Klasse der Tumorsuppressorgene dar¹ und repräsentiert einen Schlüsselregulator innerhalb der zellulären Wachstumskontrolle.² Die Funktion des Proteins besteht darin, nach DNA-Schädigungen Transkriptionsfaktoren zu aktivieren, welche entweder DNA-Reparaturmechanismen auslösen oder aber die Apoptose einleiten können. Defekte innerhalb dieses Kernenzym können diese Funktion verhindern und eine Tumorbildung fördern. In der Tat konnte bei ca. 50% aller humanen Tumore eine Mutation innerhalb des für p53 kodierenden Gens nachgewiesen werden.³

Das VHL-Gen (von-Hippel-Lindau Syndrom) stellt ein weiteres Tumorsuppressorgen dar, welches bei bis zu 90% der Patienten mit einem Nierenzellkarzinom verändert vorliegt.⁴ Durch Inaktivierung dieses Genlocus kommt es zu einer Steigerung der Expressionsrate verschiedener Transkriptionsfaktoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) oder PDGF (*platelet derived growth factor*), die das Tumorstadium beschleunigen.

Der Zellteilungszyklus kann auch durch die Überexpression bestimmter Proteine direkt angeregt werden. So werden nicht-mutierte Gensequenzen, sogenannte Proto-onkogene, infolge von DNA-Schäden zu Onkogenen umgewandelt, welche bei der

malignen Transformation von Zellen unmittelbar beteiligt sind.

1.1.2 Das Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom (NZK) wird auch als Adenokarzinom der Niere bezeichnet. Nierenzellkarzinome machen etwa 2-3% aller bösartigen Tumore des Erwachsenenalters aus.^{5;6} Das klarzellige NZK stellt mit 70-80% die größte Gruppe unter den malignen Nierentumoren dar. In den letzten Jahren wurde ein Ansteigen der Inzidenzrate des NZK beobachtet⁷, welches auch durch eine verbesserte Diagnostik mit bildgebenden Verfahren erklärt werden kann. Das Risiko an einem NZK zu erkranken, ist bei Männern etwa doppelt so hoch wie bei Frauen und nimmt altersbedingt (50-70 Jahre) zu.

Im frühen Stadium der Erkrankung haben Patienten mit NZK eine gute Prognose, da sie in der Regel kurativ operiert werden können. Jedoch liegt die Fünfjahresüberlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten im metastasiertem Stadium unter 5%⁸. Aufgrund der hohen Resistenz des Nierenzellkarzinoms gegenüber konventionellen Radiochemotherapien⁹ ist die Entwicklung neuer und effektiverer Therapiestrategien von großer Bedeutung. Dabei sind auch immunologische Therapieansätze denkbar, da verschiedene klinische Untersuchungen die Vermutung unterstützen, daß das Immunsystem zur Bekämpfung des Nierenzellkarzinoms beitragen kann. So wurden spontane Remissionen in bis zu 6% der Erkrankten¹⁰, die Infiltration von Tumorgewebe durch Lymphozyten und dendritischen Zellen (DZ's)¹¹ als auch erhöhte Inzidenzraten des Nierenzellkarzinoms unter immunsuppressiver Behandlung nach Nierentransplantationen beschrieben.¹² Desweiteren wurden zum Teil langanhaltende Tumorrückbildungen unter Interleukin-2 (IL-2) und Interferon (IFN)- α -basierten Immuntherapien in 10-25% der behandelten Patienten¹³ beobachtet. Eine dauerhafte Rückbildung der Tumore wurde nur bei einer kleinen Patientengruppe berichtet.¹⁴ Desweiteren konnten Metaanalysen keinen sicheren positiven Effekt von IL-2 für das Überleben der Patienten aufzeigen.¹⁵⁻¹⁷ Patienten mit einem klarzelligem NZK zeigen basierend auf eine IL-2-Therapie eine bessere Prognose.¹⁸ Interleukin-2 fungiert dabei als ein Stimulator für das Zellwachstum von immunologischen Effektorlymphozyten, wie z.B. T-Zellen und NK-

Zellen.¹⁹ Die Wirkungsweise von IFN- α stellt eine Kombination aus zellvermittelter Zytotoxizität infolge einer gesteigerten Antigenpräsentation der Tumorzellen, einer direkten antiproliferativen Aktivität und einem antiangiogenetischen Effekt dar. Beim NZK konnten infolge einer IFN- α -Behandlung Remissionsraten zwischen 10 und 20%¹⁶ mit einer Verbesserung der Einjahresüberlebensrate um 44% gezeigt werden, so daß eine Verlängerung der medianen Überlebenszeit der Patienten um etwa vier Monate erreicht werden konnte.¹⁵ Dabei war die Therapie nach Entfernung des Primärtumors besonders wirksam.^{15;20}

Neben dem Einsatz von Zytokinen wie IL-2 oder IFN- α wurden weitere immunologisch wirksame Therapien zur Bekämpfung von Nierenzellkarzinomen entwickelt. Diese beinhalten zum einen die therapeutische Vakzinierung durch dendritische Zellen, um eine spezifische Aktivierung des Immunsystems zu induzieren²¹, oder die sogenannte „*targeted therapy*“, bei der zur Behandlung Substanzen eingesetzt werden, welche für die Tumorpheriferation wichtige Wachstumssignale inhibieren. Hierzu zählen Antikörper und Inhibitoren, die beispielsweise gegen EGF (*epidermal growth factor*) oder VEGF (*vascular endothelial growth factor*) gerichtet sind und mit deren Hilfe die rezidivfreie Überlebenszeit der Patienten gesteigert werden kann.^{22;23} Auch die allogene Blutstammzelltransplantation stellt eine vielversprechende Strategie zur Behandlung von Patienten mit einem NZK dar. Mit Hilfe dieser Therapie konnten bei ca. 50% der Patienten, welche sich nach vorheriger Zytokinbehandlung (IL-2 und IFN- α) refraktär zeigten, partielle oder komplette Tumorremissionen erzielt werden.²⁴ Dabei werden die Patienten zunächst durch eine Chemotherapie mit reduzierter Intensität konditioniert, bevor sie mit allogenen Blutstammzellen eines verwandten oder unverwandten Fremdspenders, dessen Gewebetyp (HLA(*human leukocyte antigen*)-Typ) mit dem des Patienten kompatibel ist (HLA-*Match*), transplantiert werden. Diese Transplantations-therapie beruht auf einen durch T-Lymphozyten ausgelösten „*graft-versus-tumor*“(GvT)-Effekt, ähnlich dem „*graft-versus-leukemia*“(GvL)-Effekt, wie er nach Transplantation von Leukämiepatienten beobachtet wird. Allerdings kann es nach allogener Blutstammzelltransplantation zur sogenannten „*graft-versus-host disease*“(GvHD) kommen, die wiederum mit einer hohen Morbidität und Mortalität vergesellschaftet ist. Verursacht wird die GvHD durch immunkompetente Lymphozyten des Spenders, welche die Zelloberflächenmoleküle des Empfängers als fremd erkennen. Die Frequenz solcher

alloreaktiver zytotoxischer T-Lymphozyten im Blut dieses Patienten scheint mit dem Schweregrad der GvHD zu korrelieren.²⁵ Um eine Steigerung des GvT-Effektes bei gleichzeitiger Reduktion der GvH-Erkrankungen zu erzielen, wäre es wünschenswert, ausschließlich T-Lymphozyten mit der gewünschten Spezifität gegen Tumorzellen zu generieren. Dies setzt jedoch die Kenntnis von spezifischen Tumorantigenen voraus, welche von den T-Lymphozyten erkannt werden können.

Die Identifizierung der Zielantigene autologer tumorreaktiver T-Lymphozyten beim Nierenzellkarzinom erwies sich bislang als schwierig, da sich aus dem Blut von Nierenzellkarzinompatienten *in vitro* nur selten stabil wachsende T-Zelllinien generieren ließen.²⁶ Ein eingeschränktes T-Zellrepertoire des Patienten infolge von Mechanismen der Toleranz, Anergisierung oder auch durch zuvor durchgeführte therapeutische Maßnahmen könnte hierfür verantwortlich sein.²⁷ Um dennoch von T-Lymphozyten erkannte Tumorantigene identifizieren zu können, könnte auch die Generierung von T-Zellpopulationen aus dem Blut von allogenen HLA-kompatiblen gesunden Spendern in Betracht gezogen werden.

1.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem stellt eine Organisation von Zellen und Molekülen zur Abwehr von Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten dar. Um Infektionen durch Mikroorganismen wirkungsvoll bekämpfen zu können, stehen dem Immunsystem zwei fundamentale und miteinander kooperierende Komponenten zur Verfügung, das angeborene und das adaptive Immunsystem.^{28;29} Das angeborene Immunsystem dient der ersten Abwehr gegen mikrobielle Erreger und setzt sich aus anatomischen Anteilen (physikalisch-chemische Barriere von Haut und Schleimhäuten), physiologischen Anteilen (Körpertemperatur, Lysozym, Akutphasen-Proteine, Komplementsystem), phagozytierenden Zellen (Granulozyten, Makrophagen), natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und zahlreichen Zytokinen zusammen. Dieser erste Abwehrmechanismus wirkt mit Ausnahme von Rezeptoren gegen konservierte mikrobielle Strukturen unspezifisch und ist nicht in der Lage, einen gezielten Schutz gegenüber einer erneuten Infektion zu bieten. Die Effektoren der angeborenen Immunabwehr wie Makrophagen und

dendritische Zellen zeichnen sich aufgrund ihrer Fähigkeit zur professionellen Antigenpräsentation und Sekretion von Botenstoffen (Zytokine, Chemokine) zudem als zelluläre Schlüsselkomponenten bei der Bekämpfung von Pathogenen aus.³⁰ Nach Erkennung von pathogenassoziierten Molekülen auf der Zelloberfläche von Mikroorganismen mit Hilfe ihrer Rezeptoren können diese Zellen extrazelluläre Antigene durch Endozytose aufnehmen und somit als Vermittler zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort fungieren.³¹ Die adaptive Komponente des Immunsystems basiert hingegen auf der klonalen Selektion von Lymphozyten, bei der durch unterschiedliche Kombination von Gensegmenten eine große Vielfalt an hochspezialisierten Rezeptoren entsteht. Diese Diversität erlaubt es den Lymphozyten, praktisch jedes körperfremde Antigen zu erkennen und neben der Verstärkung der angeborenen Immunantwort ein immunologisches Gedächtnis zu vermitteln, so daß bei einer erneuten Infektion eine schnellere und effizientere Immunantwort ausgelöst werden kann. Bei der adaptiven Immunantwort lassen sich zudem eine humorale und eine zelluläre Komponente unterscheiden. Die humorale Reaktion richtet sich gegen extrazelluläre Antigene und Toxine und wird durch von B-Lymphozyten sezernierte Antikörper und die Komplementkomponenten (Plasmaproteine) vermittelt. Wichtige Effektorzellen der zellulären Reaktion des adaptiven Immunsystems stellen zytotoxische T-Lymphozyten (CTL, *cytotoxic T-lymphocytes*) dar. Sie verfügen über die Fähigkeit, Zellen nach viraler oder maligner Transformation spezifisch zu erkennen und zu zerstören. Die Erkennung maligner Zellen durch CTL beruht auf einer unterschiedlichen Proteinausstattung der betroffenen Zellen im Vergleich zu normalen Zellen des gleichen Gewebetyps. Dabei fungieren Oligopeptide als Zielstrukturen für die T-Lymphozyten, welche nach intrazellulärer Prozessierung von Proteinen auf der Oberfläche der Zielzellen in Assoziation mit Molekülen der humanen Leukozyten-Antigene (HLA, *human leukocyte antigen*) präsentiert werden.³²

1.3 HLA-Moleküle

Für die Funktionalität sowohl von humoralen als auch zellulären Immunantworten sind membranständige, heterodimere Glykoproteine, die strukturell zur Superfamilie der Immunglobuline gehören, verantwortlich. Endogen synthetisierte Peptide aus extrazellulären und zytosolischen Proteinen können von diesen Glykoproteinen gebunden werden und vermitteln so die Interaktion zwischen Zellen, die an der Regulation von Immunantworten beteiligt sind. Diese beim Menschen als HLA bezeichneten Zelloberflächenmoleküle sind ein aus körpereigenen Antigenen aufgebautes, komplexes System.³³ Sie werden von Genen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC, *major histocompatibility complex*) kodiert, der auf dem Chromosom 6 (6p21.3) lokalisiert ist.^{34;35} Der Begriff MHC für diese Genabschnitte resultiert daraus, daß ihre prominentesten Proteinbiosyntheseprodukte, die MHC-Moleküle, die Hauptverantwortlichen für die Histokompatibilität, d.h. für die Verträglichkeit von Gewebe- und Organtransplantaten sind.³⁶ MHC-Moleküle lassen sich aufgrund der Herkunft der präsentierten Peptide, der mit ihnen interagierenden T-Zellpopulationen und ihrem Expressionsmuster in zwei unterschiedliche Klassen unterteilen. MHC-Klasse-II-Moleküle findet man auf immunregulatorischen Zellen wie Makrophagen, dendritische Zellen, B-Lymphozyten und aktivierten T-Lymphozyten, während MHC-Klasse-I-Moleküle auf nahezu allen kernhaltigen, somatischen Zellen konstitutiv exprimiert werden. Dabei spiegeln die unterschiedlichen Expressionsmuster von MHC-Antigenen der Klassen I und II auch ihre verschiedenen Funktionen wider.

MHC-Klasse-II-Moleküle präsentieren durch Phagozytose und Endozytose aufgenommene extrazelluläre Antigene. Diese werden in Endosomen abgebaut und auf MHC-Klasse-II-Moleküle geladen. CD4⁺ T-Helferzellen werden von diesen HLA-Klasse-II-Antigenen stimuliert und aktiviert und werden zur Zytokinsekretion angeregt. Dies führt zu einer Interaktion mit B-Zellen und anderen Effektorzellen des Immunsystems. MHC-Klasse-I-Moleküle hingegen präsentieren Peptide, die aus intrazellulären Proteinen stammen. Werden „Selbst“-Peptide präsentiert, führt dies normalerweise zu keiner Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen, da autoreaktive T-Lymphozyten im Thymus deletiert werden. Die Erkennung von Fremdpeptiden, tumorspezifische Antigene oder Peptide aus intrazellulären Pathogenen wie Viren, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden,

führt zur Apoptose oder Lyse der erkannten Zellen.

MHC-Klasse-I-Moleküle bestehen aus einer in der Membran verankerten α -Kette (schwere Kette) mit einem Molekulargewicht von 45kD sowie einer nichtkovalent assoziierten β -Kette, deren monomorphes Gen (β_2 -Mikroglobulin-Gen) auf dem Chromosom 15 (15q21) lokalisiert ist. Die α -Kette lässt sich in fünf unterschiedliche Domänen unterteilen. Sie besteht aus zwei peptidbindenden Domänen (α_1 , α_2), einer immunglobulinähnlichen Domäne (α_3), die die Bindungsstelle für den CD8-Korezeptor enthält und mit dem β_2 -Mikroglobulin assoziiert ist³⁷, einer Transmembranregion und einem zytoplasmatischen Schwanz.

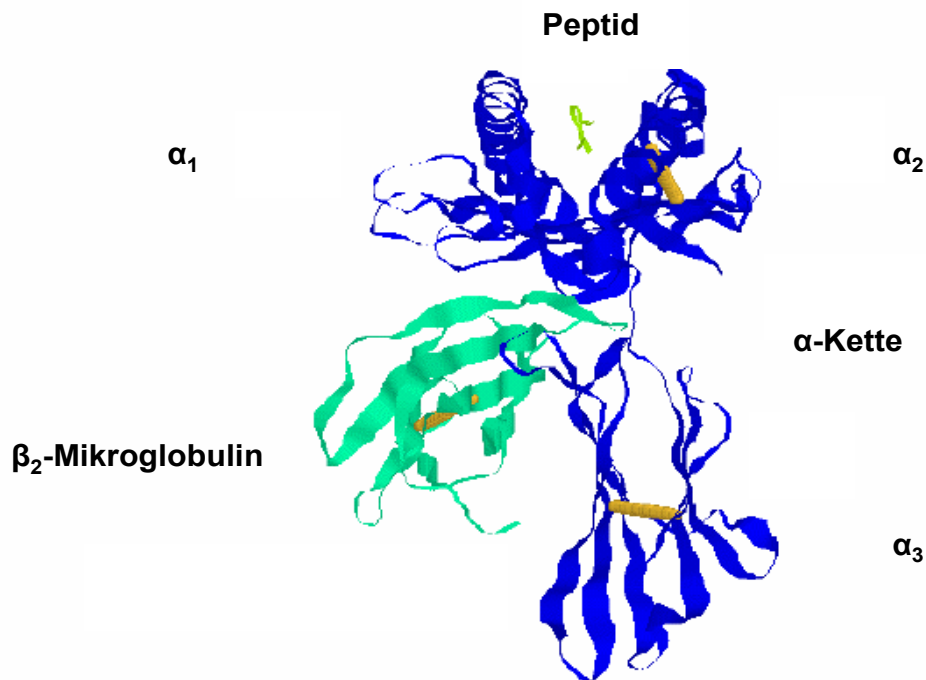


Abbildung 1.1: Kristallstruktur des HLA-A2-Moleküls im Komplex mit einem Peptidliganden, Darstellung als Ribbon-Diagramm, das gebundene Peptid ist zur besseren Unterscheidung in der Backbone-Darstellung abgebildet (Quelle:³⁸)

Die Struktur der MHC-Klasse-II-Moleküle setzt sich aus zwei schweren Ketten, einer α -Kette (34kD) und einer β -Kette (29kD), zusammen. Die schweren Ketten besitzen jeweils eine Transmembranregion, eine kurze zytoplasmische Domäne und zwei extrazelluläre Immunglobulin-domänen (α_{1-2} bzw. β_{1-2}), über die beide Ketten nichtkovalent miteinander assoziiert sind.

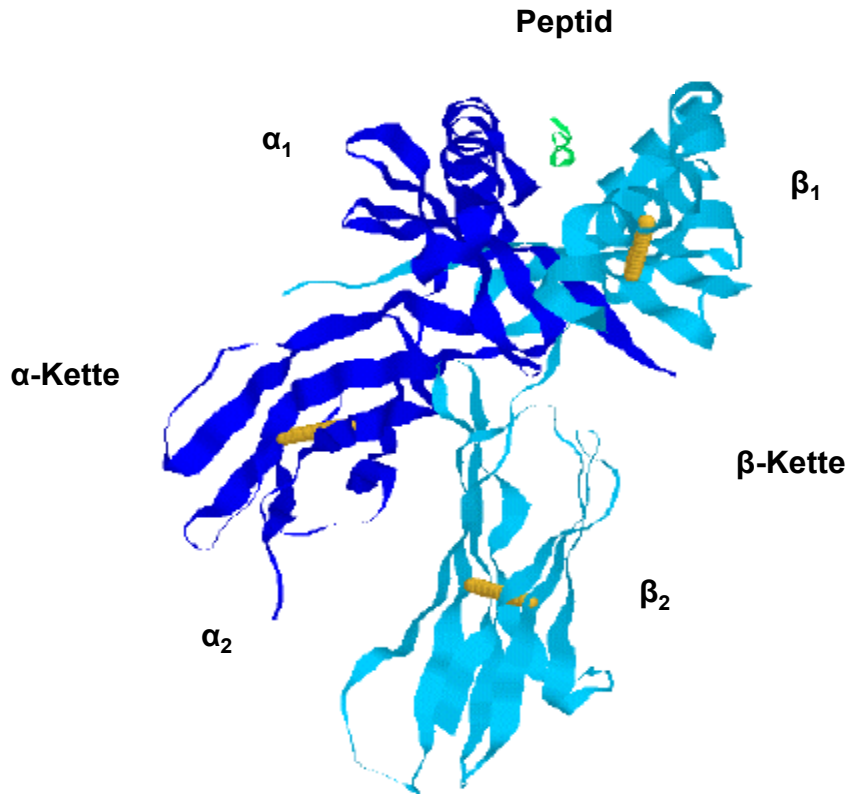


Abbildung 1.2: Kristallstruktur des HLA-DR1-Moleküls im Komplex mit einem Peptidliganden aus dem Influenza A Virus Hämagglutinin, Darstellung wie in Abb. 1.1 (Quelle:³⁸)

Aufgrund des Polymorphismus, d.h. der Tatsache, daß mehrere MHC-Klasse-I und -II-Moleküle vorhanden sind, wird die Grundlage für die große Variabilität und damit auch die Peptidpräsentationsvielfalt der MHC-Moleküle geschaffen. So sind auf dem menschlichen Chromosom 6 drei klassische MHC-Klasse-I- (HLA-A, HLA-B und HLA-C) und fünf MHC-Klasse-II-Genloci (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DM und HLA-DO) lokalisiert. Neben den klassischen HLA-Klasse-Ia-Molekülen HLA-A, -B und -C existieren weitere Gene und Pseudogene, die für nicht-klassische HLA-Klasse-Ib-Moleküle kodieren^{39;40} und als HLA-E, -F, -G und -H bezeichnet werden. Der MHC-Gencluster des Menschen zeichnet sich durch einen außergewöhnlich starken Polymorphismus aus⁴¹, der den Haplotyp des Menschen bestimmt und zudem kodominant exprimiert wird, so daß die meisten Individuen heterozygot sind und sechs MHC-Klasse-I-Moleküle besitzen. Bislang konnten 478 HLA-A-, 805 HLA-B- und 256 HLA-C-Allele identifiziert werden (<http://www.anthonynolan.com.HIG/>, August 2006, release 2.14.1).

Die Peptidbindungstasche der MHC-Moleküle entscheidet über deren Fähigkeit, Peptide an der Zelloberfläche zu präsentieren, und ist bei den beiden MHC-Klassen unterschiedlich aufgebaut. Bei MHC-Klasse-I-Molekülen erfolgt die Bindung eines Peptids über die zwei N-terminalen Domänen der schweren Ketten. Dabei bilden die α_1 - und α_2 -Domänen eine längliche Peptidbindungsgrube, die seitlich von zwei parallelen α -Helices begrenzt wird, während sich der Boden der Grube durch eine β -Faltblattstruktur aus acht Strängen zusammensetzt. Dadurch entsteht eine an den Seiten abgeschlossene Struktur, die eine Bindung von Peptiden mit der charakteristischen Länge von 8-10 Aminosäuren erlaubt, wobei die C- und N-Termini des Peptidliganden an den α -Helices der Grubenenden fixiert werden und damit zur Stabilität des MHC-Peptid-Komplexes beitragen.⁴² In ähnlicher Weise wird die Peptidbindung bei MHC-Klasse-II-Molekülen durch die α_1 - und β_1 -Domäne ermöglicht. Im Gegensatz zu MHC-Klasse-I-Molekülen entsteht allerdings eine an den Enden offene Peptidbindungstasche, so daß Peptidliganden mit variabler Länge (9-25 Aminosäuren) aufgenommen werden können.

Verantwortlich dafür, daß nur spezifische Peptide an ein bestimmtes MHC-Allel binden können, sind die hochpolymorphen Bereiche innerhalb der Bindungsfurche der MHC-Moleküle, welche vorzugsweise von bestimmten Aminosäuren des Bindungspartners besetzt werden und damit eine selektive Peptidbindung begünstigen.⁴³ Dabei weisen Peptidliganden, die an eine spezifische Allelvariante binden, identische oder ähnliche Reste auf. Da die Sequenz des Peptids an anderen Positionen für die Bindung nicht von entscheidender Bedeutung ist, kann ein breites Spektrum verschiedener Peptide mit passender Länge anbinden. Die an die räumliche Struktur jeder spezifischen MHC-Allelvariante angepaßten Aminosäuren werden als sogenannte Ankeraminosäuren bezeichnet. Durch die begrenzte Auswahl möglicher Peptide, die zur Bindung und Stabilisierung eines bestimmten MHC-Allels befähigt sind und der strukturellen Gemeinsamkeiten solcher Peptidliganden, ergibt sich für jedes Allel ein Peptidmotiv, das den Anforderungen hinsichtlich Länge und Besetzung der bindungsentscheidenden Positionen eines idealen Liganden entspricht.⁴⁴ Anhand bestimmter Ankeraminosäuren konnten bislang Peptidmotive für eine Vielzahl von MHC-Molekülen charakterisiert werden. In Tabelle 1.1 ist beispielhaft das Peptidmotiv für das HLA-B*07 dargestellt:

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ankeraminosäuren		P							L
Hilfsanker									
Bevorzugte AS	A R	V	R K	E			Y	F	
T-Zellepitope (Bsp.)									
MAGE-A1 294-302	F	P	S	L	R	E	A	A	L
CEA 598-606	I	P	Q	Q	H	T	Q	V	L
HSV-2 UL49 49-57	R	P	R	G	E	V	R	F	L

Tabelle 1.1: Gezeigt ist das Peptidmotiv für HLA-B*07. Die Ankeraminosäuren sind graphisch hervorgehoben. Die Daten wurden von <http://syfpeithi.de> übernommen. Beispiele für HLA-B*07-restringierte T-Zellepitope finden sich unter:⁴⁵⁻⁴⁷

1.4 Prozessierung und Präsentation von Peptidantigenen

Die Herkunft der von den MHC-Molekülen der Klassen I und II auf der Zelloberfläche präsentierten Peptidliganden stammt aus verschiedenen exogenen und endogenen Proteinquellen, so daß ihre Prozessierung und Beladung ebenfalls über unterschiedliche Mechanismen erfolgt.⁴⁸ Bei den zytosolischen Proteinen, deren Peptide von Klasse-I-MHC-Molekülen präsentiert werden, handelt es sich häufig um „Selbst“-Peptide, die den regulären zytosolischen Proteinbestand widerspiegeln. Aber auch virale oder tumorassoziierte Proteine können von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert und über diesen Weg dem Immunsystem zugänglich gemacht werden. Die Prozessierung der MHC-Klasse-I-Peptide beginnt im Zytosol, in dem kontinuierlich Proteine abgebaut werden. Dabei ist an dem zytosolischen Proteinabbau ein multikatalytischer Proteasekomplex, das Proteasom, beteiligt.⁴⁹ Neben alten, ausgedienten oder schädlichen Proteinen werden auch neusynthetisierte, mißgefaltete Proteine aufgrund von Fehlern in der Translation oder bei der posttranslationalen Modifikation in kurzer Zeit wieder abgebaut.^{50;51} Solche kurzlebigen Proteine, auch als DriPs (*defective ribosomal products*) bezeichnet, stellen eine Quelle für antigene Peptide dar, die das Immunsystem über den Zustand einer Zelle informieren.

Die katalytisch aktive Komponente dieses Proteasekomplexes stellt das 20S-Proteasom dar. Es setzt sich aus 28 Untereinheiten zusammen, welche sich in α - und β -Typen⁵² unterscheiden lassen. Diese Untereinheiten sind in vier heptameren Ringen übereinander angeordnet und so miteinander verbunden, daß eine zentrale Kammer resultiert, in welcher der Proteinabbau stattfindet. Die beiden inneren Ringe bestehen aus Untereinheiten vom β -Typ. Drei dieser β -Untereinheiten besitzen katalytisch aktive Zentren, an denen die Spaltung der Peptidbindungen erfolgt. Die äußeren Ringe setzen sich aus je sieben α -Untereinheiten zusammen und sind an der Steuerung der Proteolyse beteiligt. In höheren Eukaryonten mit einem adaptiven Immunsystem können nach Induktion durch Interferon- γ drei zusätzliche β -Untereinheiten, die Immununtereinheiten LMP2, LMP7 und MECL-1 exprimiert werden.⁵³ Diese ersetzen die konstitutiv katalytischen Untereinheiten und bilden das sogenannte Immunoproteasom.⁵⁴ Eine weitere Komponente des Proteasomkomplexes ist der ebenfalls durch Interferon- γ induzierbare Proteasom-Regulator PA-28.⁵⁵ Durch den Austausch der katalytisch aktiven Untereinheiten des Immunoproteasoms und die Bildung des PA-28-Aktivators kommt es zu einer markanten Veränderung der Proteasom-Aktivität. Diese führt zu einer Verbesserung der quantitativen und qualitativen Fähigkeit des Proteasoms zur Peptidgenerierung⁵⁶, da aufgrund einer veränderten Schnittpräferenz bevorzugt Peptide mit 8-11 Aminosäureresten und zudem C-Termini mit hydrophoben oder basischen Resten entstehen, welche mit den Bindungsmotiven von MHC-Klasse-I-Molekülen übereinstimmen.⁵⁷

Die im Proteasom synthetisierten Peptide gelangen im nächsten Schritt der Antigenprozessierung in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER). Verantwortlich für die Translokation der Peptide ist das heterodimere Transportprotein TAP (*transporter associated with antigen processing*), bestehend aus den Untereinheiten TAP1 und TAP2. Untersuchungen deuten darauf hin, daß auch das Transportprotein an der Auswahl geeigneter Peptide mit entsprechender Länge und Ankeraminosäuren an dem Carboxyl-Terminus beteiligt ist.^{32;58}

Zur vollständigen Prozessierung von MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexen wirken im endoplasmatischen Retikulum verschiedene Faktoren zusammen. Zunächst hält Calnexin, ein Protein mit chaperonartiger Funktion, das partiell gefaltete MHC-Klasse-I-Molekül im ER fest. Nach Assoziation des β_2 -Mikroglobulins an die α -Kette des MHC-

Moleküls dissoziiert das Heterodimer vom Calnexin ab und bindet an einen weiteren Proteinkomplex, bestehend aus Calreticulin, Tapasin und Erp57.⁵⁹ Das Calreticulin erfüllt als Chaperonmolekül ähnliche Funktionen wie Calnexin. Tapasin bildet eine Brücke zwischen dem unvollständigen MHC-Klasse-I-Molekül und dem Transportprotein TAP, während es sich bei Erp57 um eine Disulfidisomerase handelt, welche vermutlich beim Lösen und Wiederherstellen der Disulfidbindungen in der α_2 -Domäne des MHC-Moleküls bei der Peptidbeladung von Bedeutung ist. Nach Bindung des Peptids wird der trimere Komplex aus Peptid, schwerer Kette und β_2 -Mikroglobulin von dem Chaperonkomplex freigegeben und über den regulären Exozytoseweg für Membranproteine über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert (siehe Abbildung 1.3). Dieser trimere Komplex bzw. die Bindung des Peptids ist außerdem für die Stabilität des MHC-Klasse-I-Moleküls auf der Zelloberfläche verantwortlich. Sollte im Zuge des Prozessierungsweges der dimere Komplex aus schwerer Kette und β_2 -Mikroglobulin an die Oberfläche transportiert werden, erfolgt eine rasche Abdissoziation des β_2m und schließlich die Reinternalisierung der schweren Kette.⁶⁰

Die extrazellulären Proteine, die in Form von Peptiden auf den MHC-Klasse-II-Molekülen gefunden werden, stammen ebenfalls aus körpereigenen Proteinen oder von Pathogenen wie Bakterien und Parasiten, die sich in intrazellulären Vesikeln vermehren. Solche Proteine können entweder unspezifisch durch Pinozytose und Phagozytose oder spezifisch durch rezeptorvermittelte Endozytose ins endosomale bzw. lysosomale Kompartiment gelangen.⁶¹ In den Endosomen erfolgt die Spaltung der Proteine mit Hilfe von sauren Proteasen wie Cathepsin B, D, S und L.⁶² Um unspezifische Bindungen neu synthetisierter MHC-Klasse-II-Moleküle mit Polypeptidketten zu vermeiden, bilden die α - und β -Ketten im endoplasmatischen Retikulum zunächst mit einer invarianten Kette (Ii) ein Trimer, aus dem letztlich ein Nonamer (α/β -Ii)₃-Komplex entsteht.⁶³

Anschließend gelangen diese Nonamere gezielt zu spezialisierten Kompartimenten des endozytotischen Abbauweges, den *MHC class II compartments* (MIIC). In diesem lysosomalen Kompartiment kommt es zu einem selektiven proteolytischen Abbau der Ii-Kette mit Ausnahme eines als CLIP (*class-II-associated invariant-chain peptide*) bezeichneten Fragments, das die Bindungsfurche des MHC-Klasse-II-Dimers besetzt. Ein weiteres Molekül, das HLA-DM, katalysiert den Austausch der CLIP-Fragmente gegen hochaffine Peptide exogenen Ursprungs.⁶⁴ Analog zur Klasse-I-Prozessierung

wird der trimere Komplex, bestehend aus den schweren Ketten und dem Peptid, zur Zelloberfläche transportiert (Abbildung 1.3).

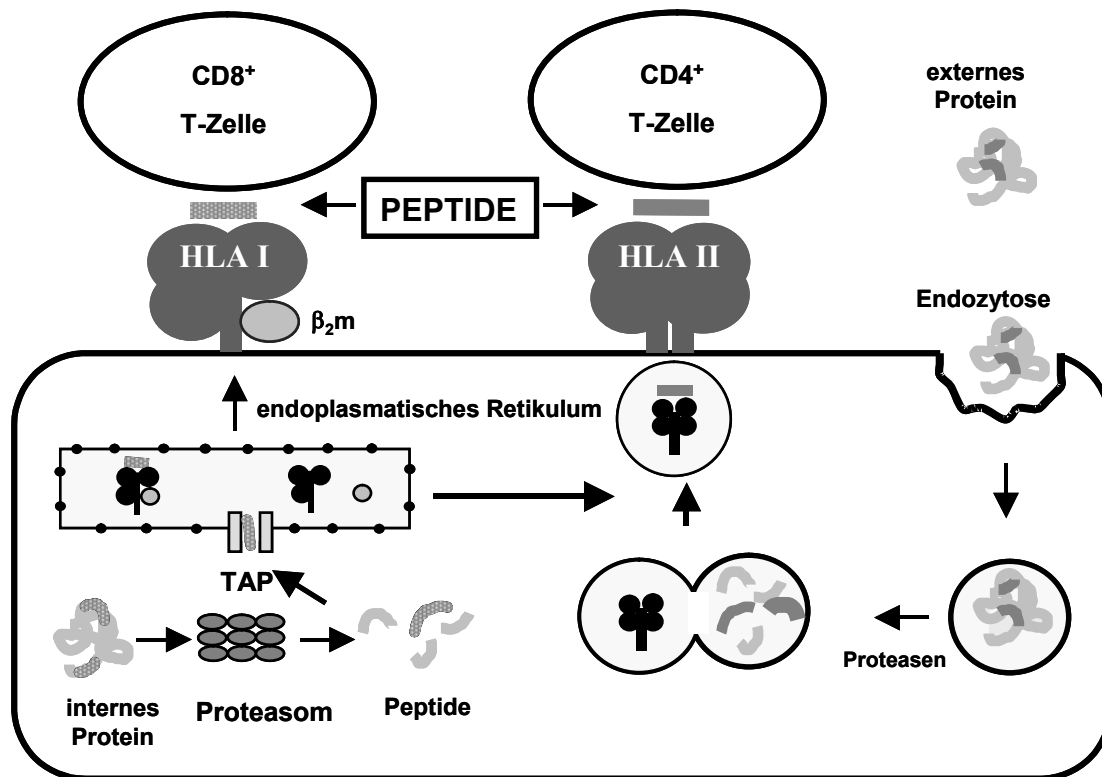


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Antigenprozessierung. Während HLA-Klasse-I-Liganden aus zellinternen Proteinen entstehen, werden HLA-Klasse-II-Liganden aus endozytierten extrazellulären Proteinen generiert.

1.5 T-Zell-vermittelte Immunantwort

Die Generierung einer effektiven Immunantwort setzt die Aktivierung und schnelle Expansion von antigenspezifischen T-Zellen voraus. Dabei werden unterschiedliche Effektorzellen, $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Lymphozyten, unterschieden. Beide Zelltypen verfügen über einen T-Zellrezeptorkomplex, der sie zur Erkennung der antigenen Strukturen auf den MHC-Molekülen der Zielzellen befähigt. Dieser Komplex setzt sich aus einem Heterodimer mit je einer hochvariablen α - und β -Kette zusammen⁶⁵, welcher über eine in die Zellmembran eingelagerte CD3-Kette assoziiert vorliegt. Die α - und β -Ketten bestehen jeweils aus einer konstanten (C_α und C_β) und einer variablen Domäne

(V_α und V_β). In selteneren Fällen ist der T-Zellrezeptor (TCR, *T-cell receptor*) aus γ - und δ -Ketten aufgebaut. Die Antigenerkennung über MHC-Klasse-I-Moleküle erfolgt über T-Lymphozyten, welche mit einem CD8-Korezeptormolekül assoziiert sind. Dieses Oberflächenmolekül interagiert mit der α_3 -Domäne des MHC-Klasse-I-Moleküls der Zielzelle und ist entscheidend an der Erkennung der Antigenstruktur beteiligt.³⁷ Die schematische Darstellung der Interaktion von $CD8^+$ T-Lymphozyten mit MHC-Klasse-I-tragenden Zielzellen ist in Abbildung 1.4 dargestellt. Die Erkennung von antigenen Peptiden, welche über MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert werden, erfolgt hingegen über $CD4^+$ T-Lymphozyten.

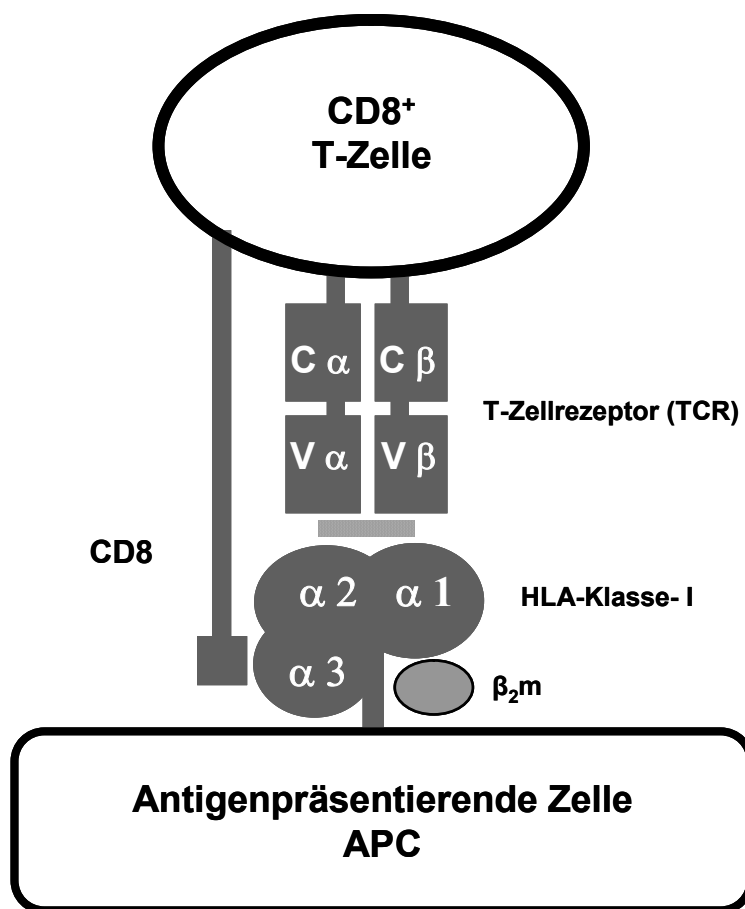


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Antigenerkennung von $CD8^+$ T-Lymphozyten über MHC-Klasse-I. Das kostimulatorische Molekül CD8 bindet an die α_3 -Domäne des MHC-I-Moleküls. Die CD3-Ketten sind nicht eingezeichnet.

Im Thymus durchlaufen alle T-Lymphozyten während ihrer Reifungsphase zwei Selektionsschritte, die für die Funktionalität der spezifischen Immunantwort eines Individuums entscheidend sind.⁶⁶ Bei der positiven Selektion wird den unreifen T-Lymphozyten, deren T-Zellrezeptor ein körpereigenes MHC-Molekül erkennen kann, ein positives Überlebenssignal vermittelt. Die negative Selektion hingegen führt zur Apoptose solcher T-Zellen, welche körpereigene, MHC-assoziierte Peptide erkennen, wie sie auch auf gesunden Körperzellen präsentiert werden. Ergänzend können durch periphere Mechanismen autoreaktive T-Zellen inaktiviert werden⁶⁷, so daß im Idealfall alle präsentierten „Selbst“-Peptide vom Immunsystem toleriert werden.

Die Aktivierung der T-Lymphozyten findet in den sekundär-lymphatischen Organen nach Erkennung eines Fremdantigens statt, indem sie ein Signal über den antigenspezifischen T-Zellrezeptor erhalten. Zur vollständigen Aktivierung sind jedoch zusätzliche, kostimulatorische Signale notwendig, die durch Interaktionen mit Molekülen von antigenpräsentierenden Zellen vermittelt werden.^{68;69} Der Kontakt des auf T-Zellen exprimierten Oberflächenmoleküls CD28 mit Molekülen der B7-Familie (CD80 und CD86) auf antigenpräsentierenden Zellen, liefert ein solches kostimulatorisches Signal, welches zur T-Zellaktivierung führt.⁷⁰ CD8⁺ T-Zellen des MHC-Klasse-I-Erkennungsweges differenzieren zu zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) und lysieren die erkannte Zielzelle durch die Freisetzung von Zytotoxinen wie Perforin und Granzymen oder über den Fas-Liganden. Perforin führt hierbei durch Polymerisation zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Membran der Zielzelle, während Granzyme (Serinproteasen) eine Apoptose-auslösende Signalkaskade im Zytosol der Zielzelle initiieren.⁷¹ Durch die Bindung des Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor der Zielzelle kann ebenfalls die Apoptose induziert werden.⁷²

Die CD4⁺ T-Zellen differenzieren nach ihrer Aktivierung durch MHC-Klasse-II-Antigene in CD4⁺ T-Helferzellen (Th) und können aufgrund ihrer Zytokinproduktion in Th₁- und Th₂-Zellen unterteilt werden. In welche dieser Effektorvarianten sich eine naive T-Helferzelle entwickelt, hängt hauptsächlich von dem sie umgebenden Zytokinmilieu zum Zeitpunkt der Antigenerkennung ab. Als Hauptinitiatoren für eine Th₁-Antwort gelten IFN- γ und IL-12, während IL-4 die Differenzierung von Th₂-Zellen bestimmt. Dabei werden die Th₁-Zellen durch die Sekretion von IFN- γ und TNF- β charakterisiert und sind durch die Aktivierung von Makrophagen und der Induktion von spezifischen CTL an der

Auslösung zellulärer Immunantworten beteiligt.⁷³ Th₂-Zellen beeinflussen den Isotypwechsel und die Antikörpersekretion von B-Zellen durch die Ausschüttung der Zytokine IL4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 und lösen somit eine humorale Immunantwort aus.

1.6 Antigen-spezifische Immuntherapie

Obwohl viele Tumore immunogen sind und auch von antigen-spezifischen T-Zellen infiltriert werden,^{74;75} ist häufig ein Fortschreiten der Tumorerkrankung zu beobachten. Deshalb besteht das Ziel einer spezifischen Immuntherapie darin, diese schwachen anti-Tumor-Immunantworten zu verstärken bzw. eine dauerhafte protektive T-Zellantwort gegen MHC-Klasse-I- und -II-restringierte Tumorantigene zu induzieren.^{76;77} Da sich Tumorzellen in der Proteinausstattung von gesunden Zellen desselben Gewebes unterscheiden, eignen sich solche Proteine oder Peptide als Tumorantigene für die Immuntherapie. Dabei sollten die tumorspezifischen Antigene über eine hohe Immunogenität verfügen, um eine starke *in vivo* T-Zellantwort hervorrufen zu können.⁷⁸

Zur Erreichung dieses Ziels werden unterschiedliche Strategien zellulärer Immuntherapien vorgeschlagen.⁷⁹ Hierzu zählt die Vakzinierung unter Verwendung von Tumorzellen, Tumorlysaten oder Hybridzellen aus Tumorzellen und dendritischen Zellen, sowie Peptidantigene oder DNA-Sequenzen, die für Tumorantigene kodieren. Vakzinierungsstrategien, welche auf komplette Tumorzellen beruhen, setzen keine vorherige Identifizierung von relevanten Tumorantigenen voraus und bieten den Vorteil, daß prinzipiell alle tumorassoziierten Antigene vorhanden sind. Der Nachteil besteht allerdings darin, daß daraus resultierende therapeutische Effekte nicht auf definierte immunologische Mechanismen zurückzuführen sind. Eine antigen-spezifische Vakzinierung läßt hingegen eine systematische Analyse der Vakzine-induzierten Immunität zu und kann aufgrund von empirischen Befunden zu einer verbesserten Impfstrategie führen. Aus diesem Grund wird der Identifizierung von tumorassoziierten T-Zellepitopen eine wichtige Rolle beigemessen.

1.7 Methoden der Antigenidentifizierung

1.7.1 Extraktion und Identifizierung natürlicher HLA-Liganden

Ein biochemisches Verfahren zur Identifizierung von MHC-Klasse-I-gebundenen Tumorantigenen beruht auf der Säureelution von HLA-Liganden aus immunchromatographisch aufgereinigten HLA-Molekülen.⁸⁰ Bei der Präparation werden zunächst große Mengen von Tumorzellen durch ein Detergens lysiert und die HLA-Moleküle mit den entsprechend assoziierten Peptiden durch Verwendung von spezifischen HLA-Antikörpern an eine Immunchromatographiesäule gebunden. Durch eine anschließende Säureelution werden die Peptidliganden von den schweren Ketten der HLA-Peptid-Komplexe getrennt und durch Filtration von höhermolekularen Antikörpern und HLA-Molekülen isoliert. Nach Fraktionierung der Peptidantigene mittels HPLC (*high performance liquid chromatography*) können die einzelnen Peptidfraktionen nach Beladung auf HLA-identen antigenpräsentierende Zellen hinsichtlich der Erkennung durch tumorreaktive, zytotoxische T-Zellklone getestet werden. Positiv auf lytische Aktivität getestete Peptidfraktionen werden anschließend durch Tandem-Massenspektrometrie untersucht und die Aminosäuresequenz des Peptidliganden bestimmt.⁸¹ Die Ermittlung des für das Peptidantigen kodierenden Gens erfolgt über die Suche in Gen- und Proteindatenbanken.⁸²

Die sogenannte Mimotop-Methode, welche auf der Testung synthetischer Peptidbibliotheken mit tumorspezifischen T-Zellklonen beruht⁸³ wird ebenfalls zur Antigenidentifizierung verwendet. Nach Synthese kombinatorischer Peptidbibliotheken werden diese auf antigenpräsentierende Zellen geladen und mit tumorspezifischen T-Zellklonen getestet. Für die Suche nach einem CTL-erkannten Mimotop aus neun Aminosäuren werden 171 (9x19, alle proteinogenen Aminosäuren mit Ausnahme von Cystein) kombinatorische Peptidbibliotheken synthetisiert und getestet. Dabei steht in jeder Bibliothek eine Aminosäure an einer Position fest, während alle anderen Positionen frei kombiniert werden. Anhand der erkannten Bibliotheken findet man für jede Position im Nonamer eine oder mehrere Kandidatenamino-säuren. Durch Datenbankvergleiche kann das Antigen, aus dem mögliche Peptide stammen könnten, identifiziert werden.

1.7.2 cDNA-Expressionsklonierung

Die Methode der cDNA-Expressionsklonierung führte zur Identifikation zahlreicher T-zellerkannter Tumorantigene.^{84;85} Dabei werden aus Tumorzellen cDNA-Bibliotheken in einem eukaryotischen Expressionsvektor konstruiert und zusammen mit HLA-kodierender cDNA kotransfiziert. Die Transfektanten werden anschließend mit den tumorreaktiven T-Zellklonen auf Erkennung getestet. Ein positiv getesteter cDNA-Pool wird dabei sukzessiv verkleinert, erneut transfiziert und mit den entsprechenden tumorreaktiven T-Zellklonen auf Erkennung überprüft, bis einzelne cDNA-Klone identifiziert sind. Durch Transfektion subklonierter Fragmente der entsprechenden cDNA kann schließlich die peptidkodierende Region eingegrenzt und ermittelt werden. Von einem erkannten cDNA-Fragment kodierte Peptide werden unter Anwendung der HLA-Peptid-Bindungsregeln (siehe Kapitel 1.3) vorhergesagt, anschließend synthetisch hergestellt und auf Erkennung durch den T-Zellklon getestet.⁸⁶

1.7.3 SEREX (*serological analysis of recombinant cDNA-expression libraries*)

Basierend auf der Hypothese, daß das Immunsystem von Tumorpatienten Antikörper gegen den eigenen Tumor generieren kann, wurden mit der SEREX-Methodik⁸⁷ eine Reihe von potentiellen Tumorantigenen entdeckt.^{88;89} Die Methode beruht darauf, autologe Immunglobulin G (IgG)-Antikörper aus dem Serum von Patienten gegen tumorassoziierte Strukturen zu identifizieren. Dabei wird eine aus der mRNA des Tumors in λ -Phagen angelegte cDNA-Expressionsbibliothek mit diesem Serum gescreent. Antigene, welche eine Antikörperantwort auslösen, können auch von T-Zellen erkannt werden, wie z.B. das SEREX identifizierte Antigen NY-ESO-1.⁹⁰ Dies führte zu der Vermutung, daß humorale und zelluläre Tumorantworten bezüglich der Erkennung bestimmter Antigene überlappen und durch SEREX definierte Antigene auch zur Stimulation von zytotoxischen T-Zellen genutzt werden könnten.

1.7.4 Theoretische Vorhersage von HLA-Liganden

Seit der Identifizierung und sukzessiven Optimierung von Peptidmotiven, welche entweder durch Aminosäuresequenzen natürlicher HLA-Liganden abgeleitet oder auf Bindungsstudien von synthetischen Peptiden bzw. Peptidbibliotheken basieren, können theoretische Vorhersagen von HLA-Liganden aus Proteinsequenzen getroffen werden.⁹¹ Mit entsprechenden Suchalgorithmen, wie beispielsweise die Internet-Datenbank SYFPEITHI (www.syfpeithi.de), können aus Proteinsequenzen und den bereits bekannten Peptidmotiven putative HLA-Liganden ermittelt werden.^{46;92} Diese, als „Reverse Immunologie“ bezeichnete Methodik basiert auf den Antigenen selbst als Ausgangspunkt und setzt die Verfügbarkeit von tumorreaktiven T-Zellen nicht voraus. Dabei kann es sich um bereits bekannte T-zellerkannte Tumorantigene handeln, für die weitere immunogene Peptide, die über dasselbe oder andere HLA-Proteine präsentiert werden, ermittelt werden sollen.⁹³ Andere Techniken wie z.B. RDA (*representational difference analysis*), DNA-Micro-Array oder Proteomanalysen können zu weiteren Kandidatenantigenen führen.⁹⁴ Solche potentiellen Antigene, welche mit Programmen zur Epitopvorhersage komplettiert werden, eignen sich sowohl für die T-Zell-Stimulation von Tumorpatienten, als auch von gesunden Spendern, weil sie eine hohe Affinität für ein betrachtetes HLA-Molekül aufweisen. Die generierten CTL werden anschließend auf ihre lytische Aktivität gegenüber den Tumorzellen, die das putative Antigen und das präsentierende HLA-Allel tragen, überprüft, um zu zeigen, daß die zur Stimulation eingesetzten Peptide von natürlich prozessierten Tumorantigenen stammen.⁹³

1.8 Klassifizierung von Tumorantigenen

Nach ersten Untersuchungen in murinen Tumormodellen⁹⁵ konnten auch tumorassoziierte Antigene im humanen System nachgewiesen werden.⁹⁶ Aufgrund ihrer Entstehung und unterschiedlichen Expressionsmuster lassen sich die bereits bekannten und von T-Zellen erkannten Tumorantigene in verschiedene Klassen einteilen.⁹⁷ Therapeutisch interessante Antigene, welche sich für Vakzinierungen eignen, resultieren aus Proteinen, die tumorspezifisch exprimiert und nicht von Genen in gesunden

Gewebe kodiert werden. Von Cancer-Testis-Antigenen spricht man, wenn solche Proteine in Tumoren unterschiedlicher Histologie, aber nicht in normalen Geweben mit Ausnahme von immunprivilegierten Zellen der Keimbahn (z.B. Spermatozoen) exprimiert werden, die über keine MHC-Klasse-I- und -II-Moleküle verfügen und somit einer T-zellvermittelten Immunantwort entgehen können.⁹⁸ Dazu zählen beispielsweise Proteine der MAGE-Genfamilie⁹⁹, NY-ESO-1, welches in verschiedenen humanen Tumoren exprimiert wird, oder RAGE-1¹⁰⁰ beim Nierenzellkarzinom.

Gewebsspezifische Differenzierungsantigene werden von normalen Zellen und Tumorzellen exprimiert, die von diesem Gewebe abstammen. Die meisten Differenzierungsantigene wurden beim Melanom gefunden. Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind Tyrosinase¹⁰¹, Melan-A/MART-1¹⁰² und Glykoprotein 100 (gp100).¹⁰³

Eine weitere Klasse von Tumorantigenen stellen strukturalterierte Antigene dar, die durch Genmutationen oder -fusionen entstanden sind. In manchen Fällen führen mutationsbedingte Aminosäuresubstitutionen oder Translokationen zu neuen tumorspezifischen MHC-Liganden, die allerdings häufig nur im autologen Tumor auftreten. Die resultierende Alteration des Proteins kann aber auch mit der Tumorentstehung oder der Tumorprogression korreliert sein. Beispiele für Antigene dieser Gruppe ist die mutierte Cyclin-abhängige Kinase 4 (CDK4)⁸⁵ oder das mutierte CASP-8.¹⁰⁴

Bei überexprimierten Antigenen kann eine genetische Modifikation zur Überexpression von Proteinen im Tumorgewebe führen, während das Genprodukt in normalen Geweben gering exprimiert wird und somit für eine tumorspezifische Immunantwort relevant werden. Ein interessanter Vertreter dieser Kategorie ist das Tumorsuppressorgen p53, das in mehr als 50% der Tumore mutiert vorliegt.^{3;105} Weitere Beispiele für überexprimierte Antigene sind PRAME⁹³, das HER2/neu-Onkogen¹⁰⁶ oder hTERT.¹⁰⁷

Auch onkovirale Proteine stellen potentielle Tumorantigene dar. Dazu zählt das Onkoprotein E7 des Human Papilloma Virus 16.¹⁰⁸ Ebenso ist für das Epstein-Barr-Virus (EBV) bekannt, daß es B-Zellen immortalisiert.¹⁰⁹

Daneben können antigene Targetstrukturen infolge posttranslationaler Modifizierungen eine Erkennung von Tumorzellen ermöglichen¹¹⁰, wie dies beispielsweise für phosphorylierte oder glykosylierte HLA-Klasse-I-Liganden gezeigt wurde.¹¹¹

1.9 Identifizierung von Nierenzellkarzinom-Antigenen mit Hilfe alloreaktiver T-Zellen

Bei der Generierung von tumorreaktiven T-Lymphozyten aus autologen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC, *peripheral blood mononuclear cell*) eines Nierenzellkarzinompatienten²⁶ muß mit einer Einschränkung der natürlichen Vielfalt des immunologischen Repertoires in Folge von Toleranz-Mechanismen solcher T-Zellen gerechnet werden.¹¹² Um solche Limitationen zu umgehen, ist es möglich, tumorreaktive T-Zellen aus allogenen CD8⁺ Lymphozyten eines gesunden Spenders zu generieren, die auf ihren Zielzellen MHC-Komplexe in Verbindung mit Allopeptiden erkennen.¹¹³ Daneben existieren jedoch auch alloreaktive T-Zellen, die gegen unbeladene MHC-Moleküle gerichtet sind.¹¹⁴ Da solche T-Zellen nach Stimulation mit tumorassoziierten Peptiden ein tumorspezifisches Reaktionsmuster zeigen können¹¹⁵, sollten diese auch für immuntherapeutische Behandlungen von Tumorerkrankungen geeignet sein.¹¹⁶ In der Transplantationsmedizin konnten bei Leukämiepatienten nach allogener Stammzelltransplantation alloreaktive T-Zellen als wesentliche Effektoren bei der „*graft-versus-host*“-Erkrankung und der „*graft-versus-leukemia*“-Reaktion identifiziert werden.¹¹⁷ Bei Stammzelltransplantationen mit einem HLA-identen Geschwisterspender waren Minor-Histokompatibilitäts-Antigene (MH-Antigene), die einem genetischen Polymorphismus entstammen und ubiquitär oder gewebespezifisch exprimiert werden, für alloreaktive Tumorantworten verantwortlich.¹¹⁸ Aus diesem Grunde versucht man die antitumorale Potenz solcher alloreaktiver T-Zellen auch bei therapierefraktären, soliden Tumoren, wie dem Nierenzellkarzinom zu nutzen.

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Die hohe Resistenz von Nierenzellkarzinomen (NZK) gegenüber Radiochemotherapien und die geringe Überlebenswahrscheinlichkeit der betroffenen Patienten zeigt die Notwendigkeit zur Entwicklung alternativer Therapiekonzepte auf. Immuntherapeutische Verfahren unter Verwendung von tumorreaktiven T-Zellen und die Identifizierung der von ihnen erkannten Oberflächenepitope gewinnen für die Behandlung von Tumoren an Bedeutung. Allerdings konnten in der Vergangenheit nur in seltenen Fällen die Zielantigene von autologen tumorreaktiven T-Lymphozyten beim NZK identifiziert werden. Dies liegt vornehmlich daran, daß aus dem Blut von NZK-Patienten infolge der tumorinduzierten immunologischen Anergie und Toleranz nur sehr selten tumorreaktive T-Zellen *in vitro* generiert und expandiert werden können. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit alternativ tumorreaktive T-Zellpopulationen aus Blutlymphozyten eines HLA (*human leukocyte antigen*)-identen, gesunden Spenders verwendet werden. Am Modell des humanen Nierenzellkarzinoms MZ1851-RCC (RCC, *renal cell carcinoma*) und peripheren Blutlymphozyten des gesunden, serologisch MHC (*major histocompatibility complex*)-Klasse-I-passenden Spenders 1009798 (siehe Abbildung 1.5) wurden aus zuvor angelegten allogenen gemischten Lymphozyten-Tumorzell-Kulturen (MLTCs, *mixed lymphocyte tumor cell cultures*) klonale CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten (CTL, *cytotoxic T-lymphocyte*) generiert. Nach Expansion sollten mit Hilfe von Zytokin-ELISPOT-Assays und ⁵¹Chrom-Zytotoxizitätstests die MHC-Restriktion und Kreuzreaktivität dieser T-Zellpopulationen charakterisiert werden. Anschließend sollten die natürlich prozessierten CTL-definierten Antigene des Nierenzellkarzinoms chromatographisch aufgereinigt und durch eine HPLC (*high performance liquid chromatography*) in Fraktionen aufgetrennt werden. In den durch T-Zellen erkannten Fraktionen sollten die HLA-assoziierten Peptidantigene mit Hilfe der Tandem-Massenspektrometrie sequenziert werden.

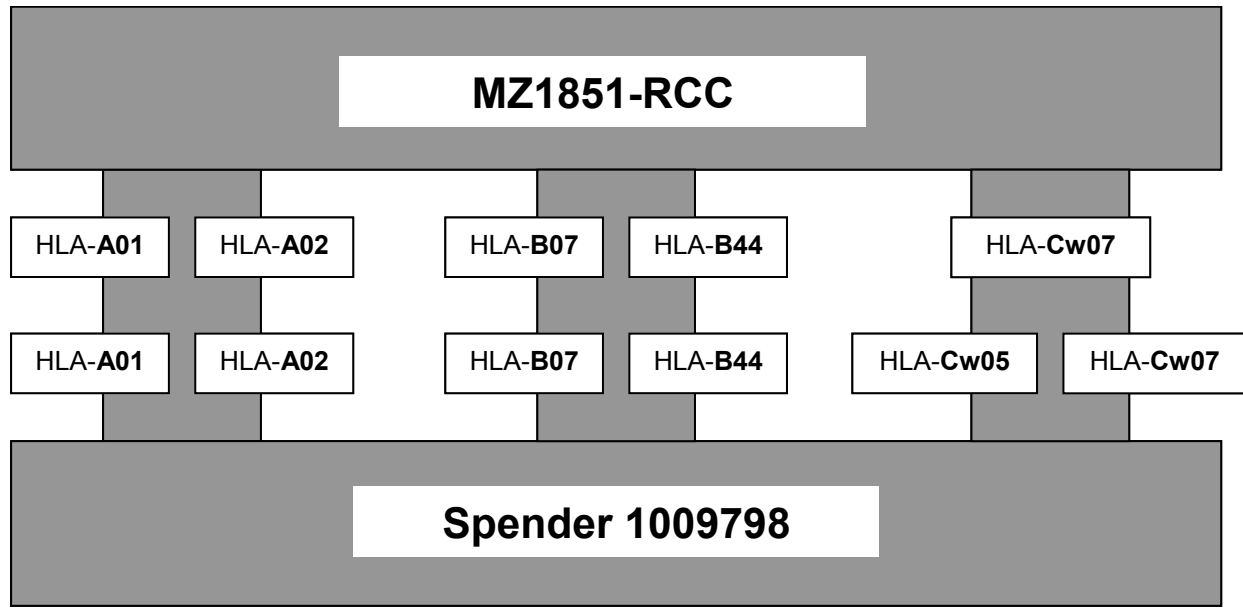


Abbildung 1.5: HLA-Klasse-I-Moleküle der Nierenzellkarzinomlinie MZ1851-RCC und den Blutlymphozyten des gesunden Spenders „1009798“.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Autoklaven	KSG Sterilisatoren (Olching)
Automatic Gamma Counter	1470 Wizard Pharmacia (Freiburg)
¹³⁷ Cäsiumquelle	OV-5, Biometra (Göttingen)
CO ₂ -Inkubator	Binder (Tuttlingen) Heraeus (Langenselbold)
Durchflußzytometer	EPICS ALTRA™ mit Software EXPO™, Beckman Coulter (Krefeld) Canto™, BD Biosciences (Heidelberg) Aria™, BD Biosciences (Heidelberg)
Eismaschine	UBE50/35, Ziegra (Isernhagen)
Feinwaage	Precisa, PAG OerlikanAG (Zürich, CH)
Heizblock	Thermomixer Comfort, Eppendorf (Hamburg)
HPLC-Gerät	EttanLC, Amersham Biosciences (Freiburg)
HPLC-Trennsäulen	µRPC C2/C18 SC2.1/10 (3µm Partikel, 300 Å Porenweite) Amersham Biosciences (Freiburg)
Kühl- und Gefrierschränke +4°C, -20°C, -80°C	Heraeus/Kendro (Langenselbold) Bosch (Stuttgart) Liebherr (Ochsenhausen)
Magnetrührer mit Heizplatte	IKAMAG RET, Janke & Kunkel (Staufen)
Massenspektrometer	Voyager DE-Pro, PerSeptive Biosystems (Foster, CA, USA) ABI-4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems (Darmstadt)

	4800 MALDI TOF/TOF™ Applied Biosystems (Darmstadt)
Phasenkontrastmikroskop für Zellkultur	Axiovert 25, Zeiss (Jena)
pH-Meter	GC842, Schott (Mainz)
Pipettierhilfe	Pipetus akku, IBS Integra Biosciences (Chur, CH)
Pipetten	1-10µl Pipette, 1-10µl Mehrkanalpipette Eppendorf (Hamburg) Pipetman 2-20µl, 20-200µl, 200-1000µl Gilson (Villiers-le-Bel, F) Mehrkanalpipetten 5-50µl, 25-200µl, Dunn Labortechnik GmbH (Asbach)
Spektralphotometer	Ultrospec 3000, Pharmacia (Freiburg)
sterile Werkbank	Nuaire/Zapf-Instruments (Sarstedt) Antair BSK, Schrader (Göttingen) CleanAir (Lausanne, CH)
Stickstoff-Kryobank	XLC 1370, MVE Europe (Solingen) Espace 331, Air Liquide (Marne la Vallée, F)
Trockenschrank	UT 6420, Heraeus (Hanau)
Vakuumentrifuge mit Kühlfalle und Vakuumpumpe (Speed-Vac)	Christ-RVC-2-18, Christ (Osterode)
Vortexer	VWR International (Darmstadt)
Wasserbad	WB20, Medingen (Dresden)
Wasserdeionisierungsanlage	Milli-Q plus, Millipore (Eschborn) ELGA, Elga-Berkefeld GmbH (Celle)
Zentrifugen	Ultrazentrifuge Optima™ XL-100K, Beckman Coulter (Krefeld) Rotixa/RP, Hettich (Tuttlingen) Centrifuge 5417, Eppendorf (Hamburg) Megafuge 1.0R, Kendro-Heraeus (Langenselbold)

2.1.2 Plastikwaren

Bechergläser, Kunststoff	Vitlab (Seeheim-Jugenheim)
Einfrierboxen	Nalge, Nunc (Wiesbaden)
Einfrierröhrchen	Cryotube, 1,8ml, Nunc (Wiesbaden)
Einmalpipetten (steril)	1, 2, 5, 10, 25 und 50ml, Greiner (Nürtingen)
FACS-Röhrchen zur Durchflußzytometrie	Sarstedt (Nümbrecht)
Gewebekulturplatten	24, 48 und 96-Löch-Gewebekulturplatten, Greiner (Nürtingen) oder Costar Corning GmbH (Wiesbaden)
LEUCO-SEP-Röhrchen	50ml, Greiner (Nürtingen)
Petrischalen	Ø 5, 9 und 13cm, Greiner (Nürtingen)
Pipettenspitzen	ART1000, ART20E, ART10reach, MBP (San Diego, CA, USA) Biosphere Filter Tips, Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße (Eppis)	200, 500, 1500, 1800 und 2000µl Eppendorf (Hamburg)
Spritzen	10, 20, und 50ml 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) Acrodisk 25mm PF 0,8/0,2 Supor Membrane, Pall Corporation (Ann Arbor, MI, USA)
Mikrotiterplatten	Flach-, Rund- und V-Bodenplatten im 96-Lochformat, Greiner (Nürtingen) oder Nunc (Wiesbaden)
Ultrazentrifugenröhrchen	36ml, BD (Heidelberg)

Wannestapel-Kultursystem (Cell-Factory)	10 Kulturebenen, > 6300cm ² Kulturfläche, Nunc (Wiesbaden)
Zellkulturflaschen	30, 80 und 175cm ² Kulturfläche, Greiner (Nürtingen) oder Nunc (Wiesbaden)
Zellkultur-Tubes	15 und 50ml, Greiner-Bio-One (Frickenhausen)
10kD Cellulose-Filtriereinheit (Cut-Off-Filter)	Centricon YM-10, bis 2ml, Millipore (Bedford, USA)

2.1.3 Glaswaren

Bechergläser	500, 1000 und 2000ml, Jenaer Glas, Schott (Mainz)
Duran-Glasflaschen	500, 1000, 2000 und 5000ml, Schott (Mainz)
Duran-Glasflasche mit Olive auf Bodenniveau und zugehörigem Schlauchmaterial	2000ml, Schott (Mainz)
Econo-column Säule zur Immunchromatographie	Ø 1 und 1,5cm mit passende Flow-Adaptoren und Schlauchmaterial, BioRad (München)
Erlenmeyerkolben	500, 1000 und 2000ml, Jenaer Glas, Schott (Mainz)
Glaszentrifugenröhrchen	Corex 30ml, Schott (Mainz)
Quarz-Küvetten	Pharmacia (Freiburg)
Zählkammern	Fuchs-Rosenthal, Schreck (Hofheim)

2.1.4 Chemikalien

ACN (Acetonitril)	Sigma (Deisenhofen)
AEC (3-Amino-9Ethyl-Carbazol)- Tabletten	Sigma (Deisenhofen)
Albumin, bovine	Sigma (Deisenhofen)
Ammoniumacetat	Merck (Darmstadt)
Aprotinin	Roche Diagnostics (Mannheim)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
CHAPS (Detergens)	Boehringer (Mannheim)
N.N-Dimethylformamid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck (Darmstadt)
Essigsäure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
EDTA (Ethylendiamin-tetraessigsäure)	Sigma (Deisenhofen)
Ethanol	Riedel-de Haen (Seelze)
Ficoll 400	Biochrom KG (Berlin)
Formaldehyd	Merck (Darmstadt)
Formamid	Merck (Darmstadt)
Glycerol	Sigma (Deisenhofen)
Glycin	Sigma (Deisenhofen)
Iodacetamid	Sigma (Deisenhofen)
Isopropanol	Fluka (Deisenhofen)
Kaliumacetat	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Leupeptin	Roche Diagnostics (Mannheim)

Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumazid	Sigma (Deisenhofen)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
SDS (Natrium-Dodecylsulfat)	Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt)
Ovalbumin (Albumin, chicken egg)	Sigma (Steinheim)
PBS (phosphat-buffered saline), flüssig	Biochrom KG (Berlin)
PBS, Instamed-Pulver	Biochrom KG (Berlin)
Pepstatin	Roche Diagnostics (Mannheim)
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
Sepharose Pulver: Protein A Sepharose CL-4B Pulver	Pharmacia Biotech (Uppsala, S)
TFA (Trifluoressigsäure)	Sigma (Deisenhofen)
Tris base (Tris (-hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma (Deisenhofen)
Tris-HCL	Sigma (Deisenhofen)
Trypanblau	Merck (Darmstadt)
Tween20 (Detergens)	Merck-Schuchardt (Hohenbrunn)
Wasser (HPLC grade)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Wasserstoffperoxid 30%	Merck (Darmstadt)

2.1.5 Substanzen für die Zellkultur

AIM-V™ Medium	Gibco BRL (Karlsruhe)
FCS (fötale Kälberserum)	Biochrom KG (Berlin)
Geneticin (G418)	Gibco BRL (Karlsruhe)
Hygromycin B	Gibco BRL (Karlsruhe)
L-Glutamin	Gibco BRL (Karlsruhe)
Heparin (Liquimin)	Roche (Grenzach-Wyhlen)
HEPES-Puffer	Sigma (Deisenhofen)
Humanalbumin	Octapharm (Langenfeld)
Pulvermedium RPMI 1640	Gibco BRL (Karlsruhe)
RPMI 1640, flüssig	Biochrom KG (Berlin)
Penicillin-Streptomycin	Gibco BRL (Karlsruhe)
Trypsin-EDTA	Gibco BRL (Karlsruhe)
Versen (1% EDTA)	Biochrom KG (Berlin)
Accutase II	PAA (Cölbe)
X-VIVO15 T-Zell-Kulturmedium	Biowhittaker (Viersen, B)

Humanserum (HS) wurde aus Blut gesunder Spender durch Abserung in der lokalen Blutbank gewonnen. Serumspenden von je zehn bis zwanzig Spendern wurden vermischt und bei 56°C für 30min hitzeinaktiviert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.1.6 Zytokine

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

2.1.7 Molekulargewichtsmarker

Cytochrom Western Control	Sigma (Rödermark)
---------------------------	-------------------

2.1.8 Kits

CD8 ⁺ Lymphozyten, Positivisolation	MACS Separation columns (130-042-201) MACS CD8-MicroBeads (452-01) Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch-Gladbach)
Vectastain [®] Elite Kit (Reagenzien A und B)	Vector Laboratories (Burlingame, USA)

2.1.9 Zellkulturmedien

RPMI 1640	RPMI Pulvermedium	104,3g
	NaHCO ₃	22,0g
	HEPES	23,8g
	Natriumpyruvat	100ml
	Nicht-essentielle Aminosäure	100ml
	Penicillin-Streptomycin	100ml
	Wasser (H ₂ O)	10l
	mit 1N HCL auf pH 7,2 eingestellt	

Vor Gebrauch wurden 1% L-Glutamin und 10% FCS (hitzeinaktiviert) ergänzt. RPMI 1640 ohne Glutamin und Serum wird im folgenden als RPMI, mit Glutamin und Serum wird es als RPMI_{komplett} bezeichnet.

Für Transfektions-ELISPOT-Assays (siehe Kapitel 2.2.6.2) wurde RPMI ohne Zusatz von Antibiotika verwendet und mit oder ohne Zusatz von 10% FCS eingesetzt.

Zur T-Zellkultur wurden AIM-VTM Medium (bzw. X-VIVO15TM) verwendet und mit 5 oder 10% Humanserum (HS) ergänzt (X-VIVO15 bzw. AIM-V_{komplett}).

Alle Medien wurden bei 4°C gelagert.

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

Zur Kryokonservierung wurden 10% DMSO zugesetzt.

2.1.10 Puffer für biochemische Präparationen

Die pH-Einstellung der einzelnen Puffer erfolgte mit 1N HCl oder NaOH.

Puffer I	50mM Tris-HCl 150mM NaCl in H ₂ O (HPLC grade)	pH 8,0
Buffered Detergent Solution (BDS)	20mM Tris-HCl 150mM NaCl 1% CHAPS in H ₂ O (HPLC grade)	pH 8,0
BDS + Proteaseinhibitoren (BDS _{PI})	100µM Iodacetamid 5µg/ml Aprotinin 10µg/ml Leupeptin 10µg/ml Pepstatin A 2mM EDTA 0,04% Natriumazid 1mM PMSF in BDS	pH 8,0

Spülpuffer 1	20mM Tris 150mM NaCl in H ₂ O (HPLC grade)	pH 8,0
Spülpuffer 2	20mM Tris 1M NaCl in H ₂ O (HPLC grade)	pH 8,0
Spülpuffer 3	20mM Tris in H ₂ O (HPLC grade)	pH 8,0
saurer Elutionspuffer	0,2N Essigsäure in H ₂ O (HPLC grade)	pH 2,7
HPLC-Lösung A	H ₂ O (HPLC grade) + 0,1% TFA	
HPLC-Lösung B	60% ACN + 0,085% TFA in H ₂ O (HPLC grade)	

2.1.11 Allgemeine Puffer und Lösungen

Acetatpuffer für ELISPOT-Assays	H ₂ O	46,9ml
	0,2N Essigsäure	4,6ml
	0,2N Natriumacetat	11,0ml
SDS 30%	SDS	150g
	H ₂ O	ad 500ml
PBS 1x	Istamed PBS-Pulver	95,5g
	H ₂ O	ad 10l
Trypanblau (Stammlösung)	Trypanblau	2,0g
	H ₂ O	ad 1l
Trypanblau (Gebrauchslösung)	Trypanblau (Stammlösung)	75ml
	150mM NaCl	25ml

2.1.12 Monoklonale Antikörper

2.1.12.1 Antikörper zum Nachweis von Oberflächenantigenen in der Durchflußzytometrie

In der vorliegenden Arbeit wurden HLA-spezifische monoklonale Antikörper (mAK) zur HLA-Färbung in der Durchflußzytometrie und für HLA-Restriktionsuntersuchungen im IFN- γ -ELISPOT-Assay oder ^{51}Cr -Zytotoxizitätstest verwendet. Es handelt sich dabei um murine Immunglobuline (IgG), die spezifisch an bestimmte humane HLA-Moleküle binden (siehe Tabelle 2.1).

Bezeichnung	Spezifität	Isotyp	Literatur
MA2.1	HLA-A2, HLA-B17	IgG1	119
BB7.2	HLA-A2	IgG1	120
GAP-A3	HLA-A3	IgG2a	121
BB7.1	HLA-B7	IgG1	122
B123.2	HLA-B, HLA-C, HLA-Aw19-Subgr.	IgG2b	123
W6/32	HLA-Klasse-I	IgG2a	124
HB55	HLA-DR	IgG2a	125

Tabelle 2.1: Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten HLA-spezifischen mAK mit Bezeichnung, Spezifität, Isotyp und Literaturnachweis.

2.1.12.2 Antikörper zum Nachweis von Oberflächenantigenen in der Durchflußzytometrie

Für die Durchflußzytometrie wurden folgende Antikörper verwendet (Tabelle 2.2):

Bezeichnung	Konjugation	Spezifität	Hersteller
Maus IgG1/IgG1	○/●	Isotypenkontrolle	*
Maus IgG1	●	Isotypenkontrolle	*
Maus IgG1	●	Isotypenkontrolle	*
Maus IgG1	■	Isotypenkontrolle	*
Maus IgG1	□	Isotypenkontrolle	+
Maus IgG2a	□	Isotypenkontrolle	+
CD3	○	anti CD3	*
CD3	●	anti CD3	*
CD3	■	anti CD3	*
CD4	●	anti CD4	*
CD8	○	anti CD8	*
CD8	●	anti CD8	*
CD8	■	anti CD8	*
CD16	○	anti CD16	*
CD27	●	anti CD27	*
CD28	○	anti CD28	*
CD44	○	anti CD44	*
CD45 RA	●	anti CD45RA	*
CD45 RO	○	anti CD45RO	*
CD56	●	anti CD56	*
CD57	○	anti CD57	*
CD62L	●	anti CD62L	*
CD69	●	anti CD69	+
CD85j	●	anti CD85j	*
CD94	○	anti CD94	*
CD158a	●	anti CD158a	*
CD158b	○	anti CD158b	+
KIRp70	●	anti KIRp70	*
NKG2A	●	anti NKG2A	*
NKG2D	●	anti NKG2D	*
CCR7	○	anti CCR7	~
TCR $\alpha\beta$	■	anti TCR $\alpha\beta$ -Kette	*
TCR $\gamma\delta$	■	anti TCR $\gamma\delta$ -Kette	*
gam	●	goat anti mouse	+

Tabelle 2.2: Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper zum Nachweis von Zelloberflächenantigenen. Konjugation: ○= Floresceinisothiocyanat (FITC), ●= Phycoerythrin (PE), ■= Phycoerythrin kovalent gebunden an Cyanin 5.1 (PC5), □= unkonjugiert. Hersteller: *= Beckman Coulter Immunotech (Marseille, F), += BD Pharmingen (San Diego, CA, USA), ~= R&D Systems (Minneapolis, USA).

2.1.13 Blutlymphozyten und Zelllinien

Blutlymphozyten des Spenders 1009798

Die in dieser Arbeit verwendeten mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC) wurden anonymisiert aus Blutspenden des Spenders 1009798 der Blutbank des Universitätsklinikums Mainz gewonnen. Für die Isolation der PBMC wurden nach routinemäßiger Abtrennung der toten Blutkörperchen anfallende „Leukozytenfilme“ (*Buffy Coat*) aus einer 450ml Vollblutspende verwendet. Der Spender hatte den serologisch erfassten HLA-Klasse-Ia-Typ -A1, -A2, -B7, -B44, -Cw5 und -Cw7.

EBV-transformierte B-Lymphozyten

Bei diesen Suspensionszelllinien handelt es sich um stabil wachsende Epstein-Barr-Virus (EBV)-transformierte lymphoblastoide B-Zelllinien (LCL = *lymphoblastoid cell line*)¹²⁶. AK-EBV-LCL ist die EBV-LCL des gesunden Spenders AK.

Nierenzellkarzinomlinie MZ1851-RCC

Bei der Nierenzellkarzinomlinie MZ1851-RCC handelt es sich um eine *in vitro* stabil wachsende Tumorzelllinie, die aus dem Primärtumor des klarzelligem Nierenzellkarzinoms des Patienten MZ1851 generiert wurde²⁶. Die Zelllinie trägt serologisch die HLA-Klasse-Ia-Moleküle -A1, -A2, -B7, -B44 und -Cw7. Sie wächst adherent in Zellkulturflaschen mit einem Amplifikationsfaktor von drei pro Woche.

Weitere Tumorzelllinien und nichtmaligne Zellen

Für sämtliche Zelllinien, die zu Kreuzreaktivitätsstudien herangezogen wurden, war der HLA-Klasse-I-Typ bekannt.

Die verwendeten Tumorzelllinien stammen aus verschiedenen Tumorentitäten mit den Abkürzungen RCC (*renal cell carcinoma*) für Nierenzellkarzinomlinien, CO (*colon cancer*) für Kolonkarzinomlinien, PC (*pancreatic carcinoma*) für Pankreas-karzinomlinien, MEL (*melanoma*) für Melanomlinien und LCL für EBV-transformierte lymphoblastoide B-Zelllinien. Nichtmaligne Nierenzellen (*nonmalignant kidney cells*) wurden mit NKC abgekürzt.

Sämtliche RCC und NKC, sowie LCL mit dem Index MZ wurden von Prof. A. Knuth,

Universität Zürich (CH), und dem Ludwig Institut für Krebsforschung (LICR), Zürich (CH) zur Verfügung gestellt.²⁶ RCC mit dem Index PB wurden von Prof. Storkus, Universität Pittsburgh (PA, USA) zur Verfügung gestellt. RCC mit dem Index BA wurden von Dr. E. Ranieri, Universität Bari, Italien; zur Verfügung gestellt. CO, HCC und LC wurden von Dr. S. Strand und Dr. S. Horn, Universität Mainz, zur Verfügung gestellt. Mel und PC wurden bereits beschrieben.^{127;128}

COS-7-Zellen

COS-7-Zellen sind fibroblastäre Nierenzellen der Grünen Meerkatze (*Ceropithecus aethiops*). Sie sind mit einem deletiertem Genom des SV40-Virus transformiert und exprimieren konstitutiv das große T-Antigen dieses Polyomavirus. Dadurch wird die episomale Replikation von zirkulären Plasmiden, die einen SV40-DNA-Replikationsursprung tragen, ermöglicht.¹²⁹ COS-7-Zellen sind in dieser Arbeit zur transienten Transfektion mit Expressionsplasmiden eingesetzt worden.

293T-Zellen

Die 293T-Zelllinie ist eine stabil wachsende Zelllinie aus humanen embryonalen Nierenzellen, die durch das transformierende Gen des Adenovirus-Typ5 immortalisiert wurde.¹³⁰ Sie exprimiert zusätzlich das große T-Antigen des SV40-Virus. Die 293T-Zellen wurden freundlicherweise von N. Shastri, University of California (Berkeley, USA), zur Verfügung gestellt.

T2-Zellen und HLA-Transfektanten

Die humane lymphoide Zelllinie T2 kann aufgrund eines genetischen Defektes keine endogenen Peptide über HLA-Klasse-I-Moleküle präsentieren.¹³¹ Sie besitzt zwar eigene HLA-Klasse-I-Moleküle, diese sind aber an der Zelloberfläche nicht stabil, da es nicht zur Ausbildung des trimeren Komplexes aus HLA-Molekül, β_2 -Mikroglobulin und Peptid kommt.¹³² T2-Zellen exprimieren rudimentär HLA-A2 und -B5¹³³. HLA-A2 lässt sich durch Zugabe von entsprechenden Peptidliganden ins Kulturmedium auf T2-Zellen stabilisieren.¹³³

Zum Testen der natürlichen Peptidliganden aus den HPLC-Fractionen standen uns HLA-Transfektanten von T2 zur Verfügung (T2-A3, T2-B7, T2-B44, T2-Cw7). Auch

diese HLA-Moleküle lassen sich durch externe Zugabe entsprechender Peptidliganden auf T2-Zellen stabilisieren.

K562-Zellen und HLA-Transfektanten

Die Zelllinie K562 wurde ursprünglich aus einem Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie isoliert.¹³⁴ Sie trägt keine HLA-Klasse-I-Moleküle an ihrer Zelloberfläche und fungiert daher als NK-Zielzelle.¹³⁵ Ähnlich den T2-Zellen können HLA-Klasse-I-transfizierte K562-Zellen zum Testen natürlicher Peptidliganden aus den HPLC-Fractionen herangezogen werden.

PHA-Blasten

Für Reaktivitätsstudien der generierten T-Zellpopulationen vom Spender 1009798 gegen autologe Zellen, wurden aus PBMC des Patienten MZ1851 PHA-Blasten generiert.¹³⁶

2.1.14 Synthetische Peptide

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden von Dr. J. W. Drijfhout (Universität Leiden, Niederlande) mit einem „Syro Peptide Synthesizer“ (Multisyntech, Witten) per Fmoc-Technik synthetisiert¹³⁷. Die lyophilisierten Peptide hatten eine Reinheit von >90%. Sie wurden in PBS/10% DMSO gelöst und auf eine Konzentration von 2mg/ml eingestellt, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über die Aminosäuresequenzen der verwendeten Peptide, den Namen des Ursprungproteins und die Angabe des präsentierenden HLA-Moleküls.

Alle Peptidsequenzen sind von N- nach C-terminal angegeben. Die Aminosäuren werden mit dem Ein-Buchstaben-Code abgekürzt.

Sequenz	Protein	präsentierendes HLA-Molekül
APGPPGRSML	RAVER 1 [Homo sapiens]	HLA-B*0702
APRVPVQAL	Serologically defined breast cancer antigen NY-BR-16 [Homo sapiens]	HLA-B*0702
LPHAPGVQM	Histone deacetylase 2 variant [Homo sapiens]	HLA-B*0702
FPAGPPSHSL	Hypothetical protein [Homo sapiens]	HLA-B*0702
LPRGSIPRSL	Minichromosome maintenance Protein 6 [Homo sapiens]	HLA-B*0702
RPAQPPRLL	C1orf85 protein [Homo sapiens]	HLA-B*0702
APSPRPLSL	C19orf28 protein [Homo sapiens]	HLA-B*0702
VPRSASVLL	unnamed protein product	HLA-B*0702

Tabelle 2.3: Sämtliche für die vorliegende Arbeit synthetisierten Peptide mit Angabe des Ursprungsproteins und des präsentierenden HLA-Klasse-I-Moleküls.

2.1.15 ELISPOT-Experimente

Multiscreen 96-well Filtration Plate (mit Nitrozellulosemembran) Millipore (Eschborn)

Anti-hIFN- γ -Antikörper #1-D1K (Maus-IgG) Mabtech AB (Nacka, S)

Anti-hIFN- γ -Antikörper #7-B6-1 (Maus-IgG) Mabtech AB (Nacka, S)
biotiniliert

Automatische Auswertung

Die Auswertung der IFN- γ ELISPOT-Experimente erfolgte automatisch mit dem KS ELISPOT-System Version 4.2.0 der Firma Zeiss (Jena). Das System besteht aus einem Auflichtmikroskop mit Motortisch und Autofokus. Jede einzelne Testeinheit (TE) der Elispotplatte kann vom Motortisch präzise angesteuert werden. Eine angeschlossene

Farbkamera nimmt die Zytokinspots auf, die digitalisiert und anschließend durch die KS ELISPOT-Software ausgewertet werden.^{138;139}

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

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% CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert.

Suspensionszellkulturen wurden in Zellkulturflaschen in einer Zelldichte von 2-4x10⁵/ml RPMI_{komplett} kultiviert, im Abstand von 3-4 Tagen gezählt und subkultiviert, wenn ihre Dichte etwa 1x10⁶ Zellen/ml erreicht hatte. Dabei wurden sie wieder auf 2-4x10⁵ Zellen/ml Medium eingestellt.

Adherent wachsende Zellkulturen wurden in liegenden Kulturflaschen verschiedener Größe in RPMI_{komplett} kultiviert und je nach Wachstumsgeschwindigkeit jeden dritten bis vierten Tag subkultiviert. Dazu wurden die Zellen für 5 Minuten in 0,05% Trypsin-EDTA inkubiert und anschließend durch Spülen mit RPMI in Suspension gebracht. Nach Zentrifugation wurden sie mit einer Dichte von 1x10⁴ Zellen/cm² ausgesät.

Die Expansion der Nierenzellkarzinomlinie MZ1851-RCC für biochemische Präparationsmethoden wurde in Wannestapel-Kultursystem (Nalge-Nunc) durchgeführt. Auf 10 Ebenen können die Zellen auf >6300cm² kultiviert werden. Ein Wannestapel-Kultursystem wurde mit 80-90x10⁶ Zellen in 1000ml RPMI_{komplett} beimpft und nach 7-10 Tagen Inkubation (37°C, 5% CO₂) „geerntet“. Dazu wurden die Zellen mit 500ml 0,01% Trypsin-EDTA oder Accutase II (1:5 mit PBS vorverdünnt) für 30min bei 37°C inkubiert, um die Zellen abzulösen. Von den geernteten Zellen wurde das Kultursystem erneut mit 80-90x10⁶ Zellen beimpft. Ein Kultursystem konnte mehrmals verwendet werden. Der Hauptteil der expandierten Zellen wurde, nach Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff

(-196°C), bei -80°C kryokonserviert. Pro Kulturzyklus konnten ca. 3×10^8 Zellen pro Wannestapel gewonnen werden.

2.2.2 Isolation CD8⁺ T-Lymphozyten aus *Buffy Coats*

Zunächst wurden aus den *Buffy Coats* sämtliche peripheren mononukleären Blutlymphozyten (PBMC) mittels Dichtegradientenzentrifugation durch Ficoll in 50ml LEUCO-SEP-Röhrchen (Greiner) isoliert. Dazu wurde der Inhalt eines *Buffy Coats* vorsichtig in die Röhrchen pipettiert, die zuvor mit 15ml Ficoll beschichtet worden waren. Nach Zentrifugation bei 1000xg (20 Minuten bei Raumtemperatur) waren die Lymphozyten als trübe Interphase oberhalb der Ficollschicht erkennbar und konnten mit einer Pipette abgenommen werden. Sie wurden mindestens viermal mit RPMI gewaschen und dann entweder in Portionen von 20 bis 50×10^6 Zellen kryokonserviert, oder einer positiven CD8⁺ T-Lymphozyten-Selektion unterzogen. Dazu wurden die PBMC mit MACS-CD8-MicroBeads (Miltenyi Biotec) inkubiert. Die Beads bestehen aus magnetischen Kügelchen, die an murine anti-humane-CD8-Antikörper konjugiert sind und binden daher ausschließlich an CD8⁺ T-Lymphozyten. Nun wurden die PBMC über eine magnetisierte Trennsäule (MACS Separation Column, Miltenyi Biotec) gegeben. Durch die magnetischen Beads werden die CD8⁺ Zellen auf der Säule gehalten. CD8⁻ Zellen (CD8-Negativfraktion) passieren die Säule und werden separat aufgenommen. Nach Entmagnetisierung der Trennsäule kann man die CD8⁺ T-Lymphozyten eluieren und durch mehrmaliges Waschen weitgehend von ungebundenen MicroBeads trennen.

2.2.3 Generierung tumorreaktiver CD8⁺ T-Lymphozyten durch allogene MLTC

Aus den frisch isolierten CD8⁺ Zellen des Spenders und, mit 100 Gray (Gy) letal bestrahlten, Tumorzellen der Linie MZ1851-RCC bzw. 35 Gray (Gy) bestrahlten CD8⁻ Zellen als „Feeder“-Zellen wurden gemischte Lymphozyten-Tumorzell-Kulturen (MLTC, *mixed lymphocyte tumor cell cultures*) angesetzt. Die Tumorzellen wurden drei Tage zuvor mit 100IU/ml IFN- γ vorbehandelt. Pro Kultureinheit einer 24-Loch-Platte wurden

1×10^6 CD8⁺ Zellen des Spenders, 1×10^5 Tumorzellen und 5×10^5 CD8⁻-Zellen in 2ml AIM-V_{komplett} kokultiviert. Am dritten Tag wurden jeder Kultureinheit (KE) 250IU/ml rhIL-2 und 5ng/ml rhIL-7 zugegeben. Sieben Tage nach der ersten Stimulation wurden die Lymphozyten restimuliert. Dazu wurden je 1×10^6 Lymphozyten erneut mit 1×10^5 bestrahlten Tumorzellen und 5×10^5 CD8⁻-Zellen in 2ml AIM-V_{komplett} inklusive rhIL-2 und rhIL-7 stimuliert. Jene CD8⁺ Zellen, die ein Antigen auf den Zielzellen erkennen, sezernieren verschiedene Zytokine, die einerseits die Zielzelle lysieren und andererseits die sezernierende T-Zelle selbst zur Proliferation stimulieren. Von nun an wurden die Zellen wöchentlich auf die gleiche Weise restimuliert. Bei starker Proliferation wurden die Zellen bereits nach vier Tagen subkultiviert, wobei der Inhalt jeder KE auf zwei KE aufgeteilt wurde. Dabei wurden alle KE mit frischem Medium ohne Zytokinzugabe auf 2ml aufgefüllt.

2.2.4 Klonierung von tumorreaktiven CD8⁺ T-Lymphozyten

Um klonale tumorreaktive T-Zellen zu erhalten, wurden die MLTC 1851-5-Responderlymphozyten mit dem Grenzverdünnungsverfahren kloniert.¹⁴⁰ Dabei wurden am Tag 28 der Kultivierung Einzelzellsuspensionen von T-Lymphozyten aus der MLTC hergestellt und unabhängig voneinander in jeweils fünf 96-Loch-Flachbodenplatten mit einer Zelle bzw. 0,3 Zellen pro well restimuliert. Die Restimulation der Responderlymphozyten erfolgte wöchentlich mit 3×10^3 zuvor mit 100Gy (Gray) letal bestrahlten und IFN- γ -vorbehandelten (100IU/ml) Zellen der Tumورlinie MZ1851-RCC sowie mit 4×10^4 AK-EBV-LCL-„Feeder“-Zellen pro well und wurden in jeweils 200 μ l AIM-V_{komplett} inklusive der Zytokine rhIL-2 (250IU/ml) und rhIL-7 (5ng/ml) pro Kultureinheit (KE) kultiviert. Die Lymphozyten, die ein Antigen auf der Tumورlinie erkennen, wurden so zur Proliferation angeregt und konnten durch mehrmalige Restimulation beachtlich expandiert werden. Abhängig von den jeweiligen proliferativen Eigenschaften der so erhaltenen klonalen CTL wurden diese in 24-Loch-Platten transferiert und wöchentlich restimuliert. Dazu wurden 1×10^6 CTL mit 5×10^4 Tumorzellen und 2×10^5 AK-EBV-LCL in 2ml AIM-V_{komplett} inklusive 250IU/ml rhIL-2 und 5ng/ml rhIL-7 pro KE ausgesät. Die drei Tage vor Stimulation mit 100IU/ml IFN- γ vorbehandelten Tumorzellen und die AK-EBV-LCL-

„Feeder“-Zellen waren mit 100Gy letal bestrahlt worden. Schnell wachsende CTL wurden nach drei bis vier Tagen subkultiviert, indem der Inhalt jeder KE auf zwei aufgeteilt wurde. Erneut wurden alle KE mit frischem Medium ohne Zytokinzugabe auf 2ml aufgefüllt.

2.2.5 Zytotoxizitätstest

2.2.5.1 Zytotoxizitätstest zum Nachweis von Tumorreaktivität

Zytotoxische T-Zellen (CTL) lysieren bei Antigenkontakt die Zielzelle durch verschiedene Effektormechanismen. Diese CTL-medierte Zytotoxizität kann durch den ^{51}Cr -Freisetzungstest gemessen werden.¹⁴¹ Die Zielzellen wurden für 90 Minuten mit $100\mu\text{Ci Na}_2(^{51}\text{Cr})\text{O}_4$ (Amersham Buchler, Braunschweig) im Brutschrank inkubiert. Dabei nehmen die Zellen das radioaktive Chromsalz auf und halten es aktiv in der Zelle. Nach viermaligem Waschen mit RPMI wurden je nach Test 1000-1500 Zellen/Testeinheit mit T-Zellen in verschiedenen Effektor/Zielzell-Verhältnissen (E:T, effector:target) zwischen 1:1 und 90:1 in Testeinheiten einer 96-Loch-V-Mikrotiterplatte gegeben. Das Inkubationsvolumen lag bei $160\mu\text{l}$. Der Test wurde für vier bis sechs Stunden im Brutschrank inkubiert und durch Zentrifugation der Platten beendet. Pro Testeinheit wurden $80\mu\text{l}$ des Überstandes entnommen und in einem Gamma-Counter (Pharmacia) auf freigesetztes Chrom überprüft. Als Positivkontrolle diente der Überstand chromierter Zellen, die durch zugegebenes Detergens (Tween20 in einer 1%-igen Lösung) lysiert wurden. Die spontane Chromfreisetzung der Tumorzellen wurde durch Zugabe von Medium ohne CTL ermittelt. Die spezifische Lyse eines T-Zellklons wurde nach folgender Formel bestimmt:

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

Klonale CTL wurden am vierten oder fünften Tag nach einer Restimulation im Zytotoxizitätstest untersucht. Alle Testansätze wurden in Doppelwerten durchgeführt.

2.2.5.2 Zytotoxizitätstest zum Screenen der HPLC-Fractionen

Da die gewonnenen HPLC-Fractionen mittels Zytotoxizitätstest auf Bioaktivität untersucht wurden, wird der methodische Ablauf des Testes hier erklärt. Der für Bioassays aufbewahrte Teil einer jeden Fraktion (70µl) wurde zunächst in der Vakuumzentrifuge auf 1µl eingengt und mit 100µl PBS verdünnt. Als Zielzellen für den Chromtest wurden T2-Zellen bzw. verschiedene HLA-Transfektanten von T2-, K562- oder C1R-Zellen verwendet. Diese wurden mit den HPLC-Fractionen beladen und dann mit den entsprechenden klonalen CTL bei einem bestimmten Effektor/Zielzell-Verhältnis (zwischen 20:1 und 40:1) inkubiert. Um die externe Peptidbeladung der HLA-Moleküle zu optimieren, wurde β_2 -Mikroglobulin (β_2m) mit einer Endkonzentration von 5-10µg/ml mit in den Versuchsansatz gegeben. Um den verbliebenen Säureanteil in den HPLC-Fractionen zu puffern, wurde HEPES-Puffer mit 25-50mM Endkonzentration ergänzt.

Es wurde bereits gezeigt, daß die Vorbehandlung von HLA-Klasse-I-positiven Zellen mit monoklonalen anti-HLA-Klasse-I-Antikörpern zu einer Verstärkung der Peptidpräsentation führt¹⁴². Dieser Effekt wurde genutzt, um die Präsentation der natürlichen Peptidliganden aus den HLA-Klasse-I-HPLC-Fractionen auf die verwendeten Zielzellen zu steigern. Die HPLC-Fractionen wurden von der fünften bis zur 70. Minute (siehe Kapitel 2.2.8.2) mit den jeweiligen T-Zellen auf Bioaktivität untersucht. Das Standardprotokoll für den Zytotoxizitätstest wurde dazu wie folgt verändert:

1000 chromierte Zielzellen wurden in 70µl Medium (inklusive β_2m und HEPES) in einer 96-Loch-V-Mikrotiterplatte vorgelegt. Dazu wurden 10µl der jeweiligen HPLC-Fraktion pipettiert. Zur Peptidbeladung wurde nun der Test vor der T-Zell-Zugabe 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der T-Zellen in 80µl Medium. Der Test wurde für 6 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.6 Gamma-Interferon-ELISPOT-Assay

Gamma-Interferon (IFN- γ) ist eines der Zytokine, die von T-Lymphozyten nach Antigenkontakt sezerniert werden (siehe Abbildung 2.1). Das Prinzip des ELISPOT-Assays (*enzyme linked immunosorbent spot assay*) besteht darin, daß ein monoklonaler Antikörper gegen ein Zytokinepitop mit dem konstanten Teil seiner schweren Kette an eine Nitrozellulose- oder Nylonmembran gebunden wird. Daraufhin werden Lymphozyten, die bei Antigenkontakt das Zytokin sezernieren können, mit ihren Zielzellen auf der Membran koinkubiert und die dabei freigesetzten Zytokine durch den variablen Abschnitt des Antikörpers gebunden. Nach Abwaschen der Zellen wird ein Detektionsantikörper, der ein zweites Epitop des Zytokins erkennt, dazugegeben. Der Zweitantikörper ist an Biotin gekoppelt, das wiederum durch Avidin nachgewiesen werden kann. Ein an Avidin gebundenes Enzym (Peroxidase oder Alkalische Phosphatase) setzt im nachfolgenden Schritt sein Substrat um und kennzeichnet dadurch die Orte der Zytokinfreisetzung auf der Membran (siehe Abbildung 2.2).

Die Elispotplatte (96-Loch-Mikrotiterplatte mit einem Boden aus Nitrozellulose) wurde am Vorabend des Testtages mit dem anti-IFN- γ -Primärantikörper beschichtet und über Nacht bei 4°C aufbewahrt oder direkt am Testtag für zwei Stunden bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Der Antikörper wurde mit 10µg/ml und 60µl/Testeinheit in PBS eingesetzt. Vor der Zellbelegung wurde nichtgebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und freie Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran durch serumhaltiges Medium blockiert. Bei Transfektionsexperimenten wurden die Zielzellen nach der Antikörperbeschichtung direkt in serumhaltigem Medium in die Testeinheiten (TE) gegeben. Anschließend wurden die Lymphozyten in AIM-V (oder RPMI_{klomplett}) zu den Zielzellen gegeben. Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMC) wurden mit 100.000 Zellen eingesetzt. Mehrfach restimulierte T-Lymphozyten wurden mit 5000-30.000 Zellen pro TE eingesetzt. Der Test wurde für 20 Stunden im Brutschrank inkubiert und danach entwickelt. Dazu wurden die Platten mit PBS/0,05% Tween20 gewaschen. Danach wurden 60µl/TE des biotinylierten Zweitantikörpers in einer Konzentration von 2µg/ml PBS/0,5% BSA in die TE pipettiert und diese für zwei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden 100µl des Avidin-Peroxidase-Komplexes zugegeben und die Elispotplatte für eine Stunde bei RT

inkubiert. Der Komplex wurde bereits 30 Minuten vorher vorbereitet, indem zu je 10ml PBS/0,1% Tween20 je ein Tropfen Reagenz A und Reagenz B aus dem Vectastain® Elite Kit gegeben wurden.

Anschließend wurde die Platte mit PBS/Tween20 und mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 100µl/TE AEC-Substratlösung wurde der Test entwickelt. Die Substratlösung bestand aus einer in 2,5ml Dimethylformamid gelösten AEC-Tablette, aufgefüllt ad 50ml mit Acetatpuffer und Zugabe von 25µl Wasserstoffperoxid. In der Regel war die Färbung nach drei bis fünf Minuten so intensiv, daß die Reaktion durch Spülen mit H₂O gestoppt werden konnte. Die automatisierte und standardisierte Zählung der IFN- γ -Spots erfolgte erst nach vollständiger Abtrocknung der Nitrozellulose.^{138;139}

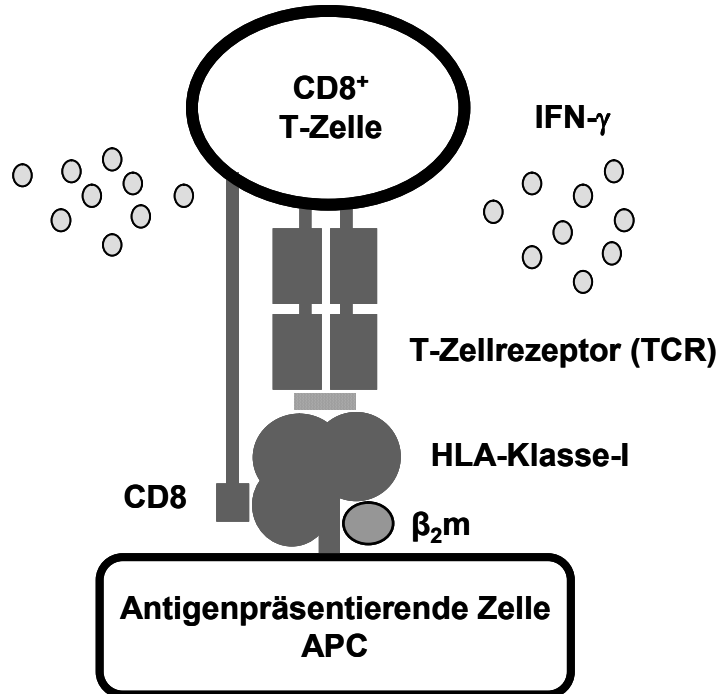


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Antigenerkennung. Die CD8⁺ T-Zelle erkennt ihr Antigen auf der Zielzelle und sezerniert verschiedene Zytokine (u. a. IFN- γ). TCR = T-Zellrezeptor, CD8⁺ = CD8 positive T-Zelle, APC = Antigenpräsentierende Zelle (z. B. MZ1851-RCC), HLA-I = HLA-Klasse I-Molekül, β_2m = β_2 -Mikroglobulin, CD8 = kostimulatorisches Molekül CD8.

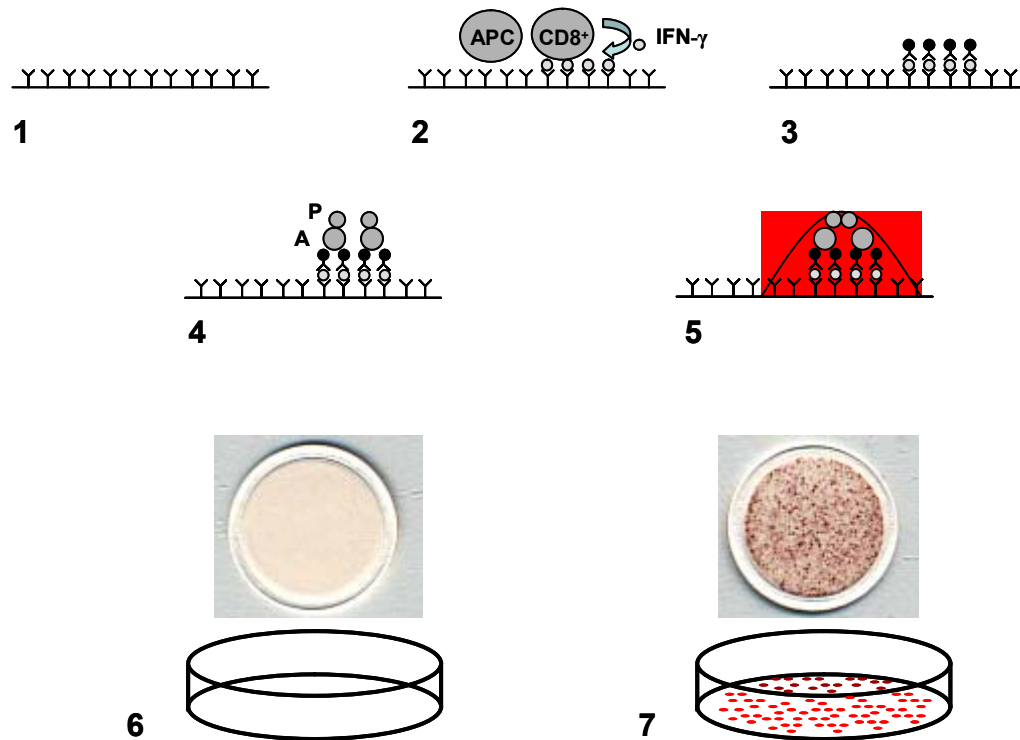


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des IFN- γ -ELISPOT-Assays. A: Avidin, APC: Antigen-präsentierende Zelle. P: Peroxidase. 1: Die Nitrozellulosemembran wird mit anti-hIFN- γ -Antikörper beschichtet. 2: Koinkubation von APC und CD8⁺ T-Zellen führt bei Antigenerkennung zur Sekretion von IFN- γ . 3: Zugabe des biotinierten Zweitantikörpers gegen humanes IFN- γ . 4: Anlagerung der Avidin-Peroxidase-Komplexe an das Biotin. 5: Zugabe von AEC (Amino-Ethyl-Carbazol) führt zur Umsetzung des Substrates durch die Peroxidase. 6: Beispiel einer Negativkontrolle. Die T-Zellen sezernieren kein IFN- γ , das durch die Antikörper nachgewiesen werden kann. 7: Beispiel einer positiven Reaktion. Nach Antigenerkennung sezernieren die T-Zellen IFN- γ , welches durch die Antikörper nachgewiesen werden kann. Jeder IFN- γ -Spot wird durch eine IFN- γ -sezernierende Zelle gebildet.

2.2.6.1 ELISPOT-Assay zur Bestimmung der HLA-Restriktion mittels Antikörperblockade (Blockadetest)

Die HLA-restringierte Reaktivität von T-Zellen gegen das Antigen auf ihrer Zielzelle kann durch bestimmte HLA-reaktive monoklonale Antikörper verhindert werden. Dabei werden die jeweiligen HLA-Moleküle auf der Oberfläche der Zielzellen sterisch derart blockiert, daß die T-Zelle ihr Antigen nicht mehr erkennt.

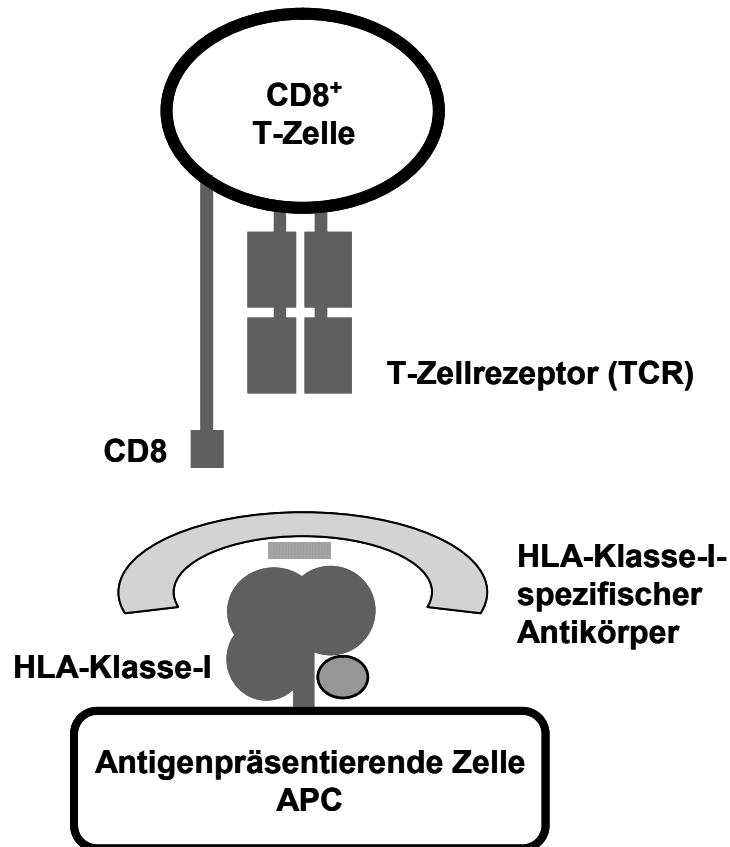


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der HLA-Blockade durch HLA-allelspezifische Antikörper. Die Erkennung des Antigens durch die T-Zelle ist durch den Antikörper unterbunden und die Zytokinsekretion bleibt aus (Abkürzungen wie bei Abbildung 2.1).

Mittels HLA-Blockade durch verschiedene HLA-allelspezifische Antikörper kann die HLA-Restriktion der T-Zellen ermittelt werden. Unter den inzwischen zahlreichen HLA-spezifischen monoklonalen Antikörpern (siehe 2.1.12) sind allerdings nur sehr wenige für Blockadeexperimente geeignet, da sie nicht nur das HLA-Allell, bzw. eine HLA-Allelgruppe, spezifisch erkennen müssen, sondern dieses auch so blockieren sollen, daß der T-Zelle die Erkennung des HLA-Peptid-Komplexes verwehrt ist.

Die verwendeten HLA-spezifischen Blockadeantikörper waren:

- W6/32: Dieser mAK erkennt eine räumliche Struktur aller HLA-Klasse-I-Proteine, die mit β_2m assoziieren. Dadurch werden alle HLA-Klasse-I-restringierte CD8⁺-T-Zellen blockiert.
- B123.2: Der mAK erkennt und blockiert ein gemeinsames Epitop aller HLA-B- und HLA-Cw-Allele, sowie der Mitglieder der HLA-Aw19-Subgruppe der HLA-A-Allele, die in unserem Modell nicht auftreten.

- GAP-A3: Der mAK erkennt und blockiert allelspezifisch HLA-A3.
- MA2.1: Der mAK erkennt und blockiert allelspezifisch HLA-A2.

Somit lagen im System MZ1851 allelspezifische Blockadeantikörper für HLA-A2 und HLA-A3 vor. Zur Blockade der Allele HLA-B7, -B44 und -Cw7 lag nur der Antikörper B123.2 vor, der an alle diese HLA-Moleküle bindet. Alle Antikörper wurden in Konzentrationen zwischen 50 und 100µg/ml zur Blockade verwendet.

2.2.6.2 Transiente Transfektion von COS-7-Zellen und 293T-Zellen im ELISPOT-Assay

Um ausschließen zu können, daß HLA-restringierte CTL des Spenders 1009798 statt eines Peptidliganden das epitopräsentierende HLA-Molekül auf der allogenen Tumorlinie MZ1851-RCC erkennen, wurden die Plasmide mit den Tumor-HLA-kodierenden cDNA-Klonen in COS-7- oder 293T-Zellen transient transfiziert. Im IFN- γ -ELISPOT-Assay konnte dann untersucht werden, ob das HLA-Molekül des Tumors bereits ohne tumorspezifisches Antigen zu einer T-Zellantwort führt.

Zur transienten Transfektion von COS-7- und 293T-Zellen mit HLA-kodierender cDNA stand die Methode mit Hilfe des PolyFect[®]-Reagenz (Qiagen, Hilden) zur Verfügung. Die transiente Transfektion mit PolyFect[®] konnte direkt in antikörperbeschichteten Elispotplatten durchgeführt werden. Dazu wurden die Zielzellen mit 2×10^4 /TE in 120µl RPMI_{komplett, ohne Antibiotika} vorgelegt, wodurch zeitgleich die freien Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran blockiert wurden. Die Plasmide mit der zu transfizierenden HLA-cDNA wurden mit dem Transfektionsreagenz in 30µl RPMI_{ohne Antibiotika} je TE auf einer Rundboden-Mikrotiterplatte folgendermaßen vorbereitet:

- 10µl RPMI inklusive der jeweilige HLA-cDNA (100-200ng)
- 20µl RPMI inklusive 0,5µl bzw. 1,0µl PolyFect (293T- bzw. COS-7-Zellen)

Die Ansätze wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich Komplexe aus sogenannten aktivierten Dendrimeren und der cDNA ausbilden konnten. Danach wurden pro TE 30µl Transfektionslösung zu den 120µl Zielzellen gegeben. Dieser Transfektionsansatz wurde für 24 Stunden inkubiert, um die entsprechenden Proteine synthetisieren zu können. Nach Abpipettieren des Mediums und Zugabe

entsprechender HLA-restringierter T-Zellen wurde der Test für weitere 20 Stunden inkubiert und anschließend entwickelt.

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden Kontrollen durchgeführt, bei denen zusätzlich zur HLA-cDNA auch eine bekannte antigenkodierende cDNA transfiziert wurde. Dies konnte dann mit entsprechenden HLA-restringierten und antigen-spezifischen CTL nachgewiesen werden. Diese Kontrollzellen wurden von Prof. T. Wölfel, Universität Mainz, zur Verfügung gestellt.

2.2.6.3 Peptiderkennung im ELISPOT-Assay

Ähnlich dem Zytotoxizitätstest mit natürlichen Peptidliganden aus HPLC-Fractionen (siehe Kapitel 2.2.5.2) läßt sich auch mittels des IFN- γ -ELISPOT-Assays die Erkennung extern zugegebener Peptidliganden (natürlich oder synthetisch) mit entsprechenden CTL testen. Dieser Test wurde in den Fällen herangezogen, die zur Ermittlung von theoretisch möglichen Peptidantigenen führten, die synthetisch hergestellt wurden. Pro Testeinheit wurden dazu 75.000 T2- oder 100.000 K562-Zellen, bzw. die jeweils relevanten T2/K562-HLA-Transfektanten, unter Anwesenheit von β_2m (5 μ g/ml) mit dem jeweiligen Peptid (10 μ g/ml) vorinkubiert und anschließend für 20 Stunden mit 10.000 Zellen pro Testeinheit mit dem jeweiligen CTL inkubiert. Wurde eines der synthetisierten Peptide erkannt war somit das Antigen des betreffenden CTL gefunden.

2.2.7 Durchflußzytometrie zur phänotypischen Charakterisierung von zellulären Oberflächenmarkern

Die phänotypischen Untersuchungen wurden zur Charakterisierung von Lymphozyten und Tumorzelllinien mit spezifischen monoklonalen Antikörpern für bestimmte Oberflächenmoleküle durchgeführt. Es handelte sich um Maus- oder Rattenantikörper (IgG), die gegen die jeweiligen humanen Moleküle gerichtet waren. Diese Antikörper waren entweder direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FITC, PE oder PC5) konjugiert, oder sie mußten durch einen farbstoffkonjugierten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus

oder Ziege-anti-Ratte) nachgewiesen werden. Durch Kombination der Fluoreszenzfarbstoffe konnten bis zu drei Oberflächenmoleküle parallel untersucht werden. Diese Fluoreszenzfarbstoffe werden im Durchflußzytometer durch Laserlicht verschiedener Wellenlänge angeregt und emittieren dabei ein positives Signal. Signalgebende Zellen können identifiziert und quantitativ ausgezählt werden.

Die zu untersuchenden Zellen wurden mit RPMI gewaschen, gezählt und pro Versuchsansatz zu 50.000-100.000 Zellen in FACS-Röhrchen gegeben. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet resuspendiert und 50µl des jeweiligen Antikörpers (1 bis 10µg/ml) zugegeben und 30min bei 4°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde mit einem fluoreszenzmarkierten Ziege-anti-Maus-Antikörper gegengefärbt und erneut 30min bei 4°C inkubiert. Bereits fluoreszenzmarkierte Antikörper wurden direkt mit dem resuspendierten Zellpellet über 20min bei RT inkubiert.

Zur Quantifizierung der Oberflächenexpression von HLA-Molekülen wurden die in Tabelle 2.1 beschriebenen anti-HLA-Antikörper verwendet. Diese sind unkonjugiert und wurden mit einem fluoreszenzmarkierten Ziege-anti-Maus-Antikörper gefärbt. T-Zellpopulationen wurden auf Expression von CD8 untersucht. Weitere Untersuchungsziele waren die quantitative Expression von CD3 und die qualitative Expression des TCR ($\alpha\beta$ -Ketten bzw. $\gamma\delta$ -Ketten). Mit Untersuchungen auf die Strukturen CD45RA, CD45RO, CD62L und CCR7 sollte geklärt werden, ob es sich um naive- oder differenzierte Memory-T-Zellen handelt. Weiterhin wurden zur Unterscheidung der T-Zellen von NK- oder NK-T-Zellen auch die CD-Moleküle CD16, CD56, CD57, CD28, CD94, CD25, CD69, sowie CD158a und CD158b untersucht.

2.2.8 Biochemische Aufreinigung und Auftrennung natürlich prozessierter Tumorantigene

Die biochemische Aufreinigung der natürlich prozessierten Tumorantigene wurde nach der Methode von Prof. F. Hunt, University of Virginia, durchgeführt.⁸⁰ Dabei werden aus einem Detergens-Lysat einzelne HLA-Peptid-Komplexe mittels Affinitätschromatographie isoliert. Die Affinitätssäulen werden zuvor durch Kopplung mit HLA-

spezifischen monoklonalen Antikörpern an eine Protein-A-Sepharose-Matrix konstruiert. Nach Aufreinigung der jeweiligen HLA-Klasse-I-Komplexe auf den verschiedenen Säulen werden sie bei pH 2,7 aufgebrochen und eluiert. Das Eluat wird durch eine 10kD-Membran filtriert, die nur von den HLA-Peptidliganden passiert werden kann. Nach anschließender Konzentration in einer Vakuumzentrifuge wird das Peptidgemisch mittels RP-HPLC in einem ansteigenden Acetonitrilgradienten separiert und in Fraktionen getrennt gesammelt.

2.2.8.1 Affinitätschromatographie der HLA-Komplexe und Aufreinigung der natürlichen HLA-Liganden

Aus insgesamt etwa $1,2 \times 10^{10}$ expandierten und kryokonservierten Tumorzellen der Nierenzellkarzinomlinie MZ1851-RCC wurde ein Detergens-Lysat hergestellt. Alle folgenden Schritte bis zum Einengen der Eluate in der Vakuumzentrifuge fanden in einem Kühlraum bei 4°C statt. Die Tumorzellen wurden in einem 500ml Becherglas mit Buffered Detergent Solution inklusive Proteaseinhibitoren (BDS_{PI}) zu einem Gesamtvolumen von 300ml aufgefüllt und 60 Minuten auf einem Magnetrührer gerührt. Durch das Detergens wurden die Zellen aufgebrochen und sämtliche Proteine freigesetzt. Für die weitere Präparation war es wichtig, daß der HLA-Peptid-Komplex aus HLA-Kette, β_2m und den Peptidliganden erhalten blieb. Das Lysat wurde anschließend durch Ultrazentrifugation (60min, 100.000xg) vom Zelldebris getrennt. Dabei sammelten sich Zellfragmente im Pellet und Lipide an der Oberfläche. Der klare Überstand, der sämtlichen Proteine enthielt, wurde gesammelt und durch einen 0,45µm Spritzenaufsatzfilter filtriert.

Parallel wurden die Immunchromatographiesäulen hergestellt. Dazu wurden vier Econo-Säulen (Ø 1,5cm, BioRad) mit ca. 2ml gequollenem Sepharose-CL-4B Gel vorbereitet und ohne Luft einschüsse mit einem Flow-Adapter verschlossen. Die Säulen wurden mit Puffer I auf pH 8,0 eingestellt. Danach wurden jeweils 15mg der Antikörper in 15ml Puffer I aufgenommen und mittels einer Peristaltik-Pumpe an die jeweilige Säule gebunden. Mit der „Bradford“-Methode zur photometrischen Proteinbestimmung (595nm Wellenlänge) konnte die Bindungseffizienz gemessen werden. Es wurden Säulen mit

den Antikörpern α -A24 und B123.2 vorbereitet. Außerdem wurde eine Econo-Säulen (\varnothing 1,0cm) mit 1ml CNBr-aktiviertem Sepharose-4B-Gel, deren aktivierte Gruppen mit Glyzin blockiert waren, vorbereitet. Sie diente in der anschließenden Chromatographie als Vorfilter. Sämtliche unspezifisch an Sepharose bindenden Proteine sollten somit aus dem Lysat gefiltert werden.

Durch Schlauchverbindungen wurden nun die Vorsäule, α -A24-Säule und die B123.2-Säule ohne Luftpfeinschlüsse hintereinander angeschlossen. Anschließend wurde das ganze System mit Puffer I und BDS_{PI} auf pH 8,0 eingestellt. Das Lysat wurde nun bei einer Flußrate von 1ml/min zweimal über das Säulensystem gepumpt. Dabei banden die HLA-Peptid-Komplexe spezifisch an die jeweiligen Antikörper auf den jeweiligen Säulen. Nun wurden die Säulen voneinander getrennt und gespült. Dazu wurde jede Säule mit den verschiedenen Tris- und NaCl-enthaltenden Puffern (Spülpuffer 1, 2 und 3; pH 8,0) mehrmals gewaschen. Anschließend wurden sie am unteren Ende verschlossen und der Flow-Adapter entfernt.

Von jeder Säule wurde ein 50 μ l-Aliquot entnommen, um per SDS-PAGE zu untersuchen, welche Menge an HLA-Molekülen aus dem Lysat an die Antikörpersäule gebunden hatte. Bei einem Säulenvolumen von 2ml entsprach dies 1/40 des Volumens und somit der eingesetzten Zelläquivalente.

Nun wurden die Säulen eluiert. Dazu wurden die Gel-Beads in der Säule mit 2ml 0,2N Essigsäure (pH 2,7) resuspendiert und 10 Minuten auf einem Rolltisch geschwenkt. Im sauren Milieu brach die Bindung der HLA-Komplexe an die Antikörper auf. Die HLA-Komplexe zerfielen in das β_2m , die schwere Kette und die prozessierten Peptidliganden. Die Säulen ließen wir in 2ml Eppendorf-Cups, in denen sich 165 μ l Essigsäure (99,9%) befand, austropfen. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt, so daß von jeder Säule ca. 7-8 gefüllte Eppendorf-Cups resultierten, die bei -80°C gelagert wurden.

Die Eluate der einzelnen Säulen wurden nun bei 3500xg und 4°C über eine 10kD-Membran filtriert (YM-10TM). HLA-Ketten, β_2m und Antikörperfragmente konnten die Membran nicht passieren. Nur die Peptidliganden passierten durch die Membran ins Filtrat, welches in 2ml Eppendorf-Cups gesammelt und eingefroren wurde. In gefrorenem Zustand wurde es in einer Vakuumzentrifuge auf 100 μ l pro Eppendorf-Cup konzentriert. Alle Filtrate von einer Antikörpersäule wurden nun in ein Gefäß zusammengeführt, auf 250 μ l eingengt und bis zur HPLC-Auftrennung bei -80°C gelagert.

2.2.8.2 Auftrennung der HLA-Liganden mittels RP-HPLC

Die HPLC ist eine leistungsstarke chromatographische Technik zur Auftrennung von niedermolekularen Peptiden.¹⁴³ Die Auftrennung aufgereinigter HLA-Liganden erfolgte mittels „reverse phase high performance liquid chromatography“ (RP-HPLC) auf einer C2/C18-Säule mit 2,1mm Innendurchmesser. Die Probe, die sämtliche natürlichen HLA-Liganden der jeweiligen Immunchromatographiesäule enthielt, wurde auf die HPLC-Säule geladen und dann mit Acetonitril/H₂O/TFA als mobiler Phase separiert. Um die Peptide aufgrund ihrer unterschiedlichen Affinität zur stationären Phase von der Säule zu eluieren, wurde der Acetonitrilanteil sukzessive erhöht (Gradientensystem). Die Flußgeschwindigkeit betrug 173µl/min bei einem Systeminnendruck von 335bar. Die beiden HPLC-Lösungen A (H₂O + TFA 0,1%) und B (H₂O + ACN 60% + TFA 0,085%) wurden so zu einem Elutionsmedium kombiniert, daß der ACN-Anteil der mobilen Phase von der fünften bis zur 70. Minute von 6% auf 45% anstieg. Dies entsprach einem Anstieg von Lösung B von 10% auf 75%, also von 1% Lösung B pro Minute. Das Eluat wurde von der fünften bis zur 70. Minute minutenweise in 1,8ml-Eppendorf-Cups fraktioniert. Gleichzeitig wurde von jedem HPLC-Lauf ein UV-Absorptionsverlauf bei 214nm Wellenlänge aufgenommen, der anzeigte, zu welchem Zeitpunkt Material von der Säule eluiert wurde. Nach jedem HPLC-Lauf wurde die C2/C18-Säule mit reiner Lösung B gespült um möglicherweise verbliebenes Material von der Säule zu waschen. Entsprechend der biochemisch aufgereinigten HLA-Liganden von der einzelnen Antikörpersäule (B123.2) wurde somit ein HPLC-Lauf durchgeführt. Von diesem HPLC-Läufe lagen 66 Fraktionen (fünfte bis 70. Minute) von jeweils 173µl Volumen vor. Jede Fraktion wurde für spätere MS-Untersuchungen und Biotests auf Antigenerkennung (⁵¹Cr-Zytotoxizitätstest) zu 100 bzw. 70µl zweigeteilt und bei -80°C aufbewahrt. Der Zytotoxizitätstest zum Screenen der HPLC-Fraktionen auf Bioaktivität ist in Kapitel 2.2.5.2 beschrieben.

2.2.9 Sequenzierung von Kandidaten-Epitopen in der Massenspektrometrie

Alle massenspektrometrischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. M. Karas (Universität Frankfurt/Main) und der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) durchgeführt. HPLC-Fractionen, die im Zytotoxizitätstest mit tumorreaktiven Responderlymphozyten zu signifikanter Lyse führten, enthielten vermutlich das natürlich prozessierte HLA-Klasse-I-assoziierte Peptidantigen der jeweiligen T-Zellen. Sie enthielten aber ebenfalls noch eine Vielzahl weiterer Peptidliganden, die aufgrund ihres Lösungsverhaltens in die gleiche HPLC-Fraktion eluiert wurden. In den letzten Jahren ist die Massenspektrometrie zu einer wichtigen Methode bei der Identifizierung und Sequenzierung einzelner Peptide aus komplexen Gemischen geworden.¹⁴⁴ Ein MALDI-Massenspektrum einer bioaktiven HPLC-Fraktion enthält viele verschiedene Masse-Peaks. Die große Menge an verschiedenen Massen macht es sehr schwierig einzelne Massenpeaks gezielt anzusteuern, um sie zur Sequenzierung fragmentieren zu können.

Dieses Problem wurde in zwei Schritten gelöst. Zuerst verschaffte man sich per MALDI-MS einen Überblick über die Massen der positiven und der jeweils benachbarten negativen, also nicht bioaktiven, Fraktionen. Nun suchte man gezielt nach Massenpeaks, die zwar in der bioaktiven HPLC-Fraktion auftraten, nicht aber in einer der benachbarten negativen Fraktionen. Die so ermittelten Massenpeaks stellten die interessantesten Kandidaten eines Peptidantigens dar.

Anschließend wurde die bioaktive HPLC-Fraktion mittels Kapillar-HPLC (*Cap*-LC) über einem weiteren Acetonitrilgradienten feiner aufgetrennt. Die erhaltenen Unterfraktionen waren weit weniger komplex als die Ausgangsfraction. Die Anzahl an Massenpeaks war reduziert, weil sich sämtliche Peptidspezies über mehrere Unterfraktionen verteilten. Aus diesen Unterfraktionen war es nun leichter möglich, einzelne Massenpeaks zu fragmentieren und anhand der Bruchstückmassen die Aminosäuresequenz zu errechnen.

2.2.10 SDS-PAGE zur Bestimmung der durch Immunchromatographie aufgereinigten Mengen an HLA-Klasse-I-Molekülen

Zur Quantifizierung der bei der Immunchromatographie angereinigten HLA-Moleküle wurde von den einzelnen Antikörpersäulen vor Eluation ein 50µl-Aliquot entnommen (siehe Kapitel 2.2.8.1) und per SDS-PAGE in einem 4-20%igen SDS-Gel nach Standardverfahren aufgetrennt (SDS-PAGE = *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*).^{145;146}

Die erwarteten Proteinbanden lagen für die schwere Kette des HLA-I-Moleküls, bzw. für β_2m bei ca. 44 bzw. 12kD. Die verwendeten Chromatographie-Antikörper waren bei der sauren Eluation teilweise in ihre schweren und leichten Ketten zerfallen und erzeugten Banden bei ca. 50 und 25kD. Zur Bestimmung der Molekülgrößen wurde jeweils ein Proteinmarker als Größenmarker mitgeführt. Aus der Dichte der Proteinbanden wurde durch Vergleich mit mitgeführten Antikörperbanden die ungefähre Menge an aufgereinigten HLA-Molekülen bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 MHC-Klasse-Ia-Genotypisierung von Effektor- und Stimulatorzellen der allogenen MLTC

Beim Vorliegen nicht-identer HLA-Klasse-Ia-Allele zwischen den Effektor- und Stimulatorzellen einer allogenen gemischten Lymphozyten-Tumorzell-Kultur (MLTC) können T-zelluläre Immunantworten gegen ein HLA-„Mismatch“-Allel *in vitro* induziert werden. Um die Generierung gewünschter antitumoraler Immunantworten mit selbst-HLA-restringierter Reaktivität zu fördern, sollte zur Anlegung der allogenen MLTC, bestehend aus Stimulatorzellen der Nierenzellkarzinomlinie MZ1851-RCC und CD8⁺ T-Lymphozyten des Spenders 1009798, eine vollständige Übereinstimmung in den HLA-Klasse-Ia-Loci vorliegen. Dazu wurden zunächst genotypische HLA-Untersuchungen mit niedrigem Auflösungsvermögen durchgeführt, die einen Unterschied innerhalb der HLA-C-Allele der verwendeten Zelllinien aufzeigten. Bei den Effektorzellen lag mit HLA-Cw5 und HLA-Cw7 eine Heterozygotie vor. HLA-Cw5 konnte zu keiner „Mismatch“-Reaktivität führen, da dieses Allel von den Stimulatorzellen nicht exprimiert wurde. Um ein „Mismatch“ innerhalb der HLA-Cw7-Suballele auszuschließen, wurde zudem eine hochauflösende HLA-Genotypisierung durchgeführt. Neben der genotypischen Übereinstimmung der Allele HLA-A1, -A2, -B7 und -B44 wurde ein Suballel-„Mismatch“ zwischen HLA-Cw*0704 seitens der Nierenzellkarzinomlinie MZ1851-RCC und HLA-Cw*0702 seitens der Effektorzellen gefunden. Das Ergebnis der HLA-Genotypisierung ist der Tabelle 3.1 zu entnehmen:

MZ1851-RCC	Spender 1009798
HLA-A*0101	HLA-A*0101
HLA-A*0201	HLA-A*0201
HLA-B*0702	HLA-B*0702
HLA-B*4402	HLA-B*4402
HLA-Cw*0702	HLA-Cw*0501
HLA-Cw*0704	HLA-Cw*0702

Tabelle 3.1 : HLA-Genotypisierung der MHC-Klasse-Ia-Loci -A, -B und -C der Tumorlinie MZ1851-RCC und T-Lymphozyten des Spenders 1009798. Neben einer Übereinstimmung der HLA-Suballele HLA-A1, -A2, -B7 und -B44 wurde ein „Mismatch“ für HLA-Cw7 (Fettdruck) identifiziert.

Die Oberflächenexpression der HLA-Klasse-I-Moleküle von MZ1851-RCC wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie unter Verwendung der HLA-allelreaktiven Antikörper MA2.1 für HLA-A2, BB7.1 für HLA-B7, B123.2 für HLA-B/C, W6/32 für Gesamt-HLA-Klasse-I und HB55 für HLA-DR (HLA-Klasse-II) nachgewiesen (siehe Abbildung 3.1). Eine Vorbehandlung der Nierenzellkarzinomlinie MZ1851-RCC mit IFN- γ bewirkte keine signifikante Steigerung in der Expression der HLA-Moleküle. Die verwendeten Antikörper können neben der phänotypischen Charakterisierung von Oberflächenmolekülen auch zur biochemischen Aufreinigung der HLA-Klasse-I-Komplexe eingesetzt werden.

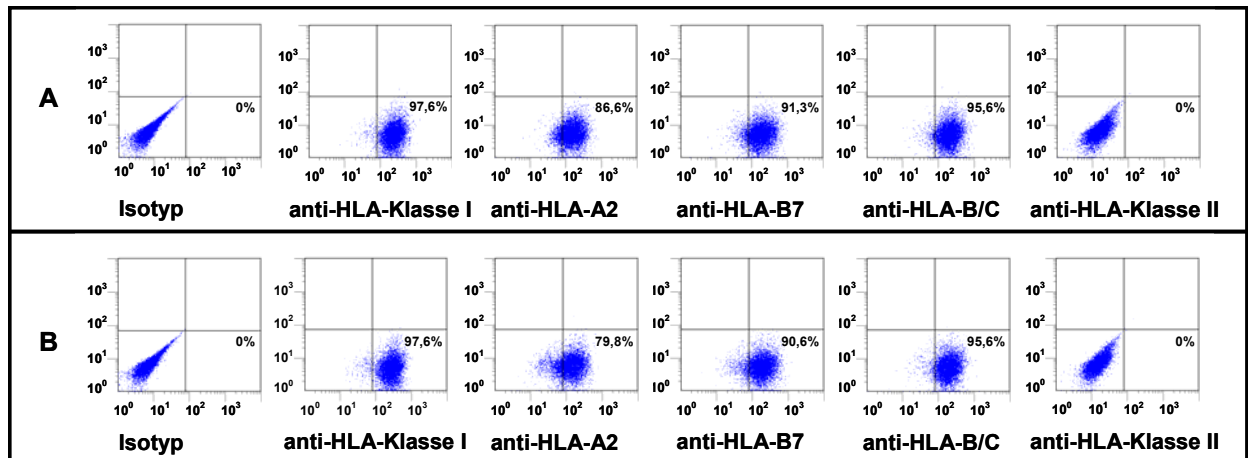


Abbildung 3.1: Phänotypische Charakterisierung der HLA-Expression der Nierenzellkarzinomlinie MZ1851-RCC. A: HLA-Expression ohne Vorbehandlung mit IFN- γ . B: HLA-Expression nach Vorinkubation mit 100IU/ml IFN- γ .

3.2 Generierung von tumorreaktiven CD8⁺ T-Zellpopulationen durch allogene MLTC

Aus dem *Buffy Coat* des gesunden Spenders 1009798 konnten $6,6 \times 10^8$ periphere mononukleäre Zellen (PBMC) durch Ficoll-dichtezentrifugation isoliert werden. Eine immunmagnetische Selektion von CD8⁺ T-Zellen ergab insgesamt 119×10^6 CD8⁺ T-Zellen, was einer prozentualen Ausbeute von ca. 18% der eingesetzten PBMC entspricht. Mit den isolierten CD8⁺ Zellen wurden verschiedene MLTCs gestartet. Die in dieser Arbeit verwendeten und im Folgenden beschriebenen T-Lymphozyten wurden

aus der MLTC 1851-5 generiert.

3.2.1 Charakterisierung der MLTC 1851-5

Mit der Ausgangszellzahl von 23×10^6 CD8⁺ T-Zellen des Spenders 1009798 wurden nach wöchentlicher Stimulation an den Tagen 0, 7 und 14 bis zum Tag 21 insgesamt 59×10^6 Responderlymphozyten *in vitro* expandiert (Abbildung 3.2).

An Tag 21 wurde die Langzeitkultur in nur wenigen Kultureinheiten weitergeführt und der überwiegende Anteil der Responderlymphozyten kryokonserviert. Desweiteren wurden phänotypische Untersuchungen hinsichtlich der Oberflächenmarker CD8, CD3 und CD4 durchgeführt. Dabei zeigten die Zellen der MLTC 1851-5 einen CD3⁺-Anteil von 95,6% und exprimierten somit den T-Zellrezeptorkomplex. Weiterhin waren sie zu 99,3% für CD8 und 11,3% für CD4 positiv (Daten nicht gezeigt).

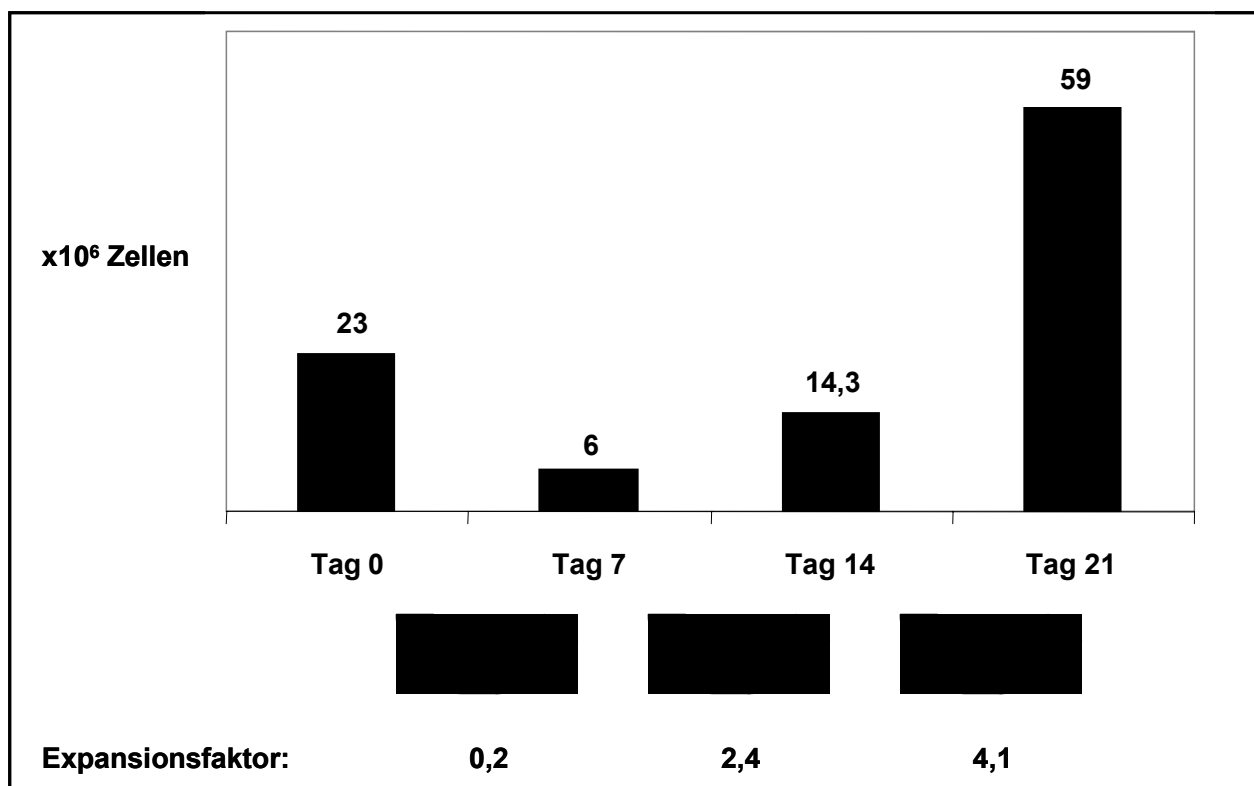


Abbildung 3.2: Wachstumsverlauf der MLTC 1851-5 mit den wöchentlichen Expansionsfaktoren

3.2.2 Charakterisierung der aus MLTC 1851-5 generierten klonalen CTL

Zur Generierung von klonalen zytotoxischen T-Zellen aus der MLTC 1851-5 wurde am Kulturtag 28 eine Klonierung mit Hilfe des Grenzverdünnungsverfahrens angesetzt. Bei dem Klonierungsansatz wurden je 480 wells mit einer statistischen Verteilung von einer bzw. 0,3 Zellen pro well ausgesät. Aus diesen Einzelkulturen wurden insgesamt 110 wachsende zytotoxische T-Zellklone isoliert, von denen zwölf auf größere Zellzahlen expandiert und charakterisiert werden konnten. Die Bezeichnung der aus dieser Klonierung hervorgegangenen CTL-Klone erfolgte aus einer Kombination von einem Großbuchstaben und einer individuellen Nummer (z.B. CTL-Klon A4). Im IFN- γ -ELISPOT-Assay zeigten alle expandierten CTL-Klone Reaktivität gegen die Tumorzelllinie MZ1851-RCC. Dagegen konnte eine Reaktivität gegen die als „Feeder“-Zellen eingesetzte Zelllinie AK-EBV-LCL nicht nachgewiesen werden, so daß die von den CTL-Klonen erkannten Antigene von der Tumorzelllinie MZ1851-RCC exprimiert werden mußten. Weitere Reaktivitätsuntersuchungen gegen PHA-Blasten des Patienten MZ1851, welche zu einem früheren Zeitpunkt kryokonserviert und für die Untersuchungen erneut in Kultur genommen wurden, waren ebenfalls negativ, so daß zunächst eine tumorspezifische Reaktivität angenommen wurde (siehe Tabelle 3.3). Von den zwölf expandierbaren CTL-Klonen konnte lediglich bei dem CTL B98 das HLA-A2-Molekül als Restriktionselement durch Blockadeexperimente mit einem spezifischen, gegen HLA-A2-gerichteten Antikörper (MA2.1) und nachfolgenden Kreuzreaktivitätsuntersuchungen identifiziert werden. Aufgrund der geringen lytischen Reaktivität und geringen IFN- γ -Freisetzung des CTL B98 gegenüber der Tumorzelllinie MZ1851-RCC war dieser CTL-Klon allerdings für die Antigenidentifizierung mittels biochemischer Aufreinigungsverfahren ungeeignet (Daten nicht gezeigt). Die IFN- γ -Spotproduktion der restlichen CTL-Klone, welche in ausreichender Zellzahl expandiert werden konnten, war in Blockadeexperimenten ausschließlich mit dem Gesamt-HLA-Klasse-I-Antikörper W6/32 und dem HLA-B/C-Antikörper B123.2 deutlich reduzierbar, so daß diese CTL über HLA-B- und -C-Allele restringiert waren (siehe Tabelle 3.2).

	CTL											
	A3	A4	C15	C18	D23	D25	E30	E32	G38	I44a	E77	B98
anti-HLA-Klasse-I	100	100	100	100	80	100	100	100	75	100	90	100
anti-HLA-A2	0	0	0	0	0	0	10	20	0	20	10	100
anti-HLA-B/C	70	100	100	65	50	95	100	70	25	100	45	0
anti-HLA-Klasse-II	10	10	10	10	0	0	10	25	15	20	15	30
HLA-Restriktion	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	A2

Tabelle 3.2: Analyse der HLA-Restriktion aus der MLTC 1851-5 generierten und expandierbaren CTL-Klone im HLA-Antikörper-Blockade-ELISPOT. Gezeigt wird die prozentuale Blockadewirkung verschiedener, gegen spezifische HLA-Moleküle gerichtete, Antikörper.

Mit Hilfe von Kreuzreaktivitätsuntersuchungen konnte bei diesen getesteten CTL, mit Ausnahme des CTL-Klons A4, das HLA-Cw7 als Restriktionselement identifiziert werden, so daß eine „Mismatch“-Reaktivität gegen das HLA-Cw*0704 angenommen wurde (siehe Tabelle 3.3). Die Kreuzreaktivitätsexperimente mit dem CTL A4 erbrachten hingegen keine weiteren Hinweise, welches HLA-B- oder HLA-C-Molekül durch den CTL als Restriktionselement genutzt wurde (siehe Kapitel 3.2.3).

Durch phänotypische Untersuchungen wurde der Nachweis erbracht, daß alle aus der MLTC 1851-5 generierten klonalen CTL positiv für die Oberflächenmarker CD3 und CD8 waren, sowie einen $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor exprimierten (siehe Tabelle 3.4). Bei diesen CTL-Klonen handelte es sich zudem um Effektor- bzw. Effektor-Memory-Zellen, da die T-Zellen eine hohe CD45RO- und CD44-Oberflächenexpression zeigten, während CD45RA, CD28, CD62L und CCR7 nur schwach und der Marker CD27 unterschiedlich stark auf der Zelloberfläche exprimiert wurde. Weitere phänotypische Analysen zeigten, daß die CTL-Klone für die NK-Zellmarker CD16 und CD57 negativ waren. Mit Ausnahme einer geringen Expression von CD85j wurden inhibitorische Rezeptoren (KIR, *killer inhibitory receptor*) wie KIRp70, CD158a und CD158b nicht exprimiert. Als Rarität identifizierten wir CTL-Klon D25, der sowohl mit anti-CD8- als auch mit anti-CD4-Antikörpern anfärbbar war.

Zelllinie	HLA-Typ ⁽¹⁾			CTL												
	A	B	C	A3	A4	C15	C18	D23	D25	E30	E32	G38	I44a	E77	B98	
MZ1851-RCC	1,2	7,44	7 ⁽²⁾	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+	+++	+++	+++	++	
MZ1851-PHA-B	1,2	7,44	7	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
MZ1257-RCC	2	7,44	7	--	--	--	--	--	--	--	+/-	--	--	--	++	
MZ1257-EBV-LCL	2	7,44	7	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
MZ5-RCC	1	7	7	--	--	--	--	--	--	--	+	--	--	--	--	
MZ1846-RCC	2	7	7	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+	
MZ1879-RCC	1,2		7	--	--	--	--	+	--	--	--	+	--	++	+	
MZ2175-RCC		7	7	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
MZ1795-RCC		7	7	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
MZ1973-RCC	1,2		7	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	++	--	
MZ1940-RCC	1			--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
MZ1774-RCC				--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+	
Heardt-RCC	1,2	44		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+++	
FMKOT-RCC	2		7	+++	--	+++	+++	+++	+	+++	++	+++	++	+++	+	
Shoemaker-RCC	1	7,44	7	+++	--	+++	+++	+++	+	+++	+	+++	+++	+++	--	
BA85-RCC		7	7	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
MZ-2-Mel	1	44		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
MZ-2-EBV-LCL	1	44		--	--	+/-	--	--	+/-	--	+	--	--	--	--	
MZ-3-Mel			7	--	--	--	--	++	--	--	--	++	--	+	--	
MZ-3-EBV-LCL			7	n.t.	n.t.	--	n.t.	+	--	n.t.	--	+++	n.t.	++	n.t.	
MZ-5-Mel		7	7	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+	--	--	
MZ-7-Mel		7	7	--	--	--	--	--	--	--	+	--	--	--	--	
MZ-7-EBV-LCL		7	7	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
MZ-9-Mel	2			--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	++	
MZ-13-Mel	2			--	--	--	--	+	--	--	--	++	--	+/-	++	
D05-Mel	2	44		n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	++	
D05-EBV-LCL	2	44		n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	+/-	
D14-Mel-SRJ		7	7	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	n.t.	
D14-EBV-LCL		7	7	--	--	--	--	--	+/-	--	--	--	--	--	n.t.	
SK-29-Mel	2	44		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	++	
SK-29-EBV-LCL	2	44		--	--	+/-	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
SK-CO-1	1,2	44	7	--	--	--	--	+/-	--	--	--	+	--	+	+	
SK-CO-2	1,2	44	7	--	--	--	--	--	+/-	--	--	--	--	--	+	
MZ-PC-1	2			n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	+	
MZ-PC-1-EBV-LCL	2			n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	--	
MZ-PC-2	1,2		7	--	--	--	--	--	+/-	--	--	--	--	+	++	
MZ-1-GB			7	--	--	--	--	--	+/-	--	+/-	+	--	+	n.t.	
29-HT	1			--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
1034-LS	2		7	--	--	--	--	--	+/-	--	--	+	--	+	+++	
480-SW	2	7	7	+	--	++	+/-	+	+	+	--	+	+	++	+	
Hep I	2	44		n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	+/-	
MCF-7	2	44		n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	+/-	
Hammes-Ca	2			n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	+	
Leukämie-55				--	--	--	--	--	--	n.t.	--	--	--	--	--	
Leukämie-268				--	--	+/-	--	--	--	n.t.	+	--	--	--	--	
HLA-Restriktion				B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	A2	

Tabelle 3.3: Kreuzreaktivitätsuntersuchungen der aus der MLTC 1851-5 generierten und expandierbaren CTL-Klone im IFN- γ -ELISPOT-Assay pro 5.000 getesteter T-Zellen und 20.000 „Target“-Zellen. „--“ ≤ 10 IFN- γ -Spots; „+/-“ 10-30 IFN- γ -Spots; „+“ 30-200 IFN- γ -Spots; „++“ 200-500 IFN- γ -Spots; „+++“ ≥ 500 IFN- γ -Spots; n.t. nicht getestet. ⁽¹⁾ Mit Ausnahme der Nierenzellkarzinomlinie MZ1851-RCC wurden nur übereinstimmende HLA-Klasse-I-Allele angegeben. ⁽²⁾ Es handelte sich hierbei um das HLA-Cw*0702- und das HLA-Cw*0704-Allel.

	CTL			
	A4	E77	D23	D25
CD3	100	100	100	100
CD4	0	3	0	100
CD8	100	100	100	100
TCR $\alpha\beta$	100	100	100	100
TCR $\gamma\delta$	0	0	0	0
CD16	0	0	0	0
CD56	42	59	23	36
CD57	1	0	4	6
CD27	61	34	6	7
CD28	2	2	3	1
CD44	100	100	100	100
CD45RA	11	4	9	5
CD45RO	93	76	93	83
CD62L	1	0	7	1
CCR7	1	1	1	1
KIRp70	0	0	1	0
CD85j	6	1	24	44
CD158a	0	0	0	0
CD158b	0	0	0	1
NKG2A	1	0	0	0
NKG2D	100	97	82	85

Tabelle 3.4: Ergebnisse der phänotypischen Untersuchungen für die CTL-Klone A4, E77, D23 und D25 als Repräsentanten der aus der MLTC 1851-5 generierten klonalen CTL. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der Zellen, die in der Durchflußzytometrie mit entsprechenden Antikörpern gegen die aufgeführten Oberflächenmoleküle anfärbbar waren.

3.2.3 Detaillierte Untersuchungen zur Spezifität des HLA-B/C-restringierten CTL-Klons A4

Der aus der MLTC 1851-5 klonierte CTL A4 erkannte sowohl im 4h-Zytotoxizitätstest als auch im 20h-IFN- γ -ELISPOT-Assay die zur Stimulation der Lymphozyten eingesetzte Tumorzelle MZ1851-RCC (siehe Abbildungen 3.3 und 3.4). Die als „Feeder“-Zellen verwendeten AK-EBV-LCL-Zellen induzierten hingegen keine IFN- γ -Freisetzung in CTL-A4. Das NK-Zell-„Target“ K562 wurde ebenfalls nicht lysiert, wodurch eine NK-Reaktivität des CTL-A4 ausgeschlossen wurde. Um eine tumorspezifische Reaktivität festzustellen, wurden sowohl kryokonservierte, als auch neu generierte PHA-Blasten des Patienten MZ1851 als Zielzellen eingesetzt. Dabei wurde im ^{51}Cr -Freisetzungstest und im IFN- γ -ELISPOT-Assay keine Reaktivität nachgewiesen, so daß der CTL-Klon A4 zweifelsfrei ein tumorassoziiertes Antigen erkennt.

Antikörper-Blockadeexperimente zeigten, daß die Erkennung der Tumorzelle MZ1851-RCC durch den HLA-B/C-spezifischen Antikörper B123.2 im gleichen Maße inhibiert wurde, wie durch den anti-HLA-Klasse-I-Antikörper W6/32 (siehe Abbildung 3.5). Damit mußte CTL-A4 über eines der HLA-B- oder -C-Allele restringiert sein. Zur genaueren Identifizierung des Restriktionselementes wurden nachfolgend Kreuzreaktivitätsuntersuchungen mit unterschiedlichen allogenen Zielzelllinien durchgeführt. Insgesamt wurden 44 verschiedene Zielzelllinien, darunter Nierenzellkarzinome, Melanome, Pankreaskarzinome, Kolonkarzinome und Leukämien, getestet, die mit MZ1851-RCC in mindestens einem HLA-B/C-Allel übereinstimmten. Es konnte keine Kreuzreaktivität mit einer dieser getesteten Zielzellen nachgewiesen werden, so daß es sich bei dem von CTL-A4 erkannten Peptidantigen möglicherweise um ein für die Tumorzelle MZ1851-RCC spezifisches Antigen handelte (siehe Abbildung 3.6).

Um zu überprüfen, ob CTL-Klon A4 nicht gegen eine strukturelle Determinante eines der möglichen HLA-B/C-Moleküle, sondern gegen ein distinktes Peptidantigen gerichtet ist, wurde ein Transfektionsexperiment auf Erkennung der verschiedenen HLA-Moleküle mit 293T- und COS-7-Zellen durchgeführt (siehe Abbildung 3.7). Dabei wurden die transfizierten cDNAs der HLA-Moleküle nicht von CTL-A4 als Zielstruktur erkannt. Einschränkend ist jedoch zu erwähnen, daß für diesen Test HLA-Cw*0704 cDNA nicht zur Verfügung stand. Dennoch erscheint HLA-Cw*0704 als Zielstruktur von CTL-Klon

A4 unwahrscheinlich, da dieser nicht mit HLA-Cw*0704-exprimierenden RCC-Zellen FMKOT-RCC und Shoemaker-RCC reagierte (siehe Tabelle 3.3 und Kapitel 3.2.4). Als Positivkontrolle im Transfektionstest wurden HLA-B7-restringierte T-Zellen, welche ein bekanntes, cDNA-kodiertes Melanomantigen nach Kotransfektion mit HLA-B7 erkennen, mitgeführt. Dadurch wurde nachgewiesen, daß die Transfektion der 293T- und COS-7-Zielzellen mit HLA-cDNA erfolgreich war und daraus ein funktionales HLA-Molekül resultierte (siehe Abbildung 3.7). Die für die Kontrolle verwendeten T-Zellen und das cDNA-kodierte Melanomantigen wurden von Dr. V. Lennerz und Prof. Dr. T. Wölfel (Universitätsklinikum Mainz) zur Verfügung gestellt.

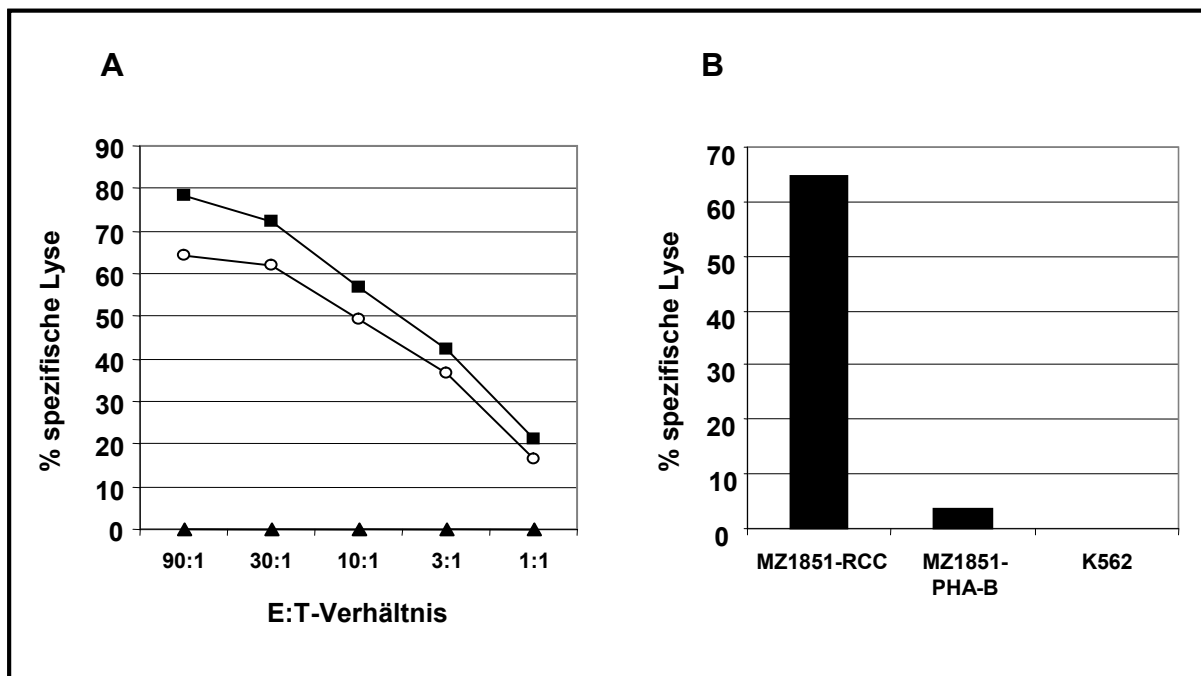


Abbildung 3.3: ^{51}Cr -Freisetzungstest mit CTL-Klon A4

A: Spezifische Lyse (%) im 4h-Zytotoxizitätstest gegen die Zielzellen MZ1851-RCC \emptyset IFN- γ (■), MZ1851-RCC mit IFN- γ (○) und das NK-„Target“ K562 (▲) bei verschiedenen Effektor/Target-Verhältnissen. B: Spezifische Lyse (%) im 4h-Zytotoxizitätstest gegen die Zielzellen MZ1851-RCC, PHA-Blasten aus dem Patienten MZ1851 und K562 bei einem Effektor/Target-Verhältnis von 30:1.

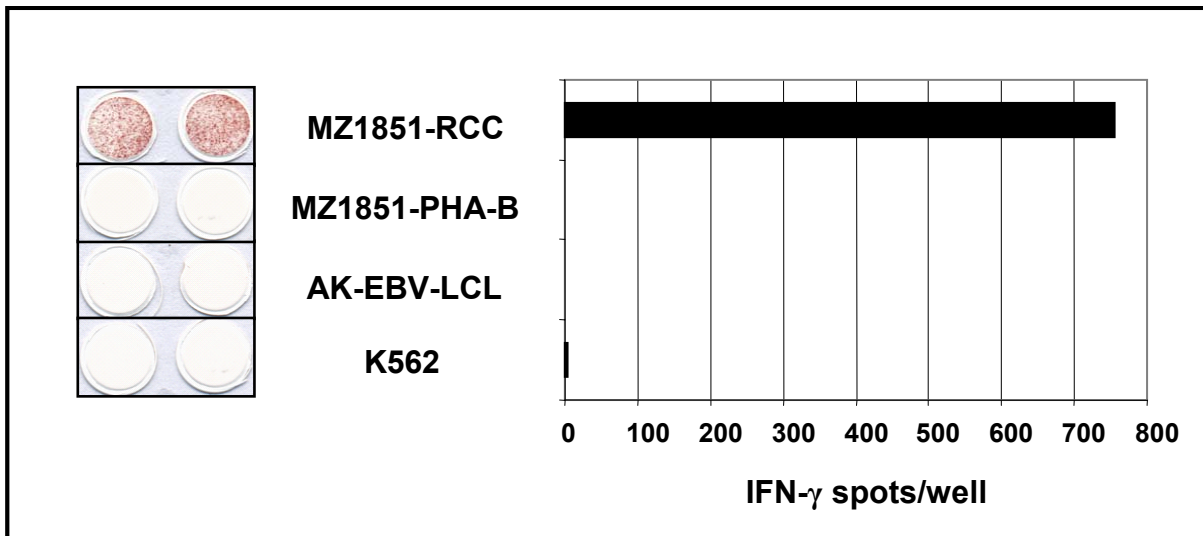


Abbildung 3.4: Reaktivitätsanalyse von CTL-Klon A4 im 20h-IFN- γ -ELISPOT-Assay gegen MZ1851-RCC, PHA-Blasten aus dem Patienten MZ1851, AK-EBV-LCL und NK-„Target“ K562. Gezeigt werden IFN- γ -Spots pro 5.000 T-Zellen und 20.000 „Target“-Zellen.

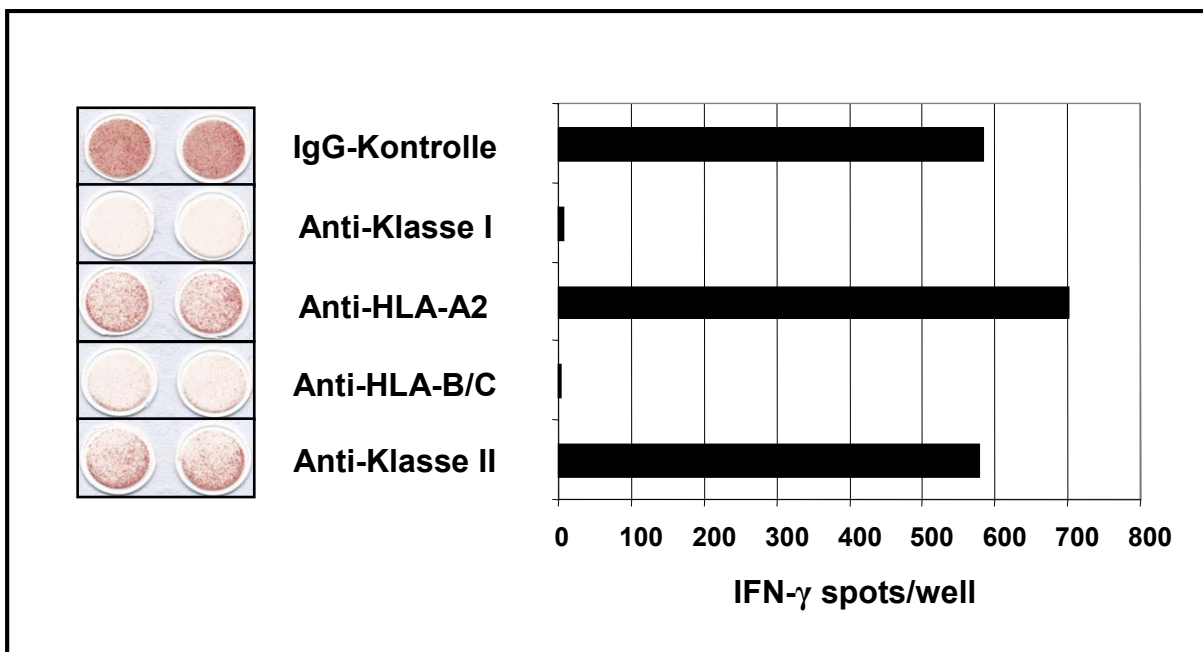


Abbildung 3.5: Analyse der HLA-Restriktion des CTL-Klons A4 im HLA-Antikörper-Blockade-ELISPOT-Assay auf MZ1851-RCC. Die IFN- γ -Sekretion ließ sich nahezu vollständig mit dem Gesamt-HLA-Klasse-I-Antikörper W6/32 sowie dem HLA-B/C-spezifischen Antikörper B123.2 blockieren. Gezeigt werden IFN- γ -Spots pro 10.000 T-Zellen und 25.000 „Target“-Zellen im 20h-IFN- γ -ELISPOT-Assay.

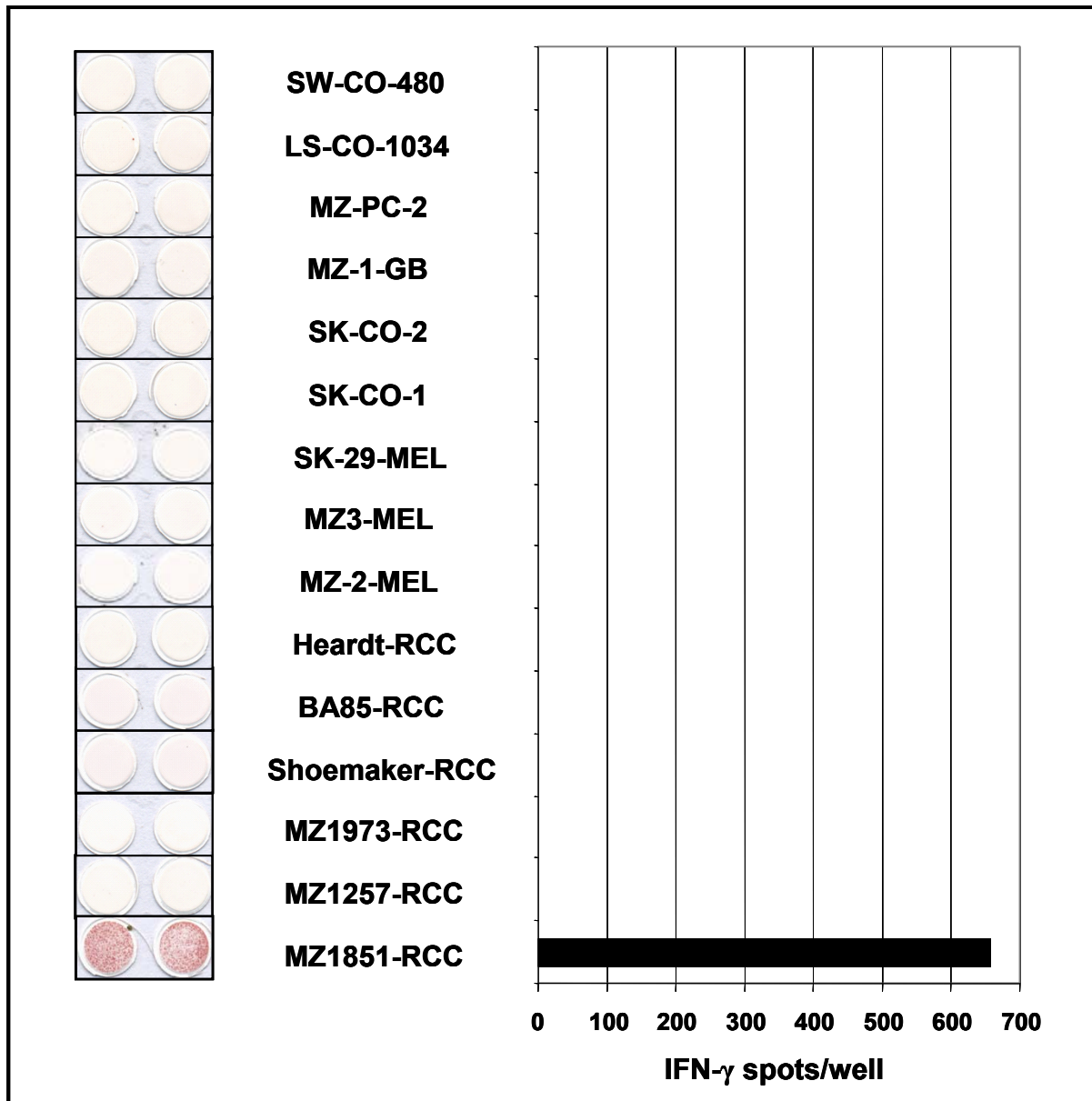


Abbildung 3.6: Kreuzreaktivitätsuntersuchungen mit CTL-Klon A4 gegen HLA-B7-, B44- und Cw7-positive Zielzellen. Mit Ausnahme der zur Stimulation der Responderlymphozyten eingesetzten Tumorzelllinie MZ1851-RCC wurden keine weiteren Zielzellen erkannt. Gezeigt werden IFN- γ -Spots pro 5.000 T-Zellen und 20.000 „Target“-Zellen im 20h-IFN- γ -ELISPOT-Assay.

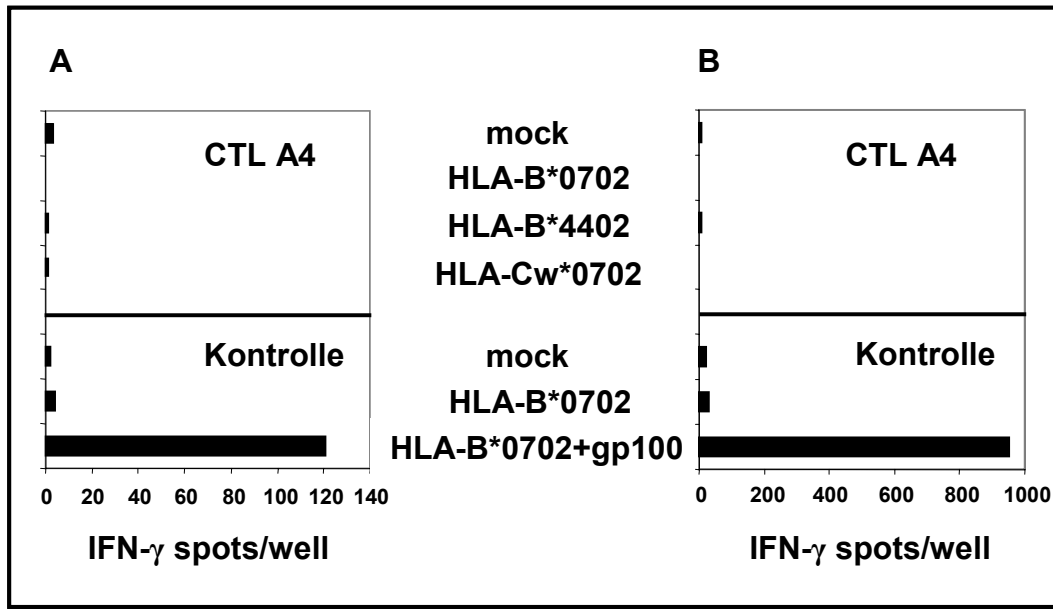


Abbildung 3.7: Analyse der Reaktivität des CTL-Klons A4 gegen HLA-B/C-Moleküle im Transfektions-Assay. A: Transfektion von cDNA verschiedener HLA-B/C-Moleküle aus MZ1851-RCC in 293T-Zellen. Die transfizierten HLA-Moleküle wurden von dem CTL-Klon A4 nicht als Zielstruktur erkannt. Eine cDNA von HLA-Cw*0704 stand für die Untersuchung nicht zur Verfügung.

Als Positivkontrolle wurden bekannte HLA-B7-restringierte T-Zellen, welche ein aus der cDNA von gp100-kodiertes Melanomentigen nach Kotransfektion mit HLA-B7-cDNA erkennen, verwendet.

B: Transfektion von cDNA verschiedener HLA-B/C-Moleküle aus MZ1851-RCC in COS-7-Zellen. Die transfizierten HLA-Moleküle wurden von dem CTL-Klon A4 nicht als Zielstruktur erkannt. Eine cDNA von HLA-Cw*0704 stand für die Untersuchung nicht zur Verfügung.

Die Positivkontrolle entspricht der Kontrolle in Abbildung 3.7 A. Gezeigt werden IFN- γ -Spots pro 10.000 T-Zellen und 20.000 „Target“-Zellen im 20h-IFN- γ -ELISPOT-Assay.

3.2.4 Detaillierte Untersuchungen zur Spezifität des HLA-B/C- restringierten CTL-Klons E77

Der CTL-Klon E77 erkannte die zur Stimulation eingesetzte Nierenzellkarzinomlinie MZ1851-RCC sowohl im ^{51}Cr -Zytotoxizitätstest als auch im 20h-IFN- γ -ELISPOT-Assay (siehe Abbildung 3.8 und 3.9). Mittels IFN- γ -Vorbehandlung der Tumorzellen wurde keine Steigerung der zytolytischen Aktivität beobachtet. Da die ebenfalls zur Stimulation der Responderlymphozyten verwendete EBV-transformierte B-Zelllinie AK-EBV-LCL keine IFN- γ -Freisetzung induzierte, gingen wir davon aus, daß die von CTL-E77 erkannte Zielstruktur selektiv auf der Tumorzelle exprimiert wird. Eine NK-Reaktivität konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, da keine zytotoxische Erkennung oder IFN- γ -Freisetzung in Gegenwart des NK-„Targets“ K562 beobachtet wurde. Im 20h-IFN- γ -

ELISPOT-Assay mit zuvor kryokonservierten PHA-Blasten aus dem Patienten MZ1851 zeigte lediglich eine schwache Reaktivität (siehe Abbildung 3.8), so daß zunächst eine tumorspezifische Reaktivität angenommen wurde. Zytotoxizitätsuntersuchungen mit neu generierten PHA-Blasten zeigten im Vergleich zur IFN- γ -ELISPOT-Analyse allerdings eine unerwartet hohe lytische Aktivität des CTL-Klons E77 gegen die neu generierten PHA-Blasten, welche sogar die Erkennung der Tumormlinie MZ1851-RCC übertraf (siehe Abbildung 3.9 B). Aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse war eine Alloreaktivität des CTL-Klons E77 anzunehmen. Dabei wurde eine T-Zellantwort ausgelöst, die vermutlich durch ein Peptidantigen hervorgerufen wurde, welches sowohl von dem Tumorgewebe als auch von gesunden Zellen des Patienten MZ1851 exprimiert wurde und es sich somit nicht um ein tumorassoziiertes Peptidantigen handelte. Blockadeexperimente mit spezifischen, gegen verschiedene HLA-Moleküle gerichtete, Antikörpern zeigten eine deutliche Reduktion der IFN- γ -Freisetzung unter Verwendung des Anti-HLA-Klasse-I-Antikörpers W6/32. Die Erkennung des CTL-Klons E77 gegen die Tumormlinie MZ1851-RCC nach Vorinkubation mit dem HLA-B/C-spezifischen Antikörper B123.2 war signifikant herabgesetzt und lieferte somit Hinweise auf eine HLA-B/C-Restriktion des CTL-E77 (siehe Abbildung 3.10).

Dieses Untersuchungsergebnis konnte durch nachfolgende Kreuzreaktivitätsexperimente bestätigt werden. In Abbildung 3.11 ist die Testung von CTL-Klon E77 gegen eine Auswahl verschiedener HLA-B/C-tragender allogener Zielzelllinien dargestellt. Dabei konnte eine Erkennung weiterer Nierenzellkarzinome, Kolonkarzinome und eines Melanoms durch den CTL-Klon E77 gezeigt werden. Auffällig war, daß alle erkannten allogenen Zielzelllinien ausschließlich HLA-Cw7 gemeinsam exprimierten, während HLA-B7 und HLA-B44 nicht auf allen „positiv“ getesteten Zielzellen vorhanden war. Dieses Ergebnis korrelierte zudem mit dem Resultat des Antikörper-Blockadeexperimentes, so daß eine HLA-Cw7-Restriktion des CTL E77 identifiziert wurde. Eine „Mismatch“-Reaktivität gegen HLA-Cw*0704 aufgrund der unterschiedlichen HLA-Suballele im HLA-Cw7-Locus zwischen dem Patienten und dem allogenen Fremdspender war im Hinblick darauf, daß ein Großteil der aus der MLTC 1851-5 generierten CTL-Klone ebenfalls HLA-Cw7 restringiert waren, wahrscheinlich.

Als nächster Schritt wurden Transfektionsexperimente auf die Erkennung der von MZ1851-RCC exprimierten HLA-B*0702, HLA-B*4402 und HLA-Cw*0702 mit 293T- und

COS-7-Zellen durchgeführt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in der Abbildung 3.12 graphisch dargestellt. Dabei wurden die transfizierten cDNA-kodierten HLA-Moleküle nicht von CTL-E77 erkannt. Eine Positivkontrolle mit bekannten HLA-B7-restringierten T-Zellen, welche ein aus der cDNA von gp100-kodiertes Melanomantigen nach Kotransfektion mit der HLA-B7-cDNA erkennen, zeigte, daß die für die Untersuchung verwendeten 293T- und COS-7-Zielzellen mit der cDNA verschiedener HLA-Moleküle transfizierbar waren und daraus funktionale HLA-Moleküle auf der Zelloberfläche exprimiert wurden. Die für die Positivkontrolle eingesetzten T-Zellen, sowie die erforderlichen cDNA-Moleküle, wurden von Dr. V. Lennerz und Prof. Dr. T. Wölfel zur Verfügung gestellt.

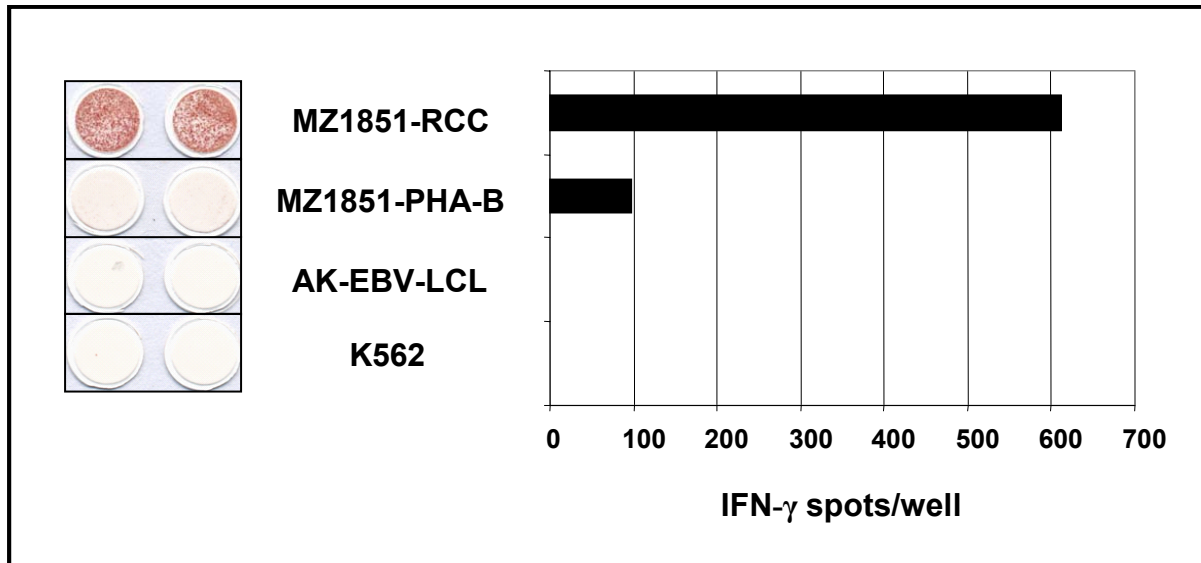


Abbildung 3.8: Reaktivitätsanalyse des CTL-Klons E77 im 20h-IFN- γ -ELISPOT-Assay gegen MZ1851-RCC, PHA-Blasten des Patienten MZ1851, AK-EBV-LCL und dem NK-„Target“ K562. Gezeigt werden IFN- γ -Spots pro 5.000 T-Zellen und 20.000 Zielzellen.

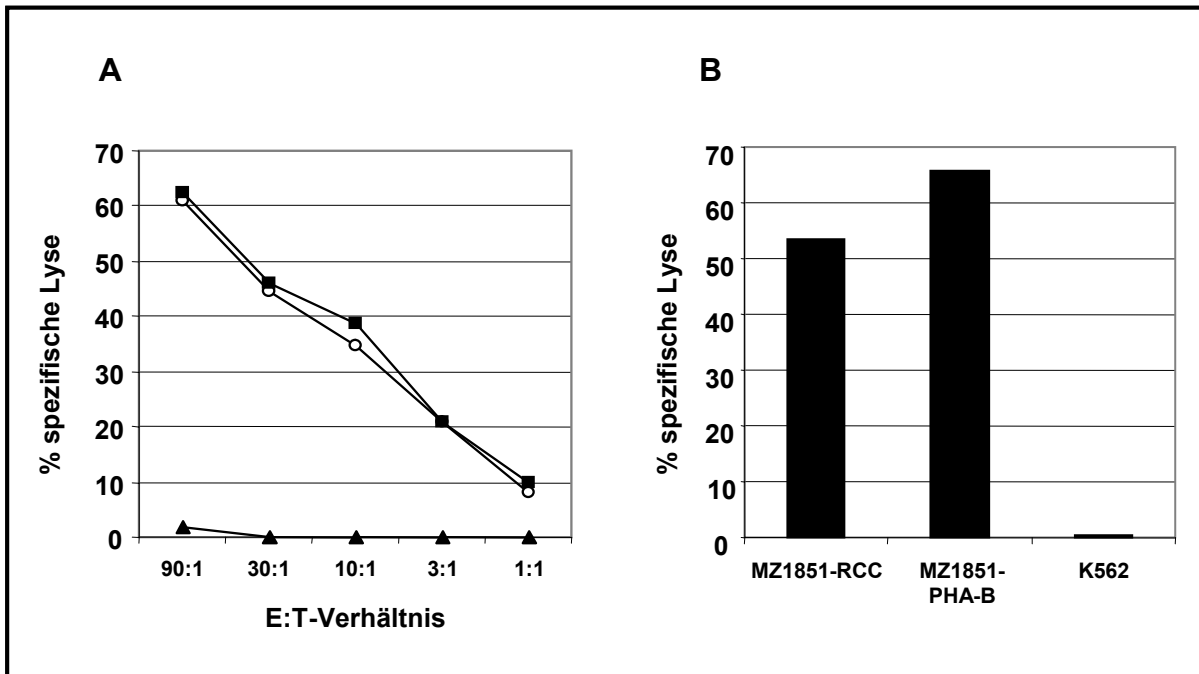


Abbildung 3.9: ^{51}Cr -Freisetzungstest mit CTL-Klon E77

A: Spezifische Lyse (%) im 4h-Zytotoxizitätstest gegen die Zielzellen MZ1851-RCC \emptyset IFN- γ (■), MZ1851-RCC mit 100IU/ml IFN- γ (○) und das NK-„Target“ K562 (▲) bei verschiedenen Effektor/Target-Verhältnissen. B: Spezifische Lyse (%) im 4h-Zytotoxizitätstest gegen die Zielzellen MZ1851-RCC, PHA-Blasten aus dem Patienten MZ1851 und NK-Zellen K562 bei einem Effektor/Target-Verhältnis von 30:1.

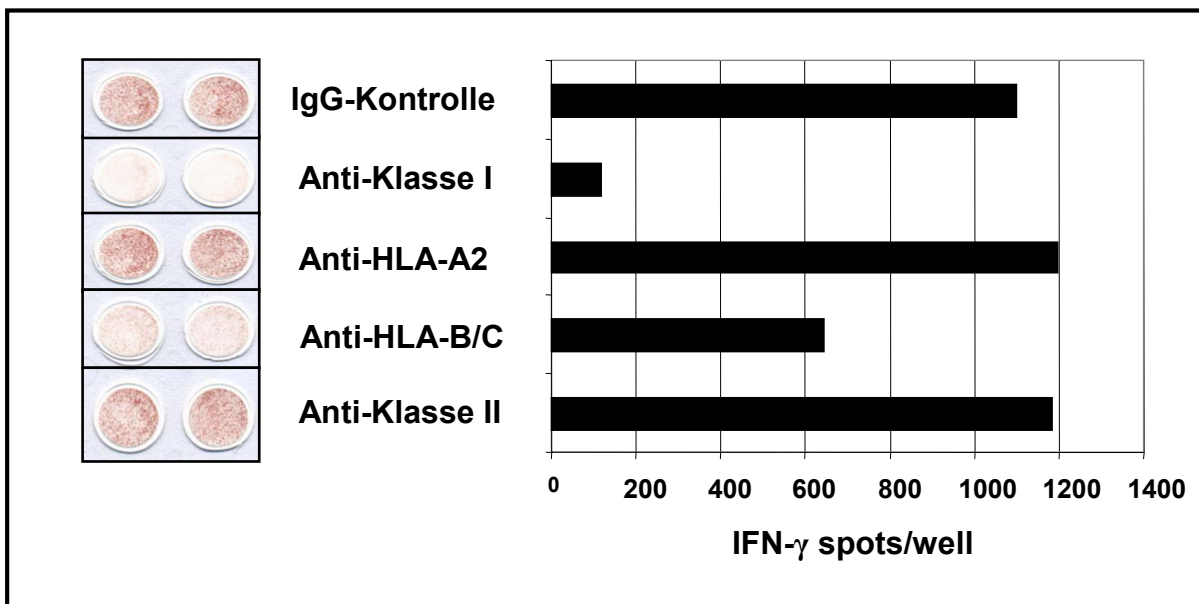


Abbildung 3.10: Ermittlung der HLA-Restriktion des CTL-Klons E77 durch Antikörper-Blockade-ELISPOT auf MZ1851-RCC. Die IFN- γ -Sekretion ließ sich mit dem Gesamt-HLA-Klasse-I-Antikörper W6/32 sowie dem HLA-B/C-spezifischen Antikörper B123.2 blockieren. Gezeigt werden IFN- γ -Spots pro 10.000 T-Zellen und 25.000 „Target“-Zellen im 20h-IFN- γ -ELISPOT-Assay.

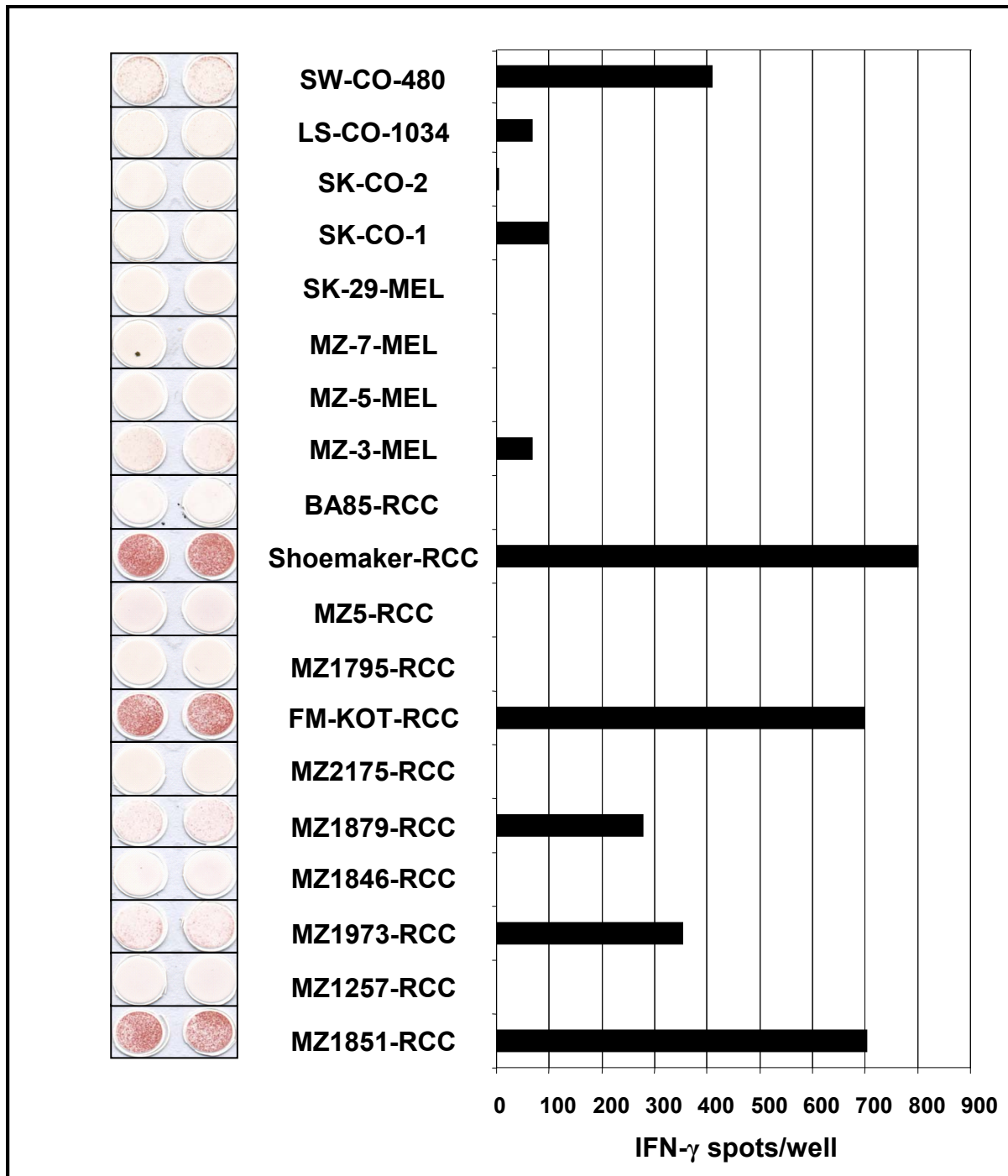


Abbildung 3.11: Kreuzreaktivitätsuntersuchungen mit CTL-Klon E77 gegen HLA-Cw7-positive Zielzellen. Neben der zur Stimulation der Responderlymphozyten eingesetzten Tumorzelllinie MZ1851-RCC wurden weitere HLA-Cw7-tragende Zielzellen erkannt. Gezeigt werden IFN- γ -Spots pro 5.000 T-Zellen und 20.000 „Target“-Zellen im 20h-IFN- γ -ELISPOT-Assay. Von HLA-Cw7-negativen Zielzelllinien, auf denen die von Spender und Nierzellkarzinompatient gemeinsam exprimierte HLA-B-Allele B*0702 und B*4402 vorhanden waren, wurde keine Zelllinie erkannt (Daten nicht gezeigt).

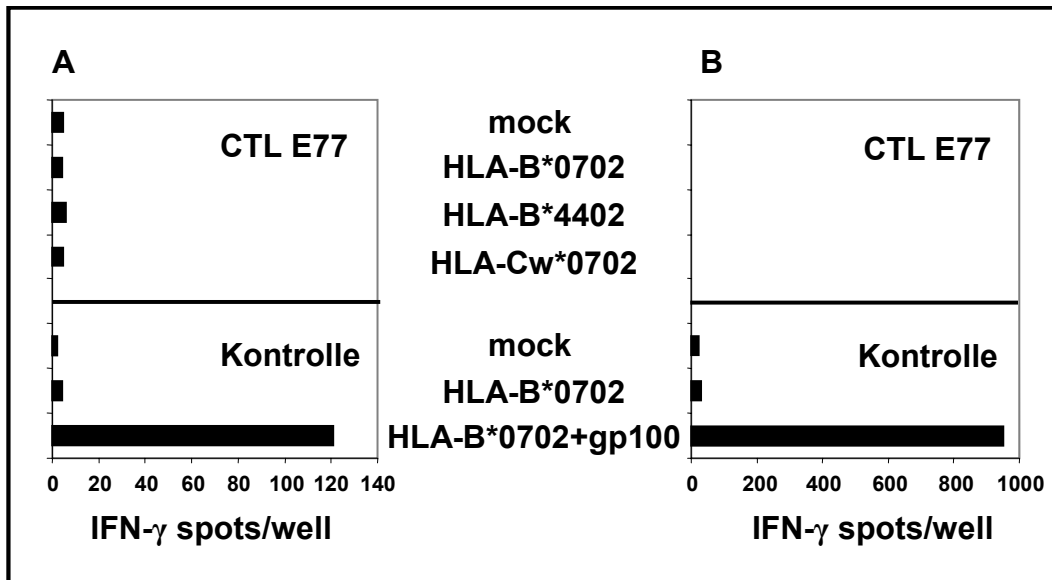


Abbildung 3.12: Analyse der Reaktivität des CTL-Klons E77 gegen HLA-B/-C-Moleküle im Transfektions-Assay. A: Transfektion von cDNA verschiedener HLA-B/C-Moleküle aus MZ1851-RCC in 293T-Zellen. Die transfizierten HLA-Moleküle wurden von dem CTL-Klon E77 nicht als Zielstruktur erkannt. Eine cDNA von HLA-Cw*0704 stand für die Untersuchung nicht zur Verfügung.

Als Positivkontrolle wurden bekannte HLA-B7-restringierte T-Zellen, welche ein aus der cDNA von gp100-kodiertes Melanomantigen nach Kotransfektion mit HLA-B7-cDNA erkennen, verwendet.

B: Transfektion von cDNA verschiedener HLA-B/C-Moleküle aus MZ1851-RCC in COS-7-Zellen. Die transfizierten HLA-Moleküle wurden von dem CTL-Klon E77 nicht als Zielstruktur erkannt. Eine cDNA von HLA-Cw*0704 stand für die Untersuchung nicht zur Verfügung.

Die Positivkontrolle entspricht der Kontrolle in Abbildung 3.12 A. Gezeigt werden IFN- γ -Spots pro 10.000 T-Zellen und 20.000 „Target“-Zellen im 20h-IFN- γ -ELISPOT-Assay.

3.3 Biochemische Aufreinigung der von den CTL-Klonen erkannten Peptidantigene

3.3.1 Immunchromatographie

Im Folgenden sollten exemplarisch die von dem HLA-B*0702-restringierten CTL-Klon A4 und dem gegen das HLA-Cw*0704 gerichteten „Mismatch“ CTL-Klon E77 erkannten, natürlich prozessierten Peptidantigene biochemisch aufgereinigt und massenspektrometrisch sequenziert werden. Zur immunchromatographischen Aufreinigung von HLA-Peptid-Komplexen war es zunächst notwendig, die Nierenzellkarzinomzelllinie MZ1851-RCC auf hohe Zellzahlen zu expandieren. Aus diesem Grund wurden die Tumorzellen in sogenannten Zellkultur-Wannestapel kultiviert. Nachdem eine Zellzahl

von etwa $1,2 \times 10^{10}$ Zellen erreicht worden war, wurde ein Detergenslysat der Zellen hergestellt, in dem zur Vermeidung von Proteinaseaktivität entsprechende Inhibitoren enthalten waren. Durch eine Ultrazentrifugation war es möglich, die im Detergenslysat enthaltenen HLA-Peptid-Komplexe von weiteren Zellbestandteilen wie beispielsweise Membranresten oder Lipiden zu trennen. Die immunchromatographische Präparation der Komplexe erfolgte anschließend über Protein-A-Sepharose-Säulen, welche zur Vorbereitung mit gegen spezifische HLA-Moleküle gerichtete Antikörper beladen wurden. Dazu wurde das Lysat über insgesamt drei hintereinandergeschaltete Protein-A-Sepharose-Säulen zirkuliert (siehe Abbildung 3.13). Die erste Säule fungierte als Vorsäule zur Aufreinigung residueller Zellbestandteile, während die zweite Säule mit einem irrelevanten anti-HLA-A24-Antikörper (α -HLA-A24) beladen war. Die dritte Protein-A-Sepharose-Säule enthielt zur Präparation der gesuchten HLA-B/C-Peptid-Komplexe den anti-HLA-B/C-Antikörper B123.2.

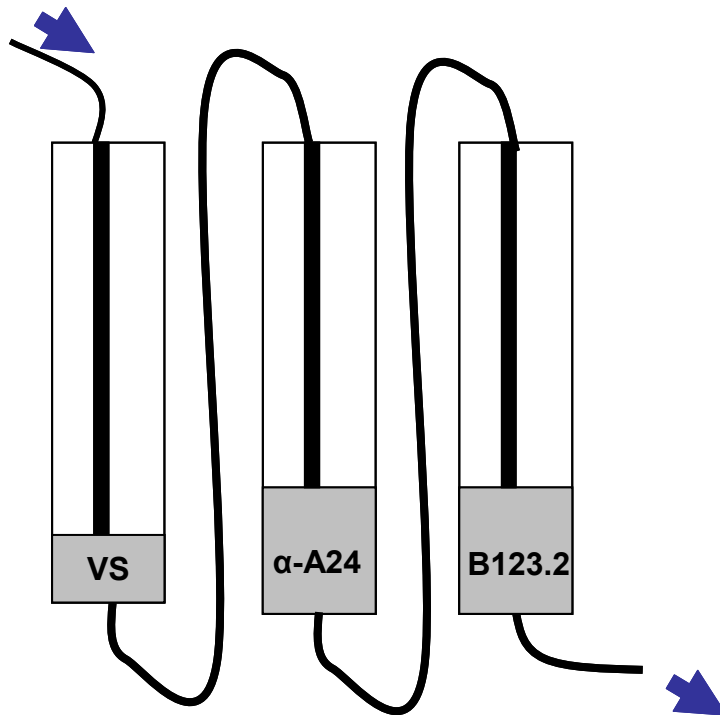


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung des experimentellen Versuchsaufbaus bei der Immunchromatographie. VS = Vorsäule, α -A24 = irrelevanter anti-HLA-A24-Antikörper und B123.2 = relevanter anti-HLA-B/C-Antikörper.

3.3.2 Nachweis aufgereinigter HLA-Moleküle mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um während der Immunchromatographie aufgereinigte HLA-B/C-Moleküle nachzuweisen, wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Dazu wurde ein Aliquot aus der HLA-B/C-Chromatographiesäule vor der Säureelution (Sephrose-beads) entnommen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Durch Absenkung des pH-Wertes auf 2,0 mittels Essigsäure während der Säureelution können die HLA-assoziierten Peptide aus dem aus den α -Ketten und β_2 -Mikroglobulin bestehenden HLA-Komplex dissoziiert werden. Mittels einer 10kD-Ultrazentrifugation erfolgte anschließend eine Abtrennung der Peptide (Filtrat) von den α -Ketten und dem β_2 -Mikroglobulin (Retentat). Ein Aliquot des Retentats nach der Ultrazentrifugation wurde ebenfalls gelelektrophoretisch aufgetrennt. Desweiteren wurde zur Kontrolle reiner B123.2-Antikörper mitgeführt. Im SDS-Gel waren die einzelnen dissoziierten Domänen des Antikörpers, bestehend aus der IgG schweren Kette mit einem Molekulargewicht von ca. 50kD und der IgG leichten Kette mit einem Molekulargewicht von etwa 22kD deutlich erkennbar. Diese Proteinbanden konnten erwartungsgemäß sowohl in der aus der B123.2-Chromatographiesäule stammenden Probe, als auch in der Retentatprobe nach der Ultrazentrifugation nachgewiesen werden. Zusätzlich zu den dissoziierten Antikörper-Domänen war im Retentat eine weitere schwache Proteinbande mit einem Molekulargewicht von etwa 44kD erkennbar, bei der es sich um die HLA- α -Kette handelte, so daß während der Immunchromatographie HLA-B/C-Moleküle aufgereinigt werden konnten.

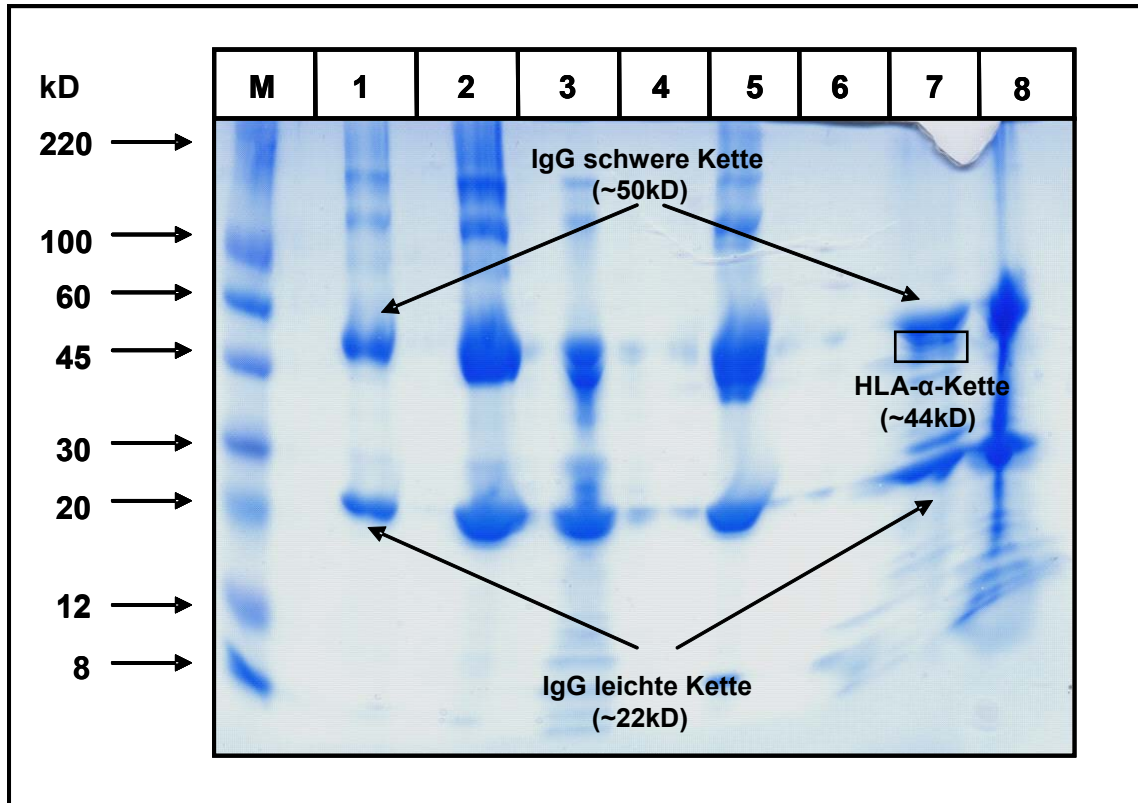


Abbildung 3.14: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Präparationen aus der Immunchromatographie. M = Molekulargewichtsmarker Cytochrom Western Control, 1 = reiner B123.2-Antikörper (5 μ g), 2 = reiner B123.2-Antikörper (10 μ g), 3 = B123.2-Antikörper 1:1 mit Essigsäure versetzt (5 μ g), 4 = freie Gelspur, 5 = Sepharose-beads aus B123.2 Chromatographiesäule (10 μ l), 6 = freie Gelspur, 7 = Retentat aus Centricon-Ultrazentrifugation (5 μ l) und 8 = Retentat aus Centricon-Ultrazentrifugation (10 μ l).

3.3.3 Auftrennung der natürlichen Peptidliganden mittels „reverse phase“ HPLC

Nach der immunchromatographischen Säulenaufreinigung der HLA-B/C-Moleküle und der Säuredissoziation der HLA-Peptid-Komplexe folgte die Fraktionierung der durch Ultrazentrifugation filtrierten natürlichen HLA-Peptidliganden mittels einer „reverse phase“-HPLC. Das Prinzip der HPLC-Fraktionierung beruht auf der reversiblen Bindung der natürlichen Peptidliganden an eine μ RPC-C2/C18-HPLC-Säule und anschließender Dissoziation dieser in Abhängigkeit ihrer chemischen Eigenschaften mittels eines ansteigenden Acetonitrilgradienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Um den Eluationszeitpunkt von der HPLC-Säule des unterschiedlichen Peptidmaterials dokumentieren zu können, wurde ein UV-Absorptionsverlauf bei einer Wellenlänge von

214nm aufgenommen (siehe Abbildung 3.15). Das UV-Spektrum zeigte an, bei welcher Acetonitrilkonzentration Peptide von der HPLC-Säule abdissoziierten. Insbesondere im Bereich zwischen der 20. und der 60. Minute traten zahlreiche Absorptionsmaxima auf. Die einzelnen HPLC-Peptidfraktionen wurden anschließend für die weiteren auf Antigenerkennung geplanten Biotests sowie massenspektrometrische Untersuchungen zweigeteilt.

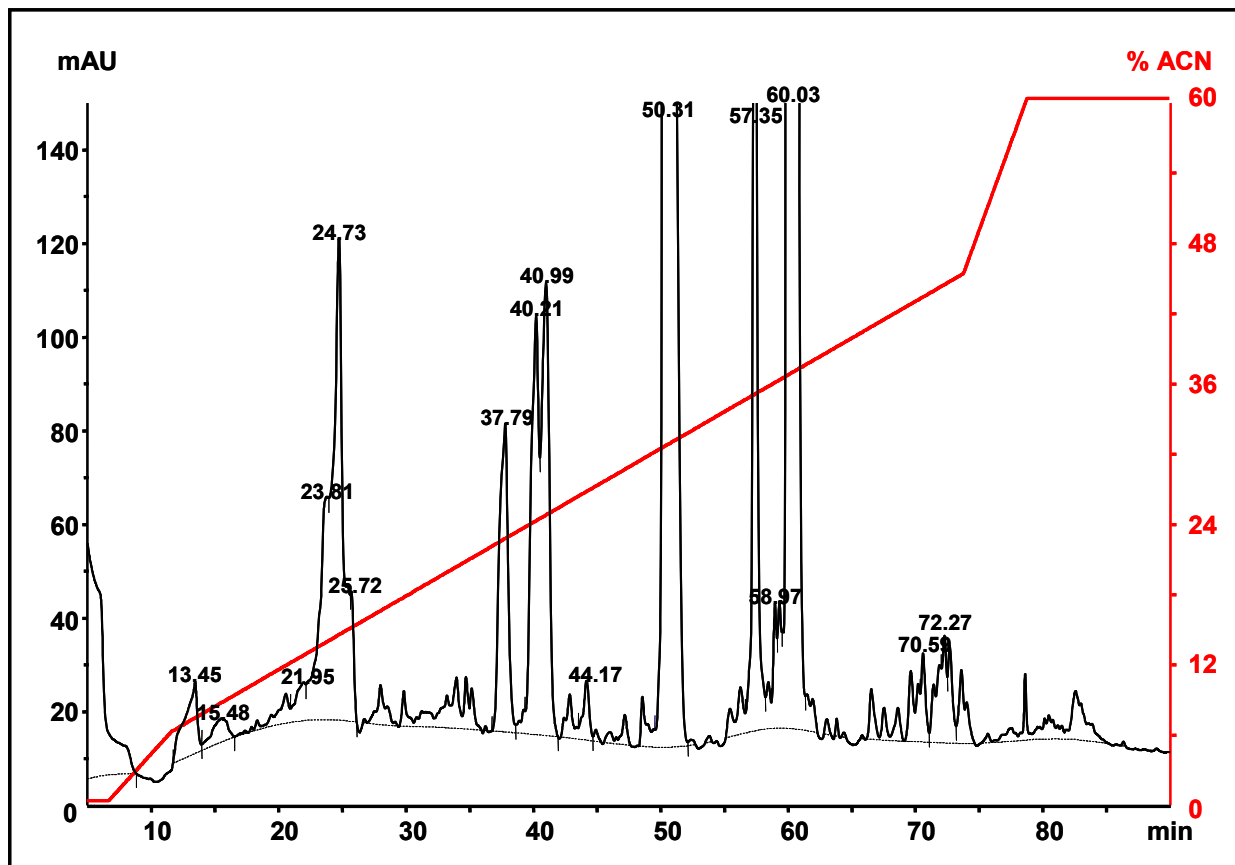


Abbildung 3.15: Separation der HLA-B/C-assoziierten natürlichen Peptidliganden aus MZ1851-RCC durch „reverse phase“-HPLC (UV-Spektrum bei 214nm Wellenlänge, Einheit AU = Absorbing Unit). Zusätzlich ist die prozentuale Acetonitril-Konzentration (ACN) im zeitlichen Verlauf eingetragen.

3.3.4 Zytotoxizitätstest mit den HPLC-Fractionen

Die Peptidliganden der einzelnen HPLC-Fractionen aus HLA-B/C-Molekülen von MZ1851-RCC wurden mit verschiedenen T2-Zellen inkubiert, die mit HLA-B*0702, HLA-B*4402 oder HLA-Cw*0702 stabil transfiziert waren. Die so beladenen T2-HLA-Transfektanten wurden mit den entsprechend HLA-restringierten CTL-Klonen auf Lyseinduktion überprüft. Um die in niedriger Konzentration vorliegenden HLA-assoziierten Peptidliganden der HPLC-Fractionen auf den T2-HLA-„Target“-Zellen effektiv präsentieren zu können, war es notwendig, die bereits mit den HLA-Komplexen assoziierten Autopeptidliganden der T2-Transfektanten zu verdrängen. Mittels einer Vorinkubation eines anti-HLA-spezifischen Antikörpers kann die Präsentation solcher exogenen Peptidliganden optimiert werden. Dieses Prinzip wurde bereits anhand des anti-HLA-A2-Antikörpers MA2.1 beschrieben.¹⁴² Ein solcher Effekt konnte unter Verwendung des anti-HLA-Klasse-I-Antikörpers W6/32 auch für HLA-B-Moleküle bestätigt werden. Dazu wurden mit W6/32 vorbehandelte sowie unbehandelte Zellen der T2-HLA-B*0702-Transfektante mit einem HLA-B7-Peptidantigen vorinkubiert und anschließend durch einen CTL-Klon, welcher dieses Peptid in Assoziation mit dem HLA-B7-Molekül erkennt, auf zytotoxische Aktivität hin überprüft (siehe Abbildung 3.16). Aufgrund der verbesserten CTL-Erkennung von mit W6/32 vorbehandelten Zielzellen wurden für die folgenden Zytotoxizitätstests regelmäßig mit W6/32 vorbehandelte T2-HLA-Transfektanten verwendet.

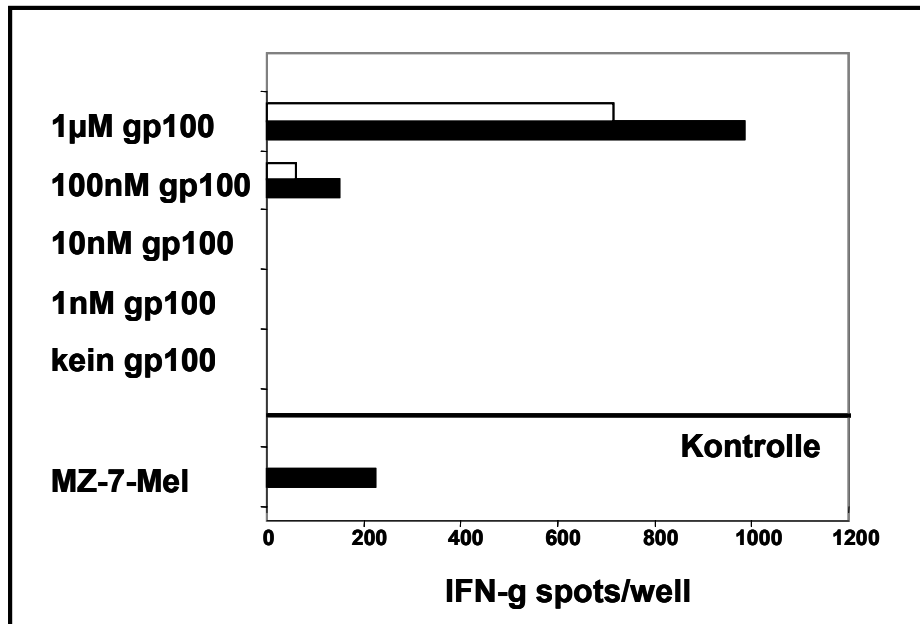


Abbildung 3.16: Die Vorinkubation einer T2-B*0702-Transfektante mit dem Gesamt-HLA-Klasse-I-Antikörper W6/32 führte zur Steigerung der Erkennung des HLA-B7-bindenden gp100-Peptidantigens durch den HLA-B*0702-restringierten CTL-12/45. „□“ Vorbehandlung der T2-B*0702-Transfektante ohne Antikörper. „■“ Vorbehandlung der T2-B*0702-Transfektante mit dem Gesamt-HLA-Klasse-I-Antikörper W6/32. Der Antikörper wurde in einer Konzentration von 100µg/ml eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde die Melanomzelllinie MZ-7-Mel mitgeführt. Gezeigt werden IFN-γ-Spots pro 10.000 T-Zellen und 50.000 „Target“-Zellen im 20h-IFN-γ-ELISPOT-Assay. Das Peptid und der CTL-Klon 12/45 wurden von Dr. V. Lennerz und Prof. Dr. T. Wölfel zur Verfügung gestellt.

3.3.4.1 Screening der HLA-B/C-assoziierten natürlichen RCC-Peptide mit dem CTL-Klon A4

Unser erstes Ziel war es, das natürlich prozessierte Peptidantigen des HLA-B/C-restringierten CTL-Klons A4 zu identifizieren. Da das exakte Restriktionselement dieses CTL-Klons in vorangegangenen Experimenten nicht eindeutig identifiziert werden konnte, wählten wir als antigenpräsentierende Zellen zunächst T2-HLA-Cw*0702- und T2-HLA-B*0702-Zellen. Die T2-„Target“-Zellen wurden mit etwa $2,5 \times 10^8$ Zelläquivalenten der HPLC-Peptidfraktionen beladen. Als Kontrollen wurde sowohl die Tumorzelllinie MZ1851-RCC, welche bei einem E:T-Verhältnis von 30:1 zu ca. 89% lysiert wurde (Daten nicht gezeigt), als auch unbeladene T2-Transfektanten, welche von dem CTL-Klon A4 nicht lysiert wurden, mitgeführt. Das Testergebnis mit T2-HLA-Cw7-transfizierten Zellen zeigte keine eindeutig bioaktive HPLC-Fraktion (siehe Abbildung

3.17), so daß das HLA-Cw7 als mögliches Restriktionselement ausgeschlossen wurde. In dem Testansatz, in dem T2-HLA-B*0702-transfizierte Zellen eingesetzt wurden, konnte hingegen eine signifikante Bioaktivität der HPLC-Fraktion C10 nachgewiesen werden, welche eine lytische Aktivität von 54% induzierte (siehe Abbildung 3.18). Die benachbarte HPLC-Fraktion C9 zeigte zudem eine sehr geringe Bioaktivität von ca. 4% Lyse und ließ vermuten, daß geringe Mengen des antigenen Peptids in diese HPLC-Fraktion eluiert worden waren. Auffällig war, daß in beiden Versuchsansätzen Lysen im Bereich der HPLC-Fractionen zwischen der 80. und 88. Minute auftraten, was auf eine unspezifische lytische Aktivität bei hohen Acetonitril-Konzentrationen hinwies.

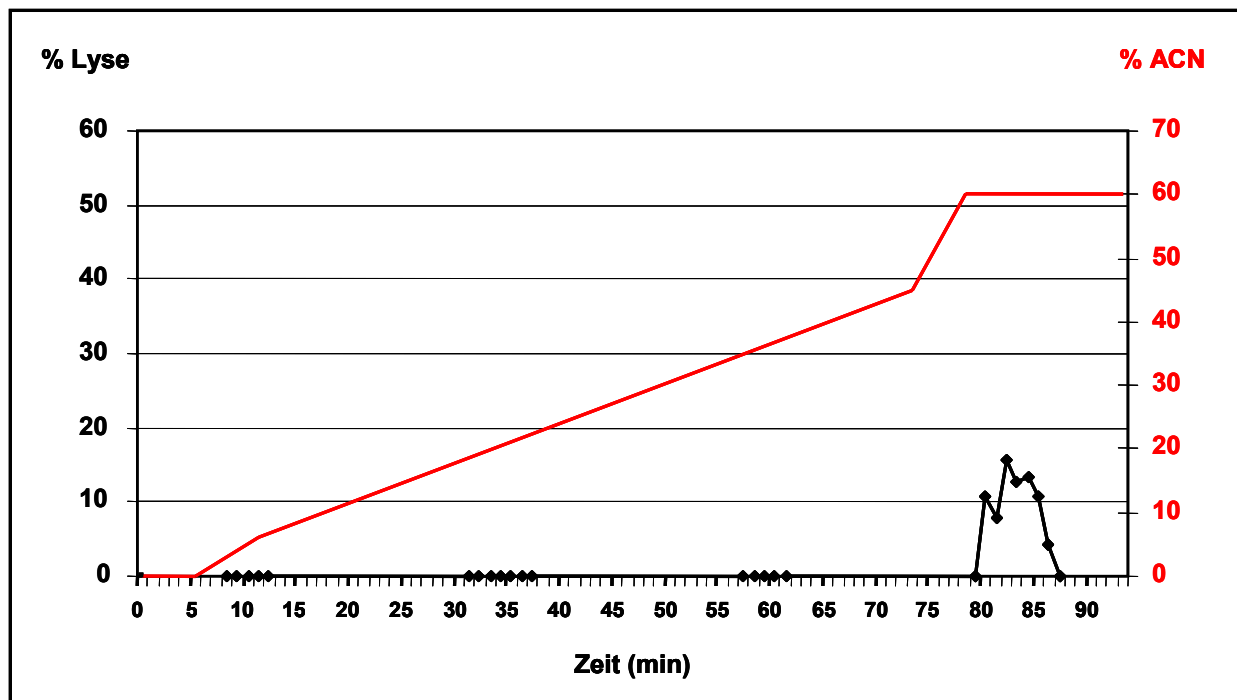


Abbildung 3.17: Screening der „reverse phase“-HPLC-fractionierten HLA-B/C-assoziierten natürlichen MZ1851-RCC-Peptide mit dem CTL-Klon A4. Zur Peptidpräsentation wurden T2-HLA-Cw*0702-transfizierte Zellen nach Vorinkubation mit dem anti-HLA-Klasse-I-Antikörper W6/32 eingesetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe der natürlichen RCC-Peptide und Testung mittels CTL-Klon A4 im 6h-Zytotoxizitätstest. Das Effektor/Target-Verhältnis lag bei 30:1.

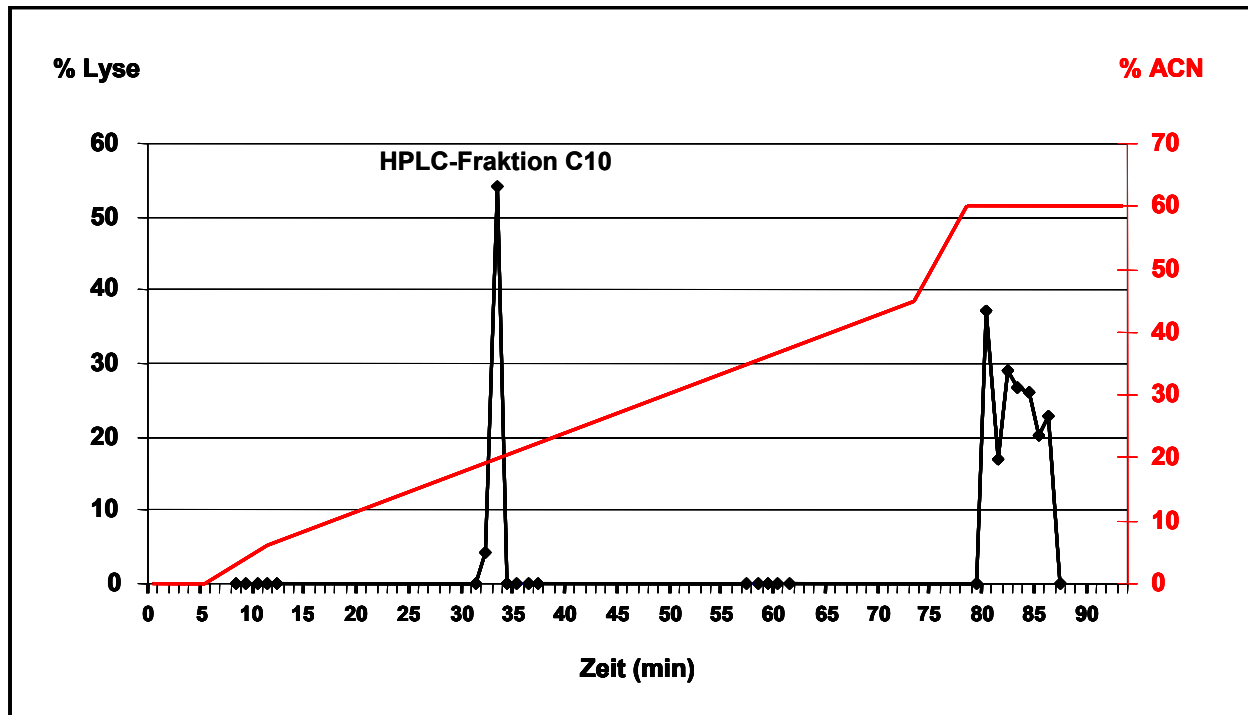


Abbildung 3.18: Screening der „reverse phase“-HPLC-fraktionierten HLA-B/C-assozierten natürlichen MZ1851-RCC-Peptide mit dem CTL-Klon A4. Zur Peptidpräsentation wurden T2-HLA-B*0702-transfizierte Zellen nach Vorinkubation mit dem anti-HLA-Klasse-I-Antikörper W6/32 eingesetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe der natürlichen RCC-Peptide und Testung mittels CTL-Klon A4 im 6h-Zytotoxizitätstest. Das Effektor/Target-Verhältnis lag bei 30:1.

3.3.4.2 Screening der HLA-B/C-assozierten natürlichen RCC-Peptide mit dem CTL-Klon E77

Die einzelnen HPLC-Fractionen der HLA-B/C-bindenden Peptidliganden aus dem Nierenzellkarzinom MZ1851-RCC wurden mit HLA-Cw*0702-transfizierten T2-Zellen inkubiert und anschließend mit dem CTL-Klon E77 auf Bioaktivität getestet. Dabei wurde aus vorangegangenen Untersuchungen vermutet (siehe Abbildung 3.11), daß CTL-E77 das zwischen Spender und MZ1851-RCC disparate HLA-Cw*0704 als „Mismatch“-Antigen erkennt. Die mit W6/32-vorbehandelten T2-Zellen wurden mit tumoreluierten Peptiden aus etwa $2,5 \times 10^8$ Zelläquivalenten beladen. Die Tumormlinie MZ1851-RCC als Kontrolle zeigte bei einem E:T-Verhältnis von 30:1 eine Zytolyse von ca. 33%, während die unbeladenen HLA-Cw7-transfizierten T2-Zellen zu etwa 3% lysiert wurden (Daten nicht gezeigt). Das Ergebnis des Zytotoxizitätstest ist in der Abbildung 3.19 dargestellt und zeigte keine signifikant hohe lytische Aktivität in einer der untersuchten HPLC-

Fractionen, welche somit für massenspektrometrische Untersuchungen zur Identifizierung des Alloantigens ungeeignet waren.

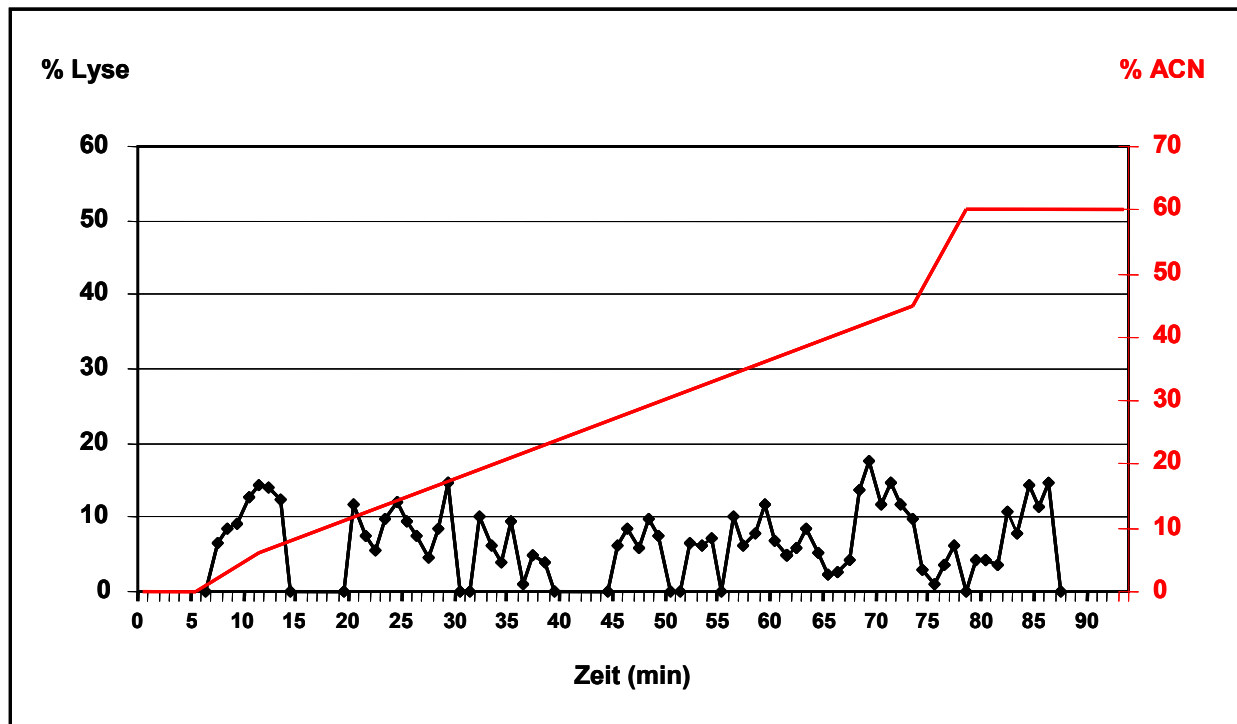


Abbildung 3.19: Screening der „reverse phase“-HPLC-fractionierten HLA-B/C-assozierten natürlichen MZ1851-RCC-Peptide mit dem CTL-Klon E77. Zur Peptidpräsentation wurden T2-HLA-Cw*0702-transfizierte Zellen nach Vorinkubation mit dem anti-HLA-Klasse-I-Antikörper W6/32 eingesetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe der natürlichen RCC-Peptide und Testung mittels CTL-Klon E77 im 6h-Zytotoxizitätstest. Das Effektor/Target-Verhältnis lag bei 30:1.

3.4 Massenspektrometrische Bestimmung der natürlichen HLA-B7-assozierten Peptidliganden

Die mit Hilfe der Immunchromatographie aufgereinigten und durch eine anschließende HPLC-Untersuchung fraktionierten natürlichen HLA-B*0702-assozierten MZ1851-RCC-Peptide sollten massenspektrometrisch charakterisiert werden. In der HPLC-Fraktion C10 war das natürlich prozessierte HLA-Klasse-I-assozierte Peptidantigen für den CTL-Klon A4 enthalten, da durch Zytotoxizitätsuntersuchungen eine signifikante Bioaktivität in dieser HPLC-Fraktion nachweisbar war (siehe Abbildung 3.18). Die jeweils benachbarten Peptidfraktionen zeigten hingegen keine oder im Falle der HPLC-Fraktion

C9 nur eine geringe (ca. 4% Lyse) Bioaktivität. Aus diesem Grunde sollten mit der MALDI-MS (*matrix assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry*)-Technik Massenspektren von den bioaktiven HPLC-Fractionen und den benachbarten, nicht bioaktiven, Peptidfraktionen (Fraktionen C8-C11) erstellt werden, um das HLA-B7-assoziierte Peptidantigen für den CTL-Klon A4 zu identifizieren. Die folgenden Untersuchungen zur Sequenzierung der Peptidliganden erfolgten in Kooperation mit Frau Dr. S. Hack aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Karas (Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Frankfurt am Main). Zur Minderung der Komplexität innerhalb der einzelnen HPLC-Fractionen wurde zunächst eine Kapillar-Flüssigkeitschromatographie (*Cap-LC*) der einzelnen HPLC-Fractionen durchgeführt, indem der Konzentrationsanstieg für Lösung B von 1% pro Minute auf 0,5% pro Minute und das Zeitintervall für die Fraktionierung von 60 auf 20 Sekunden reduziert wurde. Nachdem die so erhaltenen Subfraktionen auf einen Edelstahlprobeteller aufgebracht und eingetrocknet wurden, konnten diese der massenspektrometrischen Analyse im MALDI-TOF/TOF-Gerät zugeführt werden.

Das Prinzip des MALDI-Verfahrens beruht darauf, daß die zu untersuchende Probe zunächst mit einer Matrix kleiner, UV-absorbierender Moleküle kristallisiert und mit Laserenergie durch ein Proton (H^+) ionisiert wird. Die dadurch entstandenen und in die Gasphase überführten Ionen werden anschließend über ein elektrisches Feld beschleunigt und im Hochvakuum zum Fliegen angeregt.^{147;148} Durch Bestimmung der Flugzeit mit Hilfe eines Flugzeitmassenanalysators (TOF, *time of flight*) wird die Masse der Ionen bestimmt.^{149;150} Dabei erhält man direkt die Masse der in der Probe enthaltenen Peptide, da beim Ionisierungsschritt nur einfach positiv geladene Ionen auftreten. Aufgrund der Häufigkeit, mit der einzelne Massen auftreten, sind außerdem Rückschlüsse möglich, wie häufig eine bestimmte Masse und damit ein bestimmtes Peptid in der Fraktion enthalten ist.

Bei der MALDI-Analyse der einzelnen durch die *Cap*-LC aufgereinigten Subfraktionen erhielten wir zunächst eine Kandidatenliste der einzelnen Massen, von denen jede detektierte Masse ein potentiell Peptid darstellte. Einzelne Massenpeaks mit hoher Intensität wurden anschließend selektioniert und fragmentiert. Nach Fragmentation konnte die Aminosäuresequenz anhand der Massen der entstandenen Bruchstücke durch computergestützte Datenbanken ermittelt werden. Dieses Verfahren ist exemplarisch anhand des Massenpeaks 982,566 aus der HLA-B/C-HPLC-Fraktion C10 in den Abbildungen 3.20 und 3.21 dargestellt :

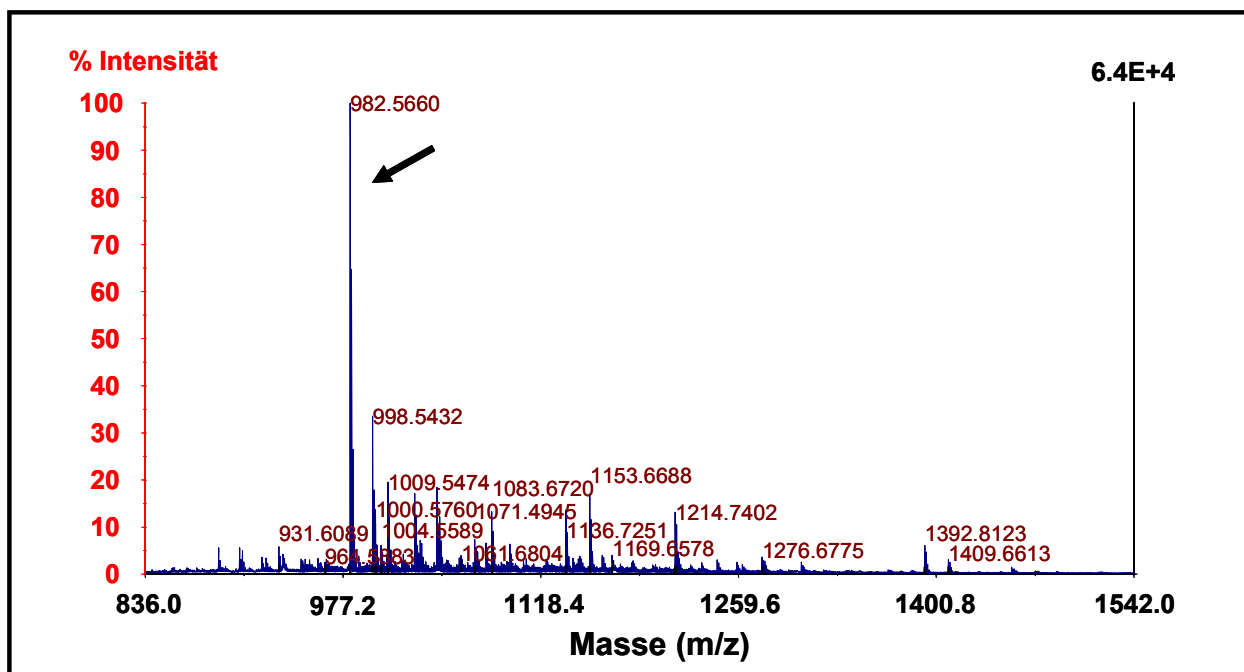


Abbildung 3.20: MALDI-MS-Spektrum der HLA-B/C-Peptidliganden von MZ1851-RCC in der HPLC-Fraktion C10 (Massen von 836 bis 1542 Dalton). Aufgetragen sind die Massen der einzelnen Peptide gegen ihre relative Häufigkeit in der Probe zum Zeitpunkt der Messung. Der Massenpeak 982,566 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

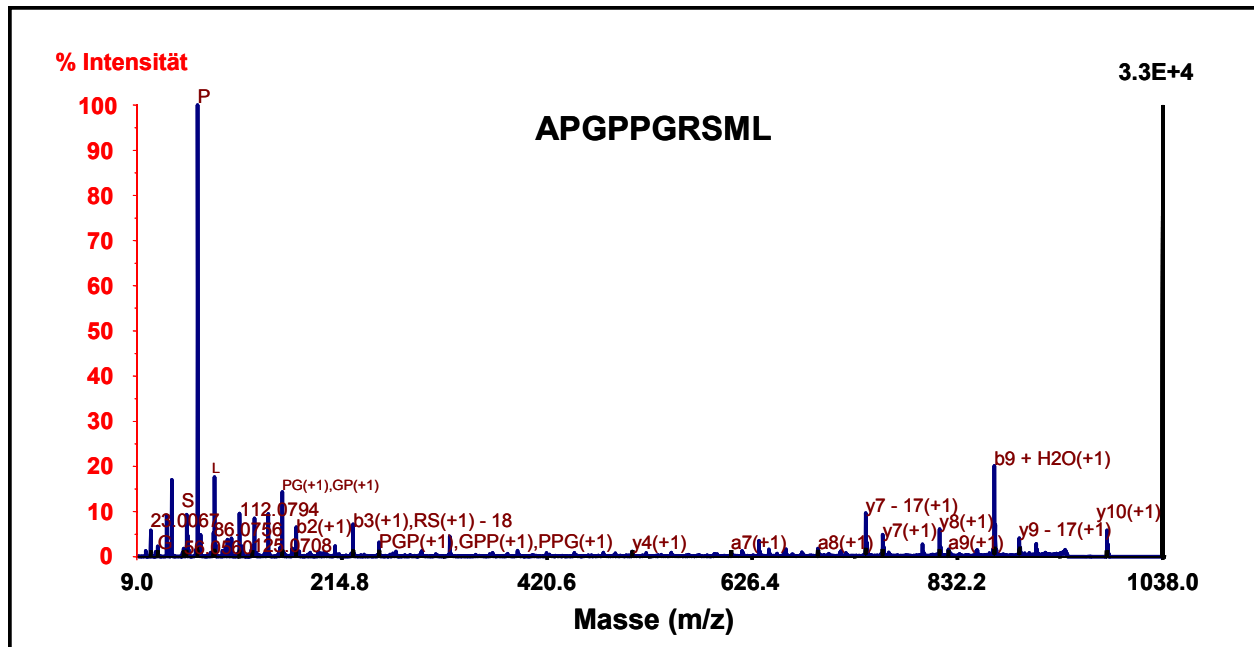


Abbildung 3.21: MALDI-TOF/TOF-Fragmentmuster des Massenpeaks 982,566 aus der HPLC-Fraktion C10 der HLA-B/C-assoziierten Peptidliganden der Tumorzelllinie MZ1851-RCC. Eine Ermittlung der Aminosäuresequenz APGPPGRSML war anhand der einzelnen Massen der Peptidbruchstücke möglich.

Mit Hilfe der MALDI-TOF/TOF-Analyse der HPLC-Frakturen C8-C11 konnten zahlreiche natürliche HLA-B/C-assoziierte Peptidliganden aus der Nierenzellkarzinomlinie MZ1851-RCC identifiziert werden (siehe Tabelle 3.5-3.8). Dabei stellten die Peptide aus der HPLC-Fraktion C10 potentielle Epitope für den CTL-Klon A4 dar. Homologievergleiche dieser experimentell ermittelten Peptide mit im Internet zugänglichen Datenbanken zeigten, daß diese Peptide aus Proteinen, welche im humanen Genom kodiert sind, prozessiert werden.

Masse (D)	Peptidsequenz	Proteinname	Position	Protein-bezeichnung
1082,6	APSQGRPGLSL	Collagen alpha-1(VI) chain precursor	778-778	gi 13878903
966,6	LARAPVRAL	PREDICTED: hypothetical protein XP_949381 [Homo sapiens]	51-59	gi 88947034
1075,6	RPYSQVNVL	utrophin (homologous to dystrophin) [Homo sapiens]	165-173	gi 55859633
994,6	VPRPPQTSL	WIZ protein [Homo sapiens]	80-88	gi 38197259
1009,6	VPPPPHRPL	HBxAg transactivated protein 2 (XTP2) [Homo sapiens]	711-719	gi 56202483
946,5	QPRPPPAAL	unnamed protein product [Homo sapiens]	81-89	gi 16551493
990,6	PARPPSPRL	unnamed protein product [Homo sapiens]	16-24	gi 21754880
968,5	LPAPPTQNM	KIAA0693 protein [Homo sapiens]	83-91	gi 3327200
1291,7	QELQEINRVY	Chain A, Annexin A2	138-147	gi 56966699
1220,7	LPRGSRAHITL	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase [Homo sapiens]	303-313	gi 38570091
921,6	APTPARPVL	PERV-A receptor 1 [Homo sapiens]	3-11	gi 27447045
943,5	SPRPGGPYL	Mam1 [Homo sapiens]	351-359	gi 6979930
1001,5	IPRGPYAEV	KIAA1151 protein [Homo sapiens]	67-75	gi 71891749
972,5	IPRGPASQF	FLJ00353 protein [Homo sapiens]	438-446	gi 21748558
928,5	APRKGWTL	lysyl hydroxylase	691-698	gi 190074
1028,5	SPRLFSNHA	KIAA0892 protein [Homo sapiens]	378-386	gi 4240273
1065,7	RPRSALPRL	FZD2 protein [Homo sapiens]	78-86	gi 30353964
1112,6	SPGPQRSLAL	OTTHUMP00000028666 [Homo sapiens]	41-51	gi 57208136
1139,7	FPREPRPKL	ZFP36L2 protein [Homo sapiens]	246-254	gi 13477111
976,6	PKALPPGLAL	suppressor of cytokine signaling 7 [Homo sapiens]	37-46	gi 53831997
1301,8	AEIRIIPAKKY	putative protein product of Nbla03646 [Homo sapiens]	138-148	gi 76879704
1017,5	APSFRAQAQL	hypothetical protein [Homo sapiens]	1945-1954	gi 4688898
1025,6	PARAAPRLCA	PREDICTED: hypothetical protein XP_948938 [Homo sapiens]	33-42	gi 89025891
988,6	PVRRGHVAP	potassium voltage-gated channel, subfamily H, member 6 isoform 1 [Homo sapiens]	2-10	gi 13540549
970,6	PRRGPPPPP	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K [Homo sapiens]	261-269	gi 55958547
914,5	SPRKGWAL	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3 precursor [Homo sapiens]	702-709	gi 4505891
992,6	VRPWGLAPP	neuronal PAS domain protein 1 [Homo sapiens]	508-516	gi 22027482
988,6	PVRRGHVAP	potassium voltage-gated channel, subfamily H, member 6 isoform 1 [Homo sapiens]	2-10	gi 13540549
937,5	APRPSSLPI	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 1 [Homo sapiens]	2014-2022	gi 11968152

Tabelle 3.5: Liste der sequenzierten HLA-B/C-Peptidliganden von der Tumoralinie MZ1851-RCC aus der HPLC-Fraktion C8.

Masse (D)	Peptidsequenz	Proteinname	Position	Protein-bezeichnung
1113,5	GPNQWRDQL	FLJ00175 protein [Homo sapiens]	1194-1202	gi 18676556
968,6	RPASPSLQL	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 13 like [Homo sapiens]	277-285	gi 40674483
1009,6	VPPPPHRPL	HBxAg transactivated protein 2 (XTP2) [Homo sapiens]	711-719	gi 56202483
1140,6	QPDQTRIVAL	FBRL_HUMAN; 34 KD NUCLEOLAR SCLERODERMA ANTIGEN [Homo sapiens]	236-245	gi 3399667
982,5	APGPPGRSML	RAVER1 [Homo sapiens]	298-307	gi 22766819
964,6	VPQGIRPVV	fer-1 like protein 3 [Homo sapiens]	1280-1288	gi 10834587
1095,7	LPRGSIPRSL	minichromosome maintenance protein 6 [Homo sapiens]	215-224	gi 7427519
950,6	APRVPVQAL	serologically defined breast cancer antigen NY-BR-16 [Homo sapiens]	744-752	gi 12060822
1306,8	APRPDLVNRL	hypothetical protein [Homo sapiens]	120-130	gi 5817108
818,5	APAPPPVAV	homeodomain protein IRXB1; irx3; irx-1 [Homo sapiens]	311-319	gi 33356603
914,5	SPRKGWAL	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3 precursor [Homo sapiens]	702-709	gi 4505891
970,6	PRRGPPPPP	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K [Homo sapiens]	261-269	gi 55958547
891,5	RPAPPAAVL	low density lipoprotein receptor-related protein 11 [Homo sapiens]	150-158	gi 55663483
1050,6	APRAGQLQL	truncated mercaptopyruvate sulfurtransferase variant [Homo sapiens]	22-31	gi 77997608
1037,6	VPRIQPQSL	hypothetical protein LOC55172 [Homo sapiens]	31-39	gi 8922519
1076,7	KPGAPLRPKL	filamin 1 (actin-binding protein-280) [Homo sapiens]	270-279	gi 4503745
935,6	LPAPPARTL	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 3 [Homo sapiens]	671-679	gi 38327037
1126,7	APSGTRVVQVL	Protocadherin gamma subfamily C, 3, isoform 1 precursor [Homo sapiens]	257-267	gi 20072790
1093,7	RPRDALPRL	hypothetical protein LOC54919 [Homo sapiens]	109-117	gi 31377744
966,6	LNLAPVARL	PREDICTED: similar to Rap guanine nucleotide exchange factor 2	802-810	gi 88981151
1172,6	FPRSPGQPSSL	KIAA0467 protein [Homo sapiens]	749-759	gi 71999153
934,5	PLGPARLNP	fibrillin 3 [Homo sapiens]	374-382	gi 46559348

Tabelle 3.6: Liste der sequenzierten HLA-B/C-Peptidliganden von der Tumorzelle MZ1851-RCC aus der HPLC-Fraktion C9.

Masse (D)	Peptidsequenz	Proteinname	Position	Protein-bezeichnung	Ion-(Mascot-)score
982,5	APGPPGRSML *	RAVER1 [Homo sapiens]	298-307	gi 22766819	65,41
950,6	APRVPVQAL *	serologically defined breast cancer antigen NY-BR-16 [Homo sapiens]	744-752	gi 12060822	63,99
949,5	LPHAPGVQM *	histone deacetylase 2 variant [Homo sapiens]	124-132	gi 62087960	53,62
921,6	PAAPRSPLL	KIAA0584 protein [Homo sapiens]	77-85	gi 3043692	51,32
1009,5	FPAGPPSHSL *	hypothetical protein [Homo sapiens]	28-37	gi 31873404	48,12
1095,7	LPRGSIPRSL *	minichromosome maintenance protein 6 [Homo sapiens]	215-224	gi 7427519	43,52
1047,6	RPAQPPRL * *	C1orf85 protein [Homo sapiens]	211-219	gi 15079485	37,24
937,5	APSPRPLSL *	C19orf28 protein [Homo sapiens]	11-19	gi 46249748	37,22
941,6	VPRSASVLL *	unnamed protein product [Homo sapiens]	5-13	gi 22761732	35,35
1011,5	GPALAVQGPAM	Mitochondrial ribosomal protein L32 [Homo sapiens]	44-54	gi 15341921	43,76
1062,5	SEDGTVRLW	TAF5 RNA polymerase II, TATA box binding protein [Homo sapiens]	562-570	gi 55961125	41,37
1097,6	APRKPDWDL	unnamed protein product [Homo sapiens]	108-116	gi 21756313	35,65
1050,7	LLRLVAGPLV	NG22 protein isoform 2 [Homo sapiens]	249-258	gi 14249468	32,66
1003,5	SPMITSPGTL	unnamed protein product [Homo sapiens]	469-478	gi 14042857	24,01

Tabelle 3.7: Liste der sequenzierten HLA-B/C-Peptidliganden von der Tumorzelle MZ1851-RCC aus der HPLC-Fraktion C10. Mit *-markierte Peptidliganden wurden synthetisch hergestellt. Zusätzlich wurde der aus Datenbank-Analysen ermittelte Ion-(Mascot-)score angegeben.

Masse (D)	Peptidsequenz	Proteinname	Position	Protein-bezeichnung
1365,7	DEIERKFDKW	hypothetical protein [Homo sapiens]	322-331	gi 4914604
1181,6	RPDYRNITF	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase [Homo sapiens]	161-169	gi 55664707
849,6	KPKPLPGL	unnamed protein product [Homo sapiens]	126-133	gi 34528139
1143,6	IPQGGRGAIQF	Sec23 (S. cerevisiae) homolog B [Homo sapiens]	473-483	gi 13477149
1003,6	VPKVPDVHL	periaxin isoform 2 [Homo sapiens]	760-768	gi 32490589
1151,7	NGVKVPGIVRL	chloride channel 6 isoform CIC-6b [Homo sapiens]	167-177	gi 12025668
1116,6	NNLRVDDTAV	immunoglobulin variable region VH mu domain [Homo sapiens]	84-93	gi 51103451
919,6	LVGIPGPPGI	alpha 1 type IV collagen preproprotein [Homo sapiens]	1388-1397	gi 7656985

Tabelle 3.8: Liste der sequenzierten HLA-B/C-Peptidliganden von der Tumorzelle MZ1851-RCC aus der HPLC-Fraktion C11.

Einige Peptide aus HPLC-Fraktion C10, die Bioaktivität in CTL-Klon A4 vermittelte, wurden peptidchemisch synthetisiert. Da es sich bei diesen Peptiden um HLA-B/C-assoziierte Liganden handelte, aber lediglich HLA-B7-Peptidantigene als Epitop für den CTL-Klon A4 in Frage kamen (siehe Abbildung 3.18), wurden für die Synthese Kandidatenepitope ausgewählt, welche über HLA-B7-spezifische Ankeramino­säuren verfügten und deren Aminosäuresequenzen sicher durch die massenspektrometrische Untersuchung bestimmt werden konnten. Als Referenz hierfür dienten Wahrscheinlichkeitsberechnungen, welche mit Hilfe von Datenbankanalysen durchgeführt wurden (*Ion- (Mascot-) score* ≥ 35). Die synthetisch hergestellten Kandidatenepitope wurden nach Beladung auf T2-B*0702 bzw. HLA-B*0702-transfizierte K562-Zellen in Anwesenheit von β_2 -Mikroglobulin zur Stabilisierung der HLA-Peptid-Komplexe im 20h-IFN- γ -ELISPOT-Assay auf Erkennung durch den CTL-Klon A4 getestet. Als Positivkontrolle wurde die Nierenzellkarzinomlinie MZ1851-RCC mitgeführt, welche eine deutliche IFN- γ -Freisetzung durch den CTL-Klon A4 induzierte (Daten nicht gezeigt). Der Peptiderkennungstest zeigte jedoch, daß es sich bei keinem der synthetisierten Peptide um das durch den CTL-Klon A4 erkannte, tumorassoziierte Peptidantigen handelte, da keinerlei peptidinduzierte T-Zellreaktivität nachgewiesen werden konnte. Um zu zeigen, daß eine Beladung der für den Test eingesetzten T2- bzw. K562-Transfektanten mit synthetisch hergestelltem HLA-B*0702-bindendem Peptid möglich war und diese Peptidbeladung prinzipiell eine IFN- γ -Freisetzung in T-Zellen induziert, wurden CTL mitgeführt, welche ein HLA-B7-restringiertes gp100-Melanomantigen erkennen (siehe Abbildung 3.22). Diese T-Zellen und das durch sie erkannte synthetische Peptid wurden von Dr. V. Lennerz und Prof. Dr. T. Wölfel zur Verfügung gestellt.












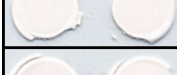






CTL-A4 vs K562-B7			CTL-A4 vs T2-B7
+ 10µM FPAGPPSHSL			+ 10µM FPAGPPSHSL
+ 10µM LPRGSIPRSL			+ 10µM LPRGSIPRSL
+ 10µM LPHAPGVQM			+ 10µM LPHAPGVQM
+ 10µM RPAQPPRL			+ 10µM RPAQPPRL
+ 10µM APSPRPLSL			+ 10µM APSPRPLSL
+ 10µM VPRSASVLL			+ 10µM VPRSASVLL
+ 10µM APGPPGRSML			+ 10µM APGPPGRSML
+ 10µM APRVPVQAL			+ 10µM APRVPVQAL
Kontrolle			Kontrolle

Abbildung 3.22: IFN- γ -ELISPOT-Assay der synthetisch hergestellten Peptide nach Beladung auf T2- bzw. K562-HLA-B7-Transfektanten auf Erkennung durch den CTL-Klon A4. Als Kontrolle wurden HLA-B7-restringierte T-Zellen mitgeführt, welche ein gp100-Melanomantigen erkennen.

4 Diskussion

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit bestand in der Generierung und Charakterisierung von allogenen tumorreaktiven CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen in einem Nierenzellkarzinommodell mit anschließender Identifizierung der tumorassoziierten Peptidpitope durch Tandem-Massenspektrometrie. Als Voraussetzung hierzu waren die Nierenzellkarzinomlinie MZ1851-RCC, welche aufgrund ihrer Wachstumseigenschaften für eine langfristige *in vitro*-Kultivierung geeignet war sowie periphere Blutlymfozyten (PBMC) eines gesunden, HLA-Klasse-I-kompatiblen Fremdspenders vorhanden.

4.1 HLA-Klasse-I-Übereinstimmung zwischen gesundem Spender und Nierenzellkarzinompatient

Die serologische HLA-Klasse-I-Typisierung der Nierenzellkarzinomlinie MZ1851-RCC und der Responderlymfozyten des allogenen gesunden Fremdspenders 1009798 zeigte neben einer Übereinstimmung in den HLA-A- und -B-Allelen eine Heterozygotie in den HLA-C-Allelen des Spenders (HLA-Cw*05 und -Cw*07), während beim Patienten das HLA-Cw*07 homozygot vorlag. Da eine T-Zell-vermittelte Immunreaktion in diesem Modell nur in Spender-versus-Nierenzellkarzinom-Richtung denkbar war, stellte das vom Spender exprimierte HLA-Cw5 kein immunologisch relevantes „Mismatch“-Allel dar. Zur exakteren Charakterisierung der HLA-Klasse-I-Moleküle des Spenders und des Patienten wurde zusätzlich eine hochauflösende HLA-Genotypisierung durchgeführt, bei der die Übereinstimmung in den HLA-A- und -B-Allelen (HLA-A*0101, HLA-A*0201, HLA-B*0702 und HLA-B*4402) bestätigt wurde. Die genotypische Bestimmung der HLA-C-Suballele zeigte im Vergleich zur Serologie jedoch, daß das HLA-Cw*07 des Nierenzellkarzinompatienten ebenfalls heterozygot vorlag (HLA-Cw*0702, HLA-Cw*0704). Da der Spender lediglich HLA-Cw*0702 exprimierte, war das HLA-Cw*0704 des Nierenzellkarzinoms als immunogene Zielstruktur von alloreaktiven T-Zellen des Spenders anzusehen.^{151;152}

Durch Homologievergleiche auf DNA-Ebene wurden im codogenen Strang (1101 Basen von HLA-Cw*0702 und HLA-Cw*0704) insgesamt neun unterschiedliche Basen an den Positionen 213, 355, 368, 419, 538-540, 601 und 618 identifiziert (siehe Abbildung 4.1). Diese führen im translatierten Protein zu Unterschieden innerhalb der Aminosäuresequenz an den Positionen 119, 123, 140, 180 und 201 zwischen dem HLA-Cw*0702 und dem HLA-Cw*0704 (siehe Abbildung 4.2). Das prozessierte HLA-Cw*07-Molekül setzt sich nach Abspaltung der Signalsequenz (Aminosäuren 1-24) aus 343 Aminosäuren zusammen und besteht aus insgesamt sieben Exons, wobei die Exons 1-5 für die Domänen α_1 , α_2 , α_3 , die Transmembrandomäne und die zytoplasmatische Domäne kodieren.¹⁵³ Verantwortlich für die Bindung von Peptidliganden an ein HLA-Molekül sind vornehmlich die α_1 - und α_2 -Domänen, welche bei der Ausbildung der Peptidbindungsfurche involviert sind und in deren Bereich auch T-Zellrezeptoren anbinden. Aufgrund von stark polymorphen, hochvariablen Regionen innerhalb dieser α_1 - und α_2 -Domänen resultieren die wesentlichen Unterschiede innerhalb der verschiedenen HLA-Allele. Der Homologievergleich zwischen dem HLA-Cw*0702 und dem HLA-Cw*0704 zeigte, daß die Unterschiede innerhalb der Aminosäuresequenzen ausschließlich im Bereich der α_2 -Domäne auftraten und somit zur Bindung unterschiedlicher HLA-Cw*07-assozierten Peptidliganden führen konnten.

Cw*0702	1	<u>ATGCGGGTCA</u>	<u>TGGCGCCCG</u>	<u>AGCCCTCCTC</u>	<u>CTGCTGCTCT</u>	<u>CGGGAGGCCT</u>	<u>GGCCCTGACC</u>	<u>GAGACCTGGG</u>	70
Cw*0704	1	<u>ATGCGGGTCA</u>	<u>TGGCGCCCG</u>	<u>AGCCCTCCTC</u>	<u>CTGCTGCTCT</u>	<u>CGGGAGGCCT</u>	<u>GGCCCTGACC</u>	<u>GAGACCTGGG</u>	70
Cw*0702	71	<u>CCTGCTCCCA</u>	<u>CTCCATGAGG</u>	<u>TATTTGACA</u>	<u>CCGCCGTGTC</u>	<u>CCGGCCCGGC</u>	<u>CGCGGAGAGC</u>	<u>CCCCTTCAT</u>	140
Cw*0704	71	<u>CCTGCTCCCA</u>	<u>CTCCATGAGG</u>	<u>TATTTGACA</u>	<u>CCGCCGTGTC</u>	<u>CCGGCCCGGC</u>	<u>CGCGGAGAGC</u>	<u>CCCCTTCAT</u>	140
Cw*0702	141	<u>CTCAGTGGGC</u>	<u>TACGTGGACG</u>	<u>ACACGCAGTT</u>	<u>CGTGCGGTTC</u>	<u>GACAGCGACG</u>	<u>CCGCGAGTCC</u>	<u>GAGAGGGGAG</u>	210
Cw*0704	141	<u>CTCAGTGGGC</u>	<u>TACGTGGACG</u>	<u>ACACGCAGTT</u>	<u>CGTGCGGTTC</u>	<u>GACAGCGACG</u>	<u>CCGCGAGTCC</u>	<u>GAGAGGGGAG</u>	210
Cw*0702	211	<u>CCCGGGGCGC</u>	<u>CGTGGGTGGA</u>	<u>GCAGGAGGGG</u>	<u>CCGAGTATT</u>	<u>GGGACCGGGA</u>	<u>GACACAGAAG</u>	<u>TACAAGCGCC</u>	280
Cw*0704	211	<u>CCCGGGGCGC</u>	<u>CGTGGGTGGA</u>	<u>GCAGGAGGGG</u>	<u>CCGAGTATT</u>	<u>GGGACCGGGA</u>	<u>GACACAGAAG</u>	<u>TACAAGCGCC</u>	280
Cw*0702	281	<u>AGGCACAGGC</u>	<u>TGACCGAGTG</u>	<u>AGCCTGCGGA</u>	<u>ACCTGCGCGG</u>	<u>CTACTACAAC</u>	<u>CAGAGCGAGG</u>	<u>ACGGGTCTCA</u>	350
Cw*0704	281	<u>AGGCACAGGC</u>	<u>TGACCGAGTG</u>	<u>AGCCTGCGGA</u>	<u>ACCTGCGCGG</u>	<u>CTACTACAAC</u>	<u>CAGAGCGAGG</u>	<u>ACGGGTCTCA</u>	350
Cw*0702	351	<u>CACCTCCAG</u>	<u>AGGATGTCG</u>	<u>GCTGCGACT</u>	<u>GGGCCCAGC</u>	<u>GGGCGCTCC</u>	<u>TCCGCGGTA</u>	<u>TGACCAGTCC</u>	420
Cw*0704	351	<u>CACCTCCAG</u>	<u>AGGATGATG</u>	<u>GCTGCGACT</u>	<u>GGGCCCAGC</u>	<u>GGGCGCTCC</u>	<u>TCCGCGGTA</u>	<u>TGACCAGTCC</u>	420
Cw*0702	421	<u>GCCTACGACG</u>	<u>GCAAGGATTA</u>	<u>CATCGCCCTG</u>	<u>AACGAGGACC</u>	<u>TGCGCTCCTG</u>	<u>GACCGCCGCG</u>	<u>GACACCGCGG</u>	490
Cw*0704	421	<u>GCCTACGACG</u>	<u>GCAAGGATTA</u>	<u>CATCGCCCTG</u>	<u>AACGAGGACC</u>	<u>TGCGCTCCTG</u>	<u>GACCGCCGCG</u>	<u>GACACCGCGG</u>	490
Cw*0702	491	<u>CTCAGATCAC</u>	<u>CCAGCGCAAG</u>	<u>TTGGAGGCGG</u>	<u>CCCGTGCGGC</u>	<u>GGAGCAGCTG</u>	<u>AGAGCCTACC</u>	<u>TGGAGGGCAC</u>	560
Cw*0704	491	<u>CTCAGATCAC</u>	<u>CCAGCGCAAG</u>	<u>TTGGAGGCGG</u>	<u>CCCGTGCGGC</u>	<u>GGAGCAGGAC</u>	<u>AGAGCCTACC</u>	<u>TGGAGGGCAC</u>	560
Cw*0702	561	<u>GTGCGTGGAG</u>	<u>TGGCTCCGCA</u>	<u>GATACCTGGA</u>	<u>GAACGGGAAG</u>	<u>GAGACGCTGC</u>	<u>AGCGCGAGA</u>	<u>ACCCCCAAG</u>	630
Cw*0704	561	<u>GTGCGTGGAG</u>	<u>TGGCTCCGCA</u>	<u>GATACCTGGA</u>	<u>GAACGGGAAG</u>	<u>AAGACGCTGC</u>	<u>AGCGCGGGA</u>	<u>ACCCCCAAG</u>	630
Cw*0702	631	<u>ACACACGTGA</u>	<u>CCCACCACCC</u>	<u>CCTCTCTGAC</u>	<u>CATGAGGCCA</u>	<u>CCCTGAGGTG</u>	<u>CTGGGCCCTG</u>	<u>GGCTTCTACC</u>	700
Cw*0704	631	<u>ACACACGTGA</u>	<u>CCCACCACCC</u>	<u>CCTCTCTGAC</u>	<u>CATGAGGCCA</u>	<u>CCCTGAGGTG</u>	<u>CTGGGCCCTG</u>	<u>GGCTTCTACC</u>	700
Cw*0702	701	<u>CTGCGGAGAT</u>	<u>CACACTGACC</u>	<u>TGGCAGCGGG</u>	<u>ATGGGGAGGA</u>	<u>CCAGACCCAG</u>	<u>GACACCGAGC</u>	<u>TTGTGGAGAC</u>	770
Cw*0704	701	<u>CTGCGGAGAT</u>	<u>CACACTGACC</u>	<u>TGGCAGCGGG</u>	<u>ATGGGGAGGA</u>	<u>CCAGACCCAG</u>	<u>GACACCGAGC</u>	<u>TTGTGGAGAC</u>	770
Cw*0702	771	<u>CAGGCCAGCA</u>	<u>GGAGATGGAA</u>	<u>CCTTCCAGAA</u>	<u>GTGGGCAGCT</u>	<u>GTGGTGGTGC</u>	<u>CTTCTGGACA</u>	<u>AGAGCAGAGA</u>	840
Cw*0704	771	<u>CAGGCCAGCA</u>	<u>GGAGATGGAA</u>	<u>CCTTCCAGAA</u>	<u>GTGGGCAGCT</u>	<u>GTGGTGGTGC</u>	<u>CTTCTGGACA</u>	<u>AGAGCAGAGA</u>	840
Cw*0702	841	<u>TACACGTGCC</u>	<u>ATATGCAGCA</u>	<u>CGAGGGGCTG</u>	<u>CAAGAGCCCC</u>	<u>TCACCCTGAG</u>	<u>CTGGGAGCCA</u>	<u>TCTTCCCAGC</u>	910
Cw*0704	841	<u>TACACGTGCC</u>	<u>ATATGCAGCA</u>	<u>CGAGGGGCTG</u>	<u>CAAGAGCCCC</u>	<u>TCACCCTGAG</u>	<u>CTGGGAGCCA</u>	<u>TCTTCCCAGC</u>	910
Cw*0702	911	<u>CCACCATCCC</u>	<u>CATCATGGGC</u>	<u>ATCGTTGCTG</u>	<u>GCCTGGCTGT</u>	<u>CCTGGTTGTC</u>	<u>CTAGCTGTCC</u>	<u>TTGGAGCTGT</u>	980
Cw*0704	911	<u>CCACCATCCC</u>	<u>CATCATGGGC</u>	<u>ATCGTTGCTG</u>	<u>GCCTGGCTGT</u>	<u>CCTGGTTGTC</u>	<u>CTAGCTGTCC</u>	<u>TTGGAGCTGT</u>	980
Cw*0702	981	<u>GGTCACCGCT</u>	<u>ATGATGTGTA</u>	<u>GGAGGAAGAG</u>	<u>CTCAGGTGGA</u>	<u>AAAGGAGGGA</u>	<u>GCTGCTCTCA</u>	<u>GGCTGCGTGC</u>	1050
Cw*0704	981	<u>GGTCACCGCT</u>	<u>ATGATGTGTA</u>	<u>GGAGGAAGAG</u>	<u>CTCAGGTGGA</u>	<u>AAAGGAGGGA</u>	<u>GCTGCTCTCA</u>	<u>GGCTGCGTGC</u>	1050
Cw*0702	1051	<u>AGCAACAGTG</u>	<u>CCCAGGGCTC</u>	<u>TGATGAGTCT</u>	<u>CTCATCACTT</u>	<u>GTAAGCCTG</u>	<u>A</u>	1101	
Cw*0704	1051	<u>AGCAACAGTG</u>	<u>CCCAGGGCTC</u>	<u>TGATGAGTCT</u>	<u>CTCATCACTT</u>	<u>GTAAGCCTG</u>	<u>A</u>	1101	

Abbildung 4.1: Homologievergleich von HLA-Cw*0702 und HLA-Cw*0704 auf DNA-Ebene (nach IMGT/HLA-Database <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>). Die Unterschiede in der Basensequenz sind hervorgehoben.

Cw*0702	1	<u>MRVMAPRAL</u> <u>L</u>	<u>LLLSGGLAL</u> <u>T</u>	<u>ETWACSHSM</u> <u>R</u>	<u>YFDTAVSRP</u> <u>G</u>	<u>RGEPRFISV</u> <u>G</u>	<u>YVDDTQFVR</u> <u>F</u>	<u>DSDAASPRG</u> <u>E</u>	70
Cw*0704	1	<u>MRVMAPRAL</u> <u>L</u>	<u>LLLSGGLAL</u> <u>T</u>	<u>ETWACSHSM</u> <u>R</u>	<u>YFDTAVSRP</u> <u>G</u>	<u>RGEPRFISV</u> <u>G</u>	<u>YVDDTQFVR</u> <u>F</u>	<u>DSDAASPRG</u> <u>E</u>	70
Cw*0702	71	<u>PRAPWVEQ</u> <u>E</u>	<u>PEYWDRET</u> <u>Q</u>	<u>YKRQAQADR</u> <u>V</u>	<u>SLRNLRGY</u> <u>Y</u>	<u>QSE</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>Q</u>	<u>RM</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>D</u>	<u>G</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>S</u>	140
Cw*0704	71	<u>PRAPWVEQ</u> <u>E</u>	<u>PEYWDRET</u> <u>Q</u>	<u>YKRQAQADR</u> <u>V</u>	<u>SLRNLRGY</u> <u>Y</u>	<u>QSE</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>Q</u>	<u>RM</u> <u>X</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>D</u>	<u>G</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>F</u>	140
Cw*0702	141	<u>AYDGKDYIA</u> <u>L</u>	<u>NEDLR</u> <u>S</u> <u>W</u> <u>T</u> <u>A</u>	<u>DTAAQITQR</u> <u>K</u>	<u>LEAARAAEQ</u> <u>L</u>	<u>RAYLEGT</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>E</u>	<u>WLRRYL</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>K</u>	<u>ETLQRAE</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>K</u>	210
Cw*0704	141	<u>AYDGKDYIA</u> <u>L</u>	<u>NEDLR</u> <u>S</u> <u>W</u> <u>T</u> <u>A</u>	<u>DTAAQITQR</u> <u>K</u>	<u>LEAARAAEQ</u> <u>D</u>	<u>RAYLEGT</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>E</u>	<u>WLRRYL</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>K</u>	<u>KT</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>K</u>	210
Cw*0702	211	<u>THVTHHPL</u> <u>S</u>	<u>HEATLR</u> <u>C</u> <u>W</u> <u>A</u> <u>L</u>	<u>GFYPAEIT</u> <u>L</u> <u>T</u>	<u>WQRDGED</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>Q</u>	<u>D</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>A</u>	<u>GDGTFQ</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>A</u> <u>A</u>	<u>V</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>R</u>	280
Cw*0704	211	<u>THVTHHPL</u> <u>S</u>	<u>HEATLR</u> <u>C</u> <u>W</u> <u>A</u> <u>L</u>	<u>GFYPAEIT</u> <u>L</u> <u>T</u>	<u>WQRDGED</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>Q</u>	<u>D</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>A</u>	<u>GDGTFQ</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>A</u> <u>A</u>	<u>V</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>R</u>	280
Cw*0702	281	<u>YTCHMQHE</u> <u>G</u> <u>L</u>	<u>QEPLT</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>P</u>	<u>SSQPTIP</u> <u>I</u> <u>M</u> <u>G</u>	<u>IVAGLAV</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>V</u>	<u>LAVLGAV</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>A</u>	<u>MMCRRK</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u>	<u>KGGSCS</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u>	350
Cw*0704	281	<u>YTCHMQHE</u> <u>G</u> <u>L</u>	<u>QEPLT</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>P</u>	<u>SSQPTIP</u> <u>I</u> <u>M</u> <u>G</u>	<u>IVAGLAV</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>V</u>	<u>LAVLGAV</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>A</u>	<u>MMCRRK</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u>	<u>KGGSCS</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u>	350
Cw*0702	351	<u>SNSAQGS</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>S</u>	<u>LITCKA</u>						366
Cw*0704	351	<u>SNSAQGS</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>S</u>	<u>LITCKA</u>						366

Abbildung 4.2: Homologievergleich von HLA-Cw*0702 und HLA-Cw*0704 auf Proteinebene (nach IMGT/HLA-Database <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>). Die Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind hervorgehoben.

Bei der Generierung klonaler T-Zellen mit Hilfe des Grenzverdünnungsverfahrens aus PBMC-isolierten CD8⁺ Responderlymphozyten des Spenders 1009798 konnte somit eine „Mismatch“-Reaktivität gegen das durch MZ1851-RCC exprimierte HLA-Cw*0704 nicht ausgeschlossen werden. Blockadeexperimente und Kreuzreaktivitätstests zeigten, daß zehn von insgesamt zwölf expandierbaren T-Zellklonen über das HLA-Cw*07-Allel restringiert waren und somit vermutlich das HLA-Cw*0704-„Mismatch“ erkannten. Beispielhaft ist in dieser Arbeit der CTL-Klon E77 beschrieben. Transfektionsexperimente, bei denen 293T- und COS-7-Zellen mit HLA-Cw*0702-cDNA transfiziert wurden, zeigten keine Erkennung der Transfektanten durch die HLA-Cw*07-restringierten CTL-Klone des Spenders 1009798. Leider gelang es uns nicht, das HLA-Cw*0704-Allel in einen cDNA-Expressionsvektor zu klonieren. Dies liegt möglicherweise an dem um eine log-Stufe niedrigeren Expressionsniveau von HLA-C- gegenüber HLA-A/B-Allelen.⁸¹ Wäre die Klonierung von HLA-Cw*0704 gelungen, hätte die Erkennung von HLA-Cw*0704-„Mismatch“-Antigen nach Transfektion in antigennegative Rezipientenzellen direkt nachgewiesen werden können.

Neben dem HLA-Cw*07-„Mismatch“ waren der Spender 1009798 und die Nierenzellkarzinomlinie MZ1851-RCC identisch für sämtliche HLA-A/B-Moleküle. Am Beispiel des HLA-B*0702-restringierten CTL-Klons A4 konnten wir zeigen, das in solchen allogenen MLTCs auch CTL heranwachsen, die Tumorzellen, hier das Nierenzellkarzinom MZ1851-RCC, über „Selbst“-HLA-Klasse-I-Allele erkennen.

4.2 Kultivierung tumorreaktiver T-Zellpopulationen mit Interleukin-2 und Interleukin-7

Das Zytokin Interleukin-2 (IL-2) gilt als Wachstumsfaktor für T-Lymphozyten und NK-Zellen, welche wichtige Effektorzellen bei der Tumorbekämpfung darstellen.¹⁵⁴ Es spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von NK-Zellen, der Induktion von LAK-Zellen (Lymphokin aktivierte Killerzellen) sowie bei der Unterstützung der antigenabhängigen Aktivierung und Expansion von CD8⁺ T-Zellen. Zur Unterstützung autokrin-gesteuerter klonaler Expansion produzieren CD8⁺ T-Zellen IL-2 nach Interaktion mit einem Antigen und kostimulatorischen Liganden. Das Zytokin stellt dabei aber mehr als nur einen Wachstumsfaktor dar, sondern wird ebenfalls für die T-Zellentwicklung und für die Regulation von AICD (*activation induced cell death*) bei T-Lymphozyten *in vivo* benötigt.¹⁵⁵ Interleukin-2 kann aber auch insbesondere bei mehrfach stimulierten zytotoxischen T-Zellen die antigenabhängige Apoptose direkt verstärken.¹⁵⁶

Für die *in vitro* Kultivierung CD8⁺ T-Zellpopulationen wird exogen zugegebenes Interleukin-2 (rhIL-2) für die T-Zellproliferation benötigt¹⁵⁷ und verstärkt zudem die Generierung zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL). Es wurden CD8⁺ T-Zellen beschrieben, welche die Fähigkeit zur endogenen IL-2-Produktion verloren hatten (AINR, *activation induced nonresponsiveness*) und nach exogener IL-2-Zugabe Proliferation zeigten, wobei die T-Zellrezeptor-vermittelte zytolytische Funktion sowie die Fähigkeit zur IFN- γ -Sekretion erhalten blieb.¹⁵⁸ Durch exogene Zugabe von unphysiologisch hohen IL-2-Konzentrationen besteht die Gefahr, daß eine antigen-unabhängige Stimulation der T-Zellen induziert wird. So konnte anhand von Virus-spezifischen CTL gezeigt werden, daß die CTL zwar zur Proliferation angeregt wurden, aber ihre antigenspezifische Reaktivität verloren hatten, wobei dieser Effekt schon bei wesentlich geringeren IL-2-Dosen als den in dieser Arbeit eingesetzten 250IU/ml beobachtet wurde. Zum Nachweis der antigenabhängigen Proliferation der CTL wurde in der vorliegenden Arbeit das Wachstum der CTL in Anwesenheit oder Abwesenheit der zur Stimulation verwendeten Tumorzelllinie MZ1851-RCC bestimmt. Dabei zeigte sich eine stärkere Proliferation in Gegenwart der Tumorzelllinie und damit ein synergistischer Effekt von IL-2 und antigenexprimierender Stimulatorzelllinie.

Das Zytokin Interleukin-7 (IL-7) begünstigt als Wachstumsfaktor die Vitalität und Proliferation von T-Zellen,¹⁵⁹ erfüllt anti-apoptotische Funktionen bei unreifen T-Zellen, ist bei Thymozyten in den frühen Phasen der T-Zellentwicklung involviert und kann in Kombination mit IL-2 die Proliferation von „Memory“-T-Zellen fördern.¹⁶⁰ Desweiteren kann es als Stimulus für T-Zellen fungieren und antigenspezifische T-Zellantworten *in vitro* verstärken.¹⁶¹

Sämtliche der in der vorliegenden Arbeit generierten zytotoxischen T-Zellen zeigten bei den verwendeten Kulturbedingungen (wöchentliche Stimulation und Zugabe von IL-2 und IL-7) eine antigenabhängige Proliferation, wobei die antitumorale Reaktivität der CTL gegen die Nierenzellkarzinomlinie MZ1851-RCC auch über längere Kulturzeiträume erhalten blieb.

4.3 Generierung tumorreaktiver CD8⁺ T-Zellen aus PBMC des gesunden Spenders

Die Möglichkeit aus PBMC eines gesunden, HLA-Klasse-I-identen Fremdspenders tumorreaktive CD8⁺ T-Zellen zu generieren, welche eine spezifische und über distinkte „Selbst“-HLA restringierte Reaktivität gegen Nierenzellkarzinomzellen entwickeln, wurde bereits beschrieben.¹⁶² Auch in der vorliegenden Arbeit konnten mit Hilfe dieser Methodik signifikante, durch T-Zellen hervorgerufene antitumorale Reaktivitäten nach nur wenigen Stimulationen mit Tumorzellen in 20h-IFN- γ -Freisetzungstests beobachtet werden. Dabei war besonders beeindruckend, wie effizient sich die tumorreaktiven T-Zellen des gesunden Spenders *in vitro* expandieren ließen. Ähnlich hohe Effizienzen konnten bei der Verwendung von autologen PBMC in der MLTC weder bei den Patienten MZ1257 oder MZ1851^{26;163} noch bei anderen Nierenzellkarzinompatienten beobachtet werden.^{164;165} Diese Ergebnisse liegen möglicherweise in der tumorinduzierten Anergie oder Toleranz autologer T-Zellen begründet, wie sie für das Nierenzellkarzinom und auch anderen Tumorentitäten bereits beschrieben wurden.^{166;167} Verschiedene aktive und passive Mechanismen könnten eine solche T-Zelltoleranz gegenüber Tumorzellen bewirken. So führen beispielsweise aktive Mechanismen zur Expression von pro-apoptotischen Molekülen (z.B. FasLigand) auf der Tumorzelle¹⁶⁸

oder zur Freisetzung von immunsuppressiven Substanzen¹⁶⁹, zu denen Zytokine und Prostaglandine zählen, welche die T-Zellaktivität negativ beeinträchtigen. Die Herunterregulation oder der Verlust von HLA-Allelen¹⁷⁰, die fehlende Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD80/CD86¹⁷¹ oder Defekte innerhalb der Antigenprozessierung und Peptidpräsentation von Tumorzellen¹⁷² werden hingegen als passive Mechanismen zusammengefaßt. Daneben könnte eine geringe Affinität des T-Zellrezeptors für die tumorassoziierten Peptide, eine defiziente IL-2-Produktion der T-Zellen oder die Expression von antagonistischen Peptiden auf Seite der Tumorzellen zur T-Zelltoleranz bzw. tumorinduzierten Anergie beitragen.¹⁷³

4.4 Charakterisierung MZ1851-RCC-reaktiver CD8⁺-T-Zellklone des gesunden Spenders

Die mit Hilfe des „Limiting-Dilution“-Verfahrens aus der MLTC 1851-5 hervorgegangenen T-Zellklone wurden phänotypisch auf die Expression von Differenzierungs- und Aktivierungsmarker untersucht (siehe Tabelle 3.4). Dabei zeigten alle gegen die Nierenzellkarzinomlinie MZ1851-RCC alloreaktiven und über HLA-Klasse-I-restringierten CTL-Klone einen CD3⁺- und CD8⁺-Phänotyp und exprimierten zudem einen $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor. Der für NK-Zellen typische Oberflächenmarker CD56 wurde von einzelnen CTL-Klonen mit unterschiedlicher Intensität exprimiert. Es ist bekannt, daß bestimmte T-Zellpopulationen abhängig von ihrem jeweiligen Differenzierungsgrad den CD56-Marker als ein Aktivierungsantigen mit assoziierter zytotoxischer Funktion tragen können.¹⁷⁴ Für CD57 waren die generierten zytotoxischen T-Zellen negativ, so daß es sich nicht um enddifferenzierte Effektorzellen handelte, wie sie bei CD57-positiven virusspezifischen T-Zellen beschrieben wurden.¹⁷⁵

Das Rezeptormolekül CD28, welches mit den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 interagiert, induziert die Aktivierung von naiven und ruhenden „Memory“-T-Zellen.¹⁷⁶ Phänotypische Untersuchungen der tumorreaktiven CTL-Klone hinsichtlich der CD28-Expression blieben negativ und zeigten somit einen CD8⁺/CD28⁻ T-Zellphänotyp, wie er beispielsweise in *ex vivo* Analysen von Transplantationspatienten, Patienten mit

HIV-Infektionen oder bei Melanompatienten als dominierende T-Zellpopulation im peripheren Blut beschrieben wurde.¹⁷⁷ Um den Differenzierungsgrad der generierten tumorreaktiven T-Zellklone zu charakterisieren, wurden die CTL auf Expression verschiedener Oberflächenmoleküle wie CD27, CD44, die Isoformen CD45RA bzw. CD45RO, CD62L und CCR7 untersucht, um eine Unterscheidung zwischen naiven T-Zellen, Effektor-„Memory“-T-Zellen (T_{EM}) und „Central-Memory“-T-Zellen (T_{CM}) zu ermöglichen. Ausgehend von naiven T-Zellen findet nach deren Konditionierung mit tumorspezifischen Antigenen in Anwesenheit kostimulatorischer Moleküle eine Differenzierung zu T_{EM} - und T_{CM} -Zellen statt. Dabei migrieren Effektor-„Memory“-T-Zellen in inflammatorische, periphere Gewebe und üben dort Effektorfunktionen aus, während „Central-Memory“-T-Zellen in sekundär lymphatischen Organen verbleiben und über keine bzw. lediglich geringe Effektorfunktionen verfügen. Humane T_{CM} -Zellen sind $CD45RO^+$ -„Memory“-Zellen, welche konstitutiv CCR7 und CD62L exprimieren. Bei dem CD45-Molekül handelt es sich um eine von Leukozyten exprimierte und an deren Aktivierung beteiligte Phosphatase, wobei CD45RO-exprimierende T-Zellen leichter aktiviert werden können als T-Zellen, welche das CD45RA-Isoform tragen.¹⁷⁸ Die Rezeptoren CCR7 und CD62L sind für naive T-Zellen charakteristisch und ermöglichen die Migration in periphere Lymphknoten.^{179;180} Humane T_{EM} -Zellen sind „Memory“-Zellen, welche durch den Verlust der konstitutiven CCR7-Expression charakterisiert sind und über eine heterogene CD62L-Expression verfügen. Sie tragen Chemokin-Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle, die für das Verbleiben in inflammatorischen Geweben verantwortlich sind. $CD8^+$ T_{EM} -Zellen synthetisieren große Mengen an Perforin und produzieren innerhalb weniger Stunden nach Antigenstimulation neben $IFN-\gamma$ auch die Zytokine IL-4 und IL-5. Bei zusätzlicher Expression des CD45RA-Moleküls (T_{EMRA}) ist zudem eine Steigerung der ohnehin starken Perforin-Synthese möglich. Die Oberflächenmoleküle CD27 und CD28 werden von naiven T-Zellen exprimiert, fehlen aber bei $CD8^+$ „Memory“-T-Zellen mit starken Effektor-Eigenschaften.¹⁸¹ Das Adhäsionsmolekül CD44 hingegen wird von naiven T-Zellen kaum exprimiert, erscheint nach Antigenkontakt aber auf der Oberfläche der „Memory“-T-Zellen.¹⁸² Die phänotypische Untersuchung zeigte bei allen der in der vorliegenden Arbeit generierten allogenen T-Zellklone eine hohe CD44- und CD45RO-Expression, während die Marker CD28, CD62L und CCR7 negativ waren. Desweiteren exprimierten die CTL-Klone das

CD27-Molekül unterschiedlich stark und das CD45RA-Isoform lediglich in schwacher Intensität. Anhand dieser Ergebnisse konnten die aus der MLTC1851-5 hervorgegangenen CTL-Klone als Effektor- bzw. Effektor-„Memory“-T-Zellen charakterisiert werden.

Inhibitorische, von natürlichen Killerzellen exprimierte, Rezeptoren (KIR, *killer inhibitory receptor*) wie CD158a, CD158b, KIRp70, CD85j, NKG2A oder NKG2D können auch auf der Oberfläche von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden.¹⁸³ Dabei werden für diese Rezeptoren unterschiedliche Funktionen postuliert. So vermutet man beispielsweise eine Beteiligung an der negativen Selektion autoreaktiver T-Zellen im Thymus, um eine Autoimmunität durch CTL, welche gegen „Selbst“-Antigene reagieren, abzuwehren.¹⁸³ Da inhibitorische KIR an HLA-Klasse-I-Moleküle binden und darüber negativ reguliert werden, kann über diese KIR eine CTL-vermittelte HLA-Klasse-I-restringierte Immunantwort gegen normale Zellen verhindert werden, während Tumorzellen aufgrund des Verlustes von HLA-Klasse-I-Allelen durch KIR-tragende CTL lysiert werden können.¹⁸⁴ Andererseits wäre auch ein Mechanismus denkbar, der die Deletion von selbstreaktiven CTL unterbindet, um eine Immunantwort gegen Tumorzellen auszulösen, welche im erhöhten Maße „Selbst“-Antigene exprimieren.¹⁸⁵ Desweiteren könnten die inhibitorischen Funktionen der Rezeptoren nach Interaktion mit ihren Liganden eine „Über“-Stimulation antigenspezifischer CTL und der damit verbundenen Apoptose verhindern, indem die durch den T-Zellrezeptor vermittelte Stimulation umgangen bzw. unterbunden wird.¹⁸⁶ Die durch phänotypische Untersuchungen charakterisierten und in dieser Arbeit vorgestellten CTL-Klone zeigten keine bzw. nur eine geringe Oberflächenexpression der KIR CD158a, CD158b, KIRp70, CD85j und NKG2A. Lediglich der NKG2D-Rezeptor wurde von den allogenen CTL-Klonen im hohen Maße exprimiert. Bei NKG2D handelt es sich um ein kostimulatorisches Molekül, das zu einer Steigerung der Effektorfunktionen von T-Zellen wie der Zytotoxizität oder der Zytokinfreisetzung beitragen kann¹⁸³ und möglicherweise regulatorisch an der IL-2-Produktion zytotoxischer T-Zellen beteiligt ist.¹⁸⁷

Als Prototyp einer alloreaktiven CD8⁺ T-Zelle wurde CTL-Klon E77 charakterisiert, der Tumorzellen mit hoher Wahrscheinlichkeit über ein HLA-Cw*07-„Mismatch“ lysiert, welches zwischen dem Nierenzellkarzinom MZ1851-RCC und dem gesunden Fremdspender 1009798 nachweisbar war. CTL-E77 zeigte eine Reaktivität nicht nur

gegen MZ1851-RCC, sondern ebenso gegen aus PBMC generierte PHA-Blasten des Patienten MZ1851. CTL-vermittelte Erkennung war im ^{51}Cr -Freisetzungstest deutlich stärker ausgeprägt, als im IFN- γ -ELISPOT-Assay. Dieses Ergebnis könnte dadurch erklärt werden, daß für den 20h-IFN- γ -ELISPOT-Assay kryokonservierte PHA-Blasten eingesetzt wurden, welche nach dem Auftauen eine vergleichsweise geringe Vitalität zeigten und dadurch möglicherweise eine entsprechend geringe IFN- γ -Sekretion durch den CTL-Klon E77 induzieren konnten. Im Gegensatz dazu wurden für den ^{51}Cr -Freisetzungstest frisch generierte PHA-Blasten verwendet. Natürlich könnte das Testergebnis auch auf eine höhere Sensitivität des Zytotoxizitätstests gegenüber dem IFN- γ -ELISPOT-Assay hinweisen. Die Erkennung der PHA-Blasten durch den CTL-Klon E77 deutete darauf hin, daß das gegenständliche T-Zellepitop nicht aus einem Protein prozessiert wird, welches infolge der malignen Transformation des Nierengewebes synthetisiert wird. Stattdessen könnte es sich bei dem Peptidantigen um ein Epitop handeln, daß auch von gesunden Zellen des Patienten präsentiert wird. Die Ergebnisse von Kreuzreaktivitätsuntersuchungen, bei denen weitere Zielzellen von CTL-Klon E77 erkannt wurden, lassen vermuten, daß es sich bei der erkannten Zielstruktur um ein ubiquitär exprimiertes Antigen handelt, welches mit HLA-Cw*0704 assoziiert. CTL-Klone, die Antigene mit einer ubiquitären Gewebeexpression ähnlich dem CTL-E77 erkennen, können im Rahmen der allogenen Blutstammzelltransplantation neben dem gewünschten GvT-Effekt auch die unerwünschte schwere GvHD-Reaktion gegen gesundes Körpergewebe auslösen (siehe Abbildung 4.3).

Im Gegensatz zu den alloreaktiven CTL-Klonen handelte es sich bei CTL-Klon A4 um eine zytotoxische T-Zelle, deren Peptidantigen auf MZ1851-RCC-Zellen über das HLA-B*0702 präsentiert wird. Eine HLA-Klasse-I-„Mismatch“-Reaktivität war ausgeschlossen, da eine genotypische Übereinstimmung des HLA-Restriktionselements zwischen der Nierenzellkarzinomlinie MZ1851 und dem allogenen Spender 1009798 vorlag. Die PHA-Blasten des Patienten MZ1851 wurden weder im ^{51}Cr -Zytotoxizitätstest noch im IFN- γ -ELISPOT-Assay erkannt. Zudem waren Kreuzreaktivitätstests gegen weitere Nierenzellkarzinome oder gegen gesunde und maligne Zellen anderer Gewebetypen negativ. Diese Testergebnisse deuteten darauf hin, daß es sich bei dem von CTL-Klon A4 erkannten Epitop um ein tumorassoziiertes Peptidantigen handelt, welches nicht ubiquitär exprimiert wird. Zytotoxische T-Zellen wie CTL-Klon A4, die ausschließlich

maligne Zellen, nicht aber gesunde Zellen desgleichen oder eines anderen Gewebetypes erkennen, könnten Tumorregressionen ohne nachweisbare GvHD nach allogener Stammzelltransplantation induzieren und sind deshalb von besonderem Interesse für die Entwicklung von neuen immunologischen Therapieansätzen (siehe Abbildung 4.3).

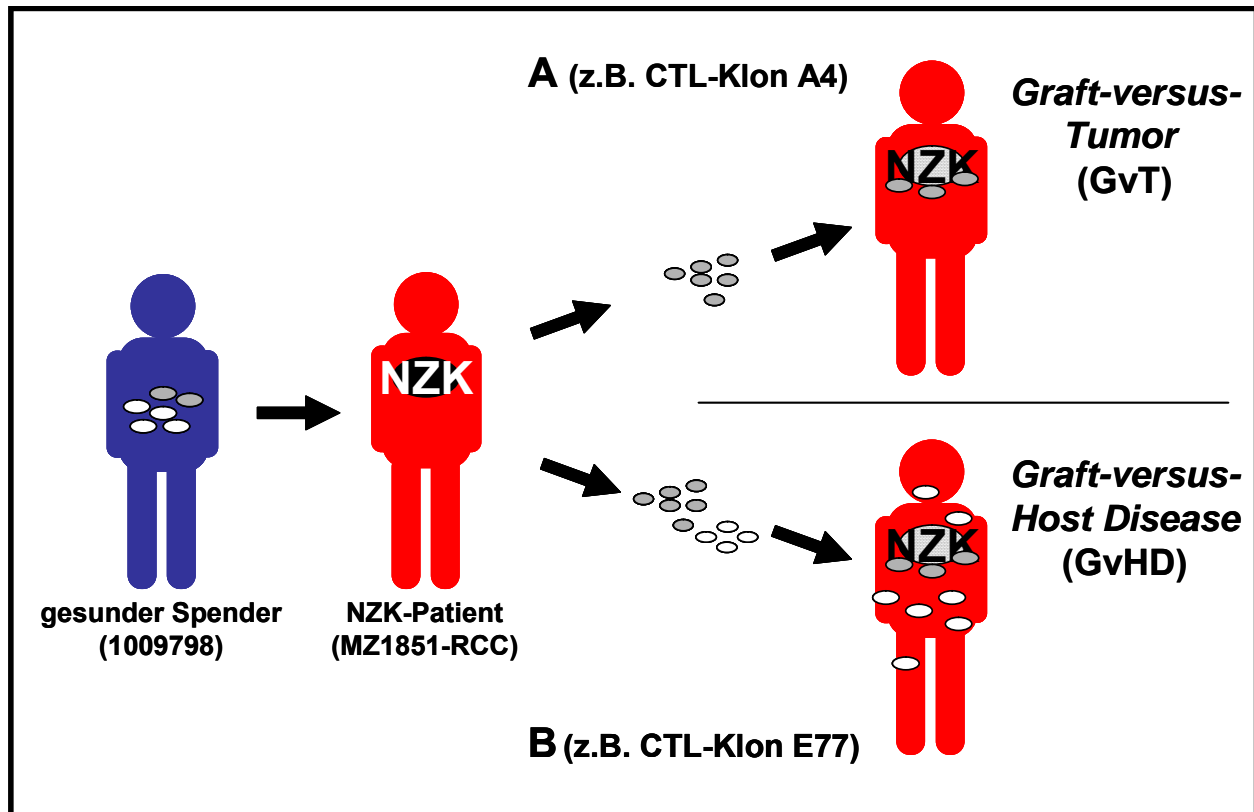


Abbildung 4.3: Potentielle Effektoren von GvT (A) und GvHD (B) im Modell des Fremdspender 1009798 und des Nierenzellkarzinompatienten MZ1851-RCC.

4.5 Biochemisch-massenspektrometrische Identifizierung der Nierenzellkarzinomantigene

4.5.1 Immunchromatographie

Ein Ziel der Arbeit bestand in der biochemisch-massenspektrometrischen Charakterisierung der von dem HLA-B*0702-restringierten CTL-Klon A4 und dem HLA-Cw*0704-reaktiven CTL-Klon E77 erkannten Peptidantigene. Die hierfür notwendige Aufreinigung der natürlich prozessierten HLA-B/C-Peptid-Komplexe der Nierenzellkarzinomlinie MZ1851-RCC erfolgte mittels einer Affinitätschromatographie unter Verwendung des HLA-B/C-spezifischen Antikörpers B123.2. Idealerweise sollten für die biochemische Aufreinigung der Peptidliganden etwa 2×10^{10} Tumorzellen eingesetzt werden, um ausreichend Probenmaterial für die nachfolgende massenspektrometrische Identifizierung zur Verfügung zu haben.¹⁶² Die Expansion der Tumorzelllinie MZ1851-RCC auf entsprechende Zellzahlen erwies sich jedoch abhängig von der Kultivierungsdauer in Wannenstapel als zunehmend schwierig, so daß lediglich $1,2 \times 10^{10}$ Tumorzellen für die Immunchromatographie verwendet werden konnten. Dadurch wurde die Identifizierung der HLA-B/C-assozierten Peptidliganden mittels Massenspektrometrie erschwert. Eine nach der biochemischen Aufreinigung durchgeführte SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigte, daß HLA-B/C-Moleküle immunchromatographisch isoliert werden konnten, da im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollen in der Retentatprobe eine zusätzliche Proteinbande auftrat, dessen Molekulargewicht von etwa 44kD gut zu dem bekannten Molekulargewicht der HLA- α -Kette (44kD) korrespondierte. Neben den HLA-B- sollten auch die HLA-C-Moleküle mittels Immunchromatographie isoliert und die Peptidliganden massenspektrometrisch identifiziert werden. Dabei konnte sich insbesondere die Identifizierung der HLA-C-assozierten Peptidliganden als problematisch erweisen, da die Expressionsdichte von HLA-C-Molekülen auf der Zelloberfläche stark reduziert ist. So werden diese in der Regel nur mit einer 10%-igen Intensität im Vergleich zu HLA-A- oder -B-Molekülen auf der Zelloberfläche exprimiert.^{81;188} Zusätzlich konnten unterschiedliche methodische Probleme während der Immunchromatographie zu einem Verlust an aufgereinigten HLA-Molekülen mit den assoziierten Peptidliganden führen. So mußte damit gerechnet

werden, daß Probenmaterial von der Herstellung des Tumorlysats bis hin zur Elution der Affinitätssäulen infolge nicht vollständig inhibierter Proteaseaktivität verloren geht. Weitere Probenverluste während der Zentrifugation und Filtration waren ebenfalls denkbar.

4.5.2 HPLC und Massenspektrometrie

Nach der immunchromatographischen Aufreinigung wurden die HLA-B/C-assoziierten Peptidliganden mittels einer „reverse phase“-HPLC fraktioniert und anschließend wurden die einzelnen HPLC-Fraktionen in ^{51}Cr -Zytotoxizitätstest auf Bioaktivität überprüft. Dabei wurden natürliche Peptidmengen von $2,5 \times 10^8$ MZ1851-RCC-Zelläquivalenten pro Testeinheit eingesetzt, sofern man präparative und methodische Materialverluste unberücksichtigt läßt. Auffällig war, daß positiv getestete HPLC-Fraktionen im Vergleich zu den mitgeführten Tumorkontrollen eine geringere lytische Aktivität durch den jeweiligen CTL Klon aufwiesen. Dies liegt darin begründet, daß in den einzelnen HPLC-Fraktionen zahlreiche verschiedene Peptidepitope enthalten sein können, welche zufällig ähnliche, biochemische Eigenschaften aufweisen und dementsprechend zur gleichen Zeit von der HPLC-Säule eluiert wurden. Aufgrund der dadurch resultierenden Kompetition konkurrieren die unterschiedlichen Peptidliganden innerhalb einer HPLC-Fraktion um die Bindung an das relevante HLA-Klasse-I-Molekül, wodurch die reduzierte lytische Aktivität erklärt werden kann.

Interessanterweise wurden neben der singulären bioaktiven HPLC-Fraktion (C10) auch die zwischen der 80. und 88. Minute entnommenen HPLC-Fraktionen in den Zytotoxizitätstests mit dem CTL-Klon A4 positiv getestet. Diese Erkennung könnte darauf zurückzuführen sein, daß das für die Bioaktivität verantwortliche Peptidepitop nicht vollständig entsprechend seiner chemischen Eigenschaften eluiert wurde. Möglicherweise erfolgte die Abdissoziation des an die Säule gebundenen restlichen Peptids erst bei einer höheren Acetonitrilkonzentration (60%), wodurch das positive Testergebnis der späten Fraktionen resultierte. Eine weitere Erklärung wäre, daß in den positiv getesteten HPLC-Fraktionen Peptide enthalten waren, deren chemische Eigenschaften dem des eigentlichen Peptidantigens ähnelten und somit zu einer

Erkennung durch den CTL-Klon A4 führten. Da jedoch die HPLC-Fractionen 80-88 auch von CTL-Klon E77 mit der verwendeten HLA-Cw*07-Transfektante erkannt wurden, gehen wir von einer „unspezifischen Erkennung“ dieser HPLC-Fractionen aus.

Anhand der Zytotoxizitätstests mit dem CTL-Klon E77 konnte keine eindeutig bioaktive HPLC-Fraktion identifiziert werden. Möglicherweise steht dieses Ergebnis damit im Zusammenhang, daß aufgrund der ohnehin geringen Expression von HLA-C-Molekülen auch nur unzureichende Mengen HLA-C-assoziiierter Peptidliganden aufgereinigt werden konnten, um eine eindeutige Erkennung von Peptiden einer distinkten HPLC-Fraktion durch den CTL-Klon E77 zu ermöglichen. Ein weiterer Grund für die ausbleibende dominante Reaktivität könnte natürlich das Fehlen einer antigennegativen T2-HLA-Cw*0704-Transfektante in den Testungen sein.

Zur Identifizierung von MHC-Klasse-I-assoziierten Peptidantigenen mittels massenspektrometrischer Verfahrenstechniken wurden in der Vergangenheit häufig Strategien angewendet, bei denen eine Mikro-Kapillar-Flüssigkeitschromatographie mit einer nano-ESI-MS/MS (*nano-electrospray ionization tandem mass spectroscopy*) gekoppelt wurden.^{80;144} Alternativ verspricht die Verwendung des MALDI MS/MS-Verfahrens (*matrix assisted laser desorption/ionization tandem mass spectroscopy*) verschiedene Vorteile bei der Identifizierung natürlich prozessierter Peptidliganden. So wurde gezeigt, daß mit Hilfe eines MALDI-TOF/TOF-Verfahrens im Vergleich zu früheren MALDI-Analysetechniken eine erhöhte Sensitivität bzw. Effektivität bei der Identifizierung von MHC-Klasse-I-assoziierten Peptidepitopen erzielt werden konnte.⁸¹ Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß das Verfahren eine Analyse mit geringerem Probenverbrauch ermöglicht, so daß ein Großteil des Probenmaterials für funktionelle Untersuchungen zur Verfügung steht. Weiterhin werden die Meßzeiten aufgrund der in der Matrix eingetrockneten Probe verlängert und der Probenteller kann zusätzlich für Wiederholungsmessungen aufbewahrt werden. Sollte nach der HPLC-Fraktionierung die Komplexität der Peptidliganden in der auf Bioaktivität getesteten HPLC-Fraktion zu hoch sein, besteht die Möglichkeit einen zweiten Chromatographieschritt (*second dimension*) durchzuführen. Dazu wird das Probenmaterial durch eine Nano-Kapillar-Flüssigkeitschromatographie (*nano-LC*) in verschiedene Subfraktionen unterteilt, um die Peptidkomplexität zu verringern¹⁸⁹, bevor die eigentliche massenspektrometrische Analyse erfolgt. Dadurch können störende Signale während der Messung verhindert und

die „*precursor*“-Massen genauer bestimmt werden.

Zur Identifizierung der HLA-B/C-assoziierten Peptidantigene der Nierenzellkarzinomlinie MZ1851-RCC wurde das nanoLC-MALDI-TOF/TOF MS/MS-Verfahren verwendet.⁸¹ Mit Hilfe dieser Analysemethode gelang es, aus insgesamt vier unterschiedlichen HPLC-Fractionen zahlreiche verschiedene Peptidepitope zu charakterisieren, deren Ankeraminosäuren den HLA-B/C-Allelen zugeordnet werden konnten. Dieses Ergebnis spiegelt die hohe Sensitivität und Effektivität dieses Verfahrens wider. Dennoch gelang es bisher nicht, das für den CTL-Klon A4 tumorspezifische Peptidantigen zu identifizieren. Als Grund hierfür könnten verschiedene Faktoren angeführt werden. Zum einen war möglicherweise die Zellzahl von $1,2 \times 10^{10}$ Tumorzellen für die Aufreinigung der HLA-assoziierten Peptidliganden nicht ausreichend, so daß die aufgereingte molare Menge des durch den CTL-Klon A4 erkannten Peptidantigens zu gering war, um in der Massenspektrometrie sequenziert zu werden, obwohl dieses Verfahren eine Identifizierung von Peptiden im femtomolaren Bereich ermöglicht.¹⁹⁰ Zum anderen könnte die Konkurrenz des gesuchten T-Zellepitops mit hochabundant exprimierten HLA-B*0702-Peptidliganden, z.B. aus überexprimierten Zellproteinen von MZ1851-RCC, für den fehlenden Erfolg der Analytik ausschlaggebend gewesen sein. Es bleibt abzuwarten, ob durch Verwendung einer höheren Ausgangszellzahl von MZ1851-RCC-Zellen vor Beginn der Immunchromatographie oder durch Einsatz sensitiverer LC-MS/MS-Methoden in Zukunft die Identifizierung der Peptidantigene der aus einem gesunden Spender generierten RCC-reaktiven CTL-Klone gelingt.

5. Zusammenfassung

Eine Voraussetzung für die Entwicklung neuer immunmodulatorischer Therapieverfahren ist die Kenntnis immunogener Tumorantigene, die von tumorreaktiven T-Zellen erkannt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden tumorreaktive CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten (CTL, *cytotoxic T-lymphocytes*) aus dem Blut eines HLA (*human leukocyte antigen*)-kompatiblen Fremdsponders generiert. Methodisch wurden hierzu CD8-selektionierte periphere Blutlymphozyten repetitiv mit der klarzelligen Nierenzellkarzinomlinie MZ1851-RCC (RCC, *renal cell carcinoma*) in einer allogenen gemischten Lymphozyten-Tumorzell Kultur (MLTC, *mixed lymphocyte tumor cell culture*) stimuliert. Aus den Responderlymphozyten wurden mit Hilfe des Grenzverdünnungsverfahrens klonale zytotoxische T-Zellen generiert und expandiert. Die CTL-Klone wurden anschließend phänotypisch mittels Durchflußzytometrie sowie funktionell mittels HLA-Antikörper-Blockadeexperimenten und Kreuzreaktivitätstests detailliert charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß aus dem Blut eines allogenen gesunden Sponders CD8⁺ T-Zellen isoliert werden können, welche Reaktivität gegen Nierenzellkarzinome (NZK) aufweisen und über verschiedene HLA-Klasse-I-Allele restringiert sind. Die von den einzelnen CTL-Klonen erkannten Zielstrukturen zeigten entweder ubiquitäre (z.B. HLA-Cw*0704-reaktiver CTL-Klon E77) oder eine tumorspezifische (z.B. HLA-B*0702-restringierter CTL-Klon A4) Gewebeexpression. Zur Identifizierung der natürlich prozessierten Peptidliganden wurden die HLA-B/C-Allele unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers B123.2 aus einem zuvor hergestellten Detergenslysat der Nierenzellkarzinomlinie MZ1851-RCC immunchromatographisch aufgereinigt. Aus den so isolierten HLA-Peptid-Komplexen wurden die tumorassoziierten Peptidliganden nach Säureelution und Filtration abgespalten und über eine „reverse phase“-HPLC (*high performance liquid chromatography*) fraktioniert. Die Überprüfung der einzelnen HPLC-Fractionen auf Bioaktivität erfolgte mit den korrespondierenden CTL-Klonen in ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstests. Dabei wurde eine HPLC-Fraktion identifiziert, die die lytische Funktion des HLA-B*0702-restringierten CTL-Klons A4 auslösen konnte. Die bioaktive HPLC-Fraktion wurde dazu durch eine zweite (*second dimension*) Kapillarflüssigkeitschromatographie (*Cap-LC, capillar liquid chromatography*) in Subfraktionen geringerer Komplexität aufgetrennt und die darin enthaltenen Peptidepitope durch das

MALDI-TOF/TOF (*matrix assisted laser desorption/ionization- time of flight/time of flight*)-Analyseverfahren sequenziert. Innerhalb dieser HPLC-Fraktion wurden eine Vielzahl von HLA-B/C-assoziierten Peptidliganden erfolgreich sequenziert, was die Effektivität dieser Verfahrenstechnik zur Identifizierung natürlich prozessierter HLA-Klasse-I-bindender Peptide unter Beweis stellt. Leider war es mit dieser Methode bisher nicht möglich, das von CTL-Klon A4 detektierte Peptidepitop zu sequenzieren. Dies liegt möglicherweise in der unzureichenden Konzentration des Peptidepitops in der bioaktiven HPLC-Fraktion begründet. In Folgearbeiten soll nun mit erhöhter Probenmenge beziehungsweise verbesserter Analytik der erneute Versuch unternommen werden, das Zielantigen des CTL-Klons A4 zu identifizieren. Die Kenntnis von Antigenen, die tumorspezifisch exprimiert und von CD8⁺ CTL aus gesunden Spendern erkannt werden, eröffnet neue therapeutische Möglichkeiten, das spezifische Immunsystem des Stammzellspenders nach allogener Blutstammzelltransplantation gezielt zur Steigerung von Tumorabstoßungsreaktionen (z.B. durch Vakzinierung oder adoptivem T-Zelltransfer) zu nutzen.

6. Literaturverzeichnis

1. Sluss,H.K. and S.N.Jones. 2003. Analysing p53 tumour suppressor functions in mice. *Expert.Opin.Ther.Targets*. 7:89-99.
2. Pietsch,E.C., O.Humbey and M.E.Murphy. 2006. Polymorphisms in the p53 pathway. *Oncogene* 25:1602-1611.
3. Soussi,T. 2000. p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer Res*. 60:1777-1788.
4. Motzer,R.J. and R.M.Bukowski. 2006. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. *J.Clin.Oncol*. 24:5601-5608.
5. Motzer,R.J. and P.Russo. 2000. Systemic therapy for renal cell carcinoma. *J.Urol*. 163:408-417.
6. McLaughlin,J.K. and L.Lipworth. 2000. Epidemiologic aspects of renal cell cancer. *Semin.Oncol*. 27:115-123.
7. Pantuck,A.J., A.Zisman and A.S.Beldegrun. 2001. The changing natural history of renal cell carcinoma. *J.Urol*. 166:1611-1623.
8. Motzer,R.J., M.Mazumdar, J.Bacik, W.Berg, A.Amsterdam and J.Ferrara. 1999. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J.Clin.Oncol*. 17:2530-2540.
9. Motzer,R.J., P.Russo, D.M.Nanus and W.J.Berg. 1997. Renal cell carcinoma. *Curr.Probl.Cancer* 21:185-232.
10. Gleave,M.E., M.Elhilali, Y.Fradet, I.Davis, P.Venner, F.Saad, L.H.Klotz, M.J.Moore, V.Paton and A.Bajamonde. 1998. Interferon gamma-1b compared with placebo in metastatic renal-cell carcinoma. Canadian Urologic Oncology Group. *N.Engl.J.Med*. 338:1265-1271.
11. Oliver,R.T., A.B.Nethersell and J.M.Bottomley. 1989. Unexplained spontaneous regression and alpha-interferon as treatment for metastatic renal carcinoma. *Br.J.Urol*. 63:128-131.
12. Schmidt,R., D.Stippel, F.Krings and M.Pollok. 1995. Malignancies of the genito-urinary system following renal transplantation. *Br.J.Urol*. 75:572-577.
13. Rosenberg,S.A., J.C.Yang, S.L.Topalian, D.J.Schwartzentruber, J.S.Weber, D.R.Parkinson, C.A.Seipp, J.H.Einhorn and D.E.White. 1994. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. *JAMA* 271:907-913.

14. Nathan,P.D. and T.G.Eisen. 2002. The biological treatment of renal-cell carcinoma and melanoma. *Lancet Oncol.* 3:89-96.
15. Coppin,C., F.Porzolt, A.Awa, J.Kumpf, A.Coldman and T.Wilt. 2005. Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *Cochrane.Database.Syst.Rev.*CD001425.
16. Doehn,C. and D.Jocham. 2004. [Immunotherapy of renal cell carcinoma: results from current phase-III-trials]. *Aktuelle Urol.* 35:121-129.
17. Atzpodien,J., H.Kirchner, U.Jonas, L.Bergmann, H.Schott, H.Heynemann, P.Fornara, S.A.Loening, J.Roigas, S.C.Muller, H.Bodenstein, S.Pomer, B.Metzner, U.Rebmann, R.Oberneder, M.Siebels, T.Wandert, T.Puchberger and M.Reitz. 2004. Interleukin-2- and interferon alfa-2a-based immunochemotherapy in advanced renal cell carcinoma: a Prospectively Randomized Trial of the German Cooperative Renal Carcinoma Chemoimmunotherapy Group (DGCIN). *J.Clin.Oncol.* 22:1188-1194.
18. Upton,M.P., R.A.Parker, A.Youmans, D.F.McDermott and M.B.Atkins. 2005. Histologic predictors of renal cell carcinoma response to interleukin-2-based therapy. *J.Immunother.* 28:488-495.
19. Flad,H.D. and A.J.Ulmer. 1981. Interaction of human lymphocyte subpopulations with interleukin 2 (Il-2). *Eur.J.Cell Biol.* 25:16-18.
20. Flanigan,R.C., S.E.Salmon, B.A.Blumenstein, S.I.Bearman, V.Roy, P.C.McGrath, J.R.Caton, Jr., N.Munshi and E.D.Crawford. 2001. Nephrectomy followed by interferon alfa-2b compared with interferon alfa-2b alone for metastatic renal-cell cancer. *N.Engl.J.Med.* 345:1655-1659.
21. Banchereau,J. and A.K.Palucka. 2005. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 5:296-306.
22. Escudier,B., T.Eisen, W.M.Stadler, C.Szczylik, S.Oudard, M.Siebels, S.Negrier, C.Chevreau, E.Solska, A.A.Desai, F.Rolland, T.Demkow, T.E.Hutson, M.Gore, S.Freeman, B.Schwartz, M.Shan, R.Simantov and R.M.Bukowski. 2007. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N.Engl.J.Med.* 356:125-134.
23. Yang,J.C. 2004. Bevacizumab for patients with metastatic renal cancer: an update. *Clin.Cancer Res.* 10:6367S-6370S.
24. Theobald,M., T.Nierle, D.Bunjes, R.Arnold and H.Heimpel. 1992. Host-specific interleukin-2-secreting donor T-cell precursors as predictors of acute graft-versus-host disease in bone marrow transplantation between HLA-identical siblings. *N.Engl.J.Med.* 327:1613-1617.

25. Niederwieser,D., A.Grassegger, J.Aubock, M.Herold, D.Nachbaur, A.Rosenmayr, A.Gachter, W.Nussbaumer, S.Gaggl and M.Ritter. 1993. Correlation of minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes with graft-versus-host disease status and analyses of tissue distribution of their target antigens. *Blood* 81:2200-2208.
26. Bernhard,H., J.Karbach, T.Wolfel, P.Busch, S.Storkel, M.Stockle, C.Wolfel, B.Seliger, C.Huber and K.H.Meyer zum Buschenfelde. 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.
27. Finke,J.H., P.Rayman, M.Edinger, R.R.Tubbs, J.Stanley, E.Klein and R.Bukowski. 1992. Characterization of a human renal cell carcinoma specific cytotoxic CD8+ T cell line. *J.Immunother.* 11:1-11.
28. Delves,P.J. and I.M.Roitt. 2000. The immune system. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343:37-49.
29. Delves,P.J. and I.M.Roitt. 2000. The immune system. Second of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343:108-117.
30. Bell,D., J.W.Young and J.Banchereau. 1999. Dendritic cells. *Adv.Immunol* 72:255-324.
31. Medzhitov,R. and C.A.Janeway, Jr. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr.Opin.Immunol* 9:4-9.
32. Rammensee,H.G. 1995. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr.Opin.Immunol* 7:85-96.
33. McCluskey,J. and C.A.Peh. 1999. The human leucocyte antigens and clinical medicine: an overview. *Rev Immunogenet.* 1:3-20.
34. Klein,J. and A.Sato. 2000. The HLA system. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343:702-709.
35. Klein,J. and A.Sato. 2000. The HLA system. Second of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343:782-786.
36. Horton,R., L.Wilming, V.Rand, R.C.Lovering, E.A.Bruford, V.K.Khodiyar, M.J.Lush, S.Povey, C.C.Talbot, Jr., M.W.Wright, H.M.Wain, J.Trowsdale, A.Ziegler and S.Beck. 2004. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet.* 5:889-899.
37. Salter,R.D., R.J.Benjamin, P.K.Wesley, S.E.Buxton, T.P.Garrett, C.Clayberger, A.M.Krensky, A.M.Norment, D.R.Littman and P.Parham. 1990. A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the alpha 3 domain of HLA-A2. *Nature* 345:41-46.

38. Saper, M.A., P.J. Bjorkman and D.C. Wiley. 1991. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 219:277-319.
39. Geraghty, D.E., B.H. Koller, J.A. Hansen and H.T. Orr. 1992. The HLA class I gene family includes at least six genes and twelve pseudogenes and gene fragments. *J. Immunol* 149:1934-1946.
40. O'Callaghan, C.A. and J.I. Bell. 1998. Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. *Immunol Rev* 163:129-138.
41. Davis, J.E., R.G. Cook, M. Van and R.R. Rich. 1988. Polymorphic Bgl II restriction sites of DR alpha demarcate a novel HLA-DR1 antigen. *Immunogenetics* 28:171-181.
42. Bouvier, M. and D.C. Wiley. 1994. Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science* 265:398-402.
43. Hildebrand, W.H., H.R. Turnquist, K.R. Prilliman, H.D. Hickman, E.L. Schenk, M.M. McIlhane and J.C. Solheim. 2002. HLA class I polymorphism has a dual impact on ligand binding and chaperone interaction. *Hum. Immunol* 63:248-255.
44. Falk, K., O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung and H.G. Rammensee. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351:290-296.
45. Zhou, M., J.R. Peng, H.G. Zhang, H.X. Wang, Z.H. Zhong, X.Y. Pan, W.F. Chen and X.S. Leng. 2005. Identification of two naturally presented MAGE antigenic peptides from a patient with hepatocellular carcinoma by mass spectrometry. *Immunol Lett.* 99:113-121.
46. Lu, J. and E. Celis. 2000. Use of two predictive algorithms of the world wide web for the identification of tumor-reactive T-cell epitopes. *Cancer Res.* 60:5223-5227.
47. Koelle, D.M., H.B. Chen, M.A. Gavin, A. Wald, W.W. Kwok and L. Corey. 2001. CD8 CTL from genital herpes simplex lesions: recognition of viral tegument and immediate early proteins and lysis of infected cutaneous cells. *J. Immunol* 166:4049-4058.
48. Neefjes, J.J. and F. Momburg. 1993. Cell biology of antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol* 5:27-34.
49. Stoltze, L., T.P. Dick, M. Deeg, B. Pommerl, H.G. Rammensee and H. Schild. 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.
50. Yewdell, J.W. and C.V. Nicchitta. 2006. The DRiP hypothesis decennial: support, controversy, refinement and extension. *Trends Immunol* 27:368-373.

51. Schubert,U., L.C.Anton, J.Gibbs, C.C.Norbury, J.W.Yewdell and J.R.Bennink. 2000. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404:770-774.
52. Tanaka,K., T.Tamura, T.Yoshimura and A.Ichihara. 1992. Proteasomes: protein and gene structures. *New Biol.* 4:173-187.
53. Groettrup,M., A.Soza, U.Kuckelkorn and P.M.Kloetzel. 1996. Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency. *Immunol Today* 17:429-435.
54. Tanaka,K. and M.Kasahara. 1998. The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol Rev* 163:161-176.
55. Groettrup,M., A.Soza, M.Eggers, L.Kuehn, T.P.Dick, H.Schild, H.G.Rammensee, U.H.Koszinowski and P.M.Kloetzel. 1996. A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. *Nature* 381:166-168.
56. Dick,T.P., T.Ruppert, M.Groettrup, P.M.Kloetzel, L.Kuehn, U.H.Koszinowski, S.Stevanovic, H.Schild and H.G.Rammensee. 1996. Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell* 86:253-262.
57. Ehring,B., T.H.Meyer, C.Eckerskorn, F.Lottspeich and R.Tampe. 1996. Effects of major-histocompatibility-complex-encoded subunits on the peptidase and proteolytic activities of human 20S proteasomes. Cleavage of proteins and antigenic peptides. *Eur.J.Biochem.* 235:404-415.
58. Momburg,F. and G.J.Hammerling. 1998. Generation and TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex class I molecules. *Adv.Immunol* 68:191-256.
59. Zhang,Y. and D.B.Williams. 2006. Assembly of MHC class I molecules within the endoplasmic reticulum. *Immunol Res.* 35:151-162.
60. Simon,A., Z.Dosztanyi, E.Rajnavolgyi and I.Simon. 2000. Function-related regulation of the stability of MHC proteins. *Biophys.J.* 79:2305-2313.
61. Watts,C. 1997. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu.Rev Immunol* 15:821-850.
62. Nakagawa,T.Y. and A.Y.Rudensky. 1999. The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol Rev* 172:121-129.
63. Cresswell,P. 1996. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84:505-507.

64. Kropshofer, H., S.O. Arndt, G. Moldenhauer, G.J. Hammerling and A.B. Vogt. 1997. HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH. *Immunity*. 6:293-302.
65. Reiser, J.B., C. Darnault, A. Guimezanes, C. Gregoire, T. Mosser, A.M. Schmitt-Verhulst, J.C. Fontecilla-Camps, B. Malissen, D. Housset and G. Mazza. 2000. Crystal structure of a T cell receptor bound to an allogeneic MHC molecule. *Nat Immunol* 1:291-297.
66. Weninger, W., N. Manjunath and U.H. von Andrian. 2002. Migration and differentiation of CD8+ T cells. *Immunol Rev* 186:221-233.
67. Schwartz, R.H. 2003. T cell anergy. *Annu. Rev Immunol* 21:305-334.
68. Hara, T. and S.M. Fu. 1985. Human T cell activation. I. Monocyte-independent activation and proliferation induced by anti-T3 monoclonal antibodies in the presence of tumor promoter 12-o-tetradecanoyl phorbol-13 acetate. *J. Exp. Med.* 161:641-656.
69. Hara, T., S.M. Fu and J.A. Hansen. 1985. Human T cell activation. II. A new activation pathway used by a major T cell population via a disulfide-bonded dimer of a 44 kilodalton polypeptide (9.3 antigen). *J. Exp. Med.* 161:1513-1524.
70. Coyle, A.J. and J.C. Gutierrez-Ramos. 2001. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol* 2:203-209.
71. Shiver, J.W., L. Su and P.A. Henkart. 1992. Cytotoxicity with target DNA breakdown by rat basophilic leukemia cells expressing both cytolysin and granzyme A. *Cell* 71:315-322.
72. Rieux-Laucat, F., F. Le Deist, C. Hivroz, I.A. Roberts, K.M. Debatin, A. Fischer and J.P. de Villartay. 1995. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268:1347-1349.
73. Constant, S.L. and K. Bottomly. 1997. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu. Rev Immunol* 15:297-322.
74. Waldner, M., C.C. Schimanski and M.F. Neurath. 2006. Colon cancer and the immune system: The role of tumor invading T cells. *World J. Gastroenterol.* 12:7233-7238.
75. Sato, E., S.H. Olson, J. Ahn, B. Bundy, H. Nishikawa, F. Qian, A.A. Jungbluth, D. Frosina, S. Gnjjatic, C. Ambrosone, J. Kepner, T. Odunsi, G. Ritter, S. Lele, Y.T. Chen, H. Ohtani, L.J. Old and K. Odunsi. 2005. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102:18538-18543.

76. Pawelec,G. and C.Gouttefangeas. 2004. Strategies for immune therapy: Wurzburg, Germany, 29 February-3 March 2004. *Cancer Immunol Immunother.* 53:755-758.
77. Pardoll,D. 1996. Releasing the brakes on antitumor immune response. *Science* 271:1691.
78. Singh-Jasuja,H., N.P.Emmerich and H.G.Rammensee. 2004. The Tubingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 53:187-195.
79. Michael,A. and H.S.Pandha. 2003. Renal-cell carcinoma: tumour markers, T-cell epitopes, and potential for new therapies. *Lancet Oncol.* 4:215-223.
80. Hunt,D.F., R.A.Henderson, J.Shabanowitz, K.Sakaguchi, H.Michel, N.Sevilir, A.L.Cox, E.Appella and V.H.Engelhard. 1992. Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* 255:1261-1263.
81. Hofmann,S., M.Gluckmann, S.Kausche, A.Schmidt, C.Corvey, R.Lichtenfels, C.Huber, C.Albrecht, M.Karas, and W.Herr. 2005. Rapid and sensitive identification of major histocompatibility complex class I-associated tumor peptides by Nano-LC MALDI MS/MS. *Mol.Cell Proteomics.* 4:1888-1897.
82. Cox,A.L., J.Skipper, Y.Chen, R.A.Henderson, T.L.Darrow, J.Shabanowitz, V.H.Engelhard, D.F.Hunt and C.L.Slingluff, Jr. 1994. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 264:716-719.
83. Linnemann,T., S.Tumenjargal, S.Gellrich, K.Wiesmuller, K.Kaltoft, W.Sterry and P.Walden. 2001. Mimotopes for tumor-specific T lymphocytes in human cancer determined with combinatorial peptide libraries. *Eur.J.Immunol* 31:156-165.
84. Lennerz,V., M.Fatho, C.Gentilini, R.A.Frye, A.Lifke, D.Ferel, C.Wolfel, C.Huber and T.Wolfel. 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.
85. Wolfel,T., M.Hauer, J.Schneider, M.Serrano, C.Wolfel, E.Klehmann-Hieb, E.De Plaen, T.Hankeln, K.H.Meyer zum Buschenfelde and D.Beach. 1995. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269:1281-1284.
86. De Plaen,E., C.Lurquin, B.Lethe, B.P.van der, V.Brichard, J.C.Renauld, P.Coulie, A.Van Pel and T.Boon. 1997. Identification of genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Methods* 12:125-142.

87. Sahin,U., O.Tureci, H.Schmitt, B.Cochlovius, T.Johannes, R.Schmits, F.Stenner, G.Luo, I.Schobert and M.Pfreundschuh. 1995. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92:11810-11813.
88. Tureci,O., D.Usener, S.Schneider and U.Sahin. 2005. Identification of tumor-associated autoantigens with SEREX. *Methods Mol.Med.* 109:137-154.
89. Valmori,D., V.Dutoit, D.Lienard, D.Rimoldi, M.J.Pittet, P.Champagne, K.Ellefsen, U.Sahin, D.Speiser, F.Lejeune, J.C.Cerottini and P.Romero. 2000. Naturally occurring human lymphocyte antigen-A2 restricted CD8+ T-cell response to the cancer testis antigen NY-ESO-1 in melanoma patients. *Cancer Res.* 60:4499-4506.
90. Gnjjatic,S., Y.Nagata, E.Jager, E.Stockert, S.Shankara, B.L.Roberts, G.P.Mazzara, S.Y.Lee, P.R.Dunbar, B.Dupont, V.Cerundolo, G.Ritter, Y.T.Chen, A.Knuth and L.J.Old. 2000. Strategy for monitoring T cell responses to NY-ESO-1 in patients with any HLA class I allele. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:10917-10922.
91. Stevanovic,S. 2002. Structural basis of immunogenicity. *Transpl.Immunol* 10:133-136.
92. Rammensee,H., J.Bachmann, N.P.Emmerich, O.A.Bachor and S.Stevanovic. 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50:213-219.
93. Kessler,J.H., N.J.Beekman, S.A.Bres-Vloemans, P.Verdijk, P.A.van Veelen, A.M.Kloosterman-Joosten, D.C.Vissers, G.J.ten Bosch, M.G.Kester, A.Sijts, D.J.Wouter, F.Ossendorp, R.Offringa and C.J.Melief. 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.
94. Kawakami,Y., T.Fujita, Y.Matsuzaki, T.Sakurai, M.Tsukamoto, M.Toda and H.Sumimoto. 2004. Identification of human tumor antigens and its implications for diagnosis and treatment of cancer. *Cancer Sci.* 95:784-791.
95. Wallny,H.J., K.Deres, S.Faath, G.Jung, A.Van Pel, T.Boon and H.G.Rammensee. 1992. Identification and quantification of a naturally presented peptide as recognized by cytotoxic T lymphocytes specific for an immunogenic tumor variant. *Int.Immunol* 4:1085-1090.
96. van der,B.P. and E.B.Van den. 1992. Molecular definition of tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Curr.Opin.Immunol* 4:608-612.
97. Paschen,A., S.Eichmuller and D.Schadendorf. 2004. Identification of tumor antigens and T-cell epitopes, and its clinical application. *Cancer Immunol Immunother.* 53:196-203.

98. Kirkin,A.F., K.N.Dzhandzhugazyan and J.Zeuthen. 2002. Cancer/testis antigens: structural and immunobiological properties. *Cancer Invest* 20:222-236.
99. van der,B.P., C.Traversari, P.Chomez, C.Lurquin, E.De Plaen, E.B.Van den, A.Knuth and T.Boon. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254:1643-1647.
100. Neumann,E., A.Engelsberg, J.Decker, S.Storkel, E.Jaeger, C.Huber and B.Seliger. 1998. Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens RAGE-1, PRAME, and glycoprotein 75 in human renal cell carcinoma: candidates for T-cell-based immunotherapies? *Cancer Res.* 58:4090-4095.
101. Wolfel,T., A.Van Pel, V.Brichard, J.Schneider, B.Seliger, K.H.Meyer zum Buschenfelde and T.Boon. 1994. Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur.J.Immunol* 24:759-764.
102. Kawakami,Y., S.Eliyahu, K.Sakaguchi, P.F.Robbins, L.Rivoltini, J.R.Yannelli, E.Appella and S.A.Rosenberg. 1994. Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J.Exp.Med.* 180:347-352.
103. Bakker,A.B., M.W.Schreurs, A.J.de Boer, Y.Kawakami, S.A.Rosenberg, G.J.Adema and C.G.Figdor. 1994. Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes. *J.Exp.Med.* 179:1005-1009.
104. Mandruzzato,S., F.Brasseur, G.Andry, T.Boon and B.P.van der. 1997. A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J.Exp.Med.* 186:785-793.
105. Greenblatt,M.S., W.P.Bennett, M.Hollstein and C.C.Harris. 1994. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 54:4855-4878.
106. Fisk,B., T.L.Blevins, J.T.Wharton and C.G.Ioannides. 1995. Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J.Exp.Med.* 181:2109-2117.
107. Vonderheide,R.H., W.C.Hahn, J.L.Schultze and L.M.Nadler. 1999. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity.* 10:673-679.
108. Furumoto,H. and M.Irahara. 2002. Human papilloma virus (HPV) and cervical cancer. *J.Med.Invest* 49:124-133.

109. Yata,J., C.Desgranges, T.Nakagawa, M.C.Favre and G.De The. 1975. Lymphoblastoid transformation and kinetics of appearance of viral nuclear antigen (EBNA) in cord-blood lymphocytes infected by Epstein-Barr Virus (EBV). *Int.J.Cancer* 15:377-384.
110. Hudrisier,D., J.Riond, H.Mazarguil and J.E.Gairin. 2001. Pleiotropic effects of post-translational modifications on the fate of viral glycopeptides as cytotoxic T cell epitopes. *J.Biol.Chem.* 276:38255-38260.
111. Hiltbold,E.M., M.D.Alter, P.Ciborowski and O.J.Finn. 1999. Presentation of MUC1 tumor antigen by class I MHC and CTL function correlate with the glycosylation state of the protein taken Up by dendritic cells. *Cell Immunol* 194:143-149.
112. Kolenko,V., Q.Wang, M.C.Riedy, J.O'Shea, J.Ritz, M.K.Cathcart, P.Rayman, R.Tubbs, M.Edinger, A.Novick, R.Bukowski and J.Finke. 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.
113. Rotzschke,O., K.Falk, S.Faath, and H.G.Rammensee. 1991. On the nature of peptides involved in T cell alloreactivity. *J.Exp.Med.* 174:1059-1071.
114. Smith,P.A., A.Brunmark, M.R.Jackson, and T.A.Potter. 1997. Peptide-independent recognition by alloreactive cytotoxic T lymphocytes (CTL). *J.Exp.Med.* 185:1023-1033.
115. Sadovnikova,E., L.A.Jopling, K.S.Soo and H.J.Stauss. 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.
116. Stauss,H.J. 1999. Immunotherapy with CTLs restricted by nonself MHC. *Immunol Today* 20:180-183.
117. Nash,R.A. and R.Storb. 1996. Graft-versus-host effect after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: GVHD and GVL. *Curr.Opin.Immunol* 8:674-680.
118. Goulmy,E. 1997. Minor histocompatibility antigens: from T cell recognition to peptide identification. *Hum.Immunol* 54:8-14.
119. Ways,J.P. and P.Parham. 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.
120. Parham,P. and F.M.Brodsky. 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.

121. Berger,A.E., J.E.Davis and P.Cresswell. 1982. Monoclonal antibody to HLA-A3. *Hybridoma* 1:87-90.
122. Toubert,A., C.Raffoux, J.Boretto, J.Sire, R.Sodoyer, S.R.Thurau, B.Amor, J.Colombani, F.A.Lemonnier and B.R.Jordan. 1988. Epitope mapping of HLA-B27 and HLA-B7 antigens by using intradomain recombinants. *J.Immunol* 141:2503-2509.
123. Rebai,N. and B.Malissen. 1983. Structural and genetic analyses of HLA class I molecules using monoclonal xenoantibodies. *Tissue Antigens* 22:107-117.
124. Parham,P., C.J.Barnstable and W.F.Bodmer. 1979. Use of a monoclonal antibody (W6/32) in structural studies of HLA-A,B,C, antigens. *J.Immunol* 123:342-349.
125. Lampson,L.A. and R.Levy. 1980. Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J.Immunol* 125:293-299.
126. Tatsumi,E. 1992. Epstein-Barr virus (EBV) and human hematopoietic cell lines: a review. *Hum.Cell* 5:79-86.
127. Wolfel,T., M.Hauer, E.Klehmann, V.Brighard, B.Ackermann, A.Knuth, T.Boon and K.H.Meyer zum Buschenfelde. 1993. Analysis of antigens recognized on human melanoma cells by A2-restricted cytolytic T lymphocytes (CTL). *Int.J.Cancer* 55:237-244.
128. Wolfel,T., W.Herr, P.Coulie, U.Schmitt, K.H.Meyer zum Buschenfelde and A.Knuth. 1993. Lysis of human pancreatic adenocarcinoma cells by autologous HLA-class I-restricted cytolytic T-lymphocyte (CTL) clones. *Int.J.Cancer* 54:636-644.
129. Gluzman,Y. 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23:175-182.
130. Graham,F.L., J.Smiley, W.C.Russell and R.Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J.Gen. Virol.* 36:59-74.
131. Salter,R.D., D.N.Howell and P.Cresswell. 1985. Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics* 21:235-246.
132. Steinle,A. and D.J.Schendel. 1994. HLA class I alleles of LCL 721 and 174 x CEM.T2 (T2). *Tissue Antigens* 44:268-270.
133. Baas,E.J., H.M.van Santen, M.J.Kleijmeer, H.J.Geuze, P.J.Peters and H.L.Ploegh. 1992. Peptide-induced stabilization and intracellular localization of empty HLA class I complexes. *J.Exp.Med.* 176:147-156.

134. Klein,E., H.Ben Bassat, H.Neumann, P.Ralph, J.Zeuthen, A.Polliack and F.Vanky. 1976. Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int.J.Cancer* 18:421-431.
135. Kaplan,J. and D.M.Callewaert. 1978. Expression of human T-lymphocyte antigens by natural killer cells. *J.Natl.Cancer Inst.* 60:961-964.
136. Porzsoft,F. and H.Heimpel. 1984. The relationship of lytic effects against autologous and allogeneic PHA blasts induced in human mixed lymphocyte cultures. *Immunol Lett.* 8:33-38.
137. Fontenot,J.D., J.M.Ball, M.A.Miller, C.M.David and R.C.Montelaro. 1991. A survey of potential problems and quality control in peptide synthesis by the fluorenylmethoxycarbonyl procedure. *Pept.Res.* 4:19-25.
138. Herr,W., B.Linn, N.Leister, E.Wandel, K.H.Meyer zum Buschenfelde and T.Wolfel. 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.
139. Britten,C.M., R.G.Meyer, T.Kreer, I.Drexler, T.Wolfel and W.Herr. 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.
140. Schawaller,R., M.Rollinghoff and H.Wagner. 1980. Fine specificity and cytolytic activity of continuously growing alloreactive cytotoxic T lymphocyte clones. *Scand.J.Immunol* 11:449-453.
141. Stulting,R.D. and G.Berke. 1973. The use of 51Cr release as a measure of lymphocyte-mediated cytolysis in vitro. *Cell Immunol* 9:474-476.
142. Bodmer,H., G.Ogg, F.Gotch, and A.McMichael. 1989. Anti-HLA-A2 antibody-enhancement of peptide association with HLA-A2 as detected by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 342:443-446.
143. Torabi-Pour,N., A.M.Nouri, R.Saffie, W.J.Morrow and R.T.Oliver. 2002. Isolation of human leukocyte antigen (HLA)-associated peptide(s) in the absence of HLA-restricted specific cytolytic T lymphocytes. *Urol.Int.* 69:219-226.
144. de Jong,A. 1998. Contribution of mass spectrometry to contemporary immunology. *Mass Spectrom.Rev* 17:311-335.
145. Schagger,H. and G.von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal.Biochem.* 166:368-379.
146. Laemmli,U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

147. Hillenkamp,F. and M.Karas. 1990. Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods Enzymol.* 193:280-295.
148. Karas,M. 1996. Matrix-assisted laser desorption ionization MS: a progress report. *Biochem.Soc.Trans.* 24:897-900.
149. Kaufmann,R. 1995. Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry: a novel analytical tool in molecular biology and biotechnology. *J.Biotechnol.* 41:155-175.
150. Hoffmann,C., D.Blechs Schmidt, R.Kruger, M.Karas and C.Griesinger. 2002. Mass spectrometric sequencing of individual peptides from combinatorial libraries via specific generation of chain-terminated sequences. *J.Comb.Chem.* 4:79-86.
151. Fleischhauer,K., N.A.Kernan, R.J.O'Reilly, B.Dupont, and S.Y.Yang. 1990. Bone marrow-allograft rejection by T lymphocytes recognizing a single amino acid difference in HLA-B44. *N.Engl.J.Med.* 323:1818-1822.
152. Sherman,L.A. and S.Chattopadhyay. 1993. The molecular basis of allorecognition. *Annu.Rev Immunol* 11:385-402.
153. Wang,H., K.Tokunaga, Y.Ishikawa, A.Asahina, S.Kuwata, T.Akaza, K.Tadokoro, Y.Shibata, M.Takiguchi and T.Juji. 1996. Identification and DNA typing of two Cw7 alleles (Cw*0702 and Cw*0704) in Japanese, with the corrected sequence of Cw*0702. *Hum.Immunol* 45:52-58.
154. Smith,K.A. 1988. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 240:1169-1176.
155. Lenardo,M.J. 1991. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 353:858-861.
156. Dai,Z., B.T.Konieczny and F.G.Lakkis. 2000. The dual role of IL-2 in the generation and maintenance of CD8+ memory T cells. *J.Immunol* 165:3031-3036.
157. Swain,S.L. 1991. Lymphokines and the immune response: the central role of interleukin-2. *Curr.Opin.Immunol* 3:304-310.
158. Shrikant,P. and M.F.Mescher. 2002. Opposing effects of IL-2 in tumor immunotherapy: promoting CD8 T cell growth and inducing apoptosis. *J.Immunol* 169:1753-1759.
159. Appasamy,P.M. 1999. Biological and clinical implications of interleukin-7 and lymphopoiesis. *Cytokines Cell Mol.Ther.* 5:25-39.

160. Ku,C.C., M.Murakami, A.Sakamoto, J.Kappler and P.Marrack. 2000. Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science* 288:675-678.
161. Kos,F.J. and A.Mullbacher. 1993. IL-2-independent activity of IL-7 in the generation of secondary antigen-specific cytotoxic T cell responses in vitro. *J.Immunol* 150:387-393.
162. Dorrschuck,A., A.Schmidt, E.Schnurer, M.Gluckmann, C.Albrecht, C.Wolfel, V.Lennerz, A.Lifke, C.Di Natale, E.Ranieri, L.Gesualdo, C.Huber, M.Karas, T.Wolfel and W.Herr. 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.
163. Jung,D., C.Hilmes, A.Knuth, E.Jaeger, C.Huber and B.Seliger. 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.
164. Schendel,D.J., R.Oberneder, C.S.Falk, P.Jantzer, S.Kressenstein, B.Maget, A.Hofstetter, G.Riethmuller and E.Nossner. 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.
165. Kausche,S., T.Weehler, E.Schnuerer, V.Lennerz, W.Brenner., S.Melchior, M.Grone, M.Nonn, S.Strand, R.Meyer, E.Ranieri, C.Huber, C.S.Falk and W.Herr. 2006. Superior antitumor in vitro responses of allogeneic matched sibling compared with autologous patient CD8+ T cells. *Cancer Res.* 66(23):11447-11454.
166. Ng,C.S., A.C.Novick, C.S.Tannenbaum, R.M.Bukowski and J.H.Finke. 2002. Mechanisms of immune evasion by renal cell carcinoma: tumor-induced T-lymphocyte apoptosis and NFkappaB suppression. *Urology* 59:9-14.
167. Sherman,L.A., D.J.Morgan, C.T.Nugent, F.J.Hernandez, H.T.Kreuwel, A.Murtaza, A.Ko and J.Biggs. 2000. Self-tolerance and the composition of T cell repertoire. *Immunol Res.* 21:305-313.
168. Rabinowich,H., T.E.Reichert, Y.Kashii, B.R.Gastman, M.C.Bell and T.L.Whiteside. 1998. Lymphocyte apoptosis induced by Fas ligand- expressing ovarian carcinoma cells. Implications for altered expression of T cell receptor in tumor-associated lymphocytes. *J.Clin.Invest* 101:2579-2588.
169. Kiessling,R., K.Kono, M.Petersson and K.Wasserman. 1996. Immunosuppression in human tumor-host interaction: role of cytokines and alterations in signal-transducing molecules. *Springer Semin.Immunopathol.* 18:227-242.

170. Ferrone,S. and F.M.Marincola. 1995. Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today* 16:487-494.
171. Chen,C. and N.Nabavi. 1994. In vitro induction of T cell anergy by blocking B7 and early T cell costimulatory molecule ETC-1/B7-2. *Immunity*. 1:147-154.
172. Bennink,J.R., R.Anderson, I.Bacik, J.Cox, P.Day, Y.Deng, C.Lapham, H.Link, G.Russ and J.W.Yewdell. 1993. Antigen processing: where tumor-specific T-cell responses begin. *J.Immunother*. 14:202-208.
173. Madrenas,J., R.H.Schwartz and R.N.Germain. 1996. Interleukin 2 production, not the pattern of early T-cell antigen receptor-dependent tyrosine phosphorylation, controls anergy induction by both agonists and partial agonists. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:9736-9741.
174. Hilders,C.G., L.Ras, J.D.van Eendenburg, Y.Nooyen and G.J.Fleuren. 1994. Isolation and characterization of tumor-infiltrating lymphocytes from cervical carcinoma. *Int.J.Cancer* 57:805-813.
175. Pittet,M.J., D.E.Speiser, D.Valmori, J.C.Cerottini and P.Romero. 2000. Cutting edge: cytolytic effector function in human circulating CD8+ T cells closely correlates with CD56 surface expression. *J.Immunol* 164:1148-1152.
176. Schwartz,R.H. 1992. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 71:1065-1068.
177. Valmori,D., C.Scheibenbogen, V.Dutoit, D.Nagorsen, A.M.Asemissen, V.Rubio-Godoy, D.Rimoldi, P.Guillaume, P.Romero, D.Schadendorf, M.Lipp, P.Y.Dietrich, E.Thiel, J.C.Cerottini, D.Lienard and U.Keilholz. 2002. Circulating Tumor-reactive CD8(+) T cells in melanoma patients contain a CD45RA(+)CCR7(-) effector subset exerting ex vivo tumor-specific cytolytic activity. *Cancer Res*. 62:1743-1750.
178. Michie,C.A., A.McLean, C.Alcock and P.C.Beverley. 1992. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature* 360:264-265.
179. Campbell,J.J., E.P.Bowman, K.Murphy, K.R.Youngman, M.A.Siani, D.A.Thompson, L.Wu, A.Zlotnik and E.C.Butcher. 1998. 6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3beta receptor CCR7. *J.Cell Biol*. 141:1053-1059.
180. Forster,R., A.Schubel, D.Breitfeld, E.Kremmer, I.Renner-Muller, E.Wolf and M.Lipp. 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99:23-33.

181. Appay,V., P.R.Dunbar, M.Callan, P.Klenerman, G.M.Gillespie, L.Papagno, G.S.Ogg, A.King, F.Lechner, C.A.Spina, S.Little, D.V.Havlir, D.D.Richman, N.Gruener, G.Pape, A.Waters, P.Easterbrook, M.Salio, V.Cerundolo, A.J.McMichael and S.L.Rowland-Jones. 2002. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med.* 8:379-385.
182. Sprent,J. and D.F.Tough. 1994. Lymphocyte life-span and memory. *Science* 265:1395-1400.
183. McMahon,C.W. and D.H.Raulet. 2001. Expression and function of NK cell receptors in CD8+ T cells. *Curr.Opin.Immunol* 13:465-470.
184. Ikeda,H., B.Lethe, F.Lehmann, N.van Baren, J.F.Baurain, C.de Smet, H.Chambost, M.Vitale, A.Moretta, T.Boon and P.G.Coulie. 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.
185. Huard,B. and L.Karlsson. 2000. KIR expression on self-reactive CD8+ T cells is controlled by T-cell receptor engagement. *Nature* 403:325-328.
186. Mingari,M.C., M.Ponte, C.Vitale, R.Bellomo and L.Moretta. 2000. Expression of HLA class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: a regulated mechanism that controls T-cell activation and function. *Hum.Immunol* 61:44-50.
187. Groh,V., R.Rhinehart, J.Randolph-Habecker, M.S.Topp, S.R.Riddell and T.Spies. 2001. Costimulation of CD8 α beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2:255-260.
188. Zemmour J. and Parham P. 1992. Distinctive polymorphism at the HLA-C locus: implications for the expression of HLA-C. *J.Exp.Med.* 176(4):937-950.
189. Zhen Y., Xu N., B.Richardson, R.Becklin, J.R.Savage, K.Blake and J.M.Peltier. 2004. Development of an LC-MALDI method for the analysis of protein complexes. *J.Am.Soc.Mass.Spectrom.* 15(6):803-822.
190. Martin S.E., J.Shabanowitz, D.F.Hunt and J.A.Marto. 2000. Subfemtomole MS and MS/MS peptide sequence analysis using nano-HPLC micro-ESI fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal.Chem.* 72(18):4266-4274.

7. Abkürzungsverzeichnis

APC	antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäure
AU	<i>„absorbing units“</i>
β_2 m	β_2 -Mikroglobulin
Cap-LC	<i>„capillar liquid chromatography“</i>
CD	<i>„cluster of differentiation“</i>
cDNA	komplementäre DNA
μ Ci	μ -Curie
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
D (kD)	Dalton (Kilodalton)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISPOT-Assay	<i>„enzyme linked immunosorbent spot assay“</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrosprayionisation
FCS	fötales Kälberserum
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
GvH	Graft (Spender) versus Host (Wirt)
GvL	Graft (Spender) versus Leukämie
GvT	Graft (Spender) versus Tumor
Gy	Gray
HLA	Humanes Leukozytenantigen
RP-HPLC	<i>„reverse phase high performance liquid chromatography“</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KE	Kultureinheit
M	Molarität
μ	mikro (10^{-6})
m	milli (10^{-3})

MALDI	<i>‚matrix assisted laser desorption/ionization‘</i>
g	Gramm (mg, µg, ng, pg)
g	Erdbeschleunigung (bei Zentrifugationen)
MIC	<i>‚major histocompatibility complex class I chain-related‘</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
l	Liter (ml, µl, nl)
MLTC	<i>‚mixed lymphocyte/tumor cell culture‘</i>
mRNA	<i>‚messenger‘</i> RNA
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
m/z	Masse / Ladung
n	nano (10 ⁻⁹)
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NZK	Nierenzellkarzinom
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	<i>‚peripheral blood mononuclear cells‘</i>
PCR	<i>‚polymerase chain reaction‘</i>
pH	potentia hydrogenii
PHA-Blasten	Phytohaemagglutinin-stimulierte Blasten
RCC	<i>‚renal cell carcinoma‘</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	<i>‚reverse transcriptase‘</i>
SDS	<i>‚sodium dodecyl sulfate‘</i>
TAP	<i>‚transporter associated with antigen processing‘</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TE	Testeinheit
Th	T-Helferzellen
TOF	<i>‚time of flight‘</i>

7.1 Der Einbuchstabencode der Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

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

Mark Gröne