

Charakterisierung von T-Zell-Antworten gegen humane Nierenzellkarzinome
sowie Identifizierung von HLA-G
als tumorassoziiertes Antigen und Immunevasionsmechanismus
des Nierenzellkarzinoms

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor
der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Jürgen Helmut Bukur
geb. in Hochheim am Main

Mainz, 2004

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Die zelluläre Immunantwort	7
1.1.1 Regulation zytotoxischer Effektorzellen	8
1.1.2 Signalkaskade der T-Zellaktivierung	11
1.1.3 Kostimulation von T-Zellen	12
1.1.4 Aberrante Effektorfunktionen in Lymphozyten von Tumorpatienten	13
1.2 HLA Klasse I-Präsentation von prozessierten Antigenen	14
1.3 Immunevasionsmechanismen von Tumoren	16
1.4 Das Nierenzellkarzinom	18
1.4.1 Nierenzellkarzinom (NZK)-assoziierte Antigene	21
1.4.2 Immunogenität des Nierenzellkarzinoms	23
1.4.3 Expression von nicht klassischen HLA Klasse Ib-Molekülen	24
2. Aufgabenstellung	27
3. Material und Methoden	28
3.1 Material	28
3.1.1 Geräte	28
3.1.2 Datenverarbeitungsprogramme	29
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	29
3.1.4 Chemikalien	29
3.1.5 Radiochemikalien	31
3.1.6 Medien, Lösungen und Puffer für die Zellkultur	31
3.1.7 Komplettsysteme	31
3.1.8 Enzyme	32
3.1.9 Längen- und Molekulargewichtsstandards	32
3.1.9.1 Längenstandards	32
3.1.9.2 Molekulargewichtsstandard	32
3.1.10 Oligonukleotide	33
3.1.11 <i>In Vitro</i> Zellkulturen	35
3.1.12 Humane Biopsien	36
3.1.13 Antikörper	37
3.1.13.1 Antikörper für durchflusszytometrische Analysen	37
3.1.13.2 Antikörper für proteinchemische Nachweisverfahren	39
3.1.14 Zellkulturmedien und Zusätze	40
3.1.15 Bakterienkulturmedien	41
3.1.16 Allgemeine Puffer und Lösungen	41
3.1.17 Lösungen für die Bakterientransformation	42
3.1.18 Puffer und Lösungen für zellbiologische Experimente	42
3.1.19 Puffer für die Plasmidaufreinigung	43
3.1.20 Lösungen und Puffer für RNS-Isolierungen	43
3.1.21 Puffer für DNS-Anwendungen	43
3.1.22 Puffer für gelelektrophoretische Anwendungen	44
3.1.23 Puffer und Lösungen für Southern Blots	44
3.1.24 Lösungen und Puffer für proteinchemische Verfahren	44
3.1.25 Plasmide	46
3.2 Methoden	48
3.2.1 Kultivieren von Bakterien	48
3.2.1.1 Herstellen von kompetenten Bakterien	48
3.2.1.2 Transformieren von kompetenten Bakterien	48
3.2.1.3 Selektion und Amplifikation rekombinanter Bakterien	49
3.2.1.4 Mini-Plasmid-DNS-Isolation	49
3.2.1.5 Präparative Isolierung von Plasmid-DNS	49
3.2.1.6 Lagerung von Bakterien	50

3.2.2	Isolieren und Kultivieren von epithelialen Zellen	50
3.2.2.1	Isolieren und Kultivieren von Lymphozyten	50
3.2.2.1.1	Kultivieren von TIL	50
3.2.2.1.2	Isolieren von PBL	50
3.2.2.1.3	<i>In Vitro</i> Sensibilisieren von PBL	50
3.2.2.1.4	Klonieren von T-Zellen	51
3.2.2.2	Entnehmen von Biopsien aus nephrektomierten Nieren	51
3.2.2.3	Etablieren von primären und permanenten <i>in vitro</i> Zellkulturen	51
3.2.2.4	Passagieren von Zelllinien	52
3.2.2.5	Klonieren von Zellen	52
3.2.2.6	Kryopräservieren von Zellen	52
3.2.2.7	Zählen von Zellen	53
3.2.2.8	IFN- γ -Behandlung kultivierter Zellen	53
3.2.2.9	Separieren vitaler Zellen	53
3.2.2.10	Bestrahlen von Zellen	53
3.2.3	Heterologer Gentransfer in eukaryotische Zellen	53
3.2.3.1	Transfektion	53
3.2.3.1.1	Lipofektion	54
3.2.3.1.2	Elektroporation	55
3.2.3.2	Transduktion	56
3.2.3.2.1	Infektion mit modifiziertem Vaccinia Virus Ankara	56
3.2.3.2.2	Infektion von B-Zellen mit dem Epstein-Barr-Virus	56
3.2.4	Zelluläre Nachweismethoden	56
3.2.4.1	Zytotoxizitätsversuche	56
3.2.4.2	Blockierungsversuche	57
3.2.4.3	TNF-Bioassay und MTT-Zytotoxizitätsversuch	57
3.2.4.4	Durchflusszytometrische Analyse zellulärer Epitope	58
3.2.4.5	Indirekter Immunfluoreszenznachweis	58
3.2.4.6	Direkter Immunfluoreszenznachweis	58
3.2.4.7	<i>In Situ</i> Nachweis von β -Galactosidase	59
3.2.5	Standardmethoden der Nukleinsäurepräparation	60
3.2.5.1	Isolieren genomischer DNS	60
3.2.5.2	Isolieren von RNS	60
3.2.5.3	Gelelektrophoretisches Auftrennen von Nukleinsäuren	61
3.2.5.4	Enzymatische Hydrolyse und Modifikation von DNS	61
3.2.5.4.1	Restriktionsfragmentanalyse	61
3.2.5.4.2	Modifikation von 5'- und 3'-überhängenden DNS-Enden	62
3.2.5.4.3	Dephosphorylieren von 5'-DNS-Enden	62
3.2.5.4.4	Ligation von DNS-Fragmenten	63
3.2.5.5	Aufreinigen von DNS	63
3.2.5.5.1	Phenol/Chloroform-Extraktion	63
3.2.5.5.2	Isolieren von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	63
3.2.5.6	Fällen von Nukleinsäuren	64
3.2.5.7	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	64
3.2.6	Nachweis von spezifischen Nukleinsäuresequenzen	65
3.2.6.1	Polymerase-Ketten-Reaktion	65
3.2.6.2	Reverse Transkription und PCR	65
3.2.6.3	Analyse von TZR-Transkripten	66
3.2.6.4	Sequenzierung von DNS	66
3.2.6.5	Bestimmen des HLA-Phänotyps von Zelllinien	67
3.2.6.6	Hybridisierungsverfahren	67
3.2.6.6.1	Transfer von DNS aus Gelen auf Membranen	67
3.2.6.6.2	Transfer von RNS aus Gelen auf Membranen	68
3.2.6.6.3	Markieren einer sequenzspezifischen Sonde	68
3.2.6.6.4	Hybridisieren von Southern Blots mit nicht-radioaktiven Sonden	68

3.2.7	Herstellen von cDNS-Expressionsbibliotheken	69
3.2.7.1	Isolieren von poly(A) ⁺ -RNS durch Affinitätschromatographie	69
3.2.7.2	cDNS-Synthese	69
3.2.7.3	Ligieren von Adaptoren	70
3.2.7.4	Fraktionieren von cDNS durch Gradientenzentrifugation	70
3.2.7.5	Aktivieren und Aufreinigen des cDNS-Expressionsplasmids	70
3.2.7.6	Titrieren der Ligationseffizienz	71
3.2.7.7	Amplifizieren der cDNS-Expressionsbibliothek	71
3.2.7.8	Konservieren und Isolieren von Expressionsplasmiden	71
3.2.8	Proteinchemische Nachweisverfahren	72
3.2.8.1	Herstellen von Proteinextrakten aus Zellen	72
3.2.8.2	Chloroform/Methanolfällung	72
3.2.8.3	Bestimmen der Proteinkonzentration	72
3.2.8.4	Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese	72
3.2.8.5	Transfer von Proteinen auf Membranen	73
3.2.8.6	Herstellen von „Immunoblots“	74
3.2.8.7	Immunpräzipitation	74
3.2.8.8	„enzyme-linked-immuno-sorbent-assay“, ELISA	75
3.2.9	Rechnergestütztes Klonieren und Auswerten von Sequenzen	76
4.	Ergebnisse	77
4.1	Identifizierung von tumorassoziierten Antigenen	77
4.1.1	Generierung zytotoxischer T-Zellen mittels CD80-Kostimulation	77
4.1.2	Charakterisierung von autologen T-Zelllinien	79
4.1.3	Konstruktion der cDNS-Expressionsbibliothek MZ1851RC	84
4.1.3.1	Wahl des eukaryotischen cDNS-Expressionsplasmids	84
4.1.3.1.1	Insertion eines „Stufferfragmentes“	87
4.1.3.1.2	Plasmidaufreinigung über den Kalium-Acetat-Gradienten	87
4.1.3.2	Synthese und Fraktionierung von cDNS	88
4.1.3.3	Klonierung von cDNS-Fragmenten in das Expressionsplasmid	90
4.1.3.4	Abschätzen der Fragmentlängen von cDNS-Integraten	91
4.1.4	cDNS-Expressionsklonierung	93
4.2.	Etablieren von Nierenzellkarzinom (NZK)-Systemen	94
4.3.	Das NZK-System MZ2733RC	97
4.3.1	<i>In Situ</i> und <i>in vitro</i> Nachweis von MHC-Komponenten	98
4.3.2	Immortalisierung von Zelllinien mit dem SV40 T-Antigen	102
4.3.3	Generierung autologer T-Zellen im NZK-System MZ2733RC	103
4.3.3.1	Isolation und Expansion von TIL	104
4.3.3.2	Charakterisierung der TIL im NZK-System MZ2733RC	105
4.3.3.3	Charakterisierung <i>in vitro</i> sensibilisierter T-Zelllinien	107
4.3.3.4	Effektoreigenschaften der verschiedenen T-Zelllinien	109
4.3.3.5	HLA-Restriktion der T-Zelllinie XIE6	114
4.3.3.6	T-Zelllinie XIE6 sezerniert Zytokine nach Antigenstimulation	115
4.3.3.7	Analyse des CD3-TZR-Längenpolymorphismus	117
4.3.3.8	Charakterisierung der TZR-V β -Ketten der T-Zelllinie XIE6	119
4.4	Nachweis des nicht klassischen HLA-G-Antigens im NZK	121
4.4.1	Analyse der Expression von HLA-G in NZK-Zelllinien	121
4.4.2	Erweiterte HLA-G-Transkriptionsanalyse	122
4.4.3	Analyse der HLA-G-Translation in NZK-Zelllinien	131
4.4.4	HLA-G ⁺ NZK-Zelllinien sezernieren lösliche HLA-G5-Moleküle	133
4.4.5	HLA-G ⁺ NZK-Zelllinien präsentieren HLA-G1-Antigene	134
4.4.6	HLA-G ⁺ MZ2733RC-Zellen inhibieren Effektorzellen	136
4.4.6.1	Verringerte ZTL-vermittelte Zytotoxizität	136
4.4.6.2	Inhibition der LAK-Zell-vermittelten Zytotoxizität	137
4.4.6.3	Verringerte NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität	138
4.4.6.4	Rekonstitution der LAK- Zell-vermittelten Zytotoxizität	141

5. Diskussion	145
5.1 Immortale NZK-Zelllinien – <i>In Vitro</i> Modelle für NZK-Läsionen ?	145
5.2 Immortalisiert das SV40-T-Antigen Nierenzelllinien ?	146
5.3 Besitzen NZK-Zelllinien defizitäre Immunphänotypen ?	148
5.4 Tumorprogression in Gegenwart von aktivierten Lymphozyten	152
5.5 Tumor-induzierte anergische TIL2733 und anergisierte PBL	153
5.6 Spezifität der T-Zelllinie XIE6	157
5.7 T-Zelllinie XIE6 - anergische Tc1- oder Tc2-Zellen ?	159
5.8 Soluble HLA Klasse I-Moleküle – ein Immunevasionsmechanismus	160
5.9 Zytokine – Mediatoren der Immunevasion von MZ2733RC ?	162
5.10 Immunevasion vor einer natürlichen und spezifischen Immunität	163
5.11 HLA-G – ein TAA des Nierenzellkarzinoms	164
6. Ausblick	168
7. Zusammenfassung	169
8. Literaturverzeichnis	171
9. Abkürzungen	204
10. Anhang	207
10.1 TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinoms	207
10.2 Functional Role of Human Leukocyte Antigen-G Up-Regulation in Renal Cell Carcinoma	208

1. Einleitung

Die Tumorummunologie untersucht Interaktionen zwischen Lymphozyten und Tumorzellen. Von großer Bedeutung sind dabei Beobachtungen, die zeigen, dass das Immunsystem von Tumorpatienten humorale und zelluläre Immunantworten gegen tumorassoziierte Antigene (TAA) entwickelt, die auf der Zelloberfläche von Krebszellen präsentiert werden (Boon et al., 1996; Rosenberg, 1997; Old et al., 1998). Eine effiziente zelluläre Immunantwort ist von der Proliferationsfähigkeit und Aktivierbarkeit zytotoxischer Effektorzellen abhängig, die ihrerseits auch eine Schlüsselrolle bei der Eliminierung von Tumorzellen besitzen.

1.1 Die zelluläre Immunantwort

Eine zelluläre Immunantwort wird durch Zytokine eingeleitet, die von Helfer-CD4⁺-T-Zellen sezerniert werden. Beispielsweise induziert Interferon (IFN)- γ die zytotoxische Aktivität von Natürlichen Killer (NK)-Zellen und aktiviert Makrophagen, während der T-Zellwachstumsfaktor Interleukin (IL)-2 die Proliferation von NK-Zellen und CD8⁺-T-Zellen induziert. Gleichzeitig wird durch IFN- γ die Translation und Oberflächenpräsentation von Genprodukten des Haupthistokompatibilitätskomplexes (engl. „major histocompatibility complex“, MHC) induziert. Dieser Genlocus liegt beim Menschen auf Chromosom 6p21.3 und kodiert für die „human leucocyte antigens“ die HLA-Moleküle. Alle kernhaltigen Körperzellen exprimieren diese hochpolymorphen Glykoproteine als heterotrimere HLA Klasse I-Komplexe, die aus der 44 kD schweren α -Kette, der nicht-kovalent gebundenen, invarianten, 12 kD leichten Kette β_2 -Mikroglobulin und einem Peptid bestehen (Bjorkman et al., 1987). Im Gegensatz zu den schweren HLA Klasse I-Ketten ist β_2 -Mikroglobulin auf Chromosom 15q21-22 lokalisiert. In den Taschen der Peptid-Bindungsgrube, die von der α 1- und α 2-Domäne der schweren Kette gebildet wird, wird ein 8-12 Aminosäuren langes Peptid, ein proteolytisches Spaltprodukt eines degradierten endogenen Proteins, an sog. Ankerpositionen (bevorzugt an die Aminosäurereste P2 und P8/P9) gebunden (Abbildung 1.1, Garrett et al., 1989; Rötzschke et al., 1990; Falk et al., 1991; Rammensee et al., 1993). Dabei kann das Peptid dem ursprünglichen gesunden „Selbst“ oder einem erworbenen „Fremd“ mit z. B. einem tumorösen, viralen oder mikrobiellen Ursprung entstammen. Die α 3-Domäne der schweren α -Kette besitzt hoch konservierte Bindungsstellen für β_2 -Mikroglobulin und den CD8-Korezeptor (Hutchinson, 2003).

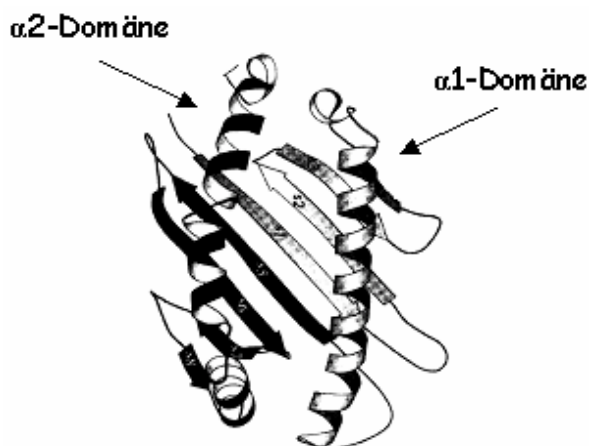


Abbildung 1.1: Die HLA Klasse I-Peptidbindungsgrube (Jardetzky et al., 1996).

1.1.1 Regulation zytotoxischer Effektorzellen

NK-Zellen und T-Zellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche mindestens drei gemeinsame transmembrane Rezeptorfamilien, die mit HLA Klasse I-Molekülen interagieren: (i) die HLA Klasse I-Allel-spezifischen „killer cell immunoglobulin-like receptor“ (KIR) und (ii) die „killer lectin-like receptors“ (KLR). Diese KLR sind heterodimere Rezeptoren, bestehend aus dem transmembranen CD94-Molekül und einem assoziierten Molekül aus der NKG2-Familie (Phillips et al., 1996). Sie vermitteln entweder inhibierende (NKG2A und -E) oder aktivierende Eigenschaften (NKG2C; Houchins et al., 1997; Biassoni et al., 2003). (iii) Darüber hinaus exprimieren NK- und T-Zellen noch den „Ig-like transcript“ (ILT)-2-Rezeptor, der mit einem Spektrum von HLA Klasse Ia- und Ib-Molekülen interagiert und inhibierend wirkt (Dietrich et al., 2001; López-Botet et al., 2004). Bindet ein inhibierender Rezeptor seinen Liganden, wird die zellulär-vermittelte Zytotoxizität der aktivierten Effektorzelle verringert. In Tabelle 1.1 sind inhibierend wirkende Rezeptoren und ihre Spezifität zusammengefasst.

Tabelle 1.1: HLA-bindende Rezeptoren mit inhibierenden Eigenschaften

KIR	Expression	HLA-Ligand	Bindestelle	Referenz
KIR2DL1/p58.1/ CD158a	NK-Zellen, einige T-Zell-Populationen	Cw2, -4, -5, -6	α 1 α 2-Region	Colonna und Samaridis, 1995; Wagtmann et al., 1995
KIR2DL3/p58.2/ CD158b	NK-Zellen, einige T-Zell-Populationen	Cw1, -3, -7, -8	α 1 α 2-Region	Colonna und Samaridis, 1995; Wagtmann et al., 1995
KIR2DL4/p49/ CD158d	NK-Zellen	G		Cantoni et al., 1998; Ponte et al., 1999; Rajagopalan et al., 2000
KIR3DL1/p70/ CD158e	NK-Zellen, einige T-Zell-Populationen	Bw4-Allele	α 1 α 2-Region	Colonna und Samaridis, 1995; D'Andrea et al., 1995; Wagtmann et al., 1995;
KIR3DL2/p140/ CD158k	NK-Zellen, einige T-Zell-Populationen	A*0301, A*1101		Colonna und Samaridis, 1995; Wagtmann et al., 1995; Pende et al., 1996
ILT2/LIR1/ CD85j	Populationen von NK- und T-Zellen, Monozyten, B-Zellen, dendritische Zellen	A, B, C, G, E, F	α 3-Domäne	Colonna et al., 1997; Wagtmann et al., 1995; Navarro et al., 1999; Gonen-Gross et al., 2003; Shiroishi et al., 2003
ILT4/LIR2/ CD85d	Monozyten, B-Zellen dendritische Zellen, NK-Zellen	A, B, C, G, E, F	α 3-Domäne	Colonna et al., 1998; Shiroishi et al., 2003
CD94/NKG2A	NK-Zellen, CD8 ⁺ T-Zellen	G, E	α 1 α 2-Region	Houchins et al., 1991; Braud et al., 1998; Navarro et al., 1999

Die inhibierenden KIR CD158a, -b und -e erkennen peptidspezifisch HLA-B- und HLA-C-Moleküle, wobei die C-terminalen Aminosäurereste P7 und P8 von in der Peptidbindungsgrube präsentierten Peptiden detektiert werden (Abbildung 1.2 A; Malnati et al., 1995; Rajagopalan und Long, 1997; Fan et al., 1999; Boyington und Sun, 2002), während andere inhibierende KIR eine Region in der α 1-Domäne von HLA-Klasse I-Molekülen binden (López-Botet et al., 2004).

Die CD8⁺-T-Zellen unterscheiden sich wesentlich von NK-Zellen. Sie exprimieren zusätzlich den antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor (TZR), der mit trimeren HLA-Klasse I/Peptid-Komplexen interagiert und das erste Signal zu ihrer Aktivierung vermittelt (Abbildung 1.2 B). Der T-Zell-Rezeptor erkennt die Aminosäurereste P4-P6 von Peptiden, die in der HLA-Peptidbindungsgrube zwischen den Ankerpositionen P2 und P8/P9 orientiert sind (Garcia et al., 1996). Erst nach Beendigung des TZR-Arrangements wird in Gedächtnis-CD8⁺-T-Zellen die Regulation von KIR induziert (Vely et al., 2001; Jabri et al., 2002).

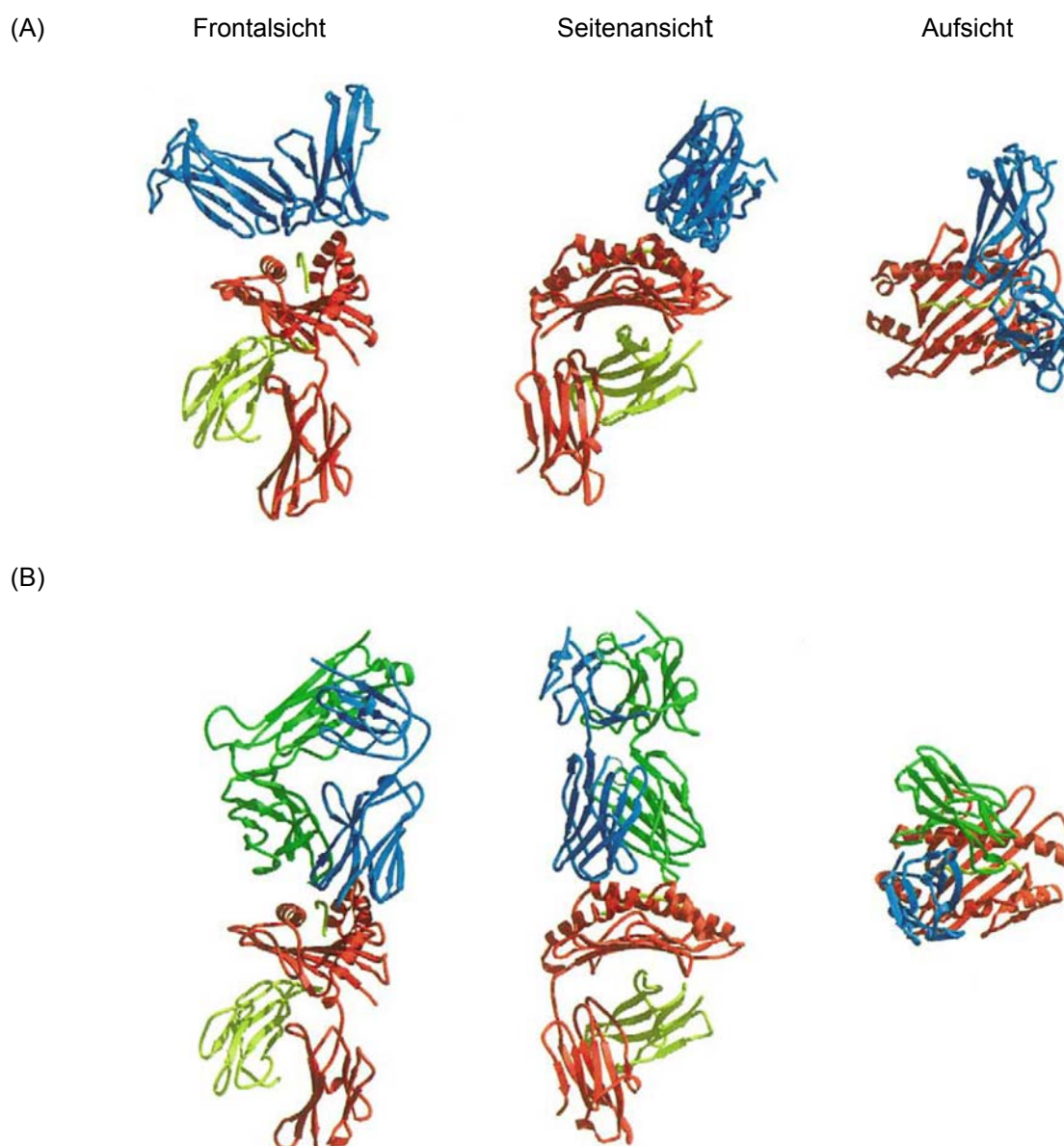


Abbildung 1.2: Vergleich der Interaktionen von KIR/HLA- und TZR/HLA-Komplex. Frontalansicht, Seitenansicht und Aufsicht auf einen (A) KIRDL2/HLA-Cw3/GAV-Komplex und (B) B7 TZR/HLA-A2/TAX-Komplex. Die HLA Klasse I-Moleküle aus schwerer Kette (rot), β_2 -Mikroglobulin (hellgrün) und Peptid (hellgrün) werden in (A) durch KIR2DL2 (blau) und in (B) durch B7 TZR (blau und grün) gebunden. Die Aufsicht (B) zeigt die von den $\alpha_1\alpha_2$ -HLA-Domänen gebildete Peptidbindungsgrube und die $V\alpha$ - (blau) und $V\beta$ - (grün) Domänen des TZR (nach Boyington und Sun, 2002).

Tumorspezifische bzw. tumorassoziierte antigene Peptide werden T-Zellen auf zwei verschiedenen Wegen präsentiert: (i) auf direktem Wege über HLA Klasse I-Moleküle (Lehner und Cresswell, 1996; Rock, 1999), die auf der Zelloberfläche von Tumorzellen exprimiert werden und (ii) indirekt durch sog. „Crosspriming“ über die HLA Klasse I- und HLA Klasse II-Moleküle von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APZ), wie z. B. dendritischen Zellen (DZ; Blankenstein und Schuler, 2002; Zinkernagel, 2002). Diese DZ exprimieren während der Interaktion mit T-Zellen weitere kostimulierende

Moleküle, wie z. B. CD80/B7-1 und CD86/B7-2, die die Reifung („priming“) antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen zu Effektor-T-Zellen unterstützen (Lenschow et al., 1996; Greenfield et al., 1998). Im Verlauf einer primären Immunantwort werden antigenspezifische Gedächtnis-CD8⁺-T-Zellen durch konsekutive Interaktionen mit CD4⁺-T-Zellen und wiederholtem Antigenkontakt generiert (Tanchot und Rocha, 2003). Die Ausreifung von antigenspezifischen CD8⁺-T-Zellen mit hochaffinen TZR erfordert eine Abfolge festgelegter Umlagerungen von verschiedenen TZR-Gensätzen. Durch konsekutive Neuarrangements und Rekombinationen werden die Gensegmente der verschiedenen TZR-Gensätze miteinander verknüpft, sodass ein hochaffiner antigenspezifischer TZR, dessen variable V α - und V β -Domänen die Antigenpezifität der T-Zelle definieren, gebildet wird (Krangel, 2003).

1.1.2 Signalkaskade der T-Zellaktivierung

Nach Vernetzung des antigenspezifischen TZR und seines CD8-Korezeptors mit dem HLA-Klasse I/Peptid-Komplex einer APZ transduziert die TZR-assoziierte ζ -Kette Signale durch die Zellmembran auf die Signalkaskade zur T-Zellaktivierung (Weiss et al., 1994). Bei diesem ersten Signal wird die TZR-assoziierte zytoplasmatische Protein-Tyrosin-Kinase p56^{lck} aktiviert, die als Initiator-molekül des kaskadenartigen Signaltransduktionsweges die antigenspezifische Stimulation von T-Zellen auslöst. Sie phosphoryliert zytoplasmatische Tyrosinreste, die in sog. zytoplasmatischen „immunoreceptor tyrosine-based activation motif“- (ITAM)-Regionen des CD3-Moleküls und der ζ -Kette vorhanden sind. Eine weitere CD3-assoziierte Tyrosinkinase ist p59^{lyn}, die eine p56^{lck} vergleichbare Funktion besitzt. Sowohl p59^{lyn} als auch p56^{lck} müssen aktiv sein, damit es zu einer fortschreitenden Phosphorylierung nachfolgender Tyrosinkinasen kommt.

Nachdem die Tyrosinkinase ZAP70 (70 kD-zeta-assoziiertes Protein) die phosphorylierte ITAM-Region der ζ -Kette gebunden hat, wird sie von p56^{lck} phosphoryliert. Dadurch erhält ZAP70 ihrerseits eine Kinaseaktivität und phosphoryliert Tyrosinreste der Adaptermoleküle Vav, SLP76 und „linker for activation in T cells“ (LAT). LAT ist ein Zellmembran-assoziiertes Protein, das aktivierte TZR mit weiteren Adaptermolekülen u. a. PLC γ 1, Ras und GRB2 komplexiert. Das nun entstehende Signal führt zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, wie z. B. ELK-1, Jun, ATF-2 und NF-AT, die Zellzyklus abhängige Prozesse aktivieren (van Leeuwen und Samelson, 1999). Parallel hierzu erfolgt durch weitere T-Zell/APZ-Interaktionen, wie z. B. CD54, CD58, CD2, CD28, CD154, die Induktion eines kostimulierenden zweiten Signals, das das vom TZR vermittelte erste Signal modulieren kann (Van Severter et al., 1990; Van Severter et al., 1992; Wingren et al., 1995; Lamphear et al., 1998; Ni et al., 2001; Chirathaworn et al., 2002; Kohlmeier et al., 2003).

Im Verlauf der effizienten Antigenstimulation kommt es zu einer nachweisbaren Polarisierung („Capping“-Struktur) in T-Zellen und zur Ausbildung einer sog. T-Zell-APZ-Synapse (Monks et al., 1998; Grakoui et al., 1999; Davis, 2002; Lee et al., 2002; van der Merwe, 2002), in die Effektormoleküle (Perforine, Granulosine) der T-Zellen sezerniert werden.

1.1.3 Kostimulation von T-Zellen

Die optimale T-Zell-Aktivierung basiert nach der Zwei-Signal-Hypothese von Bretscher und Cohn (Lafferty et al., 1983) auf der hochaffinen Bindung eines TZR an seinen spezifischen HLA Klasse I/Peptid-Komplex (Signal 1) und einem antigenunabhängigen kostimulierenden Signal (Signal 2), das das ursprüngliche Signal modulieren kann. Den Prototyp des kostimulierenden Signaltransduktionsweges bildet das Rezeptor-Liganden-Paar CD28 und CD80. Der auf der Zelloberfläche einer APZ exprimierte Ligand CD80 wird vom CD28-Rezeptor der T-Zelle gebunden (Lenschow et al., 1996). Die über CD28 vermittelte Kostimulation nimmt einen direkten Einfluss auf die Physiologie der T-Zelle und verstärkt die bestehende vom TZR initiierte Aktivierung und die darauffolgende T-Zell-Antwort u. a. durch Induktion der IL-2-Synthese (Abbildung 1.3; Alegre et al., 2001).

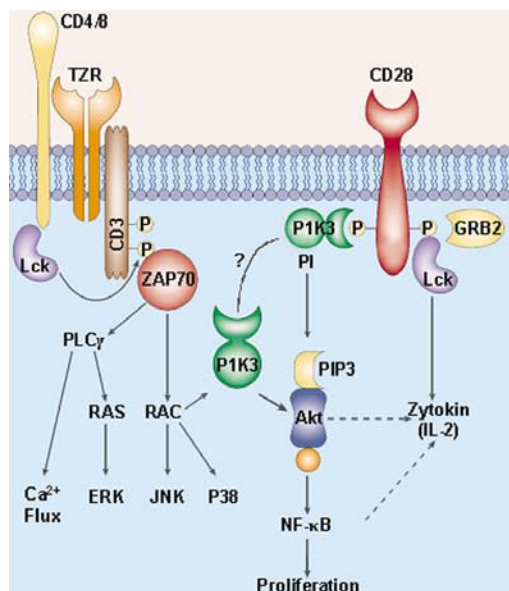


Abbildung 1.3: Signaltransduktionsweg in aktivierten T-Zellen. Signaltransduktionswege der TZR- und der kostimulierenden CD28-Signalkaskade (modifiziert nach Alegre et al., 2001).

Ohne ein vorausgehendes TZR-Signal besitzt die von CD80/B7-1 medierte Kostimulation jedoch keine physiologische Bedeutung. Inzwischen wurden weitere Rezeptor-Liganden-Paare der CD28-Familie charakterisiert, die einen stimulierenden oder inhibierenden Einfluss auf die TZR-Signalkaskade ausüben (Tabelle 1.2).

Tabelle 1.2: Kostimulatoren von T-Zellen

Rezeptor	Ligand	physiologische Aktivität
CD28	CD80, CD86	Aktivierung
CD152 (CTLA-4)	CD80, CD86	Inhibition
ICOS	B7h/B7h2/LICOS	Aktivierung
PD-1	B7H1/PD-L1	Inhibition

Vier verschiedene aktivierende und inhibierende Kostimulationswege, die an Interaktionen von T-Zellen mit APZ beteiligt sind, wurden bisher charakterisiert (Chambers et al., 2001).

Da angenommen wird, dass die meisten Tumorzellen keine kostimulatorischen Moleküle exprimieren und darüber hinaus nur eine verringerte HLA Klasse I-Antigenpräsentation auf ihrer Zelloberfläche besitzen, wird möglicherweise eine unvollständige Aktivierung der T-Zellen induziert, die in einem Zustand der Anergie endet (Khong und Restifo, 2002).

1.1.4 Aberrante Effektorfunktionen in Lymphozyten von Tumorpatienten

Aus humanen Tumoren werden immer wieder Tumor infiltrierende Lymphozyten (TIL) isoliert, deren proliferative und zytotoxische Antworten beeinträchtigt sind (Miescher et al., 1998). Es werden Defekte in der TZR-Signaltransduktionskaskade und in der Stimulus-abhängigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nukleärer Faktor-κB (NF-κB) von TIL und peripheren Blutlymphozyten (PBL) beobachtet. Dabei werden mit der Progression und fortschreitenden Metastasierung eines Tumors auch periphere T-Zellen immer stärker in ihren Funktionen beeinträchtigt. Dies bedeutet, dass ein fortschreitender Krankheitsverlauf zu einer generellen Immunsuppression führen kann, die nicht mehr spezifisch für einzelne Organe ist (Pawelec et al., 1997). Eine solche systemische Immunsuppression wird häufig in Patienten mit Leukämien, Neuroblastomen und metastasierenden Nierenzellkarzinomen beobachtet (Elliott et al., 1990; Massaia et al., 1994; Renner et al., 1996; Morford et al., 1997; Bukowski, et al., 1998; Buggins et al., 1998).

Wie schon zuvor in experimentellen Mausmodellen nachgewiesen (Loeffler et al., 1992), werden auch in TIL bzw. tumorassoziierten Lymphozyten (TAL) von Patienten mit Melanomen, Kopf-Hals-, Kolon-, Nieren-, Prostata-, Ovarial- und Zervixkarzinomen verringerte oder fehlende Proteinexpressionen der TZR-ζ-Kette und der Signaltransduktionsmoleküle p56^{lck} und p59^{fyn} beobachtet (Finke et al., 1993; Nakagomi et al., 1993; Zea et al., 1995; Kono et al., 1996; Lai et al., 1996; Rabinowich et al., 1996; Healy et al., 1998; Reichert et al., 1998). Dabei wurde bei Patienten mit metastasierendem Melanom gezeigt, dass eine verringerte Expression der ζ-Kette und der Sig-

naltransduktionsmoleküle p56^{lck} und ZAP70 auf ein kleines Spektrum von defizienten CD3⁺-T-Zellen beschränkt ist, das definierte TZR-V β -Ketten-Familien exprimiert (Maccalli et al., 1999).

In TIL von Nierenzellkarzinom (NZK)-Patienten werden weitere Veränderungen, die die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B betreffen, beobachtet (Li et al., 1994; Uzzo et al., 1999). Hierbei kommt es nach einer Aktivierung von T-Zellen zu einer fehlerhaften oder fehlenden Anreicherung des transaktivierenden Komplexes aus RelA/NF- κ B (p50) im Zellkern und damit zu einer verringerten Effektorfunktion in T-Zellen, da dieser Transkriptionsfaktor-Komplex die Expression von Genen kontrolliert, die für Zytokine, Zytokinrezeptoren und andere Moleküle der T-Zell-Aktivierung von Bedeutung ist (May und Gosh, 1998). Diese Dysfunktionen werden durch sezernierte, immunsupprimierend wirkende Faktoren, die aus Kulturüberständen von histopathologisch verschiedenen Tumorzellen isoliert wurden, vermittelt. Diese Faktoren inhibieren die Proliferation und Zytotoxizität von TIL und initiieren darüber hinaus die Apoptose in aktivierten T-Zellen (O'Mahoney et al., 1993; Uzzo et al., 1999).

1.2 HLA Klasse I-Präsentation von prozessierten Antigenen

Die Präsentation von Peptiden in HLA Klasse I/Peptid-Komplexen auf der APZ-Zelloberfläche setzt eine simultane Expression von Genprodukten des endogenen Protein-Prozessierungsapparates, bestehend aus dem Proteasomenaktivator PA28, dem multikatalytischen Proteasomenkomplex und dem heterodimeren „transporter associated with antigen processing“ TAP1/TAP2-Peptidtransporter, der prozessierte Peptide unter ATP-Hydrolyse aus dem Zytosol in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) pumpt, voraus (Neefjes et al., 1993; Shepherd et al., 1993; Androlewicz und Cresswell, 1994; Androlewicz et al., 1994; Groettrup et al., 1996). Wie in Abbildung 1.4 dargestellt, werden polyubiquitinierte Proteine von einem multikatalytischen 26S-Proteasomenkomplex mit überwiegend chymotryptischen Eigenschaften zu Peptiden degradiert (Eleuteri et al., 1997; Sparato et al., 1998; Kloetzel und Ossendorp, 2004). Der heterodimere TAP1/TAP2-Peptidtransporter besitzt eine selektive Substratspezifität für prozessierte Peptide mit einer Länge von 8-12 Aminosäuren und einem hydrophoben oder basischen C-terminalen Ende und stimmt darin mit der Peptid-Bindungsaffinität der HLA Klasse I-Moleküle überein (Momburg et al., 1994; Schumacher et al., 1994; Neefjes et al., 1995; van Endert et al., 1994). Die konstitutiv im ER exprimierten Chaperone, Tapasin, Calnexin, Calretikulin und ERp57 sind an der Stabilisierung und der Peptidbeladung von leeren HLA-Molekülen im ER-Lumen beteiligt (Sadavisan et al., 1996; Koopmann et al., 1997; Hughes und Cresswell, 1998; Momburg und Tan, 2002). Peptidbeladene HLA Klasse I-Moleküle werden aus dem ER über den Trans-Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert.

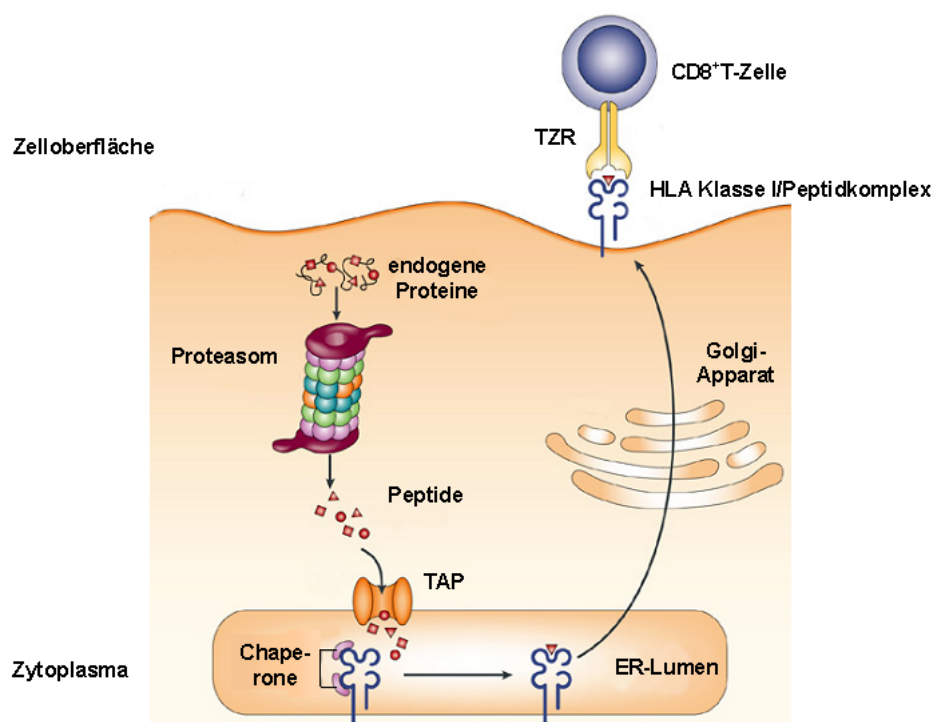


Abbildung 1.4: Prozessierung und Präsentation von HLA Klasse I-bindenden Peptiden. Schematische Darstellung der Antigenprozessierung und -präsentation von endogenen Proteinen (modifiziert nach Yewdell et al., 2003).

Die Zelloberflächenexpression von HLA Klasse I-Molekülen ist direkt von der Präsenz endogen prozessierter Peptide abhängig und wird durch die Bindungsaffinität eines Peptids zu einer Peptidbindungsgrube stabilisiert (Yewdell et al., 1999). Die Allelspezifischen HLA Klasse I-Moleküle präsentieren individuelle Peptidvolumen. Durch die Bindung eines antigenspezifischen TZR an einen HLA Klasse I/Peptid-Komplex (Ligand) kommt es zu einer T-Zellaktivierung, die von der Aminosäuresequenz des präsentierten Peptids abhängig ist (Kageyama et al., 1995). Da hochaffine Peptide HLA Klasse I/Peptid-Komplexe über ein längeres Zeitintervall auf der Zelloberfläche der APZ stabilisieren, hat die Affinität eines Peptids zu seinem HLA Klasse I-Molekül einen indirekten Einfluss auf die antigenspezifische T-Zell-vermittelte Immunantwort (Singal et al., 1996; Yewdell et al., 1999). Darüber hinaus wird die T-Zellantwort von der Peptidkonzentration bzw. von der Epitopdichte der HLA Klasse I/Peptid-Komplexe determiniert. Dadurch bestimmt das präsentierte Peptidvolumen indirekt die Spezifität von kompletten CD8⁺-T-Zellpopulationen (Doherty et al., 1998). Bereits minimale Epitopdichten von nur 1-5 HLA Klasse I/Peptid-Komplexen genügen, um eine antigenspezifische Proliferation und Zytokinsekretion von T-Zellen zu induzieren bzw. eine zytotoxische Effektorfunktion von T-Zellen auszulösen (Harding und Unanue, 1990; Demotz et al., 1990; Sykulev et al., 1996).

1.3 Immunevasionsmechanismen von Tumoren

Die verschiedenen Tumorevasionsmechanismen beeinflussen die Interaktionsphase von T-Zellen und/oder NK-Zellen mit Tumorzellen und verhindern dadurch (i) eine Reifung von neuen tumorspezifischen zytotoxischen Effektor-T-Zellen, (ii) eine Aktivierung und Proliferation von NK-Zellen und/oder Effektor-Gedächtnis T-Zellen, und (iii) inhibieren Effektorfunktionen von aktivierten NK-Zellen und/oder antigenspezifischen aktivierten T-Zellen (Kiessling et al., 1999; Radoja und Frey, 2000; Khong und Restifo, 2002; Dunn et al., 2002, Chouaib et al., 2002). Außerdem werden Veränderungen bei Tumorzellen beobachtet, die die lymphozytären Effektormoleküle, die eine Apoptose-induktion in Tumorzellen einleiten, inhibieren oder antagonisieren.

Generell werden sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre Mechanismen beobachtet, die Tumore nutzen, um der Kontrolle des Immunsystems zu entkommen. Dabei differenziert man (i) Tumorzellen, die diffusible Faktoren in das umgebende Milieu sezernieren, die mit den T-Zellen interagieren können, bevor diese den Tumor erreichen, z. B. lösliche HLA Klasse I/Peptid-Komplexe, lösliches MIC, lösliches CD54, IL-10, TGF- β , Ganglioside (Saito et al., 1991; Sakakibara et al., 1991; Hoon et al., 1993; Zavazava et al., 1996; Angevin et al., 1997; Wojtowicz-Praga, 1997; Maccalli et al., 1999; Groh et al., 2002), von (ii) Tumorzellen, die auf ihrer Zelloberfläche Liganden und Rezeptoren exprimieren, die antigenspezifische, aktivierte T-Zellen und aktivierte NK-Zellen nach Zell-Zell-Kontakt in ihrer Effektorleistung inhibieren und/oder sie in die Apoptose treiben, z. B. FasL, HLA-E, -G, B7-H1 (Hahne et al., 1996; Braud et al., 1999; Borrego et al., 1998; Restifo et al., 2000; Dong et al., 2002). Alle Strategien desensibilisieren T-Zellen, indem sie die Schlüsselstellen der Signaltransduktionswege bzw. Aktivierungskaskaden beeinflussen (Tabelle 1.3).

Parallel hierzu verfügen Tumorzellen über Evasionsmechanismen, die sie indirekt vor den Effektormolekülen schützen: Zu diesen zählen (i) eine fehlende bzw. verminderte Expression von klassischen HLA Klasse I-Molekülen (Ferrone und Marincola, 1995; Garrido et al., 1997; Khong und Restifo, 2002), (ii) eine defiziente HLA Klasse I-Antigenprozessierung (Restifo et al., 1993; Cromme et al., 1994; Seliger et al., 2000; Khong und Restifo, 2002; Ruiz-Cabello et al., 2002), (iii) eine verminderte HLA Klasse I Expression durch Verlust der IFN γ -Induktion der TAP1-Expression (Abril et al., 1996; Doherty et al., 2000), (iv) eine konstitutive bzw. zytokinabhängige, induzierte Expression von nicht-klassischen HLA-E- und -G-Molekülen (Paul et al., 1998; Real et al., 1999; Moreau, 1999), (iv) eine fehlende Kostimulation von Effektorzellen, z. B. durch Adhäsions- und kostimulierende Moleküle (Becker et al., 1993; Maccalli et al., 1999; Khong und Restifo, 2002), siehe Tabelle 1.3.

Tabelle 1.3: Extrinsische Immunevasionsmechanismen von Tumoren

modulierendes Signal	modulierter Aktivierungsmechanismus in Effektorzellen
geringe / fehlende HLA Klasse I-Expression, geringe Antigenpräsentation / geringe Peptidaffinität / Antigenverlust	Verringerung der TZR-vermittelten Aktivierung (1.Signal)
HLA-E, HLA-G	Inhibition der Effektorfunktion von NK-Zellen
Verringerung der TAP-Funktion durch Mutation oder onkogene Transformation, dadurch Verringerung der Antigenpräsentation	Verringerung der TZR-vermittelten Aktivierung (1.Signal)
Verlust der β_2 -Mikroglobulinexpression und assoziierter Verlust der HLA Klasse I-Expression	Verlust der TZR-vermittelten Aktivierung (1.Signal)
lösliche klassische und nicht-klassische HLA Klasse I-Moleküle	CD8-vermittelte Apoptose-Induktion in T-Zellen
lösliches MIC	Verlust der Kostimulation / Induktion von Apoptose
Verlust / Verminderung von membranständigen kostimulierenden Signalen z. B. CD54, CD80	Verminderung der kostimulatorischen T-Zell-Aktivierung (2.Signal), Verlust einer NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität
lösliches CD54	Kompetition des kostimulierenden membranständigen Signals
TGF- β (transformierender Wachstumsfaktor β)	Inhibition der NF- κ B-vermittelten Signaltransduktion in T-Zellen / Wachstumsarrest
Interleukin-10 induziert die Suppression von HLA Klasse I-Molekülen und Antigenprozessierungskomponenten von APZ	Verringerung der TZR-vermittelten Aktivierung (1.Signal); Blockade der durch das Zytokin IL-12 vermittelten Th1-Induktion
sezernierte Ganglioside	Inhibition der NF- κ B-vermittelten Signaltransduktion
membranständige Expression von B7-H1	durch den Todesrezeptor PD-1-vermittelte Apoptose-induktion in antigenspezifischen T-Zellen
membranständige Expression des Fas-Liganden (FasL) / sezernierter FasL	durch den Fas-Rezeptor vermittelte Induktion der Apoptose in aktivierten T-Zellen
Verlust des IFN- γ -Signaltransduktionsweges	keine Th1-vermittelte Induktion der HLA Klasse I-Antigenpräsentation

Darüber hinaus existieren weitere Tumorevasionsmechanismen, die die Wirkkaskaden sezernierter Effektormoleküle antagonisieren. Die folgende Tabelle 1.4 fasst die verschiedenen intrinsischen Evasionsmechanismen von Tumoren zusammen.

Tabelle 1.4: Intrinsische Immunevasionsmechanismen von Tumoren

blockierendes Signal	blockiertes Effektormolekül
extrazellulärer Decoy receptor 3 (DcR3)	Inhibition des löslichen Fas-Liganden
fehlender Mannose 6-Phosphat / „insulin-like-growth factor II“-Rezeptor	keine Rezeptor-vermittelte Granzym B-Aufnahme
zytoplasmatischer Serinprotease-Inhibitor PI9 / Serpin	Inhibition von Granzym B
zytoplasmatisches FLICE-Inhibitor-Protein (cFLIP)	Blockade der Caspase 8-vermittelten Apoptose-Initiation
zytoplasmatische Indolamin-2,3-Dioxygenase	Tryptophanentzug / Wachstumsarrest von Lymphozyten in der G1-Phase des Zellzyklus
CD55 („decay-accelerating factor“, DAF)	Blockade der C3- und C5-Konvertase der Komplementkaskade
CD59 („competitor of the membrane attack complex of complement“, MAC)	Blockade der Polymerisierung des Komplementfaktors C9

Zu den intrinsischen Evasionsmechanismen zählen der lösliche „Decoy receptor 3“ (DcR3), der von aktivierten T-Zellen sezernierte lösliche Fas-Liganden bindet und ihre Wirkung blockiert (Ashkenazi et al., 2002), der Verlust des Mannose 6-Phosphat-„insulin-like-growth factor II“-Rezeptors und die dadurch fehlende Rezeptor-vermittelte Endozytose von Granzym B (Motyka et al., 2000), die zytoplasmatische Expression des Proteinaseinhibitors 9 (PI9 / Serpin; Medema et al., 2001), die Tumorzellen vor einer Granzym B-initiierten Apoptose schützt (Bird et al., 1998), die zytoplasmatische Expression des FLICE Inhibitorproteins (cFLIP), die die Caspase 8-Spaltung blockiert (Irmeler et al., 1997; Medema et al., 1999), und schließlich führt die zytoplasmatische Expression von Indoleamin-2,3-Dioxygenase in Tumorzellen zu einem lokalen Tryptophanentzug aus dem Serum und damit zu einer Proliferationsinhibition von TIL (Munn et al., 1999; Uyttenhove et al., 2003). Außerdem wurde auf Tumorzellen die Expression der Moleküle CD55 und CD59 nachgewiesen, die eine durch das Komplementsystem ausgelöste Zytolyse antagonisieren, indem sie die C3- und C5-Konvertasen bzw. die C9-Polymerisierung des Membranangriffskomplexes inaktivieren (Fishelson et al., 2003).

1.4 Das Nierenzellkarzinom

Etwa 3 % aller malignen Neubildungen entfallen auf die Niere und Nierenkarzinome sind für 3 % aller Krebstodesfälle verantwortlich. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen an Nierenkrebs in Deutschland wird für Frauen auf etwa 5.700, für Männer auf etwa 8.300 geschätzt. Davon entfallen ungefähr 10 % auf die epidemiologisch zur Harnblase zählenden Urothelkarzinome des Nierenbeckens und des Harnleiters. Das

durchschnittliche Erkrankungsalter liegt für Männer bei 63, das für Frauen bei über 67 Jahren. Nierenkarzinome treten sporadisch vor allem bei Erwachsenen auf und werden zu 75 bis 85 % als sog. klarzellige Nierenzellkarzinome (Hypernephrome) klassifiziert. Nephroblastome (Wilmstumore), Sarkome oder Lymphome der Niere sind im Erwachsenenalter selten. Bei nur etwa 4 % aller diagnostizierten Nierenzellkarzinome werden genetisch erbliche Prädispositionen beschrieben (Krebs in Deutschland, 2004). Etwa 5 % aller Nierenzellkarzinome entstehen multifokal, jedoch treten bei nur 1 % aller Patienten bilaterale Nierenzellkarzinome auf (Motzer et al., 1996). Das Risiko an einem Nierenzellkarzinom zu erkranken, ist bei übergewichtigen Personen, bei Personen mit erhöhtem Blutdruck (Mellemegaard et al., 1995; Wolk et al., 1996), bei Exposition mit Mineralölgrundsubstanzen, Schwermetallen (Cadmium) und Asbest erhöht (Mandel et al., 1995). Auch Raucher besitzen ein doppelt so hohes Risiko, an einem Nierenzellkarzinom zu erkranken (McLaughlin et al., 1994; Yu et al., 1986).

Durch molekularbiologische Untersuchungen werden immer wieder Genregionen identifiziert, die mit einer Progression der Tumorerkrankung assoziiert sind. Vor allem sog. Tumorsuppressorgene, wie z.B. VHL-, RASSF1A-Gen (Morrissey et al., 2001), PTEN (Brenner et al., 2002), das tuberöse Sklerosis (TSC)-Gen (Sampson et al., 1995; Bjornsson et al., 1996) und Onkogene, wie z. B. MET (Linehan et al., 2003), scheinen mit der Nierenkarzinogenese und Progression assoziiert zu sein. Viele Nierenzellkarzinome können aufgrund histopathologischer Befundung fünf verschiedenen Subtypen zugeordnet werden (Thoenes et al., 1986; van den Berg, 1995). Diese werden in klarzellige, chromophile/papilläre, chromophobe Nierenzellkarzinome und Onkozytome sowie Karzinome des Sammelrohrs (Ductus Bellini-Typ) differenziert. Der häufigste und aggressivste Subtyp aller spontan auftretenden Nierentumore ist mit 75 bis 85 % das klarzellige Nierenzellkarzinom (Motzer et al., 1996). Es ist zyto-genetisch vorwiegend durch den Verlust der Heterozygotie (engl. „loss of heterozygosity“, LOH) des Chromosoms 3p charakterisiert, eine Region, die neben dem gut charakterisierten von Hippel Lindau (VHL)-Tumorsuppressorgen (3p25) auch die Tumorsuppressor-Kandidatengene FHIT (3p14.2) und RASSF1A (3p21.3) trägt (van den Berg und Buys, 1997; Martinez et al., 2000). In 97 % aller klarzelligen Nierenzellkarzinome wird ein VHL-Allel-Verlust beobachtet. Darüber hinaus trägt das in den Tumorzellen verbliebene VHL-Allel in etwa 50 % der Tumorerkrankungen somatische Mutationen und ist zusätzlich in bis zu 20 % aller Erkrankungen durch Hypermethylierungen inaktiviert (Gnarra et al., 1994; Foster et al., 1994; Herman et al., 1994). Die beobachteten Alterationen des VHL-Gens sind häufig mit soliden und invasiv wachsenden Tumoren und einer Metastasenbildung assoziiert, die in einem Zeitraum von 5 bis 10 Jahren nach radikaler Nephrektomie auftreten kann (Brauch et al., 2000).

Der zweithäufigste Subtyp (10 bis 15 %) ist das chromophile/papilläre Nierenzellkarzinom. Zytogenetisch werden sowohl Amplifikationen der Chromosomen 7, 12, 16, 17 und 20 als auch ein Verlust von Chromosom Y sowie die Translokation t(X;1) (p11;q21) beobachtet, die mit der Progression dieses Nierenzellkarzinom-Subtyps in Verbindung gebracht werden (van den Berg et al., 1993). Etwa 5 % aller Nierenzellkarzinome entfallen auf den chromophoben Subtyp. Bisher wurden zytogenetische Alterationen in den Chromosomen 2, 6, 9, 13 und 21 beobachtet, jedoch keine Krankheits-assoziierte Genregion durch molekulargenetische Untersuchungen identifiziert. Die benignen Onkozytome der Niere sind selten und nicht mit Metastasenbildung assoziiert (Morra, 1993). Noch seltener mit einer Frequenz von kleiner 1 % werden aggressive Sammelrohrkarzinome diagnostiziert (Kennedy et al., 1990). Wie die spontanen Nierenzellkarzinome werden auch die vererblichen Formen des Nierenzellkarzinoms den o. g. vier verschiedenen Subtypen zugeordnet.

Alle Nierentumore werden pathophysiologisch nach dem „TNM-System“ der „Union Internationale contre le Cancer“- (UICC) bezüglich ihrer Ausbreitung (Staging) und ihrem Grad der Entdifferenzierung (Grading) eingeteilt (siehe Anhang I, Guinan et al., 1997; Wittekind, Meyer und Bootz, 2002).

Nierenzellkarzinom (NZK)-Patienten mit unbehandeltem metastasierendem Nierenzellkarzinom haben eine mittlere Überlebensrate von 12 Monaten und eine 5-Jahres-Überlebensrate von weniger als 10 % (Atzpodien et al., 2004). Aufgrund der relativ geringen Sensitivität des Nierenzellkarzinoms gegenüber Chemo-, Strahlen- und Hormonbehandlung werden bei diesen Therapieansätzen unzufriedenstellende Behandlungsergebnisse beobachtet (Motzer et al., 2000). In den letzten Jahren gewinnt die Entwicklung von Immuntherapien zunehmend an Bedeutung. Eine Verbesserung des Therapieerfolges wurde durch den Einsatz der Zytokine IL-2, IFN- α -2a oder ihrer Kombination erzielt (Rosenberg et al., 1987; Atzpodien et al., 1990; Jayson et al., 1998). Inzwischen werden Kombinationstherapien bestehend aus Zytokinen und Chemotherapeutika eingesetzt, um NZK-Patienten zu behandeln (Sternberg, 2003). Hierbei zeigt sich, dass eine Kombinationstherapie bestehend aus subkutaner Gabe von Interferon- α -2a/IL-2 und intravenöser Gabe von Fluorouracil, sowie eine orale Applikation von 13-cis-Retinsäure zu einer verbesserten Überlebensrate führt (Atzpodien et al., 2004). Trotzdem ist der Therapieerfolg nicht zufriedenstellend, sodass neue Vakzinierungsstrategien entwickelt werden, die gentechnisch modifizierte Tumorzellen, mit tumorassoziierten Antigenen beladene DZ oder antigenspezifische monoklonale Antikörper, wie z. B. G250, verwenden (Nestlé et al., 1998, Rosenberg et al., 1998; Bleumer, 2004).

Ein weiterer neuer Therapieansatz wendet die allogene Stammzelltransplantation nach nonmyeloablativer Chemotherapie an. Jedoch wurden in hochselektionierten Patientenkollektiven mit metastasiertem Nierenzellkarzinom bei etwa einem Drittel aller bisher behandelten Patienten nur partielle Tumorremission bei einer Lethalitätsrate von bis zu 50 % beobachtet (Harlin et al., 2004; Ueno et al., 2003). Die bei der Behandlung auftretenden Komplikationen sind akute bzw. chronische Graft-versus-Host-Reaktionen bei gleichzeitiger Progression des Tumors (Hori et al., 2004). Da die mittlere Überlebenszeit für NZK-Patienten abhängig von dem Metastasierungsgrad ist und etwa zwei bis fünf Jahre beträgt, können die derzeitigen Ergebnisse noch keinen Aufschluss über die Nachhaltigkeit der Stammzelltransplantation liefern. Aufgrund der hohen Morbidität und Mortalität sollte dieser Therapieansatz jedoch nicht bei älteren Patienten angewandt werden (Heinzer et al., 2004).

1.4.1 Nierenzellkarzinom (NZK)-assoziierte Antigene

Durch die Etablierung von permanenten *in vitro* kultivierten Tumorzelllinien und die T-Zellklonierungstechnik wurden HLA-restringierte, tumorspezifische ZTL-Linien und ZTL-Klone aus TIL und PBL generiert. Die Voraussetzung für die erfolgreiche Isolierung und Charakterisierung des ersten ZTL-definierten Melanom-assoziierten Antigens MAGE-1 (van der Bruggen et al., 1991; Traversi et al., 1992) war die Entwicklung der cDNA-Expressionsklonierung (Aruffo und Seed, 1987). Seither wurde eine Vielzahl von tumorassoziierten Antigenen (TAA) mittels dieser Methode isoliert (Gaugler et al., 1996; Brändle et al., 1996; Ikeda et al., 1997; van den Eynde et al., 1999; Gaudin et al., 1999; Ronsin et al., 1999; Vissers et al., 1999; Morel et al., 2000; Probst-Kepper et al., 2001).

In Anlehnung an die Klassifizierung der verschiedenen ZTL-definierten Antigene, die bereits für das Melanom charakterisiert wurden, werden auch ZTL-definierte TAA beim Nierenzellkarzinom systematisch erfasst (Tabelle 1.5; van der Bruggen et al. 2002).

Die bisher isolierten ZTL-definierten TAA werden aufgrund ihrer Expression vier verschiedenen Gruppen zugeordnet. Dabei werden „individuelle“ (Gruppe 1) von „ubiquitären“ Antigenen (Gruppen 2-4) differenziert. Die Gruppe der ubiquitären Antigene wird in tumorspezifische Antigene (Gruppe 2), Differenzierungsantigene (Gruppe 3) und überexprimierte Antigene (Gruppe 4) gegliedert.

HLA Klasse I-restringierte, individuelle Antigene (Gruppe 1) entstehen durch Punktmutationen in ubiquitär exprimierten Genen. Davon betroffen ist das offene Leseraster eines Gens in einem Tumor eines oder weniger Tumorpatienten. Diese TAA werden in einer Anzahl von Tumoren verschiedenster histopathologischer Ursprünge, wie z. B. Melanom, Blasenkarzinom, chronisch myeloische Leukämie, Hals- und Kopftumoren

und Nierenzellkarzinom, nachgewiesen (Tabelle 1.5; van der Bruggen et al., 2002). Zwei individuelle Nierenzellkarzinom-assoziierte Antigene der Gruppe 1 sind *HLA-A2** und *hsp70-2*, in denen sich durch Aminosäurenaustausch neue antigene Determinanten bildeten, die von ZTL erkannt wurden (Brändle et al., 1996, Gaudin et al., 1999). Im Gegensatz dazu werden die ubiquitären Tumorantigene von vielen histopathologisch verschiedenen Tumoren exprimiert. (i) Gruppe 2 umfasst HLA Klasse I-restringierte „Cancer/Testis“-Antigene, die in histopathologisch verschiedenen humanen Tumorentitäten und mit Ausnahme der Plazenta und Spermatozyten/Spermatogonien des Hodens nicht in Normalgeweben synthetisiert werden. (ii) Gruppe 3 beschreibt alle HLA Klasse I-restringierten Differenzierungsantigene, die sowohl von Tumoren als auch von den korrespondierenden gesunden Normalgeweben exprimiert werden. Beispielsweise wird das TAA Tyrosinase in Melanozyten und im Melanom exprimiert (Wölfel et al., 1994). (iii) In Gruppe 4 sind HLA Klasse I-restringierte organübergreifend transkribierte Antigene vertreten. Sie werden in vielen gesunden Geweben konstitutiv exprimiert und in verschiedenen Tumorentitäten überexprimiert, z. B. die Onkogene Her-2/neu, mdm2 und ras.

Als erstes ZTL-definiertes Nierenkarzinom-assoziiertes Antigen wurde „Renal Antigen-1“ (RAGE-1) mittels eines HLA-B7-restringierten CD3⁺/CD8⁺ ZTL-Klons, der aus PBL eines Patienten mit metastasierendem Nierenzellkarzinom isoliert wurde, charakterisiert (Brouwenstijn et al., 1996; Gaugler et al., 1996). Das Gen kodiert ein 40 Aminosäuren langes Protein mit unbekannter Funktion (Gaugler et al., 1996). Die Transkription von RAGE-1 wurde in der Retina, weiteren Nierenzellkarzinomen und davon abgeleiteten Zelllinien, jedoch nicht in normalen Nierengeweben nachgewiesen (Neumann et al., 1998).

Durch die Transfektion von kostimulierenden B7-Molekülen in NZK-Zellen wurde das TAA RU2AS identifiziert, das von einem offenen Leseraster eines „antisense“-Stranges eines „housekeeping“-Gens kodiert wird (van den Eynde et al., 1999). Des Weiteren wurden TAA isoliert, die durch alternative Translationsstartpunkte der Gene iCE und M-CSF entstehen und im Nierenzellkarzinom, gesunden Nierenepithel und der Leber überexprimiert werden (Ronsin et al., 1999; Probst-Kepper et al., 2001). Darüber hinaus wurden durch die „reverse Immunologie“ p53- und mdm2-peptid-spezifische T-Zellen charakterisiert, die NZK-Zelllinien lysieren (Tabelle 1.5; Heit, Theobald und Seliger, unveröffentlicht).

Tabelle 1.5: TAA des Nierenzellkarzinoms (van der Bruggen et al., 2002)

Gruppe 1	Gruppe 4
HLA-A*0201-R170I, HSP70-2M	RAGE-1, G250, iCE, M-CSF, RU2AS, HER-2/neu, p53*, mdm2*

*Heit et al., unveröffentlicht.

Außer diesen TAA wurden beim Nierenzellkarzinom RNS-Transkripte der ZTL-definierten Melanom-assoziierten „Cancer/Testis“-Antigene gp75, gp100, MAGE-2, PRAME, das Sarkom-assoziierte Antigen sowie Her-2/neu nachgewiesen (Brossart et al., 1998; Neumann et al., 1998). Darüber hinaus wurde das Antikörper-definierte Epitop G250 charakterisiert, das auf der Zelloberfläche von bis zu 85 % aller Nierentumore detektiert werden kann (Oosterwijk, 1989; Vissers et al., 1999; Seliger et al., 2003).

Zur serologischen Identifizierung von TAA werden zwei verschiedene Verfahren angewandt: (i) die cDNS-rekombinante Expressionsklonierung (SEREX) und (ii) das PROTEOMEX-Verfahren. Im Gegensatz zum Expressionsklonierungsverfahren verwendet PROTEOMEX Lysate von Tumoren und korrespondierenden gesunden Geweben. Bei beiden werden Seren von gesunden Spendern bzw. von Karzinompatienten eingesetzt, um tumorspezifische antigene Determinanten zu identifizieren. Hierdurch wurden bereits eine Vielzahl neuer Zielstrukturen für Therapieansätze charakterisiert (Türeci et al., 1997; Kellner et al., 2002).

Einen völlig anderen Therapieansatz unter Anwendung neuer Erkenntnisse bzgl. TAA scheint das Basenanalogen 5-Aza-2'-Deoxycytidin zu bieten. Eine Behandlung von NZK-Zelllinien mit dem Basenanalogen führte zu einer Induktion der Transkription und Proteinexpression von „Cancer/Testis“-Antigenen und RAGE-1 in NZK-Zelllinien, wobei einige NZK-Zelllinien dadurch sensitiv für antigenspezifische ZTL wurden (Coral et al., 2002).

1.4.2 Immunogenität des Nierenzellkarzinoms

Das Nierenzellkarzinom stellt eine Tumorentität dar, die von einer relativ hohen Frequenz an spontanen Remissionen charakterisiert ist (Oliver et al., 1989; Belldegrun et al., 1988). Obwohl *in vitro* zytotoxische T-Zellen (ZTL) generiert werden können, die autologe humane Tumorzellen erkennen und lysieren, werden nur in einer kleinen Zahl von NZK-Patienten tumorspezifische ZTL nachgewiesen (Caignard et al., 1996; Banat et al., 2001).

Häufig ist das Nierenzellkarzinom von einer großen Anzahl mononukleärer Zellen, einschließlich T-Zellen, infiltriert (Finke et al., 1990; Morita et al., 1992; Whiteside et al., 1994). Jedoch sind die Eigenschaften dieser TIL so stark beeinträchtigt, dass sowohl ihre Proliferation als auch ihre Zytotoxizität inhibiert ist (Alexander et al., 1993). Darüber hinaus wird auch eine Einleitung der Apoptose in *in vitro* aktivierten T-Zellen („activation induced cell death“, AICD) beobachtet (O'Mahoney et al., 1993; Uzzo et al., 1999). Infolgedessen bleibt die Induktion einer zellulären, inflammatorischen Th1-Immunantwort in der Tumorfrente aus (Miescher et al., 1988a; Alexander et al., 1993; Wang et al., 1995). Trotzdem werden in TIL von Nierenzellkarzinomen eine große Anzahl von aktivierten CD3⁺-T-Zellen beobachtet, die selektiv durch immunsupprimierende Zytokine, die von NZK-Zellen ins umgebende Milieu sezerniert werden, gehemmt werden (Angevin et al., 1997).

Parallel dazu werden in vergleichenden immunhistochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen von Nierenzellkarzinomen sowohl inter- als auch intratumorale Expressionsveränderungen von Komponenten des Antigenprozessierungs- und -präsentationsweges beschrieben. Davon betroffen sind die Untereinheiten des TAP-Peptidtransporters, die Proteasomenuntereinheiten LMP2, LMP7, MECL 1, die Chaperone Tapasin und Calretikulin und schließlich die Zelloberflächenexpression von HLA Klasse I-Molekülen (Seliger et al., 1996a; Seliger et al., 1996b; Seliger et al., 2000; Atkins et al. 2004). Außerdem wurde auch eine Proteinexpression von nicht-klassischen HLA-G-Molekülen für das Nierenzellkarzinom *in situ* beschrieben (Ibrahim et al., 2001).

1.4.3 Expression von nicht klassischen HLA Klasse Ib-Molekülen

Wie die klassischen HLA Klasse Ia-Moleküle (HLA-A, -B, -C), werden auch die nicht-klassischen HLA Klasse Ib-Moleküle HLA-E und HLA-G, jedoch nicht HLA-F, in einem TAP-abhängigen Schritt mit Peptiden beladen und auf der Zelloberfläche exprimiert (Lee et al., 1995; Lee et al., 1998; Lee et al., 2003; Seliger et al., 2003). Analog zu den HLA Klasse Ia-Molekülen stellen auch die HLA Klasse Ib-Moleküle Liganden für ILT-, KIR- und KLR-Rezeptoren dar, die von NK-Zellen und T-Zellen exprimiert werden und deren zytotoxische Aktivität inhibieren (Moretta et al., 1997; Pende et al., 1997; Adrian-Cabestre et al., 1999; Gati et al., 2001).

HLA-G-Moleküle haben einige Gemeinsamkeiten mit den klassischen HLA Klasse Ia-Molekülen. Ihre Gene besitzen eine Exon-Intron-Struktur, sie assoziieren mit β_2 -Mikroglobulin, besitzen konservierte Bindestellen für den CD8-Korezeptor in der $\alpha 3$ -Domäne der schweren Kette und präsentieren ein restringiertes Repertoire an nonameren Peptiden (O'Callaghan und Bellm, 1998; Carosella et al., 2000). Jedoch besitzt HLA-G auch spezifische Eigenschaften, (i) eine verkürzte zytoplasmatische Domäne, die kei-

ne potentiellen Endozytosesignale trägt (Park et al., 2001), (ii) einen geringeren Polymorphismus als die klassischen HLA Klasse Ia-Gene (Bainbridge et al., 2001) und (iii) eine Transkription von bis zu sieben verschiedenen alternativen Spleißvarianten, die für Proteinisoformen kodieren (Abbildung 1.5; modifiziert nach Paul et al., 2000a). Bislang wird angenommen, dass vier membranständige Isoformen HLA-G1, -G2, -G3, -G4 auf der Zelloberfläche präsentiert und drei soluble Isoformen HLA-G5, -G6, -G7 sezerniert werden (Abbildung 1.5; modifiziert nach Paul et al., 2000a). Die in Abbildung 1.5 fehlende Isoform HLA-G7 entspricht derjenigen von HLA-G3, ist jedoch um zwei C-terminale Aminosäuren verlängert (Paul et al., 2000a). HLA-G-Transkripte und -Moleküle wurden zuerst in Zytotrophoblasten der Plazenta und in verschiedenen Geweben, u. a. in primären Thymusepithelzellen, nachgewiesen (Ishitani et al., 1992; McMaster et al., 1995; Amiot, 1998; Mallet et al., 1999), wobei die Transkription durch IFN- γ , IL-10, Glucokortikoide und durch Hitzeschock induziert werden kann (Ibrahim et al., 2000; Lefebvre et al., 2001; Urosević et al., 2001; Moreau et al., 2001). Aufgrund der HLA-G-Expression in Zytotrophoblasten der Plazenta wurde eine modulierende Funktion auf die Zell-vermittelte Immunantwort postuliert (Le Bouteiller, 2000). NK-Zellen und T-Zellen exprimieren Rezeptoren, die membranständiges HLA-G1 binden und inhibierende Funktionen vermitteln (Munz et al., 1997; Rajagopalan et al., 2000; Shiroishi et al., 2003). Im Gegensatz dazu interagiert die sezernierte Isoform HLA-G5 mit CD8-Korezeptoren und löst, wie sezernierte klassische HLA Klasse Ia-Moleküle, eine Apoptose in aktivierten CD8⁺-T-Zellen und NK-Zellen aus (Fournel et al., 2000a; Marchal-Bras-Goncalves et al., 2001; Contini et al., 2003).

Es wurden bis zu sieben alternativ gespleißte HLA-G-Transkripte in Tumorzelllinien verschiedener Entitäten, wie z. B. Melanom, Glioblastom, Leukämien, Brust- und Lungenkrebs, beschrieben (Amiot et al., 1996; Paul et al., 1999; Real et al., 1999a; Urosević et al., 2001; Wiendl et al., 2002; Lefebvre et al., 2002), wobei die Frequenz der HLA-G-Transkription und eine Proteinexpression kontrovers diskutiert wird (Polakova et al., 2000). Die Proteinexpression von HLA-G *in situ* wurde im Melanom, in B- und T-Lymphomen, im Nierenzellkarzinom und im Glioblastom nachgewiesen (Amiot et al., 1998; Paul et al., 1998; Paul et al., 1999; Ibrahim et al., 2001; Urosević et al., 2002; Wiendl et al., 2002). Funktionell kann die Oberflächenexpression von HLA-G1-Molekülen auf Melanom- und Glioblastomzelllinien zu einer Desensibilisierung von ZTL und NK-Zellen führen (Le Gal et al., 1999; Riteau, et al., 1999; Wiendl et al., 2002).

Als Ursache für eine HLA-G-Transkription in HLA-G⁺ Zelllinien werden Veränderungen von epigenetischen Methylierungsmustern, von CpG-Inseln in der Promotorregion, angenommen. Diese epigenetische Expressionskontrolle ist in Tumorzellen verloren-

gegangen und ihr Verlust scheint für die HLA-G-Transkription ursächlich zu sein (Moreau et al., 2003; Rouas-Freiss et al., 2003). Ob die auf Tumorzellen vorkommende HLA-G-Proteinexpression ihre Immunevasion *in vivo* begünstigt, oder eine irrelevante Begleiterscheinung ist, bleibt noch zu klären (Frumento et al., 2000; Wagner et al., 2000; Davies et al., 2001).

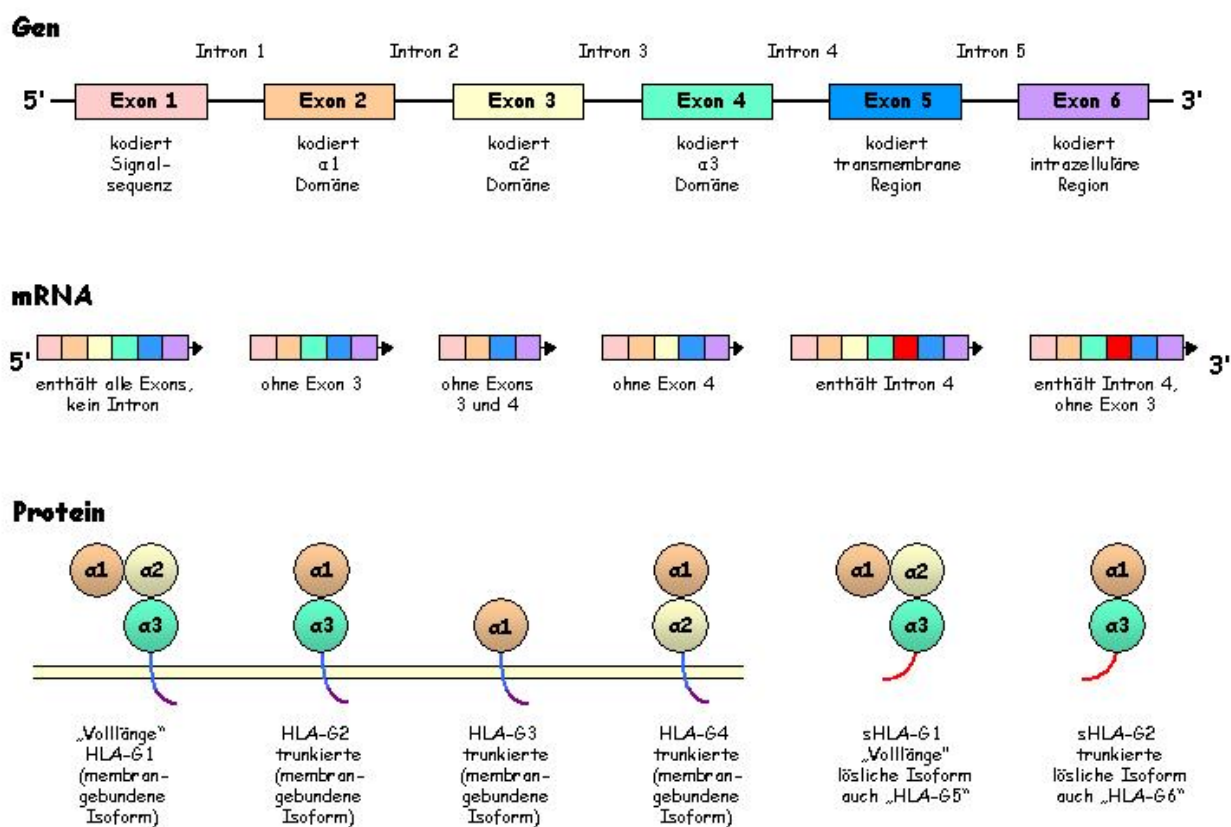


Abbildung 1.5: Differenziell gespleißte HLA-G-Isoformen (nach Paul et al., 2000). Von HLA-G werden durch alternatives Spleißen der Exons zwei, drei und sechs verschiedene Transkripte erzeugt, die zur Bildung verschiedener HLA-G-Isoformen führen.

2. Aufgabenstellung

Zur effizienten Therapie von NZK-Patienten ist die Entwicklung von hochwirksamen Vakzinen notwendig. Hierfür müssen viele Eigenschaften der untersuchten Tumore ebenso wie verschiedene Hindernisse bei der Entwicklung von Tumorkvakzinen berücksichtigt werden (Pardoll, 2002). Aus TIL von NZK bzw. aus PBL von NZK-Patienten werden *in vitro* reaktive T-Zellen isoliert, die Effektorfunktionen gegen autologe NZK-Zelllinien entwickeln, nachdem sie TAA im Komplex mit HLA Klasse I-Molekülen spezifisch erkannt haben (van der Bruggen, 2002). Ebenso werden durch die Verwendung von Patientenseren und die darin enthaltenen Antikörper TAA des NZK detektiert, die Zielstrukturen für künftige Vakzinierungen bieten (Türeci et al., 1997; Kellner et al., 2002). Eine Anzahl von ZTL-definierten Peptidantigenen des Melanoms wird bereits in klinischen Studien als Vakzin eingesetzt (Nestle et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit soll ein TAA des NZK identifiziert und charakterisiert werden. Hierzu wird aus nephrektomierten Nieren von NZK-Patienten Biopsiematerial entnommen, das für molekularbiologische Untersuchungen und für die Etablierung von *in vitro* Primärkulturen aus Nierenepithel und Tumor verwendet wird. Ziel ist es, autologe NZK-Systeme bestehend aus permanent wachsenden NZK-Zelllinien und korrespondierenden Nierenzelllinien zu etablieren. Die Zelllinien werden auf die Expression von immunmodulatorischen Zelloberflächenantigenen untersucht, um einen tumorspezifischen Immunphänotyp zu charakterisieren. Hierbei steht die Untersuchung von HLA Klasse I-Molekülen im Vordergrund, da sie essentiell für die Induktion einer spezifischen T-Zellantwort sind. Von besonderem Interesse ist dabei die Charakterisierung des nicht-klassischen HLA-G-Allels in NZK-Zelllinien und in Biopsiematerial von NZK-Patienten. Dabei wird die Transkription, die Molekülexpression und ein Zusammenhang von HLA-G und Malignität beim NZK untersucht. Parallel dazu wird die biogene Wirkung der HLA-G-Molekülexpression auf verschiedene Effektorpopulationen der zellulär-vermittelten Immunantwort charakterisiert. Ebenso werden im NZK-System MZ2733RC TIL *in vitro* propagiert oder nach *in vitro* Sensibilisierungen von peripheren autologen T-Zellen aus proliferierenden „Responder“-Kulturen zytotoxische CD3⁺/CD8⁺-T-Zelllinien generiert. Diese T-Zellen werden auf ihre Effektoreigenschaften, wie z. B. Zytotoxizität und Zytokinsekretion, sowie ihre HLA-Restriktion charakterisiert. Im Vergleich dazu wird in dem bereits etablierten NZK-System MZ1257RC untersucht werden, ob mittels einer CD80/B7-1 Modifikation von NZK-Zellen eine Induktion von autologen zytotoxischen T-Zellen möglich ist. In diesem NZK-System ist bereits ein HLA-A2 restringierter, zytotoxischer T-Zellklon charakterisiert worden, dessen Peptidspezifität im Rahmen einer bestehenden Kooperation durch das cDNS-Expressionsklonierungsverfahren mit einer dafür herzustellenden cDNS-Expressionsbibliothek aufgeklärt werden soll.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Absaugpumpe	KNF Neuberger (Freiburg)
Autoklav	Technorama Deutschland (Fernwald)
Bakterienschüttler	SM 25DIGI mit Aufsatz TH25, Edmund Bühler (Bodelshausen)
Bakteriensterilbank	Twin 30, Gelaire Flow Laboratories (Sarstedt)
Bestrahlungsanlage	IBL 437C, Isotypendiagnostik CIS GmbH (Dreieich)
Biopsieaufbereiter	Medimachine, DAKO (Hamburg)
β -, γ -Counter	Top Count, Tri Carb 1600 TR, Packard (Dreieich)
CO ₂ -Begasungsschränke	Heraeus B5060EK/CO ₂ , Kendro (Hanau)
Durchflusszytometer	Epics XL-MCL, Beckman Coulter (Krefeld)
Einfrierboxen	Cryo Freezing Container, Nalgene (Hereford, UK)
Elektroporationsgerät	Elektroporations-Impulsgenerator, Fa. Dr. L. Fischer (Heidelberg)
Entwicklermaschine	RG II, Fuji X-Ray Film Processor, Fuji (Düsseldorf)
Gefrierschrank (-80°C)	Heraeus Herafreeze, Kendro (Hanau)
Gelapparaturen, horizontal	Horizon 11.14 und 58, Invitrogen (Karlsruhe)
Glasschalen aus Pyritt	Newell (Mühlthal)
Hybridisierungsöfen	OV10, Biometra (Göttingen)
Kühlwasserbad	F10, Julabo (Seelbach)
Luminometer	LB 9501, Berthold (Bad Wildbach):
Mikroskop	Wilovert S, H. Hund GmbH (Wetzlar)
MTP Plattenreader	MRXII, Dynex (Denkendorf)
PAGE-Gelapparaturen	Minigel-Twin, Biometra (Göttingen)
PCR-Geräte	Trioblock, Biometra (Göttingen)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Rotoren	SW40, VTI65.2, Beckman (München)
Sofortbildkamarasystem	Polaroid MP4 Land Camera, Polaroid (Offenbach)
Spannungsgeräte	Power Supply ST504, Invitrogen (Karlsruhe)
Spektralphotometer	Uvicon 930, Kontron Instruments (Neufarn)
Sterilbänke	Nuaire, Zapf (Sarstedt)
Sterilschrank	Heraeus T6080, Kendro (Hanau)
Stickstofftank	tec-lab (Königstein)
Tank-Blot-Apparatur	Trans Blot Cell, Bio Rad (München)
Thermomixer	Thermomixer 5436, Eppendorf (Hamburg)
Trockenschrank	Heraeus UT6420, Kendro (Hanau)
Ultrazentrifuge	Centrikon T-1065, Kontron Instruments (Neufarn) L7-65, Beckman (München)
UV-Leuchtschirm	UV Kontaktlampe Chroma 41, 254 nm, Vetter GmbH (Wiesloch)
Vakuumzentrifuge	Keutz Laborgeräte (Reiskirchen)
Waagen	analytic, BP 310S, Sartorius (Einbeck)
Wasserdeionisierungsanlage	Milli Q Plus Ultra Pure Water System, Millipore (Eschborn)
Zellseparationsapparatur	Minimacs, Miltenyi (Gladbach)

Zentrifugen Heraeus Omnifuge 2.ORS, Megafuge 3.OR, Biofuge 15, Suprafuge 22, Kendro (Hanau)

3.1.2 Datenverarbeitungsprogramme

Acrobat Reader 5.0	Adobe Systems Inc. (Unterschleißheim)
Adobe Photoshop Version 5.0.2	Adobe Systems Inc. (Unterschleißheim)
Align plus, Version 4.0	Scientific & Education Software (Durham, USA)
Clone manager, Version 5.2	Scientific & Education Software (Durham, USA)
Enhance, Version 3.1	Scientific & Education Software (Durham, USA)
Microsoft Excel 2000	Microsoft Corporation, USA
Microsoft Power Point 2000	Microsoft Corporation, USA
Microsoft Word 2000	Microsoft Corporation, USA
Primer designer, Version 4.1	Scientific & Education Software (Durham, USA)

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Einmalsterilfilter	0,22 µm, Millipore GmbH (Eschborn)
Einmalpipetten 23 cm	Greiner (Frickenhausen)
Glaspasteurpipetten 23 cm	Brand (Wertheim/Main)
Kryogefäße	Nunc (Wiesbaden)
Laborfilm	Braun (Melsungen)
LeucoSeprörchen	Greiner (Frickenhausen)
Festphasenscintillator	Lumaplate, Packard (Dreieich)
Filme	Kodak Scientific Imaging Film X-OMAT AR Kodak (Fernwald)
Magnetische Partikel	Deutsche Dynal GmbH (Hamburg)
Magnetseparator	Deutsche Dynal GmbH (Hamburg)
Maxisorb-Multititerplatten	Nunc (Wiesbaden)
Nylonmembranen	Hybond N oder N+ Amersham (Braunschweig)
Nylonsiebe (100 µM)	Nylonmesh, Becton Dickinson (Wiesbaden)
Nitrozellulose	Schleicher & Schüll (Dassel)
Parafilm	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg), Greiner (Frickenhausen)
Polaroidfilme	Polaroid Typ 667, Format 8,6 x 10,8 cm, Polaroid (Offenbach)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Ultrazentrifugenröhrchen	Polyallomer Röhrchen, Beckman (München):
Whatman-Papier	Schleicher & Schüll (Dassel)
Zellkulturgefäße	Greiner (Frickenhausen), Nunc (Wiesbaden)

3.1.4 Chemikalien

Acrylamid	Amresco (Solon, Ohio, USA)
Adenosintriphosphat	Roche Diagnostics (Mannheim)
AG 501-X8(D)	Biorad (München)
Agar	Invitrogen (Karlsruhe)
Agarose (Ultra Pure™)	Invitrogen (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat	AppliChem (Darmstadt)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Aprotinin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Bacto-Trypton	Difco (Augsburg)
Bacto-Yeast-Extract	Difco (Augsburg)
Biotin-14-dCTP	Invitrogen (Karlsruhe)

Bisacrylamid	Amresco (Solon, Ohio, USA)
Blocking Reagent	Roche (Mannheim)
BCIP	Roche (Mannheim)
Bromphenolblau	AppliChem (Darmstadt)
BSA Fraktion V	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
n-Butanol	Merck KGaA (Darmstadt)
Cäsiumchlorid	Invitrogen (Karlsruhe)
CDP-Star™	Roche (Mannheim)
D-Glucose	Merck KGaA (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Dithiothreitol	Roche Diagnostics (Mannheim)
dNTP's	Desoxyribonukleosidtriphosphatgemisch, Perkin Elmer (Weiterstadt)
Eisessig	Merck KGaA (Darmstadt)
Ethanol	Merck KGaA (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Merck KGaA (Darmstadt)
Ethylendiamintetraacetat	Merck KGaA (Darmstadt)
Ficoll Typ 400	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Formaldehyd 37%	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
G418 Sulfat (Neomycin)	PAA Laboratories (Coelbe)
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Glycerin, wasserfrei	AppliChem (Darmstadt)
Glycin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Guanidin Isothiocyanat	Invitrogen (Karlsruhe)
HCl (Salzsäure)	Merck KGaA (Darmstadt)
HEPES	Invitrogen (Karlsruhe)
Hygromycin	Roche Diagnostics (Mannheim)
Interleukin (IL)-2	Proleukin®, Chiron (München)
IL-7	Strathmann (Hannover)
IL-12	Strathmann (Hannover)
IFN-γ	Imukin®, Boehringer Ingelheim (Ingelheim)
Isopropanol	Merck KGaA (Darmstadt)
Isopropyl-β-D-thiogalacto- pyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Jodacetamid	AppliChem (Darmstadt)
Kaliumacetat	Merck KGaA (Darmstadt)
Kaliumhexacyanoferrat	Merck KGaA (Darmstadt)
Kaliumhexacyanoferrit	Merck KGaA (Darmstadt)
Kaliumhydrogencarbonat	Merck KGaA (Darmstadt)
Kaseinhydrolysat	Invitrogen (Karlsruhe)
Leupeptin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Lipofectamin™	Invitrogen (Karlsruhe)
LMP-Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt)
Magnesiumsulfat	Merck KGaA (Darmstadt)
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Methanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Milli-Q-Wasser	Millipore GmbH (Eschborn)
MOPS	AppliChem (Darmstadt)
Natriumacetat	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

Natriumcarbonat	Merck KGaA (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Merck KGaA (Darmstadt)
NBT	Roche Diagnostics (Mannheim)
Nonident P-40	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Pepstatin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth (Karlsruhe)
Phenylmethansulfonsäurefluorid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Phosphorsäure	Merck KGaA (Darmstadt)
PMSF	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Pyronin G	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
RNase Inhibitor	Roche Diagnostics (Mannheim)
Streptavidin-AP	Roche Diagnostics (Mannheim)
Tetramethylethyldiamin	Serva Feinbiochemica GmbH (Heidelberg)
Tetramethylbenzidine	Biosource (Solingen)
Tris/Acetat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Tris/HCl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Triton-X-100	Merck KGaA (Darmstadt)
Trypanblau	Merck KGaA (Darmstadt)
Trypsininhibitor	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Tween-20	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
X-Gal	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Xylencyanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

3.1.5 Radiochemikalien

⁵¹ Di-Natrium-Chromsulfat	New England Nuclear, (Bad Homburg)
--------------------------------------	------------------------------------

3.1.6 Medien, Lösungen und Puffer für die Zellkultur

X-Vivo15	Bio Whittaker (Apen)
RPMI 1640	Invitrogen (Karlsruhe)
DMEM (high glucose)	Invitrogen (Karlsruhe)
Hank's gepufferte Salzlösung	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin-EDTA	Invitrogen (Karlsruhe)
Fötales Kälberserum/Humanserum	Invitrogen (Karlsruhe)
Insulin/Transferrin/Selenit	Invitrogen (Karlsruhe)
L-Glutamin	Invitrogen (Karlsruhe)
Natriumpyruvat	Invitrogen (Karlsruhe)
Nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen (Karlsruhe)
Fungizone	Invitrogen (Karlsruhe)

3.1.7 Komplettsysteme

Biotin-Labeling-Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
β-Galaktosidase Staining Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
ECL Detection Reagents	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Galacto Light™	Serva (Heidelberg)
mRNA-Isolation Kit	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Opt EIA ELISA Sets	Pharmingen (Wiesbaden)

PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Plasmid-Isolierungs-Kits	Qiagen (Hilden)
Protein Assay ESL	Roche Diagnostis (Mannheim)
Qia Quick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
RNS-Isolierungs-Kit	Qiagen (Hilden)
Sequenzierungs-Kit	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Taq DNS Polymerase PCR Kit	Roche Diagnostis (Mannheim)
Titan™ One Tube RT-PCR System	Roche Diagnostis (Mannheim)
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
Zellseparationssysteme	Myltenyi (Mönchengladbach)

3.1.8 Enzyme

AMV reverse Transkriptase	Amersham Phamacia (Freiburg)
CIP, alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics (Mannheim)
Collagenase Typ IV (Zellkultur)	Invitrogen (Karlsruhe)
DNase I (amplification grade)	Invitrogen (Karlsruhe)
DNase I (Zellkultur)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Klenow Enzym	Roche Diagnostics (Mannheim)
Proteinase K	Roche Diagnostics (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	Roche Diagnostics (Mannheim)
RNase A	Roche Diagnostics (Mannheim)
RNase H	Roche Diagnostics (Mannheim)
RNase T	Roche Diagnostics (Mannheim)
Superscript™	Invitrogen (Karlsruhe)
Streptavidin-	
Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics (Mannheim)
T4 DNS Ligase	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Taq-DNS-Polymerase	Roche Diagnostics (Mannheim)
Terminale Desoxynukleotidyl- transferase	Invitrogen (Karlsruhe)

3.1.9 Längen- und Molekulargewichtsstandards

3.1.9.1 Längenstandards

100 Basenpaar-Leiter	Invitrogen (Karlsruhe)
500 Basenpaar-Leiter	NEB (Frankfurt/Main)
„RNS-Ladder“	(Invitrogen, Karlsruhe)
λ-Phagen-DNS x BstEII-Leiter	λcl857Sam7, Roche Diagnostics (Mannheim)

3.1.9.2 Molekulargewichtsstandard

RPN 800 (Protein-Leiter)	Amersham Pharmacia (Freiburg)
--------------------------	-------------------------------

3.1.10 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Softwareprogramms „Primer designer“ abgeleitet und von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Die Sequenzen sind in der 5'-3'-Orientierung angegeben.

Tabelle 3.1: HLA-G spezifische Oligonukleotide

Name	Sequenzen	T _m [°C]	Nachweis
G.257	5'-ggaagaggagacacggaaca-3'	61	Exon 2
G.292*	5'-ggctctgcagggtcattctgtc-3'	59,5	Exon 2
Intron 2*	5'-gttactcagtggcctcgctc-3'	61	Intron 2
G.526*	5'-ccaatgtggctgaacaaagg-3'	57	Exon 3
Intron 3*	5'-gaccaacaccagaatatcgc-3'	57	Intron 3
G.647*	5'-ccaccaccctgtctttgact-3'	57	Exon 4
Intron 4*	5'-gagcatcatgtctgttagg-3'	57	Intron 4
G.927*	5'-atcatgggtatcgttgctgg-3'	57	Exon 5
Intron 5*	5'-atgagtgtgatggtgcttc-3'	57	Intron 5
G.1225	5'-tgagacagagacggagacat-3'	61	3'-UTR

* Oligonukleotide wurden mit 14-Biotin-dCTP am 3'-Ende markiert und als Hybridisierungssonden für Southern-Blot-Analysen eingesetzt.

Tabelle 3.2: T-Zell-Rezeptor-Familien spezifische Oligonukleotide

TZR-Familie	5'-3'-Sequenz
Vβ1	5'-ccgcacaacagttccctgactgc-3'
Vβ2	5'-ggccacatacgagcaaggcgtcga-3'
Vβ3	5'-cgcttctcccggattctggagtcc-3'
Vβ4	5'-ttcccatcagccgccaaacctaa-3'
Vβ5	5'-agctctgagctgaatgtgaacgcc-3'
Vβ6	5'-tctcaggtgatccaaattcggg-3'
Vβ7	5'-cctgaatgcccacacagctctctc-3'
Vβ8	5'-ccatgatgcgggactggagtgc-3'
Vβ9	5'-ttccctggagcttggtgactctgc-3'
Vβ10	5'-ccacggagtcaggggacacagcac-3'
Vβ11	5'-tgccaggccctcacatacctctca-3'
Vβ12	5'-gtcaccagactgggaaccaccac-3'
Vβ13	5'-cactgcggtgtaccaggatatga-3'
Vβ14	5'-gggctcggctaaggcagacctac-3'
Vβ15	5'-caggcacaggctaaattctccctg-3'
Vβ16	5'-gcctgcagaactggaggattctgg-3'
Vβ17	5'-tcctctcactgtgacatcgccca-3'
Vβ18	5'-ctgctgaattcccaaagagggcc-3'
Vβ19	5'-tctcaatgcccagaacgcaccc-3'
Vβ20	5'-tgcccagaatctctcagcctcca-3'
Vβ21	5'-tccaacctgcaaggctgacgact-3'
Vβ22	5'-aagtgatcttgcgctgtgtccca-3'
Vβ23	5'-gcagggtccaggtcaggacccca-3'
Vβ24	5'-cccagttgaaagccagtgacct-3'
Sonde	5'-cacagcgacctcgggtggg-3'
Cβ	5'-cgggctgctcctgaggggctgcg-3'

Die Oligonukleotide zur Detektion von Transkripten der TZR-Vβ-Familien entstammen den Arbeiten von Pannetier und Koautoren (1995) sowie Genevee und Koautoren (1992) und wurden vom Institut f. Med. Mikrobiologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3.3: Sonstige Oligonukleotide

Name	Sequenzen	T_m [°C]	Nachweis
E.312	5'-tgcgcggtactacaatcag-3'	55	HLA-E
E.1052	5'-tgtcgctccactcagccttc-3'	55	HLA-E
β-Aktin 5'	5'-gaagcatttgcggtggacgat-3'	58	β-Aktin
β-Aktin-3'	5'-tcctgtggccatccacgaaact-3'	58	β-Aktin

3.1.11 *In Vitro* Zellkulturen

Tabelle 3.4: Eukaryotische Zelllinien

Bezeichnung	Ursprung	Quelle
MZ1257RC	Nierenzellkarzinom	Uniklinik Mainz
MZ1774RC	Nierenzellkarzinom	
MZ1790RC	Nierenzellkarzinom	
MZ1795RC	Nierenzellkarzinom	
MZ1846RC	Nierenzellkarzinom	
MZ1851RC	Nierenzellkarzinom	
MZ1851LN	Nierenzellkarzinom	
MZ1879RC	Nierenzellkarzinom	
MZ1940RC	Nierenzellkarzinom	
MZ1973 10-4RC	Nierenzellkarzinom	
LE89.15RC	Nierenzellkarzinom	Brouwenstijn, et al., 1996
JEG3	Chorionkarzinom	Gobin et al., 2002
AB	EBV-B-LCL	Wölfel et al., 1994
NA8	Melanom	Wölfel et al., 1994
Mel624	Melanom	S. F. (Buffalo, USA)
Skmel29	Melanom	S. F. (Buffalo, USA)
HT3	Zervixkarzinom	American Type Culture Collection (Manassas, USA)
Me180	Zervixkarzinom	
SW480	Lungenkarzinom	
Colo206F	Kolonkarzinom	
CX1	Kolonkarzinom	
818.4	Pankreaskarzinom	
Pankreas 1	Pankreaskarzinom	Uniklinik Mainz
293	humane embryonale Nierenzellen	Graham et al., 1977
COS 7	Nierenzellen der grünen Meerkatze	Gluzman, 1981

Der tyrosinasespezifische T-Zellklon wurde etabliert von Wölfel et al., 1994.

Tabelle 3.5: Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ , l ⁻ , hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺), deoR, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, D(argF-lacZYA)169, F80d(lacZ Δ M15)	Hanahan, 1983
<i>Epicurian coli</i> XL2-Blue	recA1 end1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lac ^q Δ M15 Tn10 (Tet ^r) Amy Cam ^r]	Bullock et al., 1987

3.1.12 Humane Biopsien

Tabelle 3.6: Pathologisch typisierte Nierenzellkarzinome

Nummer	NZK-Subtypen	TNM-Klassifikation	Grading
2708	klarzellig	pT2, Nx, Mx	G2
2714	chromophil	pT3b, N0, M1	G2
2716	klarzellig	pT1, Nx, Mx	G2
2728	klarzellig	pT3b, N0, M0	G3
2748	klarzellig	pT3b, N0, M0	G2
2749	keine Angabe	pT1, N0	G2
2794	klarzellig	pT3a, N2, M1	G2-3
2796	klarzellig	pT1, N0, M0	G2
2797	klarzellig	pT2, N0, M0	G2-3
2798	klarzellig	pT1, N0, M0	G3
2803	klarzellig	pT1, N0, M0	G1
2804	klarzellig	pT3b, N0, M0	G3
2808	chromophob	pT1	G2-3
2810	chromophob	pT2, N1, M0	G3
2817	klarzellig	pT3b, N0, M0	G4
2821	klarzellig	pT1, N0, M0	G2-3
2825	klarzellig	pT1, N0, M0	G2
2829	klarzellig	pT3a, N0, M0	G2
2832	klarzellig	pT3a, N0, M1	G3
2839	klarzellig	pT3b, N0, M0	G3
2856	klarzellig	pT1, N0	G2
2857	klarzellig	pT3a, N0	G2-3
2859	klarzellig	pT2, N0	G3
2874	klarzellig	pT1	G2
2876	klarzellig	pT1, Nx, Mx	G1
2877	klarzellig	pT3a, Nx, Mx	G2
2878	klarzellig	pT1, Nx, Mx	G3
2879	klarzellig	pT1, N0	G2
2889	klarzellig	pT3b, Nx, Mx	G3
2892	klarzellig	pT3b, Nx, Mx	G2

Die Gewebeproben von Nierenzellkarzinomen und korrespondierenden gesunden Nierengewebe wurden von der Urologischen Klinik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur Verfügung gestellt.

3.1.13 Antikörper

3.1.13.1 Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

Tabelle 3.7: Isotypspezifische Kontrollantikörper

Bezeichnung	Verwendung	Quelle
IgG1 FITC	Isotypspezifische Kontrollantikörper	Beckman Coulter (Krefeld)
IgG2a FITC		
IgG1 PE		
IgG2a PE		

Tabelle 3.8: Antikörper zur Charakterisierung von Immunphänotypen

Spezifität	Verwendung	Quelle
CD3 FITC/PE	Detektion spezifischer Lymphozytenantigene	Beckman Coulter (Krefeld)
CD4 FITC/PE		
CD8 PE		
CD40 PE		
CD45R0 FITC		
CD45RA PE		
CD54 FITC		
CD56 PE		
CD58 FITC		
CD80 FITC		
CD86 PE		
CD95 FITC		
TZR α/β		
TZR γ/δ		
TZR- ζ -Kette		
HLA-ABC FITC	Detektion von HLA-Molekülen	Exbio (Prag, Tschechien)
MEM-G/9 FITC		

Tabelle 3.9: T-Zell-Rezeptor-V β -Familien spezifische Antikörper

Spezifität	Bezeichnung	Hersteller
V β 1 F/P	BL37 2	
V β 2 F/P	MPB2D5	
V β 3 F	LE-89	
V β 5.1 F/P	Immu157	
V β 5.2 P	36213	
V β 5.3 P	3D11	
V β 7 F/P	20E	
V β 8 F/P	56C5.2	
V β 9 P	FIN9	
V β 11 P	C21	
V β 12 F	VER.32 1	Beckman Coulter (Krefeld)
V β 13.1 P	Immuno222	
V β 13.6 F	JU74 3	
V β 14 F	CAS1 13	
V β 16 F	TAMAYA1 2	
V β 17 F/P	E17 5F3	
V β 18 P	BA626	
V β 20 F	ELL1 4	
V β 21.3 F	IG125	
V β 22 F/P	Immuno546	
V β 23 P	AF23	

F: Fluorescein-Isothiocyanat, P: Phycoerythrin.

3.1.13.2 Antikörper für proteinchemische Nachweisverfahren

Tabelle 3.10: Antikörper für Immunhistochemie, Immunpräzipitation und Western Blot

Bezeichnung	Verwendung	Quelle
HC-A2	Immunpräzipitation	S. F. (Buffalo, USA)
HC 10	Immunhistochemie	
TAP1 (148.3)	Immunhistochemie	Momburg et al., 1994
LMP7	Immunhistochemie	Affinity (Mamhead, Großbritannien)
MEM-G/1	Western Blot, Immunpräzipitation	Exbio (Prag, Tschechien)
MEM-G/9		
Pab101	Western Blot	Pharmingen (Wiesbaden)
β-Aktin	Western Blot	Abcam (Cambridge, GB)

Tabelle 3.11: Antikörper für zellbiologische Blockadeexperimente

Antikörper	Spezifität	Quelle
w6/32	pan HLA Klasse I	Barnstable et al., 1978
mA2.1	HLA-A2	American Type Culture Collection (Manassas, USA)
B1.23.2	HLA-Bw, -Cw	
IgG1	Isotypkontrolle	Beckman Coulter (Krefeld)
IgG2a	Isotypkontrolle	
CD158a	CD158a	
CD158b	CD158b	
NKG2A	NKG2A	
OKT3	CD3	

Tabelle 3.12: Sekundärantikörper

Antikörper	Verwendung	Hersteller
Ziege anti-Maus (IgG + IgM)-FITC	Durchflusszytometrie	Beckman Coulter (Krefeld)
Kaninchen-anti-Maus IgG-AP	Western Blot	DAKO (Hamburg)

AP: alkalische Phosphatase; FITC: Fluorescein isothiocyanat.

3.1.14 Zellkulturmedien und Zusätze

Tabelle 3.13: Zusammensetzung der zelltypspezifischen Kulturmedien*

Medium und Medium-zusätze	Nierenzellen	NZK-Zellen	TIL/NK-Zellen	T-Zellen	Hersteller
X-Vivo15	-	-	-	93,6 %	Bio Whittaker (Apen)
RPMI 1640	87,6 %	-	86,6 %	-	Invitrogen (Karlsruhe)
DMEM (high glucose)	-	74,6 – 84,6 %	-	-	Invitrogen (Karlsruhe)
Fötales Kälberserum	10 %	10 – 20%	10 %	-	Invitrogen (Karlsruhe)
Humanes Serum	-	-	-	5 %	Blutbank der Johannes Gutenberg-Universität (Mainz)
Insulin/ Transferrin/ Selenit ¹	-	1 %	1 %	-	Invitrogen (Karlsruhe)
L-Glutamin ²	1 %	1 %	1 %	-	Invitrogen (Karlsruhe)
Natriumpyruvat ³	-	1 %	-	-	Invitrogen (Karlsruhe)
Nicht-essentielle Aminosäuren ⁴	-	1 %	-	-	Invitrogen (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin ⁵	1 %	1 %	1 %	1 %	Invitrogen (Karlsruhe)
Fungizone ⁶	0,4 %	0,4 %	0,4 %	0,4 %	Invitrogen (Karlsruhe)

*Angegeben sind die prozentualen Anteile am Endvolumen.

¹Insulin/Transferrin/Selenit (100 fach konzentriert)

²L-Glutamin (200 mM)

³Natriumpyruvat (100 mM)

⁴Nicht-essentielle Aminosäuren (100 fach konzentriert)

⁵Penicillin/Streptomycin (10.000 IU/ml/10.000 µg/ml)

⁶Fungizone (250 µg/ml)

3.1.15 Bakterienkulturmedien

Den Kulturmedien wurden die Selektionsantibiotika Ampicillin und Kanamycin in Endkonzentrationen von 100 µg/ml bzw. 40 µg/ml zugesetzt.

LB-Medium, pH 7,5	10 g Bacto Trypton 5 g Hefeextract 5 g NaCl ad 1 l Millipore H ₂ O
YT⁺⁺-Medium, pH 7,5	8 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Yeast Extract 5 g NaCl ad 1 l Millipore H ₂ O, autoklavieren, 10 ml 2 M MgSO ₄ 10 ml 1 M KCl
NZY+ Broth	10 g Kaseinhydrolysat 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 l Millipore H ₂ O, autoklavieren 125 mM MgCl ₂ 125 mM MgSO ₄ 20 mM D-Glucose
Terrific Broth (TB)-Medium	TB-Lösung 1, pH 7,5 12 g Bacto-Trypton 24 g Hefeextract 4 ml Glyzerin ad 900 ml Millipore H ₂ O, autoklavieren 100 ml TB-Lösung 2 TB-Lösung 2 170 mM KH ₂ PO ₄ 720 mM K ₂ HPO ₄ , autoklavieren
Nährboden	1 l LB-Medium 15 g Agar, autoklavieren

3.1.16 Allgemeine Puffer und Lösungen

50 x Denhardt-Lösung	1 % BSA 1 % Ficoll 1 % Polyvinylpyrrolidon
10 x MOPS-Puffer, pH 7,0	200 mM 3-[N-Morpholin]-propansulfonsäure-N'- [2-ethansulfonsäure] 50 mM Natrium-Acetat 10 mM EDTA
20 x SSC, pH 7,5	3 M NaCl 0,3 M Trinatriumcitrat

50 x TAE-Puffer, pH 9,5	2 M Tris 1 M Eisessig 50 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris/HCL (pH 8,0) 1 mM Natrium-EDTA
RNase 2000	100 mg RNase A 1 x 10 ⁵ RNase T1 ad 49 ml 10 mM Tris/Cl (pH 7,5) mit 15 mM NaCl 15 min kochen

3.1.17 Lösungen für die Bakterientransformation

TFB I	30 mM Kaliumacetat 100 mM RbCl 10 mM CaCl ₂ 15 % Glyzerin
TFB II	10 mM Na-MOPS (pH 7,0) 50 mM MnCl ₂ 75 mM CaCl ₂ 100 mM RbCl 15 % Glyzerin
SOC-Medium	2 % Bacto-Trypton 0,5 % Bacto-Yeast Extract 10 mM NaCl 2,5 mM KCl, autoklavieren 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM D-Glucose

3.1.18 Puffer und Lösungen für zellbiologische Experimente

MTT-Lösungspuffer	60 ml 30 %ige SDS-Lösung 30 ml DMF [N,N-Dimethylformamid]
--------------------------	--

Den pH-Wert mit einer 2,5 %igen Essigsäure (80 % Essigsäure und 20 % 1 N HCL) auf einen Wert von pH 4,7 einstellen.

Fixierungslösung	PBS-Puffer 2 % Formaldehyd 0,2 % Glutaraldehyd
-------------------------	--

Färbelösung	PBS-Puffer 4 mM Kaliumhexacyanoferrit 4 mM Kaliumhexacyanoferrat 2 mM Magnesiumchlorid 1 % X-gal (20 mg/ml in N-N-Dimethylformamid)
--------------------	---

3.1.19 Puffer für die Plasmidaufreinigung

Puffer P1	50 mM Tris/HCl, pH 8 10 mM Na ₂ EDTA 100 µg/ml RNase A
Puffer P2	0,2 M NaOH 1 % SDS
Puffer P3	3 M Kaliumacetat, pH 5,5
Puffer QBT	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7 15 % Ethanol 0,15 % Triton X-100
Puffer QC	1 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7 15 % Ethanol
Puffer QF	1,25 M NaCl 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 15 % Ethanol

3.1.20 Lösungen und Puffer für RNS-Isolierungen

GITC-Lösung	4 M GITC 25 mM Natriumcitrat, pH 7,0 115 mM β-Mercaptoethanol
Cäsiumchlorid-Lösung	5,7 M Cäsiumchlorid 25 mM Natriumacetat, pH 5,0
Hochsalzpuffer	TE-Puffer, pH 7,4 0,5 M NaCl
Niedrigsalzpuffer	TE-Puffer, pH 7,4 0,1 M NaCl

3.1.21 Puffer für DNS-Anwendungen

CIP-Ergänzungspuffer	10 x CIP-Puffer 1 mM ZnCl ₂ 10 mM Spermidin
10 x Ligationspuffer	300 mM Tris/HCl, pH 7,7 100 mM MgCl ₂ 100 mM DTT 10 mM Spermidin/HCl 4 mM ATP

6 x DNS-Beladungspuffer 10 ml TAE-Puffer, pH 7,5
 80 ml Glycerin (87%)
 0,2 g Bromphenolblau
 0,2 g Xylen Cyanol

3.1.22 Puffer für gelelektrophoretische Anwendungen

TAE-Puffer 40 mM Tris (pH 9,5)
 20 mM Eisessig
 1 mM Na-EDTA

PAGE-Elektrophoresepuffer 25 mM Tris/HCl (pH 8,3)
 250 mM Glycin
 0,1 % SDS

3.1.23 Puffer und Lösungen für Southern Blots

Prähybridisierungslösung 3 x SSC
 0,1 % SDS
 10 x Denhardts-Lösung
 250 µg/ml denaturierte Herings-DNS

Hybridisierungslösung Prähybridisierungslösung
 5 ng/ml biotinylierte DNS-Sonde

SB-Blockierungspuffer 0,1 M Maleinsäure, pH 7,5
 0,15 M NaCl
 1 % Blockierungsreagenz (Roche)

Detektionspuffer 10 ml Blockierungspuffer mit
 1 µl Streptavidin-AP-Konjugat

SB-Waschpuffer 0,1 M Maleinsäure, pH 7,5
 0,15 M NaCl
 0,3 % Tween 20

Reaktionspuffer 0,1 M Tris-HCl, pH 9,5
 0,1 M NaCl

3.1.24 Lösungen und Puffer für proteinchemische Verfahren

Proteasen-Inhibitor-Puffer PBS-Puffer, pH 7,5
 10 µg/ml Aprotinin
 10 µg/ml Sojabohneninhibitor
 50 µg/ml PMSF
 370 µg/ml Jodacetamid
 17 µg/ml Pepstatin
 9,5 µg/ml Leupeptin

2 x SDS-Puffer	1 g Saccharose 4 ml 25 %iges SDS 1,2 ml 1 M Tris/HCl, pH 6,8 4,8 ml Aqua bidest. 1 Krümel Pyronin G
WB-Transferpuffer	25 mM Tris/HCl, pH 8,3 192 mM Glycin 20 % Volumenanteile Ethanol abs.
Ponceau-S-Lösung	3 % Trichloressigsäure 0,2 % Ponceau-S
TBS-T	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 145 mM NaCl 0,2 % Tween 20
TBS-AP	100 mM Tris/HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 23 mM MgCl ₂
IP-Lyse-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 5 mM MgCl ₂ 2 mM PMSF 1 % TX114
„Coating-Buffer“	0,1 M Natriumcarbonat, pH 9
ELISA-Puffer 1	PBS, pH 7,0 0,05 % Tween 20
ELISA-Puffer 2	PBS, pH 7,0 10 % FKS
ELISA-Substratlösung	<u>T</u> etramethyl <u>b</u> enzidine (<u>T</u> MB) Hydrogen Peroxid
ELISA-Stopplösung	2 N H ₂ SO ₄

3.1.25 Plasmide

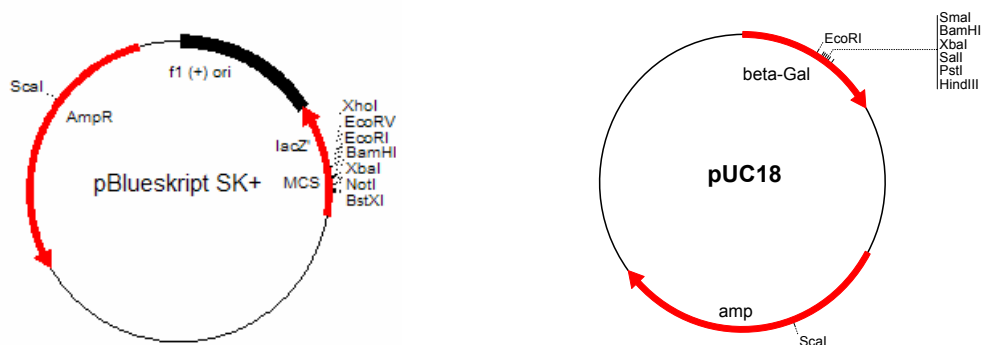


Abb 3.2: Plasmide pBlueskript und pUC18 zur Klonierung von DNS-Fragmenten in Bakterien. Die beiden prokaryotischen „high copy“ Plasmide wurden aufgrund der von ihnen kodierten lacZ'-Untereinheit der β -Galactosidase und der damit verbundenen Möglichkeit der Blau/Weiß-Selektion eingesetzt. AmpR = Ampizillin-Resistenzgen, f1(+) ori bzw. colE1 ori = Replikationsursprung, lacZ' = Leseraster der funktionellen Z-Untereinheit der β -Galactosidase, die durch α -Komplementation die Funktion der bakteriellen defizitären (lacZ Δ M15)- β -Galactosidase wieder herstellt.

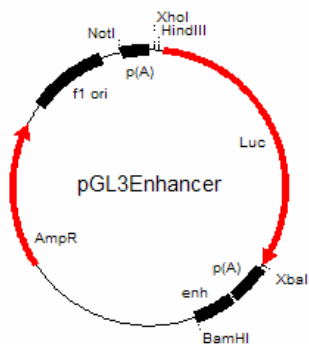


Abb. 3.3: Das Plasmid pGL3Enhancer (Promega, Heidelberg).

Es enthält das *Renilla Luciferase*-Gen (Luc), das als Reporter gen in die Plasmide p2, p81, p85 inseriert wurde. enh = enhancer

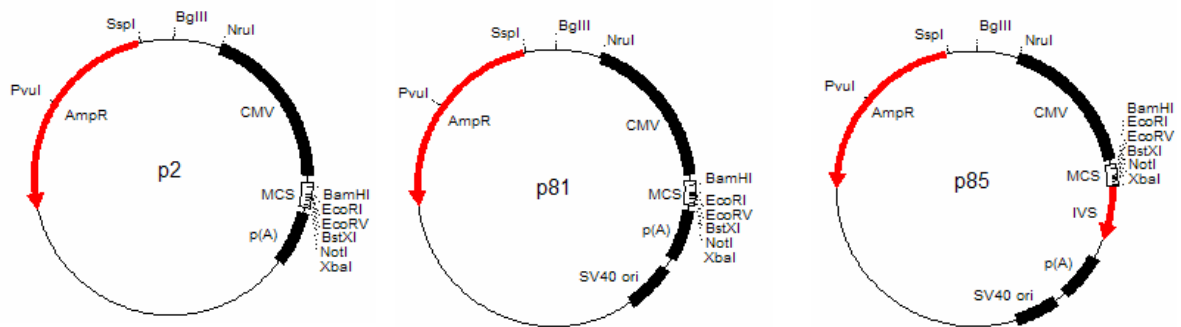


Abb 3.4: Die cDNS-Expressionsplasmide p2, p81, p85.

Die eukaryotischen cDNS-Expressionsplasmide p2, p81, p85 wurden zur Verfügung gestellt. Das parentale Plasmid p2 wurde um die Sequenzabschnitte SV40 ori (p81) und SV40 ori und einer „intervening sequence“, IVS (p85) verändert. Als IVS diente das erste Intron des HLA-A2-Gens. CMV = Promotor des Zytomegalievirus, SV40 ori = Replikationsursprung des Simian Virus (SV)40. MCS = „multiple cloning site“, p(A) = Polyadenylierungssignal.

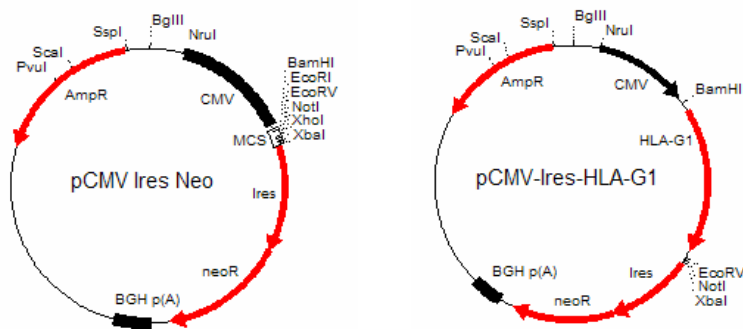


Abb 3.5: Die cDNS-Expressionsplasmide pCMV Ires Neo und pCMV-Ires-HLA-G1.

Die aus den NZK-Zellen MZ2733RC isolierte HLA-G1-cDNS wurde in das Expressionsplasmid pCMV Ires Neo inseriert. Das entstandene Plasmid pCMV-Ires-HLA-G1 kodiert für die bicistronische mRNA aus HLA-G1-Ires-neoR und wurde transient in die autologen Nierenzellen MZ2733NNSV transfiziert. Ires = „internal ribosome entry site“; BGH p(A) = Polyadenylierungssignal des bovines Wachstumshormongens, MCS = „multiple cloning site“, neoR = Neomycinresistenzgen.

3.2. Methoden

3.2.1 Kultivieren von Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien erfolgte (i) zur Herstellung kompetenter Bakterien oder (ii) zur Amplifikation rekombinanter Plasmid-DNS.

3.2.1.1 Herstellen von kompetenten Bakterien

Mit der Methode nach Hanahan (1983) wurden mit dem Bakterienstamm *E. coli* DH5 α gute Transformationsfrequenzen von 2-3 x 10⁸ cfu (engl. „colony forming units“) pro μ g Plasmid-DNS erzielt. Hierzu wurden 2 ml YT⁺⁺-Medium mit einer einzigen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht in einen Inkubator bei 37°C und unter Rotation mit 225 UpM inkubiert.

Aus dieser Bakterienkultur wurden 50 μ l entnommen, in 5 ml auf 37°C vorgewärmtes YT⁺⁺-Medium überführt und für weitere 3,5 Stunden bei 37°C mit 230 UpM inkubiert. Die logarithmisch proliferierende Bakterienkultur wurde danach in 100 ml auf 37°C vorgewärmtes YT⁺⁺-Medium resuspendiert und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,45 bis 0,55 inkubiert. Diese Kultur wurde zu zweimal 50 ml portioniert, auf Eis abgekühlt und durch Zentrifugation (8 min, 2.500 g, 4°C) sedimentiert. Die Bakterien wurden in 10 ml eiskaltem sterilen TFB I resuspendiert, für 10 min auf Eis gekühlt, erneut sedimentiert, in je 2 ml eiskaltem sterilen TFB II aufgenommen und zu 100 - 200 μ l in vorgekühlten 1,5 ml-Reaktionsgefäßen in einem Ethanol/Trockeneisbad eingefroren. Danach wurden die kompetenten Bakterien bei -80°C gelagert. Am darauffolgenden Tag wurde die Transformationsfrequenz mit 10 ng eines aufgereinigten Plasmids pUC18 ermittelt.

3.2.1.2 Transformieren von kompetenten Bakterien

Die Transformation, die Einführung von DNS in eine Bakterienzelle wurde modifiziert nach Hanahan (1983) durchgeführt. Die kompetenten Bakterien (3.2.1.1) wurden auf Eis aufgetaut. 100 μ l der kompetenten Bakterien wurden mit 5 μ l eines Ligationsansatzes fremder DNS oder mit mindestens 10 ng eines Plasmids 30 min lang auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (45 sec, 42°C) wurde der Ansatz wiederum für 2 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit 900 μ l SOC-Medium (37°C) gemischt und 45 - 60 min lang bei 37°C im Schüttelinkubator bei 230 Upm inkubiert. Danach wurden die Bakterien durch Zentrifugation (20 sec, 10.000 g) sedimentiert, in 100 μ l SOC-Medium resuspendiert, anschließend auf einem Nährboden mit dem plasmidspezifischen Resistenzantibiotikum ausgestrichen und für 12 bis 16 Stunden in einen Inkubator bei 37°C gestellt.

3.2.1.3 Selektion und Amplifikation rekombinanter Bakterien

Von den Nährböden wurden einzelne Bakterienkolonien in Vorkulturen mit 3 bis 5 ml LB-Medium und dem spezifischen Resistenzantibiotikum (3.1.13) überimpft und 12 bis 16 Stunden bei 37°C im Schüttelinkubator mit 225 UpM kultiviert. Anschließend wurde eine Plasmidisolierung (3.2.1.4) und eine anschließende Restriktionsfragmentanalyse (3.2.5.5.1) durchgeführt. Aus Bakterienkulturen, die das gewünschte rekombinante Plasmid produzierten, wurden 50 µl entnommen und zur Herstellung größerer Plasmidmengen in 50 ml-LB- oder 50 ml-TB-Medium überimpft und für weitere 12 bis 16 Stunden im Schüttelinkubator kultiviert.

3.2.1.4 Mini-Plasmid-DNS-Isolation „Schnelle Lyse“

Aus 1,5 ml einer Bakterienkultur wurden die Plasmide durch alkalische Lyse nach Seed und Koautoren (1983) isoliert. Durch Zentrifugation (20 sec, 10.000 g) wurden die Bakterien sedimentiert und in 200 µl Lösung I resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zugabe von 400 µl Lösung II und sofortiges Invertieren lysiert. Nach Zugabe von 300 µl Lösung III wurde der pH-Wert des Ansatzes neutralisiert. Durch eine Zentrifugation (5 min, 15.000 g) wurden bakterielle genomische DNS und Proteine als unlösliches weißes Präzipitat sedimentiert. Die im Überstand (900 µl) gelöste Plasmid-DNS wurde abgenommen und durch Zugabe von 600 µl Isopropanol p. A. und eine nachfolgende Zentrifugation (5 min, 15.000 g) bei Raumtemperatur gefällt und sedimentiert. Die DNS wurde mit 500 µl 70 %igem Ethanol (-20°C) gewaschen, bei 65°C getrocknet, in 100 µl TE-Puffer (pH 8,0) unter stetigem Schütteln (2 min, 65°C) gelöst und danach auf Eis gekühlt und sofort für eine Restriktionsfragmentanalyse (3.2.5.5.1) verwendet oder bei -20°C verwahrt.

Lösung 1 (10 mM EDTA, pH 8)

Lösung 2 (0,2 M NaOH 1% SDS)

Lösung 3 (2,5 M Kaliumacetat, 2,5 M Essigsäure, pH 4,7)

3.2.1.5 Präparative Isolierung von Plasmid-DNS

Präparative Plasmidisolierungen mit einem höheren Reinheitsgrad wurden aus 50 ml-Bakterienkulturen mittels Midi Plasmid-DNA Isolation Kit (Qiagen, Hilden) gemäß Protokoll des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden die Bakterien durch die sukzessive Zugabe von 5 ml Puffer P1 und 10 ml P2 mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen. Der pH-Wert des Puffergemisches wurde durch Zugabe von 10 ml Puffer P3 neutralisiert. Während einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurde die bakterielle RNS durch die in P1 enthaltene RNaseA degradiert. Durch einen Zentrifugationsschritt (15 min, 15.000 g, 4°C) wurde die im Überstand gelöste Plasmid-DNS von bakteriellen Proteinen und genomischer DNS abgetrennt. Die Plasmid-DNS wurde über eine mit 10 ml QBT-äquilibrierte Anionenaustauschersäule aufgereinigt. Dabei band die Plasmid-

DNS unter niedrigen Salzkonzentrationen an die Säule. Nach Waschen mit 30 ml Puffer QC wurde die DNS unter hohen Salzkonzentrationen mit 5 ml Puffer QF von der Säule eluiert. Aus dem Eluat wurde die DNS durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol p. A. gefällt und in einer anschließenden Zentrifugation (20 min, 15.000 g, 4°C) sedimentiert, bevor sie mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 µl TE-Puffer pH 8,0 bei 37°C gelöst wurde.

3.2.1.6 Lagerung von Bakterien

Zur Langzeitverwahrung von Wildtyp-Bakterien bzw. von rekombinanten Bakterien wurde eine 1 : 1-Verdünnung von Bakterienkulturen und sterilem wasserfreien Glycerin hergestellt und bei -80°C eingefroren.

3.2.2 Isolieren und Kultivieren von epithelialen Zellen

3.2.2.1 Isolieren und Kultivieren von Lymphozyten

3.2.2.1.1 Kultivieren von TIL

Kleine Biopsien eines Tumors oder die zuvor ficollierte, enzymatisch aufgeschlossene Zellsuspension einer Biopsie wurden in X-Vivo 15 in 24-Loch-Platten ausgesät. Nach drei Tagen wurde zu den TIL ein Interleukin-„Cocktail“ bestehend aus IL-7 (10 ng/ml) und IL-2 (100 IU/ml) zur Wachstumsstimulation zugegeben (Sica et al., 1993). Proliferierende Lymphozytenkulturen wurden alle drei Tage 1 : 3 auf neue Kulturgefäße aufgeteilt. Nach etwa 21 Tagen wurden expandierte Lymphozytenkulturen in der Durchflusszytometrie (3.2.4.4) auf Oberflächenantigene untersucht, in Zytotoxizitätsversuchen (3.2.4.1) verwendet oder für spätere Anwendung kryopräserviert (3.2.2.6).

3.2.2.1.2 Isolieren von PBL

Peripheres Blut von Spendern oder von Tumorpatienten wurde aus Blutkonserven oder 10 ml-Heparin-Monovetten aufgearbeitet. Aus dem Blut wurden PBL über einen Ficollgradienten mittels Zentrifugation (25 min, 400 g) von Granulozyten und Erythrozyten abgetrennt. Die in der Interphase angereicherten Lymphozyten wurden geerntet, mehrmals mit PBS/EDTA-Puffer gewaschen, gezählt und sofort verwendet oder zu Portionen von 1-3 x 10⁷ Zellen kryopräserviert (3.2.2.6).

3.2.2.1.3 *In Vitro* Sensibilisieren von PBL

Frisch ficollierte oder kryopräservierte und aufgetaute PBL wurden in T-Zellmedium gewaschen und zur *in vitro* Sensibilisierung verwendet (modifiziert nach Hérin et al., 1987). Hierzu wurden autologe Tumorzellen (5 x 10⁴ bis 1 x 10⁵ Zellen/ml), die zuvor 48 Stunden lang mit IFN-γ (300 IU/ml) behandelt und mit 100 Grey bestrahlt worden waren, in T-Zellmedium aufgenommen und zu einem Milliliter je Loch einer 24-Loch-

Platte verteilt. Danach wurde jede Kultur durch Zugabe von 1×10^6 bis $1,5 \times 10^6$ PBL/ml komplettiert und für 72 Stunden in den CO₂-Inkubator eingestellt. Alle Kulturen wurden mit IL-2 (50-500 IU/ml) stimuliert und für vier weitere Tage inkubiert. Dieses wöchentliche Stimulationsverfahren wurde zweimal wiederholt. Danach wurden aus proliferierenden „Responder“-Kulturen durch ein Klonierungsverfahren (engl. „limiting dilution assay“, LDA) T-Zellen isoliert.

3.2.2.1.4 Klonieren von T-Zellen

Die T-Zellen aus „Responder“-Kulturen wurden in Verdünnungen von 0,3-; 1-; 3- und 10- Zellen je Loch in 96-Loch-Rundboden-Mikrotiterplatten in T-Zellmedium zusammen mit 50-500 IU/ml IL-2, 5×10^3 bestrahlten (100 Gy) IFN- γ behandelten Tumorzellen und 1×10^5 bestrahlten (100 Gy) allogenen EBV immortalisierten lymphoblastoiden B-Zellen oder 1×10^5 bestrahlten (40 Gy) allogenen PBL von fünf verschiedenen gesunden Spendern inkubiert (Hérin et al., 1987; van Elsas et al., 1995). Nach dreimaliger wöchentlicher Stimulation wurden die proliferierenden Kulturen in Löcher von 24-Loch-Schalen transferiert und durch wöchentliche Restimulation mit 5×10^4 bestrahlten (100 Gy) IFN- γ behandelten Tumorzellen, 6×10^5 bestrahlten (100 Gy) EBV immortalisierten lymphoblastoiden B-Zellen oder 2×10^6 bestrahlten (40 Gy) allogenen PBL in Gegenwart von 250 - 500 IU/ml IL-2 expandiert.

3.2.2.2 Entnehmen von Biopsien aus nephrektomierten Nieren

Von den nephrektomierten Nieren wurde die Bindegewebshaut entfernt. Mit einem Skalpell wurde ein dorsoventraler Schnitt durch Niere und Tumor geführt und die beiden Nierenhälften aufgeklappt. Mit einem Skalpell wurden aus der Tumorfrente und aus dem entfernt dazu gelegenen Nierengewebe einige Kubikzentimeter große Gewebestücke herauspräpariert. Die Gewebestücke wurden für spätere Anwendungen sofort in Zellkulturmedium oder in flüssigem auf -80°C vorgekühlten Isopenten überführt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.2.2.3 Etablieren von primären und permanenten *in vitro* Zellkulturen

Nach Entnahme wurden die Nierengewebestücke sowie die Tumormasse mit einem Skalpell in etwa 1 mm^3 große Stücke zerkleinert und in serumfreiem Zellkulturmedium (RPMI 1640), das mit einem Enzymmix bestehend aus Collagenase Typ IV (50 U/ml) und DNase I (5 $\mu\text{g/ml}$) komplettiert war, aufgenommen und für 12 bis 16 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Hämroller inkubiert. Nach dem Auswaschen der Enzyme wurden durch ein Nylonsieb mit 100 μm Porenweite Zellklumpen von der Zellsuspension abgetrennt. Aus der Zellsuspension wurden lebende Zellen über einen Ficollgradienten durch Zentrifugation (25 min bei 800 g) als Interphase abgetrennt, in kompletten Zellkulturmedium (3.1.12) resuspendiert und wahlweise in 3 cm-Schalen oder

T75-Zellkulturflaschen ausgesät. Nach drei Tagen erfolgte mittels Durchlichtmikroskopie eine erste Kontrolle auf Adhäsion der isolierten Zellen und ein erster Mediumwechsel. Primärkulturen von Nierenepithelzellen wurden nach Bildung konfluenter Zellmonolayer kryopräserviert (3.2.2.6). Die Primärkulturen von Nierentumoren wurden für mehr als 20 Passagen *in vitro* kultiviert, bevor sie als permanente NZK-Zelllinien bezeichnet wurden.

3.2.2.4 Passagieren von Zelllinien

Die Kultivierung von adhärent wachsenden Zelllinien, wie z. B. die NZK-Zelllinien, und von Suspensionszelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen oder -schalen mit verschiedenen großen Bodenflächen (25 cm², 75 cm² und 175 cm²) in begasteten Inkubatoren mit 5% CO₂ gesättigter Atmosphäre bei 37°C. Bildeten die adhärent wachsenden Zelllinien einen nahezu konfluenten Zellmonolayer bzw. erreichten die Suspensionszelllinien eine Zelldichte von $\geq 1 \times 10^6$ Zellen/ml, wurden sie passagiert. Hierzu wurden die adhären Tumorzelllinien mit 10 ml PBS gespült und durch eine Inkubation mit 2 ml - 4 ml Trypsin/EDTA-Lösung von den Flaschenböden gelöst, in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und abzentrifugiert (5 min, 400 g). Die sedimentierten Zellen wurden in frischem Zellkulturmedium aufgenommen und auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Bei Suspensionszellkulturen entfiel sowohl der Waschschrift als auch die Trypsin/EDTA-Inkubation. Die Zelllinien wurden je nach Wachstumsgeschwindigkeit passagiert, wobei von einzelnen Zelllinien unterschiedlich hohe Verdünnungen von 1×10^5 bzw. 2×10^5 Zellen/ml der Parentalkulturen ausgesät wurden.

3.2.2.5 Klonieren von Zellen

Etablierte Zelllinien wurden zunächst als „Batchkulturen“ gezogen. Durch die Verwendung von „Klonierungsringen“ (Sigma, Deisenhofen) wurden zunächst Sublinien und durch Einzelzellklonierungsansätze (3.2.2.1.4) wurden Zellklone erhalten. Genetisch modifizierte Zellen wurden in einem Selektionsmedium zu Zellklonen expandiert.

3.2.2.6 Kryopräservieren von Zellen

Zur Langzeitlagerung wurden Zellen in Einfriermedium, bestehend aus 90 % FKS und 10 % DMSO resuspendiert, in 1 ml-Ampullen abgefüllt, mit einer Kühlgeschwindigkeit von -1°C pro Minute auf -80°C in mit Isopropanol gefüllten, speziellen Kryogefäßen eingefroren und am darauffolgenden Tag zur Langzeitverwahrung in die Gasphase eines Stickstofftanks überführt (modifiziert, nach Hérin et al., 1987). Aufzutauende, kryokonservierte Zellen wurden dem Stickstofftank entnommen, in einem Wasserbad bei 37°C erwärmt und dreimal in 10 ml Zellkulturmedium gewaschen, bevor sie in verschiedenen großen Kulturgefäßen und in notwendiger Zelldichte ausgesät wurden.

Als Faustformel galt, dass ca. 2×10^5 Suspensionszellen bzw. 1×10^5 adhärenente Zellen je Milliliter Zellkulturmedium in neue Zellkulturgefäße überführt wurden.

3.2.2.7 Zählen von Zellen

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen. Davon wurden 100 μ l Volumen mit dem gleichen Volumen 0,4 %iger Trypanblau-Lösung verdünnt. In einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen innerhalb der Fläche von vier Eckquadraten, einem Äquivalentvolumen von je 1 mm³, ausgezählt und ihr Mittelwert \bar{n} bestimmt. Daraus berechnet sich die Zellzahl je Milliliter einer Zellsuspension wie folgt: Zellzahl/ml = $\bar{n} \times 10.000 \times \text{Verdünnungsfaktor}$.

3.2.2.8 IFN- γ -Behandlung kultivierter Zellen

In Vitro Zellkulturen wurden für 24 bis 48 Stunden mit 300 IU/ml rekombinantem humanen IFN- γ inkubiert, bevor sie experimentellen Versuchsansätzen zugeführt wurden.

3.2.2.9 Separieren vitaler Zellen

Tote Zellen wurden aus Zellkulturen mittels eines Ficollgradienten abgetrennt. Die in der Interphase angereicherten vitalen Zellen wurden isoliert, zweimal in Kulturmedium gewaschen und danach in neue Kulturgefäße ausgesät.

3.2.2.10 Bestrahlen von Zellen

Neben Tumorzellen, die als stimulierende APZ zu *in vitro* Sensibilisierungen von auto-logen oder allogenen PBL bzw. aufgereinigten CD8⁺ T-Lymphozyten dienten, wurden auch „Feeder“-Zellen, EBV-LCL lymphoblastoide Zellen und PBL gesunder Spender, die bei der Klonierung von T-Zelllinien eingesetzt wurden, den γ -Strahlen einer Cäsium-Strahlenquelle ausgesetzt. Durch eine Strahlendosis von 100 Grey wurde die Proliferation von Tumorzellen und EBV-LCL lymphoblastoiden Zellen und durch 40 Gy wurde die der allogenen PBL inhibiert.

3.2.3 Heterologer Gentransfer in eukaryotische Zellen

3.2.3.1 Transfektion

In sog. „Shuttle-Plasmide“ integrierte cDNS von eukaryotischen Genen wurde in Säugetierzellen transferiert. Hierzu wurden unterschiedliche Transfektionsmethoden eingesetzt, um eine transiente oder eine stabile transkriptionelle Aktivität des eingeführten Gens zu erreichen. Das Transgen wurde über das Transkript, sein Translationsprodukt oder über dessen enzymatische Aktivität nachgewiesen.

3.2.3.1.1 Lipofektion

Die Transfektion wurde mit aufgereinigter Plasmid-DNS und Lipofektamin™ nach Angaben des Herstellers in Zellkulturschalen durchgeführt.

Die Transfektionslösung wurde aus gleichen Volumina einer 3 %igen Lipofektamin™-Lösung und einer 1 %igen Plasmid-DNS-Lösung hergestellt. Beide Lösungen wurden miteinander gemischt und zur Bildung von DNS/Lipidkomplexen 30 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die zu transfizierenden Zellen mit serumfreiem Medium gespült waren, wurden sie mit der Transfektionslösung und danach mit dem dreifachen Volumen des serumfreien Mediums überschichtet und zwischen 4 und 20 Stunden bei 37°C inkubiert. In Tabelle 3.14 sind die Volumen/Mengenverhältnisse der einzelnen Komponenten von transienten Transfektionsansätzen zusammengestellt. Danach wurde die Transfektionslösung gegen serumhaltiges Medium ausgetauscht und die Zellen für weitere 24 – 48 Stunden im CO₂-Inkubator kultiviert.

Zur transienten Transfektion wurde ein cDNS rekombinantes Plasmid zusammen mit dem Reporter-Gen-Plasmid pSV-beta-Galaktosidase in einem Gewichtsverhältnis von 10 : 1 kotransfiziert. Nach einer Inkubationsdauer von 24 - 48 Stunden wurde die Transfektionseffizienz über die Enzymaktivität der β -Galaktosidase durch ein farbgebendes Substrat ermittelt. Zur Ermittlung der Transkriptionsaktivität der verschiedenen cDNS-Expressionsplasmide wurden das Reporter-Gen Luciferase verwendet.

Tabelle 3.14: Transfektionsmaßstäbe transienter Transfektionen

Multititerplatte	Zelllinie	Zellzahl/ Loch	Lipofektamin™ [μ l]	Plasmid-DNS [ng]
96-Loch	COS 7, HEK 293	10.000	1 – 1,5	150 ng – 200 ng
24-Loch	COS 7, HEK 293	20.000	1 – 2	200 ng – 500 ng
6-Loch	COS 7, HEK 293	100.000	2 – 3	500 ng – 2 μ g

Die Zelllinien COS 7, HEK 293 und MZ2733NNSV wurden zur transienten Transfektion in 96-, 24- und 6-Loch-Multititerschalen ausgesät und mit Lipofektamin/Plasmid-DNS-Gemischen inkubiert.

Die stabile Transfektion von Plasmid-DNS wurde mittels Lipofektion oder Elektroporation (3.2.3.1.2) durchgeführt. Hierfür wurden linearisierte, rekombinante „Shuttle“-IRES-Plasmide, sog. „bicistronische“ Expressionsplasmide auf Basis des Plasmids pCMV Ires Neo (3.1.14.8) verwendet, die die Expression der gewünschten cDNS an die Expression eines Selektionsmarkers in Form einer bicistronischen mRNA koppeln. Die Transkription der mRNA wurde von einem CMV-Promotor kontrolliert, der in den transfizierten Zellen eine konstitutive Expression induzierte. 24 bzw. 48 Stunden nach der Transfektion wurde die Selektion mit dem Antibiotikum begonnen, dessen Resis-

tenzgen vom Expressionsplasmid codiert wurde. Um den Selektionsdruck aufrechtzuerhalten wurde das Selektionsmedium alle 3 bis 4 Tage erneuert. Innerhalb von 10 bis 14 Tagen wurden nicht transfizierte Zellen durch die Wirkung des Selektionsantibiotikums abgetötet. Gleichzeitig bildeten die stabil transfizierten Zellen konfluente Zellmonolayer, die auf die genomische Integration und Proteinexpression des Zielgens analysiert wurden. Aus den genetisch modifizierten Zellen wurden permanent wachsende Zelllinien etabliert.

In Abhängigkeit von der jeweiligen Zelllinie wurden zur Selektion von transfizierten Zellen die folgenden Antibiotika in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt: Hygromycin (0,25 mg/ml bis 0,6 mg/ml) und Neomycin (0,3 mg/ml-0,5 mg/ml).

3.2.3.1.2 Elektroporation

Die Elektroporation ist eine physikalische Methode, um Plasmid-DNS in Zellen zu transferieren. Im Gegensatz zu chemischen Methoden wie der Calcium-Phosphat-Präzipitation-, Lipofektion oder DEAE-Dextran-Transfektion, die zur Endozytose-vermittelten Aufnahme der DNS führen, werden in der Zellmembran durch ein kurzzeitig angelegtes elektrisches Feld Poren geschaffen, durch die die DNS infolge des elektrischen Feldes gerichtet in die Zelle gelangt (Shigekawa et al., 1988). Alle Elektroporationen von eukaryotischen Zellen wurden mit einem Rechteckpuls (Dr. Fischer, Heidelberg) durchgeführt. Hierzu wurden 2×10^6 Zellen in 0,5 ml PBS aufgenommen und in eine Elektroporationsküvette (0,4 cm Elektrodenabstand) überführt. Nach Zugabe von 10 µg des linearisierten Plasmids erfolgte der 2 msec dauernde elektrische Spannungspuls mit 450 V bei 1200 µF. Der elektrische Spannungspuls wurde so gewählt, dass 30 bis 50 % der Zellen irreversibel geschädigt wurden. Dabei galt als Faustregel, dass sich mit der prozentualen Zunahme der geschädigten Zellen auch der prozentuale Anteil an transfizierten, lebensfähigen Zellen erhöht. Danach wurden die Zellen in Zellkulturmedium aufgenommen und auf 9 cm-Kulturschalen verteilt.

3.2.3.2 Transduktion von eukaryotischen Zellen

3.2.3.2.1 Infektion mit einem modifizierten Vaccinia Virus Ankara

Zur Überprüfung des funktionellen HLA Klasse I Antigen-Prozessierungs-/Präsentationsweges wurden Zelllinien mit dem ZTL-definierten Tyrosinase-Antigen, das als Surrogatmarker für die T-Zell-vermittelte Immunreaktion verwendet wurde, infiziert (Drexler et al., 1999). Die cDNS der humanen Tyrosinase wurde per Infektion mit einem rekombinanten modifizierten Vaccinia Virus Ankara (rMVA) in die Zielzellen eingeschleust. Hierzu wurden 1×10^6 Zellen mit 10 U/Zelle MVA tyr infiziert. Drei Stunden nach Infektion wurden die Zellen für eine Stunde radioaktiv mit $100 \mu\text{C } ^{51}\text{Di-Natrium-Chromat}$ markiert und zunächst *in vitro* kultiviert, bis sie 10 Stunden nach

Infektionsbeginn mit HLA-A2-restringierten tyrosinasespezifischen ZTL in einem Zytotoxizitätsversuch (3.2.4.1) kokultiviert wurden.

3.2.3.2.2 Infektion von B-Zellen mit dem Epstein Barr Virus

Hierzu wurden PBL von gesunden Spendern oder von Tumorpatienten aufgereinigt und mit dem Zellkulturüberstand der Marmoset-Zelllinie B95-8 inkubiert (modifiziert, nach Neitzel, 1986). Dieser Zellkulturüberstand enthält virulentes EBV-Virus, das gezielt B-Zellen infiziert. Infolge der Infektion kommt es zur extrachromosomalen Persistenz des EBV-Genoms in den B-Zellen. Die vom EBV-Genom translatierten Gene produkte immortalisieren die infizierten B-Zellen. Für jede Immortalisierung wurden 1×10^7 PBL in 2 ml virushaltigen Zellkulturüberstand resuspendiert und in Gegenwart von 2,5 µg/ml Cyclosporin A für 24 Stunden in einen Inkubator mit 5 % CO₂ gesättigter Atmosphäre und 37°C eingestellt. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 400 g) sedimentiert und in 10 ml kompletten RPMI1640/20 % FKS resuspendiert, auf 5 Löcher einer 24-Loch-Platte verteilt und unter Zellkulturbedingungen gezogen, bis sich kleine Zellaggregate formiert hatten. Diese wurden miteinander vereinigt und in einer „Batch“-Kultur fortgeführt, die je nach Bedarf expandiert wurde. Die EBV B-LCL Zellen wurden als „Feeder“-Zellen in der T-Zellkultur eingesetzt. Gut proliferierende EBV B-LCL lymphoblastoide Zelllinie wurden als „Feeder“-Zelllinien T-Zellklonierungen verwendet.

3.2.4 Zelluläre Nachweismethoden

3.2.4.1 Zytotoxizitätsversuche

Auf Effektorzell spezifische Erkennung zu untersuchende Zielzellen wurden mit 100 µCi radioaktivem ⁵¹Di-Natrium-Chromat für 60 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (Brouwenstijn et al., 1998). Nicht aufgenommene Radioaktivität wurde mit Zellkulturmedium durch dreimaliges Waschen mit serumfreiem Zellkulturmedium entfernt. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von 1×10^4 Zellen/ml in T-Zellmedium verdünnt und davon wurden 100 µl auf 96-Loch Rundboden-Mikrotiterplatten verteilt. Anschließend wurden die T-Zellen in Verhältnissen von 30 : 1, 10 : 1, 3 : 1 und 1 : 1 zu den Zielzellen in 100 µl Volumen pipettiert. Jede Messung wurde als Zweifachansatz durchgeführt. Nach einer 4- bis 6-stündigen Inkubation unter Zellkulturbedingungen wurde die freigesetzte Radioaktivität in 50 µl Volumen des zellfreien Überstandes auf die Festphasen-Szintillationsplatten Lumaplate™ transferiert, getrocknet und in einem Zählgerät („β-Counter“) gemessen. Die Werte für die maximale Lyse wurden durch eine Behandlung mit einer 2 %igen Triton-X-100-Lösung erzielt. Die spezifische Lyse der verwendeten Effektoren wurde aus den Mittelwerten ihrer spezifisch freigesetzten

Aktivität „X“, der spontan freigesetzten Aktivität „S“ und der maximal freigesetzten Aktivität „M“ berechnet und die prozentuale Freisetzung wie folgt kalkuliert:

$$[(X-S) / (M-S)] \times 100 = \text{Prozent spezifische Lyse}$$

3.2.4.2 Blockierungsversuche

Die Blockierungsversuche sind eine Variante der Zytotoxizitätsversuche, jedoch wurden T-Zell- und NK-Zell-vermittelte Effektorleistungen durch die Verwendung von HLA Klasse I spezifischen mAk blockiert. Hierzu wurden 1×10^5 radioaktiv markierte Zielzellen mit 2 µg/ml bis 5 µg/ml mAk markiert (30 min, 4°C), bevor sie mit den Effektoren inkubiert wurden.

3.2.4.3 TNF-Bioassay und MTT-Zytotoxizitätsversuch

Zur Quantifizierung von TNF-α, und TNF-β wurde die zytotoxische Wirkung dieser Zytokine auf die TNF-sensitiven, permanent wachsenden murinen Fibrosarkom-Zellen WEHI-164 (Espevik und Nissen-Meyer, 1986) mit dem Tetrazoliumsalz MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid untersucht (Mosman, 1983). Das Verfahren basiert auf der Reduktion des löslichen, gelben Tetrazoliumsalzes zu einem blau-violetten unlöslichen Formazankristall vermittelt durch die Pyrimidin-nukleotid-Kofaktoren NADH und NADPH von metabolisierenden Zellen (Berridge und Tan, 1993).

WEHI-164-Zellen wurden in Kulturmedium RPMI1640/5 % FKS, 10 mM HEPES, L-Arginin (116 mg/l), L-Asparagin (36 mg/l) und L-Glutamin (216 mg/ml) gezogen. Alle Zellen wurden in 9 cm-Schalen bei 37°C in 6 % CO₂ mit einer Zelldichte bis maximal 100.000 Zellen/ml kultiviert und vor Versuchsbeginn in einem Versuchsmedium resuspendiert, das 2 µg/ml Actinomycin D und 40 mM LiCl enthielt. Zur Bestimmung des TNF-Gehalts in Kokulturen von COS 7-cDNS-Transfektanden und ZTL wurden 50 µl des zellfreien Überstands in 96-Loch-Mikrotiterschalen vorgelegt. Zu jedem Überstand wurden 30.000 WEHI-Zellen in 50 µl Versuchsmedium hinzugegeben. Danach wurde 20 bis 24 Stunden unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden 50 µl eines PBS-Puffers, der 2,5 mg/ml MTT enthält, hinzupipettiert und für weitere 2 - 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit bildeten sich blaue Formazankristalle. Die Menge des gebildeten Formazans war proportional zur Menge der vitalen Zellen und wurde durch die Zugabe von 100 µl MTT-Lösungspuffer (3.1.14.2) innerhalb von 24 Stunden bei 37°C wieder aufgelöst, um die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen einen Referenzwellenlänge von 670 nm zu bestimmen. Die halbmaximale Lethaldosis (LD 50) für TNF-sensitive WEHI-164-Zellen entsprach einer Menge von ungefähr 1 bis 5 pg TNF-β/ml.

3.2.4.4 Durchflusszytometrische Analyse zellulärer Epitope

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Analyse und Darstellung von extra- bzw. intrazellulären Epitopen mittels fluoreszenzmarkierter spezifischer Antikörper. Die Photonenemission eines Fluoreszenzfarbstoffes wird durch einen Argon-Ionen-Laser angeregt und die Streuung des Laserlichts in Strahlrichtung (engl. „forward scatter“, FSC) und quer zur Strahlrichtung (engl. „sidescatter“, SSC) gemessen. Dabei ist das Vorwärtsstreulicht ein Maß für die Größe, das Seitwärtsstreulicht für die Granulierung der Zelle. Die Fluoreszenzemission wird durch Lichtfilter und Spiegel getrennt und von verschiedenen Detektoren registriert. Die beobachtete spezifische Fluoreszenzemission ist ein Maß für die Expressionsstärke des detektierten Zielantigens. Sie wird in Relation zur unspezifischen Bindung eines Isotypantikörpers gesetzt und logarithmisch gegen die Zellzahl aufgetragen. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression von membranständigen und intrazellulären Proteinen durch direkte oder indirekte Immunfluoreszenzmarkierung nach Seliger und Koautoren (1997) dargestellt.

3.2.4.4.1 Indirekter Immunfluoreszenznachweis

Für eine durchflusszytometrische Analyse wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in 1 ml Zytometriepuffer (PBS-Puffer/10 % FKS) aufgenommen und zentrifugiert (5 min, 400 g, 4°C). Der Überstand wurde dekantiert, und in den Rücklauf wurden, je nach zu untersuchender Determinante, zwischen 5 µl und 150 µl der unkonjugierten Primärantikörperlösung bzw. 5 µl einer unkonjugierten isotypspezifischen Kontrollantikörperlösung hinzugegeben und zur Epitopdetektion für 30 min auf Eis inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden mit 1 ml Zytometriepuffer ausgewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 3 µl des fluoreszenzmarkierten FITC-konjugierten spezifischen Zweitantikörpers für 30 min bei 2°C bis 8°C im Dunkeln inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden mit 1 ml Zytometriepuffer ausgewaschen, die Zellen wurden in 750 µl Zytometriepuffer aufgenommen und in der Durchflusszytometrie analysiert.

3.2.4.4.2 Direkter Immunfluoreszenznachweis

Für eine Vielzahl von antigenen Determinanten existieren qualitativ hochwertige mAk, die bereits mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sind. Hierbei werden mAk, die mit unterschiedlichen Fluorochromen konjugiert sind, in sog. Mehrfach-Farbmessungen eingesetzt. Somit entfällt der Einsatz eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers.

3.2.4.5 *In Situ* Nachweis von β -Galactosidase

Die β -Galaktosidasefärbung wurde nach Angaben des Herstellers 48 Stunden nach der Transfektion von Zellen mit dem Reporterplasmid pSV- β -Galaktosidase durchgeführt. Das Zellkulturmedium wurde abgenommen, und die Zellen wurden mit PBS ge-

spült. Danach wurden die Zellen mit Fixierungslösung überschichtet und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die fixierten Zellen mit der Färbelösung überschichtet. Nach 20-stündigen Inkubation unter Zellkulturbedingungen wurden blau gefärbte Zellen im Durchlichtmikroskop beobachtet, siehe Abbildung 3.1. Die Transfektionseffizienz wurde in 5 - 10 Gesichtsfeldern wie folgt ermittelt:

(Anzahl der gefärbten Zellen : Anzahl aller Zellen) x 100 = % Transfektionseffizienz.

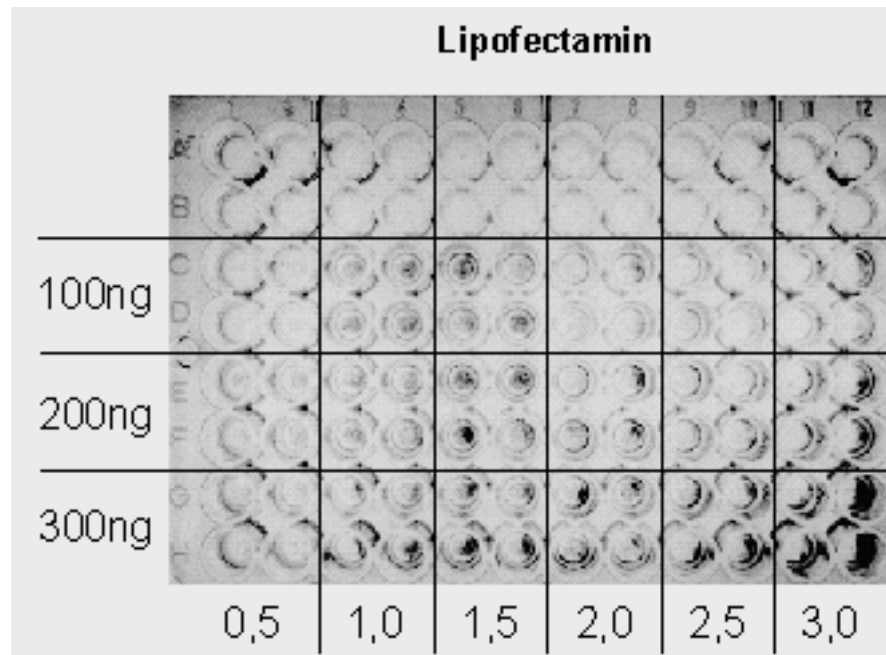


Abbildung 3.6: Repräsentativer β -Galactosidase-Nachweis in transient transformierten Zellen. 1×10^4 COS 7-Zellen wurden in jedes Loch der 96-Loch-Multitierplatte ausgesät, mit unterschiedlichen Mengen des Reporterplasmids pSV- β -Galactosidase (100 ng bis 300 ng) und mit Lipofektamin (0,5 μ l bis 3,0 μ l) für 4 Stunden transient transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurde die transiente Proteinexpression der β -Galactosidase *in situ* mit dem Farbstoff X-Gal nachgewiesen.

3.2.5 Standardmethoden zur Nukleinsäurepräparation

3.2.5.1 Isolieren von genomischer DNS

1 x 10⁷ Zellen wurden nach Zugabe von 3 ml DNS-Lysepuffer und von 30 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit 6 ml puffergesättigtem Phenol (pH 8,0; 50°C) 15 min lang extrahiert. Die wässrige Phase wurde durch Zentrifugation (15 min, 2500 g) abgetrennt und 3 Stunden lang bei 37°C mit 30 µl RNase 2000 inkubiert. Die DNS wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 5,3) und 2 Vol. Ethanol p. A. (-20°C) präzipitiert und in 500 µl TE-Puffer (pH 8,0) über Nacht bei Raumtemperatur gelöst und bei 4°C verwahrt.

3.2.5.2 Isolieren von RNS

Die Isolierung von kleinen RNS-Mengen aus tiefgefrorenem menschlichen Gewebebiopsien erfolgte je nach Ausgangsmenge des Gewebes mit dem QIAGEN RNeasy total RNA Kit (Qiagen, Hilden) oder mit dem QIAGEN Total RNA Midi-Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

Die Isolierung von großen RNS-Mengen erfolgte über einen CsCl-Gradienten (Chirgwin et al., 1979). Adhärente Zellen aus drei Kulturflaschen mit einer Bodenfläche von 180 cm² wurden mit eiskaltem PBS gespült und nacheinander in 6 ml GITC-Lösung aufgeschlossen. Mit dieser GITC-Lösung wurden 4 ml CsCl-Lösung eines zuvor beschickten Zentrifugenröhrchens (Beckmann, 14 x 89 mm) überschichtet und in einer Ultrazentrifuge 18 h lang mit bei 32.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Während der Dichtegradientenzentrifugation wurde die RNS sedimentiert, die hochmolekulare DNS sowie die niedermolekulare RNS (5 sRNS und tRNS) verblieben in Lösung und wurden entfernt. Die sedimentierte RNS wurde getrocknet, in 200 µl Aqua bidest. gelöst und nach Zugabe von 40 µl Natrium-Acetat (pH 5,2) und 880 µl Ethanol p.A. (-20°C) 30 min lang bei -80°C gefällt und durch eine Zentrifugation (30 min, 15.000 g, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt und das Sediment mit 500 µl 80 % igen Ethanol (-20°C) gespült. Nach einer erneuten Zentrifugation (10 min, 15.000 g, 4°C) wurde der Überstand quantitativ entfernt, die RNS an der Luft getrocknet und in 100 µl Aqua bidest. auf Eis gelöst. Nach der spektrophotometrischen Konzentrationsbestimmung wurde ein Volumenäquivalent der RNS-Lösung in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (3.2.5.4), bevor es dokumentiert wurde. Die verbliebene RNS wurde bei -80°C für spätere Anwendungen verwahrt.

3.2.5.3 Gelelektrophoretisches Auftrennen von Nukleinsäuren

In Gegenwart eines Molekulargewichtsstandards wurden Nukleinsäure-Fragmente wie z. B. DNS-Restriktionsfragmente von Hydrolyseansätzen (3.2.5.5.1), Scherungsfrag-

mente hochmolekularer DNS oder RNS-Moleküle in horizontalen 0,5 % - 2 %igen Agarosegelen aufgetrennt (verändert nach Sambrook et al., 1989). Als Puffersystem wurde 1 x TAE verwendet. Zur Darstellung der Nukleinsäuren enthielten die Agarosegele Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,4 µg/ml. Die Agarosegele wurden mit einem Gemisch aus (9 - 15 µl) der Nukleinsäurelösungen und 1 - 1,5 µl eines Beladungspuffers beschickt. Durch Anlegen einer Spannung von 5 V je Zentimeter Elektrodenabstand wurden die Nukleinsäurenfragmente ihrer Ladung/Molekülgröße entsprechend aufgetrennt. Die Größenbestimmung erfolgte durch einen gleichzeitig aufgetrennten Längenstandard. Mittels UV-Illumination wurden die Ethidiumbromid-gefärbten Nukleinsäuren sichtbar gemacht und mit einer Sofortbildkamera dokumentiert.

Für die analytische Auftrennung von RNS-Molekülen wurden horizontale 1% ige GTG-Agarosegele (6,5 % Formaldehyd) mit 1 x MOPS-Puffer als Laufpuffer verwendet (modifiziert, nach Lehrach et al., 1977). Vor der Elektrophorese wurde zu der RNS 1/10 Volumen Ethidiumbromid (5 mg/ml) und das dreifache Volumen „RNS Loading-Buffer“ gegeben. RNS-Sekundärstrukturen wurden durch Erhitzen (5 min, 72°C) und sofortiges Inkubieren auf Eis aufgelöst. Der Ansatz wurde danach mit 1/10 Volumen RNS-„Bluemarker“ versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Längenstandard für die RNS wurde ein „RNS-Ladder“ (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

3.2.5.4 Enzymatische Hydrolyse und Modifikation von DNS

3.2.5.4.1 Restriktionsfragmentanalyse

Restriktionsendonukleasen wurden aus verschiedenen Bakterienstämmen isoliert. Sie erkennen und spalten spezifisch unterschiedliche, meist in sich tandemrepetitive DNS-Sequenzen. Bei diesem Hydrolysevorgang entstehen in 5'- oder 3'-Orientierung überhängende („sticky ends“) oder glatte Enden („blunt ends“).

Für Restriktionsfragmentanalysen wurden 200 - 500 ng rekombinante oder nichtrekombinante Plasmid-DNS in 10 µl Volumen eines Spaltungsansatzes mit dem Enzym spezifischen Reaktionspuffer und 1 U bis 3 U eines Enzyms für 90 min bis 150 min bei 37°C hydrolysiert. Der komplette Hydrolyseansatz wurde nach Zusatz eines von 2,5 µl eines 5fach konzentrierten DNS-Auftragspuffers in einem TAE-Ethidiumbromid-Agarosegel aufgetrennt und durch UV-Illumination die Ethidiumbromidfluoreszenz mittels Sofortbildkamera dokumentiert. Durch die Gegenwart eines parallel aufgetrennten Längenstandards wurden die Größen der erhaltenen DNS-Fragmente abgeschätzt. Für jedes untersuchte rekombinante Plasmid ergab sich ein charakteristisches Fragmentmuster, das Informationen über Schnittstellen und die Orientierung des Integrates in der Plasmidsequenz lieferte.

In „präparativen Ansätzen“ wurde 1 - 2 µg eines Plasmids oder eines DNS-Restriktionsfragments mit 3 U - 10 U einer Restriktionsendonuklease inkubiert. Nach einer 20-stündigen Hydrolyse wurden die Spaltungsprodukte gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.2.5.4), das gewünschte DNS-Fragment wurde aus dem Gel isoliert (3.2.5.6.2).

3.2.5.4.2 Modifikation von 5'- und 3'-überhängenden DNS-Enden

DNS-Fragmente wurden in Plasmide inseriert. Hierzu wurden sowohl die DNS-Fragmente als auch Plasmide mit den gleichen Restriktionsenzymen vorbehandelt. War dies nicht möglich, wurden die Enden der DNS-Fragmente und der linearisierten Plasmide durch Behandlung mit dem Klenow-Enzym geglättet.

Das Klenow-Enzym ist eine modifizierte DNS-Polymerase I aus *E. coli* und besitzt neben der 5'-3'-DNS-Polymerase- eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Mit Hilfe dieses Enzyms wurden 5'-Überhänge von DNS-Fragmenten oder Plasmiden zu glatten Enden aufgefüllt oder 3'-Überhänge entfernt, um eine Ligation von Plasmidvektor und Integrat zu ermöglichen. Die Nachbehandlung von DNS-Spaltprodukten mit dem Klenow-Enzym erfolgte direkt im Anschluss an eine Hydrolyse mit dem entsprechenden Restriktionsenzym. Für eine Auffüllreaktion wurden zu einem 10 µl-Hydrolyseansatz 0,2 µl 50 mM DTT, 0,25 µl dNTP und 0,5 U Klenow-Enzym hinzupipettiert und 15 min bei Raumtemperatur und 20 min bei 37°C inkubiert. Zur Glättung 3'-überhängender Enden wurde die Reaktion ohne dNTP durchgeführt. Durch anschließendes Erhitzen auf 70°C für 10 min in Gegenwart von 0,3 µl 0,5 M Na-EDTA (pH 8,0) wurde die Reaktion beendet und danach das Reaktionsprodukt durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion (3.2.5.5.1) aufgereinigt.

3.2.5.4.3 Dephosphorylieren von 5'-DNS-Enden

Die nur geringe Ligationseffizienz von Plasmid und Integrat insbesondere bei Ligationen mit glatten Enden oder mit komplementären Schnittstellen am 5'- und 3'-Ende lässt sich dadurch steigern, dass die reagierenden 5'-DNS-Enden des linearisierten Plasmids dephosphoryliert werden. Dadurch wird die monomolekulare, energetisch begünstigte Selbstligation des Plasmids unterdrückt, und es kommt zur bevorzugten Verknüpfung von Plasmid und Integrat. Die als Dephosphorylierung bezeichnete Reaktion wurde mittels alkalischer Phosphatase („calf intestinal alkaline phosphatase“, CIP) durchgeführt. Auch die Dephosphorylierung des Plasmids erfolgte direkt nach der DNS-Hydrolyse durch die Restriktionsenzyme. Hierzu wurden 1,3 µl CIP-Ergänzungspuffer und 1,0 µl CIP (1 U/µl) mit 10 µl eines Hydrolyseansatzes gemischt und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde erneut 1 µl CIP zugegeben und für weitere 30 min inkubiert. Nach Zugabe von 0,3 µl EDTA (0,5 M, pH 8,0) wurde die

Dephosphorylierung durch eine 10-minütige Inkubation bei 65°C beendet und das Reaktionsprodukt durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion (3.2.5.5.1) aufgereinigt.

3.2.5.4.4 Ligation von DNS-Fragmenten

Bei dem als Ligation bezeichneten Verfahren wurde linearisierte Plasmid-DNS mit einem beliebigen DNS-Fragment kovalent verknüpft. Voraussetzung dafür war, dass beide Fragmente kompatible, glatte oder kohäsive, Enden aufwiesen. Die kovalente Verknüpfung der beiden Fragmente erfolgte durch das Enzym T4-DNS-Ligase. Für die Reaktion wurde ein Überschuss an Integrat-Enden zu Plasmid-Enden im Verhältnis von etwa 3,5 : 1 für kohäsive Enden bzw. 10 : 1 für glatte Enden hergestellt. Die Konzentrationen der Ligationspartner wurden durch Auftrennen eines Aliquots im TAE-Agarosegel im Vergleich zu einem aufgereinigten 600 Bp langen doppelsträngigen DNS-Fragment (25 ng/µl) abgeschätzt. Es wurden etwa 25 ng Plasmid-DNS mit der erforderlichen Integrat-DNS-Konzentration in einem Volumen von 10 µl inkubiert. Die Ligation erfolgte durch 1 U T4-DNS-Ligase über Nacht im Kühlwasserbad bei Temperaturen von 14°C bzw. 16°C.

3.2.5.5 Aufreinigen von DNS

Nach enzymatischer Behandlung wurden die Nukleinsäuren entweder durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließende Fällungsreaktion (3.2.5.7) oder durch eine gelelektrophoretische Auftrennung (3.2.5.4) und nachfolgende Isolierung aus dem Agarosegel aufgereinigt.

3.2.5.5.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Aufgrund des unterschiedlichen Lösungsverhalten von DNS und Proteinen wurden Proteine aus wässrigen DNS-Lösungen durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion von der DNS abgetrennt (verändert nach Silhavy et al., 1984). Hierzu wurde das Reaktionsvolumen mit TE-Puffer (10 mM, pH 8,0) auf 100 µl aufgefüllt. Nach Zugabe des gleichen Volumens einer Phenol/ Chloroform-Lösung (1 : 1, pH 7,5) wurde der Ansatz 1 min lang auf einem Vortexer gemischt. Durch eine Zentrifugation (5 min, 15.000 g) wurden die wässrige und die organische Phasen voneinander getrennt. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch eine zweimalige Extraktion mit 100 µl einer Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (24 : 1) wurden Phenolreste entfernt, und danach wurde die DNS aus der wässrigen Lösung präzipitiert (3.2.5.7).

3.2.5.5.2 Isolieren von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Ein DNS-Fragment wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung in einem TAE-Agarosegel mit einem sauberen Skalpell unter UV-Licht Wellenlänge (254 nm) ausgeschnitten. Die Elution der DNS aus dem Agarosegel wurde nach Protokoll des

„QIAquick Agarose Gel Extraction-Kit“ der Firma Qiagen durchgeführt. Die Gelmatrix wurde durch eine Natriumiodat/Natriumchlorat-Lösung innerhalb von 7 - 10 min bei 50°C aufgelöst. Unter hohen Salzkonzentrationen band die DNS an die Silicamatrix vorgefertigter Zentrifugationssäulen. Nach zweimaligem Waschen mit einer alkoholischen Lösung und Entgasen des Alkohols wurde die DNS unter niedrigen Salzkonzentrationen mit Aqua bidest. oder einem Tris-Puffer (10 mM, pH 8,0) von der Silicamatrix eluiert. Ein Volumenanteil (1 µl) des Eluates wurde erneut mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, mit einem bildgebenden Verfahren dokumentiert und die Konzentration im Volumenanteil abgeschätzt.

3.2.5.6 Fällern von Nukleinsäuren

Aus einer wässrigen Phase wurde DNS nach Zugabe von LPA (20 µg/ml; Strauss und Varshavsky, 1984), 1/9 Volumenanteil 5 M NaCl-Lösung und dem zweifachen Volumen an Ethanol abs. bei -80°C für 20 min präzipitiert (Wallace et al., 1987). Durch eine nachfolgende Zentrifugation (20 min, 15.000 g, 4°C) wurde die DNS sedimentiert. Aus dem DNS-Sediment wurde durch zweimaliges Waschen mit 500 µl 70 %igem Ethanol überschüssiges Fällungssalz entfernt. Danach wurde die DNS an der Luft getrocknet und danach in Aqua bidest. oder TE-Puffer (10 mM Tris-EDTA, pH 8,0) gelöst.

Die RNS wurde aus der wässrigen Phase nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und dem zweifachen Volumen Ethanol abs. gefällt, mit 80 %igem Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und in 100 µl Aqua bidest. gelöst bzw. im gefällten Zustand bei -80°C gelagert.

3.2.5.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration verschiedener Nukleinsäurelösungen wurde durch photometrische Dichtemessung bestimmt. Hierzu wurden 4µl von RNS-Lösungen bzw. 5µl von DNS-Lösungen in 1 ml TE-Puffer verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gemessen. Aus der Absorption bei 260 nm wurde die Konzentration berechnet. Der Quotient aus A_{260}/A_{280} gibt den Reinheitsgrad der Nukleinsäuren an.

Berechnungsformel: $A_{260} \times V \times OD = \mu\text{g/ml Nukleinsäure}$

A_{260} = Absorption bei 260 nm, V = Verdünnungsfaktor, OD = optische Dichte

1 OD entspricht 20 µg/ml Oligonukleotide, 40 µg/ml einzelsträngige DNS/RNS oder 50 µg/ml doppelsträngige DNS/RNS.

3.2.6 Nachweis von spezifischen Nukleinsäuresequenzen

3.2.6.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die „polymerase chain reaction“ (PCR) ist ein Verfahren zur selektiven Amplifikation von definierten Nukleinsäuresequenzabschnitten mit einer Länge zwischen 0,1 und 40 kB aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen (Saiki et al., 1988). Das Verfahren wurde verwendet, um aus aufgereinigter DNS, genomischer DNS von Zellextrakten und aus cDNS (3.2.6.2) spezifische Sequenzabschnitte gezielt zu amplifizieren oder um die genomische Integration eines rekombinanten Plasmids in transfizierten Zellen nach heterologem Gentransfer (3.2.3) nachzuweisen. Die PCR-Reaktionen wurden in 50 µl-Ansätzen durchgeführt. Die Ansätze enthielten 100 ng DNS, 100 ng cDNS oder die genomische DNS von 2×10^4 Zellen.

Jeder Ansatz enthielt neben der DNS-Matrize 40 mM KCl, 10 mM Tris/HCl (pH 8,3), 1,5 - 2,5 mM MgCl₂, jeweils 1 µM der beiden Oligonukleotide, jeweils 250 µM der vier dNTPs und 1U Taq-DNS-Polymerase. Die Amplifikation erfolgte nach einer initialen 5-minütigen Denaturierung bei 95°C durch 20 - 35 Amplifikationszyklen bestehend aus DNS-Denaturierung (95°C, 1 min), „Primer-Annaeling“ (55°C - 65°C, 1 min) und Elongation (72°C, 1 min/kB). Nach dem zehnten Amplifikationszyklus wurde jeder Elongationsschritt um ein Inkrement von 5 sec verlängert. Durch eine finale Inkubation für 10 min bei 72°C wurde jede Amplifikation beendet. Dieses Standardprogramm wurde den jeweiligen Oligonukleotiden und DNS-Matrizen entsprechend angepasst.

Zum Nachweis der Integration eines Plasmids wurden 5×10^3 bis 2×10^4 Zellen in 20 µl Aqua bidest. verwendet. Nach dem initialen 5-minütigen DNS-Denaturierungsschritt bei 95°C wurde der Ansatz auf 55°C abgekühlt, um einen 1-stündigen Proteaseverdau durch Zugabe von 5 µl Proteinase K (0,2 mg/ml) auszuführen, der durch einen zweiten Denaturierungsschritt (10 min, 95°C) beendet wurde, bevor die Amplifikation durch Zugabe von 25 µl 2-fachkonzentriertem PCR-Mix mit Taq-DNS-Polymerase und Oligonukleotiden fortgesetzt. Alle Amplifikationsreaktionen wurden mit Paraffinöl überschichtet und in Trioblock (Biometra) ausgeführt.

3.2.6.2 Reverse Transkription und PCR

Nach der sequenzspezifischen reversen Transkription der mRNA in cDNS schließt sich unmittelbar eine PCR-Amplifikation der cDNS an. Beide Reaktionen wurden in einem Reaktionsgefäß nach den Angaben des Herstellers als „Titan™ One Tube RT-PCR-Reaktionen“ (Titan-Kit, Roche Biochemicals, Mannheim) durchgeführt. Für jede Reaktion wurden 100 ng DNS-freie Gesamt-RNS in Gegenwart von sequenzspezifischen Oligonukleotiden mittels AMV-Reverser-Transkriptase in cDNS umgeschrieben (30 min, 50°C), die anschließend mittels PCR amplifiziert wurde. Hierzu diente ein

Enzymmix aus Taq- und Pwo-DNS-Polymerase. Nach einem initialen 10-minütigen Denaturierungsschritt bei 95°C folgten 20 - 35 Amplifikationszyklen, deren Anzahl in Abhängigkeit des Vorkommens der nachzuweisenden mRNA-Transkripte bzw. ihrer cDNA-Kopien variierte. Jede Amplifikation wurde durch eine finale 10-minütige Inkubation bei 72°C beendet.

3.2.6.3 Analyse von TZR-Transkripten

Das Repertoire verschiedener TZR-Transkripte kann über den CDR3-Fragmentlängenpolymorphismus analysiert werden. Die Analysen wurden von Frau Dr. Höhn (Institut f. Medizinische Mikrobiologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) durchgeführt.

50 ng cDNA wurden in 20 µl PCR-Reaktionen mit individuellen Oligonukleotiden für die 29 verschiedenen TZR V α -Ketten und für die 24 verschiedenen TZR V β -Ketten nach Genevee und Koautoren (1992) bzw. nach Puisieux und Koautoren (1994) amplifiziert. Jeweils 2 µl einer Reaktion der nicht markierten 29 V α -Ketten- und 24 V β -Ketten-Amplikons wurden für weitere 3-6 Zyklen in einer sog. „run-off“-Reaktion mit dem fluoreszenzmarkierten TZR C α -spezifischen Oligonukleotid (5'-atacacatcagaatcc-ttactttg-3') bzw. dem fluoreszenzmarkierten TZR C β -spezifischen Oligonukleotid (5'-gt-gcacctcctcccattcacc-3') in 10 µl-Reaktionsvolumen mit 0,2 mM Desoxynukleotiden, 1,5 mM MgCl₂, und 0,5 Units Taq-Polymerase inkubiert. Fluoreszierende Amplikons wurden mittels einer DNS-Fragmentanalyse mit einem „310 ABI Sequenzer“ und der notwendigen „Genescan“ Software untersucht. Die TZR-V α / β -Ketten wurden dabei als einzelne Gipfel in Histogrammen abgebildet und repräsentieren entweder monoklonale TZR-Transkripte oder oligoklonale TZR-Transkripte mit verschiedenen Sequenzen und einer identischen TZR CDR3-Länge. Jeder Gipfel entspricht einer Gauss-Verteilung einer TZR V α / β -Familie und repräsentiert die Basenpaarfolge, der TZR-Transkripte. Die Fläche unter dem Gipfel entspricht der Frequenz mit der eine bestimmte CDR3-Länge in einer individuellen TZR-V α / β -Familie vorkommt. Oligoklonale Transkripte liegen vor, wenn mehrere Gipfel in einer CDR3-Längenanalyse auftreten. TZR werden als monoklonal bezeichnet, wenn nach der Klonierung des PCR-Produktes nur eine TZR-Sequenz isoliert wird (Höhn et al., 2002).

3.2.6.4 Sequenzierung von DNS

Die hergestellten rekombinanten Plasmide wurden nach Restriktionsfragmentanalyse zur Überprüfung der Sequenzidentität der klonierten Integrate sequenziert. Zur Sequenzierung wurde die von Lee und Koautoren (1992) modifizierte DNS-Sequenzierung des von Sanger und Koautoren (1977) beschriebenen Kettenabbruchverfahrens angewendet. Hierbei wird einzelsträngige DNS in einer PCR-Reaktion ausgehend von einem spezifischen „Primer“ durch eine Mischung von Desoxy- und unterschiedlich

fluoreszierenden Didesoxynukleotiden komplementiert. Der statistische Einbau der modifizierten Didesoxynukleotide führt zu vorzeitigen Kettenabbrüchen, die je nach dem zum Abbruch führenden Nukleotid unterschiedlich fluoreszieren. Die Sequenzierung wurde mit dem „PRISM Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit“ nach Angaben des Herstellers (Applied Biosystems, Weiterstadt) in einer linearen PCR-Reaktion mit 24 Zyklen (95°C 15 sec, 55°C 15 sec, 72°C 4 min) durchgeführt. Der Sequenzieransatz wurde danach gefällt, in geringerem Volumen gelöst und auf automatischen 373A- bzw. 377-Sequenziergeräten (Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und detektiert.

3.2.6.5 Bestimmen des HLA-Phänotyps von Zelllinien

Die Bestimmung des HLA-Phänotyps der etablierten NZK-Zelllinien wurde freundlicherweise von E. Hilmes (Johannes Gutenberg-Universität, Blutbank, Mainz) unter Verwendung des „Dyna SSP Primersystems“ (Dyna, Hamburg) durchgeführt.

3.2.6.6 Hybridisierungsverfahren

Zur Detektion eines spezifischen Sequenzabschnittes eines Nukleinsäurefragmentes werden die in einem Agarosegel größenfraktionierten Nukleinsäuren auf einer Trägermatrix (Filter) immobilisiert und mit einer markierten sequenzidentischen Sonde inkubiert.

3.2.6.6.1 Transfer von DNS aus Gelen auf Membranen

Die größenfraktionierten DNS-Moleküle wurden nach der von Southern (1975) beschriebenen jedoch modifizierten „Sandwich“ Blot Methode (Sambrook et al., 1989) auf eine Nylonmembranen transferiert. Als Transferpuffer wurde ein Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH mit 1,5 M NaCl) verwendet. Der Transfer der DNS auf die Nylonmembran erfolgte innerhalb von 12 – 16 Stunden. Die DNS-Auftragsstellen wurden markiert, die Membran wurde in 2 x SSC gewaschen, auf Whatman-Papier getrocknet und durch eine 5-minütige UV-Licht-Exposition („UV-Crosslinking“) einer Sterilbank fixiert.

3.2.6.6.2 Transfer von RNS aus Gelen auf Membranen

Gelelektrophoretisch aufgetrennte RNS-Moleküle wurden in Agarosegelen 3 x 5 min in DEPC-H₂O gewaschen, um das Formaldehyd aus dem Gel zu entfernen. Der Transfer der RNS auf Hybond-N⁺-Filter (Amersham, Braunschweig) erfolgte für 1 Stunde mit 2 x SSC als Transferpuffer unter Vakuum in einer Vacugene XL-Kammer (Pharmacia). Der erhaltene „Northern Blot“ wurde für 5 min einer UV-Lichtquelle exponiert (3.2.6.5).

3.2.6.6.3 Markieren einer sequenzspezifischen Sonde

Zur Detektion von Nukleinsäuresequenzen wurden 20 Bp lange Oligonukleotids verwendet, die durch eine rekombinante Telomerase am 3'-Ende nach Angaben des Herstellers mit 14-Biotin-dCTP in einem 20 µl-Reaktionsansatz für 15 min bei Raumtemperatur markiert wurden (verändert nach Schmitz et al., 1991). Die Markierungsreaktion wurde durch Zugabe einer Stopplösung (200 µl 0,2 M EDTA pH 8,0, 10 % Glykogen) abgebrochen. Nach Zugabe von 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl Ethanol abs. (-20°C) wurde die DNS präzipitiert (30 min, -80°C) und durch Zentrifugation (20 min, 15.000 g, 4°C) sedimentiert. Nach Waschen mit eiskaltem 70% igen Ethanol wurde die DNS durch Zentrifugation (5 min, 15.000 g, 4°C) sedimentiert, danach getrocknet und in 10 µl Aqua dest. gelöst.

SB-Markierungsreaktion:

4 µl Reaktionspuffer (5 fach konzentriert)
 4 µl 25 mM CoCl₂
 1 µl 330 ng/µl Oligonukleotid
 1 µl 1 mM 14-dCTP-Biotin
 1 µl Terminale Transferase (50 Units)
 7 µl H₂O

3.2.6.6.4 Hybridisieren von Southern Blots mit nicht-radioaktiven Sonden

Der Nylonfilter wurde nach Sambrook und Koautoren (1989) in einem größenangepassten Hybridisierungsröhrchen mit 10 ml Prähybridisierungslösung unter ständiger Rotation in einem Hybridisierungssofen (2 Stunden, 55°C) inkubiert. Dadurch wurden unspezifische Bindungsstellen auf dem Nylonfilter für die cDNS-Sonden blockiert. Danach wurde die Prähybridisierungslösung erneuert und mit 50 ng einer 14-dCTP-Biotin endmarkierten sequenzspezifischen DNS-Sonde versehen. Die Inkubation des Nylonfilters wurde über Nacht fortgesetzt. Durch mehrere Waschvorgänge, jeweils zweimal für 15 min mit 2 x SSC bei Raumtemperatur, 2 x SSC bei 55°C, 1 x SSC bei 55°C und 1 x SSC bei Raumtemperatur wurde die unspezifisch gebundene DNS-Sonde vom Nylonfilter entfernt., bevor die sequenzspezifische Detektion erfolgte.

Der Southern Blot wurde für 1 min in Waschpuffer äquilibriert, danach 30 min lang in SB-Blockierungspuffer getränkt und in 10 ml Detektionspuffer (SB-Blockierungspuffer mit einer 1 : 10.000 Verdünnung des Streptavidin-AP-Konjugats) für weitere 30 min inkubiert. Nach zweifachem Spülen in Waschpuffer wurde der Filter in Reaktionspuffer äquilibriert und mit der Substratlösung (Reaktionspuffer mit 0,25 mM CDP-Star Substrat, pH 9,5) benetzt. Nach 3-minütiger Inkubation wurde die Substratlösung entfernt, der Nylonfilter kurz angetrocknet, in einen Gefrierbeutel eingeschweißt und einem Film (X-Omat, Kodak) exponiert.

3.2.7 Herstellen von cDNS-Expressionsbibliotheken

3.2.7.1 Isolieren von poly (A)⁺-RNS durch Affinitätschromatografie

Poly (A)⁺-RNS wurde aus Gesamt-RNS von 6×10^7 NZK-Zellen über eine oligo(dT)-Zellulosechromatographie nach Angaben des Herstellers (mRNA Purification Kit, Amersham Pharmacia, Freiburg) isoliert. Hierzu wurden 1×10^7 Zellen in 0,4 ml Extraktionspuffer lysiert und mit 0,8 ml Elutionspuffer vermischt und durch eine Zentrifugation (1 min, 15.000 g) wurden Zelltrümmer sedimentiert. Danach wurde 1 ml des Überstands zur äquilibrierten Oligo(dT)-Zellulose pipettiert und 3 min lang durch Invertieren vermischt. Während dieser Inkubation band die poly (A)⁺-RNS an die Oligo(dT)-Zellulose. Durch kurzes Zentrifugieren (10 sec, 15.000 g) wurde die Oligo(dT)-Zellulose sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellulose wurde fünfmal mit 1 ml Hochsalzpuffer und zweimal mit 1 ml Niedrigsalzpuffer gewaschen, bevor sie in 0,3 ml Niedrigsalzpuffer resuspendiert und auf Mikrozentrifugations-säulchen pipettiert wurde. Durch kurzes Zentrifugieren mit (20 sec, 15.000 g) wurde der Niedrigsalzpuffer entfernt. Danach wurde die Oligo(dT)-Zellulose dreimal mit 0,5 ml Niedrigsalzpuffer gewaschen, bevor die mRNS mit 0,4 ml Elutionspuffer von der Säule gewaschen wurde. Alle mRNS-Eluate wurden miteinander vereinigt und durch Zugabe von 1/10 Volumen 2,5 M Kalium-Acetat (pH 5,0) und 1/40 Volumen Glycogen (5 - 10 mg/ml in DEPC-Wasser) sowie dem zweifachen Volumen Ethanol abs. bei -20°C über Nacht präzipitiert. Anderntags wurde die mRNS durch Zentrifugation (20 min, 15.000 g, 4°C) sedimentiert, zweimal mit 80 %igem Ethanol gewaschen und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die mRNS wurde in 17,5 μl gelöst, davon wurden 2,5 μl für eine Konzentrationsbestimmung verwendet und die restlichen 15 μl wurden für die cDNS-Synthese verwahrt.

3.2.7.2 cDNS-Synthese

Die cDNS wurde nach einer veränderten Methode von Gubler und Hofmann (1983) präpariert. 5 μg mRNS wurden in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß 5 min lang auf 72°C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Das Volumen wurde auf 67 μl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Zu dieser Lösung wurden sukzessiv 20 μl Erststrang-Synthesepuffer (0,25 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,25 M KCl, 30 mM MgCl_2), 2 μl RNase-Inhibitor (72 Units), 1 μl 1 M DTT, 1 μl Not I-Primer-Adaptor (2 μg) und 2 μl von jedem Desoxyribonukleosid-Triphosphat (25 mM) sowie 1 μl SuperscriptTM Reverse Transkriptase (200 Units/ μl) hinzu pipettiert. Nach 1-stündiger Inkubation bei 42°C wurde die Reaktion durch 10-minütiges Erhitzen auf 72°C beendet. Der Reaktionsansatz wurde auf Eis abgekühlt und um 320 μl RNase-freies Wasser ergänzt. Danach wurden 80 μl Zweitstrangpuffer (0,1 M Tris/HCl pH 7,5), 25 mM MgCl_2 , 0,5 M KCl, 0,25 mg/ml BSA, 50 mM DTT), 25 Units DNS-Polymerase I und 4 Units RNase H hinzu pipettiert, zu-

nächst für 1 Stunde bei 15°C und dann für eine weitere bei 22°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl 0.5 M EDTA (pH 8,0) abgebrochen und der Reaktionsansatz zweimal mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) sowie einmal mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert. Um die cDNS zu fällen, wurde die wässrige Phase mit 50 µl 5 M NaCl vermischt, bevor lineares Polyacrylamid in einer Endkonzentration von 20 µg/ml und das zweifache Volumen Ethanol p.A. (-20°C) hinzugegeben wurde. Anschließend wurde die cDNS 30 min lang bei -80°C inkubiert. Durch eine Zentrifugation (5 min, 15.000 g, 4°C) wurde die cDNS sedimentiert, danach zweimal mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 30 µl Tris/HCl (pH 7,5) gelöst.

3.2.7.3 Ligieren von Adaptoren

Die Ligation von 1 µg/ml Bst XI Adaptoren und 5 µg cDNS erfolgte nach Wu und Koautoren (1987) bei 15°C über Nacht in 300 µl Ligasepuffer bestehend aus 6 mM Tris/HCl (pH 7,5), 6 mM MgCl₂, 5 mM NaCl, 0,35 mg/ml BSA, 7 mM 2-Mercaptoethanol, 0,1 mM ATP, 2 mM DTT, 1 mM Spermidine durch 400 Units T4-DNS-Ligase. Danach wurde die cDNS mit 300 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) extrahiert und die wässrige Phase mit dem zweifachen Volumen Ethanol abs. gefällt, in 100 µl TE (pH 8,0) gelöst und auf 5 ml eines 5 - 20 %igen Kalium-Acetat-Gradienten mit 1 µg/ml Ethidiumbromid geschichtet.

3.2.7.4 Fraktionieren von cDNS durch Dichtegradientenzentrifugation

Der Kaliumacetatgradient wurde mittels 5 %iger und 20 %iger Kaliumacetatlösung und einem Gradientenmischer in Ultrazentrifugenröhrchen geformt (Aruffo und Seed, 1987). cDNS oder Plasmide wurden auf den Gradienten geschichtet, mittels Ultrazentrifugation (3 Stunden, 50.000 UpM, 4°C) ihrer Fragmentlänge entsprechend aufgetrennt und danach von Hand fraktioniert. Hierzu wurde eine Butterfly-Injektionsnadel kurz über dem Konus des Zentrifugenröhrchens eingeführt und das gesamte Volumen des Gradienten in Fraktionen zu etwa 300 µl portioniert. Nach Zugabe von linearem Polyacrylamid in einer Endkonzentration von 20 µg/ml und 800 µl Ethanol abs. wurde die cDNS in den einzelnen Fraktionen bei -80°C gefällt und durch Zentrifugation (30 min, 15.000 g, 4°C) sedimentiert. Die Sedimente wurden jeweils zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 15 µl TE resuspendiert. 2 µl jeder Fraktion wurde in einem 1 %igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Es wurden nur Fraktionen miteinander vereinigt, die cDNS-Moleküle größer als 800 Bp enthielten.

3.2.7.5 Aktivieren und Aufreinigen des cDNS-Expressionsplasmids

Von dem cDNS-Expressionsplasmid wurden 2 µg mit den Restriktionsendonukleasen BstXI (100 Units) und NotI (100 Units) in 100 µl Restriktionspuffer über Nacht hydroly-

siert. Der Spaltungsansatz wurde über einen 5 - 20 %igen Kalium-Acetat-Gradienten, wie für die cDNS beschrieben, fraktioniert. Die Plasmid enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt. Die Plasmid-DNS wurde wie die cDNS aufgereinigt und in TE-Puffer (pH 7.5) gelöst.

3.2.7.6 Titrieren der Ligationseffizienz

In einer Serie von Testligationen wurde das Bst XI/NotI vorbehandelte cDNS-Expressionsplasmid gegen cDNS titriert und ligiert. Dabei wurde immer die Hälfte eines Ligationsansatzes (10 µl) in chemisch kompetente *E.coli* DH5α transformiert. Tags darauf wurde die Anzahl der unabhängigen Klone jedes Ligationsansatzes bestimmt und miteinander verglichen.

3.2.7.7 Amplifizieren der cDNS-Expressionsbibliothek

Die durch die Titrationsreihen der Testligationen und anschließenden Transformationen ermittelten cDNS-Plasmid-Mengenverhältnisse wurden verwendet, um höher kompetente Bakterien des *Epicurian coli* XL2-Blue-Stammes nach Standardprotokoll für Ligationsansätze zu transformieren. Mehrere Transformationsansätze wurden miteinander vereinigt, bevor 10 µl dieser Bakteriensuspension auf vorbereiteten Selektions-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert wurden. Entsprechend die Anzahl der unabhängigen Klone der berechneten Abschätzung wurde das gesamte Transformationsvolumen so verdünnt, dass in jeder von 480 5 ml-Flüssigkulturen 250 unabhängige Klone über Nacht bei 37°C unter ständiger Rotation mit 230 rpm heranwuchsen.

3.2.7.8 Konservieren und Isolieren von Expressionsplasmiden

Am darauffolgenden Tag wurde von jeder Bakterienkultur eine Glycerinkonserve hergestellt und bei -80°C verwahrt, bevor die Plasmidpräparationen im 96er-Format nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) durchgeführt wurden. In einem mehrschrittigen Prozess wurden hierzu zunächst die Bakterien lysiert. Die dabei isolierten Nukleinsäuren banden an eine Silica-Membran. Durch die Verwendung verschiedener Puffer wurde sowohl genomische DNS als auch bakterielle RNS von der Plasmid-DNS geschieden. Die Plasmid-DNS wurde präzipitiert und in TE (pH 8,0) eluiert. Die hergestellte cDNS-Expressionsbibliothek umfasste 120.000 unabhängige Bakterienklone. Die Plasmide von jeweils 12.000 Bakterienkulturen wurden zu Parentalgruppen zusammengefasst.

3.2.8 Proteinchemische Nachweisverfahren

3.2.8.1 Herstellen von Proteinextrakten aus Zellen

Etwa $2 - 3 \times 10^6$ adhärenente Zellen wurden zur Präparation von Proteinen eingesetzt. Die adhärenenten Zellen wurden dreimal mit kaltem PBS gewaschen, danach mit 1 ml PBS-Proteasen-Inhibitormix benetzt, mit einem „Rubber-Policeman“ von der Zellkulturschale gelöst und durch Zentrifugation (2 min, 15.000 g, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment in 200 µl 1 x SDS-Puffer lysiert und denaturiert (5 min, 95°C). Anschließend wurden die Proteine bei -20°C gelagert.

3.2.8.2 Chloroform/Methanolfällung

Zur spektrophotometrischen Proteinbestimmung wurde das Licht absorbierende SDS aus den Proteinextrakten durch eine Chloroform/Methanolfällung entfernt. Hierzu wurden 5 µl der SDS-Protein-Lösung in 95 µl Aqua bidest. verdünnt. Nacheinander wurden 100 µl Chloroform, 400 µl Methanol und 300 µl Aqua bidest. addiert und gründlich gemischt. Nach Zentrifugation (5 min, 15.000 g) des Fällungsansatzes bildete sich eine zweiphasige Lösung, in dessen Interphase die Proteine präzipitierten. Die obere Phase wurde durch 300 µl Methanol ersetzt und der Extrakt wurde erneut gemischt. Nach Zentrifugation (10 min, 15.000 g) bildete sich ein Sediment, das in 10 µl NaOH (0,1 N) gelöst und zur Proteinbestimmung verwendet bzw. bei -20°C verwahrt wurde.

3.2.8.3 Bestimmen der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde nach den Angaben des Herstellers mit dem Bio-Rad-Assay nach Bradford (1976) durchgeführt. Das Bradford-Reagenz bildet mit Proteinen einen Farbkomplex, dessen Intensität der Proteinkonzentration proportional ist.

2 µl des aufgereinigten Proteins wurden in 800 µl Aqua bidest. gelöst und mit 200 µl filtriertem Bradford-Reagenz für 10 bis 30 min inkubiert. Parallel dazu wurde eine Eichkurve mit 2 µg bis 14 µg bovinem Serumalbumin (BSA) erstellt. Die Extinktion des Farbkomplexes wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen einen Leerwert aus 800 µl Aqua bidest. mit 200 µl Bradford gemessen und die Konzentration unter Berücksichtigung der Verdünnung mit Hilfe einer Eichgeraden bestimmt.

3.2.8.4 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde nach Sambrook und Koautoren (1987) durchgeführt, um amphotere Proteine ihrer Größe entsprechend aufzutrennen. Wässrige Acrylamidlösungen diskontinuierlicher pH-Werte bildeten zusammen mit dem bifunktionellen Vernetzungsreagenz Bisacrylamid, dem Katalysator TEMED und dem Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS) polymerisierte, chemisch inerte Gele für gelelektrophoretische Trennungen von Proteinen. Es wurden Gele der Größe

10 x 10 cm (Biometra, Göttingen) aus 10 %igen Trenngelen und 5 %igen Sammelgelen verwendet, siehe Tabelle (3.15).

Tabelle 3.15: Zusammensetzung der verwendeten Standardgele

10 %iges Trenngel	10%	5 %iges Sammelgel	5%
40% Acrylamid	1,5 ml	40% Acrylamid	0,25 ml
2% Bisacrylamid	0,8 ml	2% Bisacrylamid	0,13
1,88 M Tris/HCl, pH 8,8	1,2 ml	0,625 M Tris/HCl, pH 6,8	0,4 ml
0,5% SDS	1,2 ml	0,5% SDS	0,4 ml
Temed	5 µl	Temed	2 µl
10% APS	30 µl	10% APS	10 µl
Aqua bidest.	1,3 ml	Aqua bidest	0,82 ml

Das anionische Detergens SDS bindet in konstanten molaren Verhältnissen an Proteine. Die starke negative Ladung der SDS-Moleküle überdeckt die Eigenladung der Proteine, sodass deren elektrophoretische Trennung im elektrischen Feld des PAGE-Elektrophoresepuffers nur von der Molekülgröße abhängt. Jeweils 20 µg Protein eines Proteinextraktes bzw. des eingefärbten Molekulargewichtsstandards (MGS) wurden in 15 µl mit 2 x SDS-Puffer denaturiert (5 min, 95°C) und in die Auftragsstellen der Polyacrylamidgele pipettiert. Die Auftrennung erfolgte mit einer Stromstärke von 10 mA je Gel im Sammelgel und 20 mA im Trenngel. Dabei wurden die Proteine im Sammelgel in einer scharfen Proteinfront, der Kohlräuschbande, konzentriert und nach Übertritt in das Trenngel ihrer Größe entsprechend aufgetrennt.

3.2.8.5 Transfer von Proteinen auf Membranen

Der Transfer der Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran wurde modifiziert nach Burnette (1981) und über Nacht in einer vertikalen „Tank-Blot“-Kammer mittels des sog. „Nassblottingverfahrens“ mit einer Stromstärke von 100 mA bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde der hergestellte „Western Blot“ für 2 min in einer der Ponceau-S-Lösung geschwenkt, um den erfolgten Proteintransfer zu überprüfen. Der Western Blot wurde durch TBS-T wieder entfärbt, bevor er zur Immundetektion verwendet wurde.

3.2.8.6 Herstellen eines „Immuno Blots“

Der spezifische Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Proteine erfolgte nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran durch eine Immundetektion mittels epitopspezifischer Antikörper.

Zuerst wurden freie hydrophobe Bindungsstellen auf der Membran mit der Blockierungslösung (TBS-T mit 2 % Trockenmilch und 10 % hitzeinaktiviertes Pferdeserum, Sigma) innerhalb von 2 Stunden maskiert. Danach wurde der Western Blot dreimal mit TBS-T für jeweils 5 min gewaschen und mit einem epitopspezifischen Primäranti-

körper in TBS-T über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Der überschüssige Primärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte in TBS-T bei Raumtemperatur innerhalb von einer Stunde durch einen Zweitantikörper, der gegen murine IgG-Antikörper gerichtet und mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist. Der Zweitantikörper wurde 1 : 2500 in TBS-T verdünnt. Überschüssiger Zweitantikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt, bevor der spezifische Epitopnachweis durch ein fargebendes Substrat erfolgte. Hierzu wurden 200 µl NBT/BCIP-Substratlösung zu 10 ml TBS-AP-Lösung pipettiert und auf die Nitrozellulosemembran gegeben und 5 min bis 20 min unter Lichtabschluss inkubiert. Durch Spülen mit Aqua bidest. wurde die Reaktion gestoppt. Der Immuno Blot wurde zwischen zwei Whatman-Papieren getrocknet und unter Lichtabschluss aufbewahrt. Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis einer spezifischen Detektion bietet die Konjugation des Zweitantikörpers an das Enzym Meerrettich-Peroxidase. Im Anschluss an die Inkubation mit dem Zweitantikörper wurde der Immuno Blot in einer Entwicklungslösung, die ein lumineszierendes Substrat enthält, inkubiert (ECL-System, Amersham Pharmacia). Der Immuno Blot wurde anschließend einem Röntgenfilm (X-Omat, Kodak) exponiert und danach entwickelt.

3.2.8.7 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation ist ein sehr empfindliches Verfahren zur Identifikation von Proteinen. Es nutzt die hohe Affinität eines monoklonalen IgG-Antikörpers für seine spezifische Determinante. 1×10^8 immunomagnetische Partikel, die mit einem gegen murines IgG gerichteten Ziegeantikörper konjugiert sind, wurden zusammen mit 10 µg eines antigenspezifischen murinen IgG-Detektionsantikörpers über Nacht bei 4°C inkubiert. Überschüssiger Detektionsantikörper wurde durch mehrere Waschschrte mit PBS entfernt und die Partikel wurden in 1 ml PBS resuspendiert.

5×10^6 Zellen von humanen Zelllinien wurden in 1 ml Lyse-Puffer 30 min lang bei 4°C aufgeschlossen. Die Zellfragmente wurden durch Zentrifugation (10 min, 10.000 g, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die im Überstand solubilisierten Bestandteile wurden 5 min lang bei 37°C inkubiert. Währenddessen bildeten sich Membranmizellen in der wässrigen Lösung aus, die durch eine Zentrifugation (10 min, 300 g) in zwei Phasen getrennt wurden. Die obere wässrige Phase wurde verworfen und die Detergentien-Phase, die die Zellmembranfraktion enthielt, wurde mit PBS auf 1 ml Volumen aufgefüllt. Um spezifische Epitope in diesem Zelllysate oder in 6 ml des Zellkulturüberstands zu immunpräzipitieren, wurden 250 µl der antigenspezifischen Partikel zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach fünf Waschschrten in PBS mit 0,05 % Tween 20 wurden die Partikel in Gegenwart von 20 µl PBS mit 150 mM β-Mercaptoethanol und 1 % SDS 5 min lang erhitzt. Die eluierten Antigene wurden danach über eine reduzierende PAGE aufge-

trennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Auf dem Western Blot wurden die immunpräzipitierten Proteine durch einen weiteren murinen mAk detektiert, der spezifisch für ein alternatives, lineares Epitop war. Die spezifische Detektion wurde mit einem sekundären, gegen murine IgG gerichteten mAk nachgewiesen, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert war.

3.2.8.8 „enzyme-linked immunosorbent assay“, ELISA

Mittels des „enzyme-linked immunosorbent assays“ (ELISA) wurden humane Zytokine in Überständen aus Kokulturen von T-Zellen und APZ nachgewiesen. Nach Angaben des Herstellers wurde die „capture“-Antikörperlösung 1 : 250 in „Coating-Buffer“ verdünnt und 100 µl auf die Löcher einer 96-Flachboden-Mikrotiterplatte (Maxisorp, Nunc) verteilt. Die Mikrotiterplatten wurden mit Parafilm verschlossen und in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C inkubiert. Tags darauf wurden die Mikrotiterplatten in einem Waschvorgang dreimal mit ELISA-Puffer 1 gespült und Flüssigkeitsrückstände auf Filterpapier ausgeklopft. Danach wurden die Löcher mit je 300 µl ELISA-Puffer 2 für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu minimieren. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die Verdünnungsreihe des Zytokinstandards sowie die Verdünnungen der zu untersuchenden Zellkulturüberstände in Tripelansätzen zu 100 µl auf die Mikrotiterplatte pipettiert, mit Parafilm verschlossen und für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang wurden 100 µl des entsprechenden biotinylierten „Detection“-Antikörpers (1 : 250 in ELISA-Puffer 2 verdünnt) auf die Löcher der Mikrotiterplatte verteilt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden 100 µl einer 1 : 250 Verdünnung eines Avidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugats auf die Löcher der Mikrotiterplatte verteilt, das innerhalb von 30 min spezifisch an den Detektionsantikörper band. Nach einem abschließenden Waschvorgang wurden 100 µl der ELISA-Substratlösung hinzu pipettiert und die Mikrotiterplatte für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur entwickelt. Infolge der Enzymreaktion kam es zu einem Farbumschlag entsprechend der ursprünglich vorhandenen Menge des untersuchten Zytokins. Durch Zugabe von 50 µl ELISA-Stopplösung wurde die Enzymreaktion in jedem Loch beendet. Mittels eines „ELISA-Readers“ wurde die Hintergrundabsorption bei einer Wellenlänge von 570 nm von der spezifischen Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm subtrahiert. Unter Verwendung des mitgeführten Standards wurde durch die spezifische Absorption die Konzentration des untersuchten Zytokins berechnet. Die Standardreihe wurde aus einer Zytokinammlösung durch serielle Verdünnungen zu Konzentrationen von 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml und 15,6 pg/ml in T-Zellmedium hergestellt.

3.2.9 Rechnergestütztes Klonieren und Auswerten von DNS-Sequenzen

Alle verwendeten Originalsequenzen wurden von der Genbank des NCBI über das Internet heruntergeladen und auf Institutsrechnern unter Verwendung der Software der Fa „Scientific and Education“ bearbeitet. Mit dieser Software wurden Primersequenzen ermittelt und „*in silico*“-Klonierungen und Sequenzvergleiche durchgeführt. Homologievergleiche von Nukleotidsequenzen mit Datenbanken wurden mit dem Programm „BLASTN“ (Altschul et al., 1990) durchgeführt. Es ermöglichte das Vergleichen einer Nukleotidsequenz mit Nukleotidsequenzen der Datenbank „GenBank“.

4. Ergebnisse

4.1 Identifizierung von tumorassoziierten Antigenen

Eine Voraussetzung für die Entwicklung von modernen peptidbasierenden Immuntherapien ist die Identifizierung von tumorassoziierten Antigenen. Die Grundlage für die Fortschritte bei der Identifizierung von Antigenen stellen Tumorzelllinien dar, die als APZ in *in vitro* Sensibilisierungsexperimenten zur Generierung von autologen tumorreaktiven T-Zellen eingesetzt werden. Da Tumorzellen an sich nur eingeschränkt immunogen sind, werden sie mit kostimulierenden Molekülen transfiziert. Durch die Koinkubation von CD80/B7-1 modifizierten Tumorzellen mit T-Zellen (engl. „mixed lymphocyte tumor culture“, MLTC) werden *in vitro* proliferierende „Responder“-T-Zellkulturen induziert. Aus diesen werden durch aufwendige Klonierungsverfahren antigenspezifische T-Zelllinien bzw. T-Zellklone mit zytotoxischen Effektoreigenschaften generiert, die die autologen Tumorzellen in einer HLA Klasse I-restringierten, peptidspezifischen Reaktion eliminieren. Die von den ZTL erkannten Peptidantigene werden mit dem cDNS-Expressionsklonierungsverfahren charakterisiert.

4.1.1 Generierung zytotoxischer T-Zellen mittels CD80-Kostimulation

Zur Generierung von autologen tumorreaktiven T-Zellen wurde die CD80/B7-1 modifizierte NZK-Zelllinie B7-1⁺ MZ1257RC (Jung et al., 1999) verwendet. Die autologen T-Zellen wurden mit bestrahlten und mit IFN- γ vorbehandelten Tumorzellen *in vitro* sensibilisiert (3.2.2.1.3). Nach drei Stimulationszyklen wurden drei proliferierende Responderkulturen zur weiteren Charakterisierung von Effektoreigenschaften ausgewählt (Abbildung 4.1).

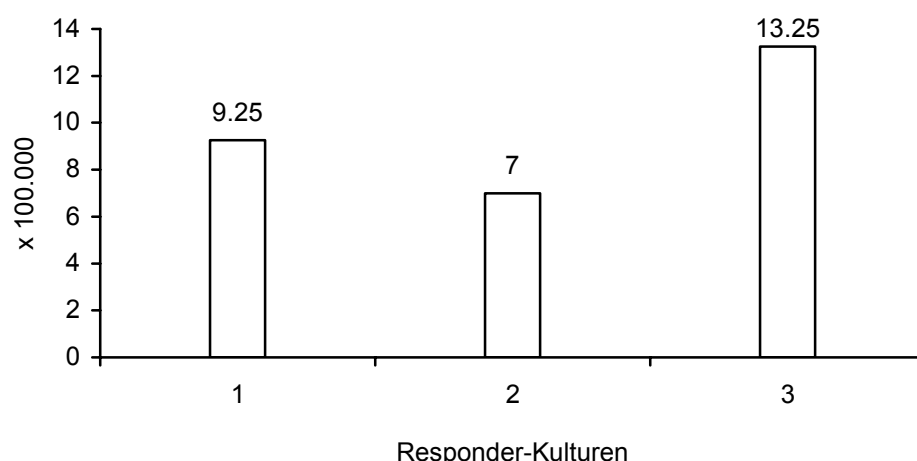


Abbildung 4.1: Proliferation *in vitro* sensibilisierter „Responder“-T-Zellen. In Gegenwart von autologen bestrahlten PBL wurden aufgereinigte 3×10^5 CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen dreimal mit den modifizierten NZK-Zellen B7-1⁺ MZ1257RC in Anwesenheit von IL-2 (250 IU/ml), wie in (3.2.2.1.3) beschrieben, stimuliert und ihre Zellzahl an Tag 21 ermittelt (3.2.2.7).

Wie in Abbildung 4.1 dargestellt, wurden nach der dritten Restimulation an Tag 21 aus drei proliferierenden „Responder“-Kulturen 1, 2 und 3 T-Zellen für einen Zytotoxizitätsversuch (3.2.4.1) entnommen. Da neben einer von T-Zellen vermittelten HLA-restringierten auch eine von NK-Zellen vermittelte unspezifische Effektoreigenschaft nach der *in vitro* Sensibilisierung in Gegenwart von IL-2 induziert wird, wurden verschiedene Zelllinien als "target" eingesetzt, um eine unspezifische von einer tumorspezifischen Reaktion zu unterscheiden. Die NK-sensitive, Erythroleukämie-Zelllinie K562 wurde als Kontrolle für die unspezifische, die modifizierten B7-1⁺ MZ1257RC-Zellen als Kontrolle für die tumorspezifische Reaktion verwendet. Es zeigte sich, dass die „Responder“-Kulturen unterschiedliche Reaktivitäten gegenüber den einzelnen Zelllinien entwickelten (Abbildung 4.2).

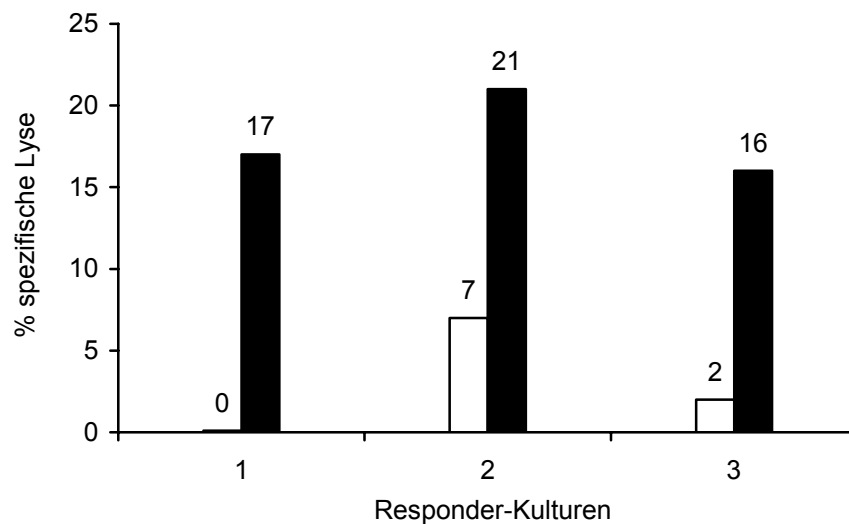


Abbildung 4.2: IVSB-Kulturen lysieren K562-Zellen und B7-1⁺ MZ1257RC-Zellen. Radioaktiv mit ⁵¹Chrom markierte Erythroleukämie-Zellen K562 (weiße Balken) und Tumorzellen B7-1⁺ MZ1257RC-Zellen (schwarze Balken) wurden, wie in (3.2.4.1) beschrieben, mit Lymphozyten der Responder-Kulturen 1, 2 und 3 in einem "Effektor" zu "Target"- (E : T)-Verhältnis von 30 : 1 für 4 Stunden koinkubiert. Danach wurde in 50 µl des zellfreien Überstandes enthaltene Radioaktivität mit einem Szintillationsmessgerät ermittelt.

Die gegenüber den B7-1⁺ MZ1257RC-Zellen ermittelten Lyseraten der drei Responderkulturen sind insgesamt höher als die gegenüber den Erythroleukämie-Zellen K562 (Abbildung 4.2). Bis auf die Responderkultur 2, hier wurde eine geringe unspezifische Reaktivität in Höhe von 7 % gegenüber K562-Zellen gemessen, vermittelten die Responderkulturen eine spezifische Lyse von B7-1⁺ MZ1257RC-Zellen in Höhe von 16 bis 21 %. Die T-Zellen der Responderkultur 2 wurden für eine T-Zellklonierungsanalyse (engl. „limiting dilution analysis“, LDA) verwendet. Zur Klonierung wurden die T-Zellen in Verdünnungen von 1, 3 und 10 Zellen in 96-Loch-Mikrotiterplatten aus-

gesät und in Gegenwart von EBV-immortalisierten lymphoblastoiden B-Zellen (EBV-B-LCL) als „Feeder-Zellen“, die von Herrn Prof. T. Wölfel (III. Medizinische Klinik) zur Verfügung gestellt wurden, inkubiert (3.2.2.1.4). In wöchentlichen Abständen wurde eine Stimulation der T-Zellen mit B7-1⁺ MZ1257RC-Zellen und 250 IU/ml IL-2 durchgeführt.

4.1.2 Charakterisierung von autologen T-Zelllinien

Nach einer 4-wöchigen Stimulationsdauer wurden 96 proliferierende T-Zelllinien aus verschiedenen Klonierungsansätzen isoliert. Davon entfielen (i) 60 auf den Ansatz mit 10-Zellen/Loch, (ii) 34 auf den Ansatz mit 3-Zellen/Loch und (iii) 12 auf den Ansatz mit 1-Zelle/Loch. Alle T-Zelllinien wurden auf zwei neue Kulturschalen aufgeteilt. Je ein „Split“ wurde zur weiteren Expansion restimuliert, der andere in einem 4-stündigen Zytotoxizitätsversuch auf die Reaktivität gegenüber autologen B7-1⁺ MZ1257RC-Zellen untersucht. In den nachfolgenden Tabellenübersichten (Tabelle 3.1 A und B) sind die prozentualen spezifischen Lyseraten der T-Zelllinien aufgeführt, die nach der Klonierung eine Lyse von größer oder gleich 40 % erreichten. Alle anderen T-Zelllinien wurden mit "X" markiert und verworfen. Da die Anzahl der eingesetzten T-Zellen aufgrund der noch zu geringen Zellzahl nicht ermittelt wurde, sind die erhaltenen Lyseraten nur ungefähre Trendwerte, die dazu dienten, T-Zelllinien mit zytotoxischen Effekteigenschaften zu selektionieren.

Tabelle 4.1: Zytotoxizität der autologen T-Zelllinien

A) 10-Zellen/Loch-Verdünnung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		91	66	62	61	54	41	49	60	X	43	
C		60	59	X	58	51	51	57	57	X	X	
D		55	58	X	50	X	40	46	X	X	X	
E		53	X	50	48	X	X	49	51	X	X	
F		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
G		X	X	X	X	X	X	X	X	41	X	
H												

B) 1- bzw. 3-Zellen/Loch-Verdünnung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		X	51	X	X	50	X	X	41	53	X	
C		53	47									
D												
E		X	44	48	40	X	X	46	X	X	X	
F		46	X	43	X	X	X	46	X	X	X	
G		44	X	X	X							
H												

Die proliferierenden T-Zellen wurden mit 1×10^3 mit $^{51}\text{Chrom}$ -markierten Tumorzellen in einem 4-stündigen Zytotoxizitätsversuch koinkubiert. Die in $50 \mu\text{l}$ des zellfreien Überstandes enthaltene Radioaktivität wurde im Szintillationsmessgerät (β -Counter) ermittelt und in Prozent spezifischer Lyse angegeben. Dargestellt ist die Lyse von B7-1^+ MZ1257RC-Zellen durch autologe T-Zelllinien der Verdünnung **(A)** 10-Zellen/Loch und **(B)** 1- und 3-Zellen/Loch. Dabei sind die Lyseraten der Verdünnungen 1-Zelle/Loch in den Reihen B und C und 3-Zellen/Loch in den Reihen E bis G angegeben. Die Namensgebung der T-Zelllinien erfolgte entsprechend ihrer Anordnung.

In den beiden Tabellen 4.1 A und B sind die Lyseraten der propagierten T-Zelllinien gegenüber B7-1^+ MZ1257RC-Zellen, die zwischen 91 % (10B2) und 40 % (10D7) variierte, zusammengestellt. Insgesamt wurden unterschiedlich viele zytotoxische T-Zelllinien in den einzelnen Verdünnungsansätzen erhalten: 21/60 im 10-Zellen/Loch-Ansatz (Tabelle 3.1A), 8/360 im 3-Zellen/Loch-Ansatz und 6/360 im 1-Zelle/Loch-Ansatz (Tabelle 3.1B). Alle T-Zelllinien wurden für vier weitere Restimulationsrunden expandiert. Danach vermittelten noch elf T-Zelllinien eine Lyse von Wildtyp-(Wt)-MZ1257RC- und den B7-1^+ MZ1257RC-Zellen.

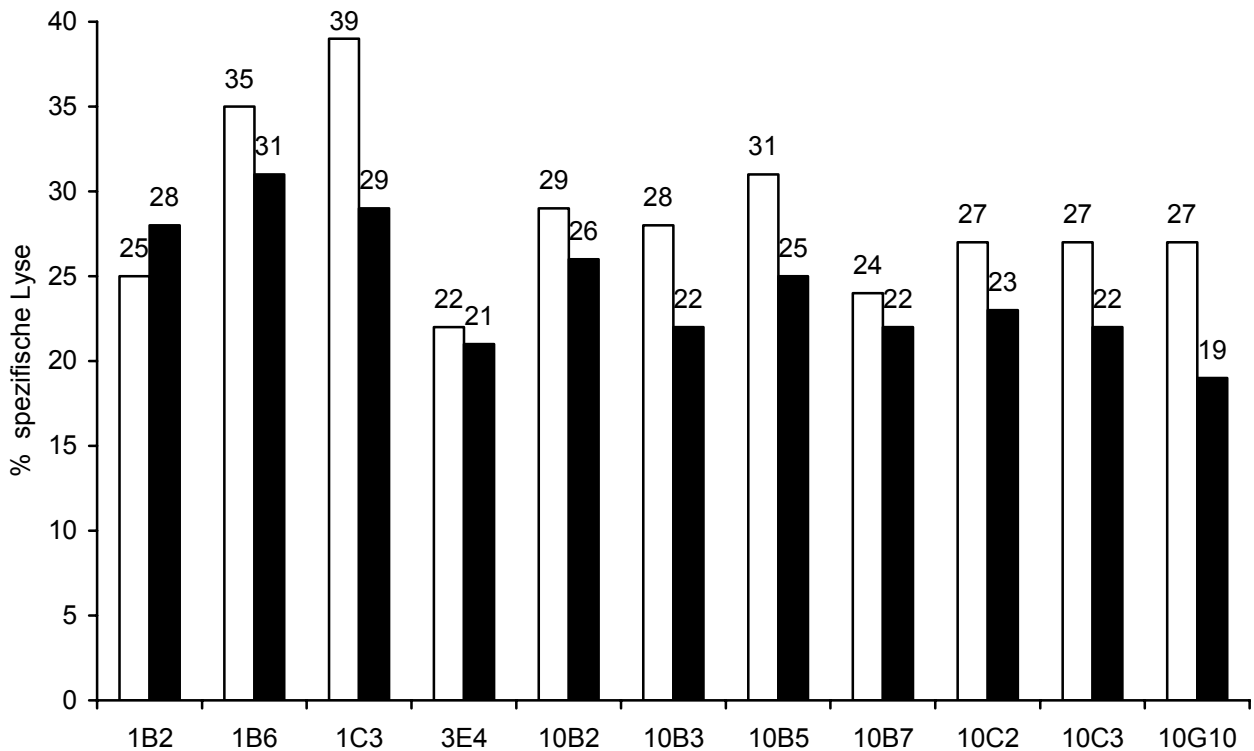


Abbildung 4.3: T-Zelllinien lysieren B7-1⁺ MZ1257RC- und B7-1⁻ MZ1257RC-Zellen. Spezifische prozentuale Lyse der B7-1⁺ MZ1257RC-Zellen (weiße Balken) und B7-1⁻ MZ1257RC-Zellen (schwarze Balken) durch 11 autologe T-Zelllinien bei „Effektor“ zu „Target“-Verhältnissen von 30 : 1 in einem 4-stündigen Zytotoxizitätsversuch (3.2.4.1).

Die Abbildung 4.3 fasst die zytotoxischen Effektoreigenschaften von 11 T-Zelllinien zusammen, die aus der gleichen Klonierungsanalyse stammen: (i) 1-Zelle/Loch-Verdünnung 1B2, 1B6, 1C3, (ii) 3-Zellen/Loch-Verdünnung 3E4, (iii) 10-Zellen/Loch-Verdünnung 10B2, 10B3, 10B5, 10B7, 10C2, 10C3, 10G5. Die T-Zelllinien der 10-Zellen/Loch-Verdünnung vermittelten eine durchschnittliche Lyserate von 28 % gegenüber B7-1⁺ MZ1257RC-Zellen bzw. von 23 % gegenüber B7-1⁻ MZ1257RC-Zellen. Die T-Zelllinie 3E4 vermittelte nahezu identische Lyseraten von 22 bzw. 21 % gegenüber beiden Tumorzelllinien. Im Gegensatz dazu wurden die höchsten mittleren Effektorleistungen für die drei T-Zelllinien 1B2, 1B6, 1C3 beobachtet. Sie lag für B7-1⁺ MZ1257RC-Zellen bei 33 % und für B7-1⁻ MZ1257RC-Zellen bei 29 %. Darüber hinaus vermittelten die beiden T-Zelllinien 1B6 und 1C3 die höchste Lyse gegenüber B7-1⁺ MZ1257RC-Zellen mit Werten zwischen 35 und 39 % bzw. gegenüber den parental B7-1⁻ MZ1257RC-Zellen in Höhe von 31 bzw. 29 %.

Die meisten antigenspezifischen T-Zelllinien sezernieren Zytokine als Antwort auf einen Antigenkontakt in den Zellkulturüberstand. Diese Zytokine werden durch das sensitive Immundetektionsverfahren ELISA nachgewiesen. Es wurden die zytotoxischen T-Zelllinien 1B2, 1B6, 1C3, 10B2, 10B5 und 10C5 in einem „Effektor“ zu „Target“-Ver-

hältnis von 1 : 1 mit bestrahlten Tumorzellen für 24 Stunden unter Kulturbedingungen koinkubiert und die freigesetzte Menge von TNF- α , IFN- γ und IL-4 in pg/ml nachgewiesen (3.2.8.8).

Tabelle 4.2: Antigen-spezifische Zytokinfreisetzung der T-Zelllinien

T-Zelllinie	Zytokine [pg/ml]		
	IFN- γ [pg/ml]	TNF- α [pg/ml]	IL-4 [pg/ml]
1B2	3389	0	7
1B6	3794	16	49
1C3	3332	0	22
10B2	3696	7	737
10B5	0	0	13
10C5	3328	0	16

Für sechs verschiedene T-Zelllinien wurde 24 Stunden nach Antigenstimulation die Menge von den in die Kultur sezernierten Zytokinen TNF- α , IFN- γ und IL-4 mittels ELISA (3.2.8.8) bestimmt. Die erhaltenen Werte sind in [pg/ml] angegeben.

Wie in Tabelle 4.2 aufgeführt, sezernieren die T-Zelllinien nach Inkubation mit B7-1⁺ MZ1257RC-Zellen differentielle Zytokinmuster mit großen Mengen von IFN- γ und geringen Mengen von TNF- α und IL-4. Im Einzelnen wurden von allen T-Zelllinien geringe Mengen IL-4, zwischen 7 pg/ml und 747 pg/ml, und mit Ausnahme von 10B5 von allen mehr als 3300 pg/ml IFN- γ innerhalb von 24 Stunden nach Antigenkontakt sezerniert. Zudem wurden im zellfreien Überstand der beiden T-Zelllinien 1B6 und 10B2 geringe Mengen des proinflammatorischen Zytokins TNF- α in Höhe von 16 pg/ml bzw. 7 pg/ml nachgewiesen.

Vier T-Zelllinien 3E4, 10B3, 10B5 und 10B7 wurden auf die Expression der typischen T-Zelloberflächenantigene CD3 und CD8 mittels Durchflusszytometrie untersucht (Abbildung 4.4).

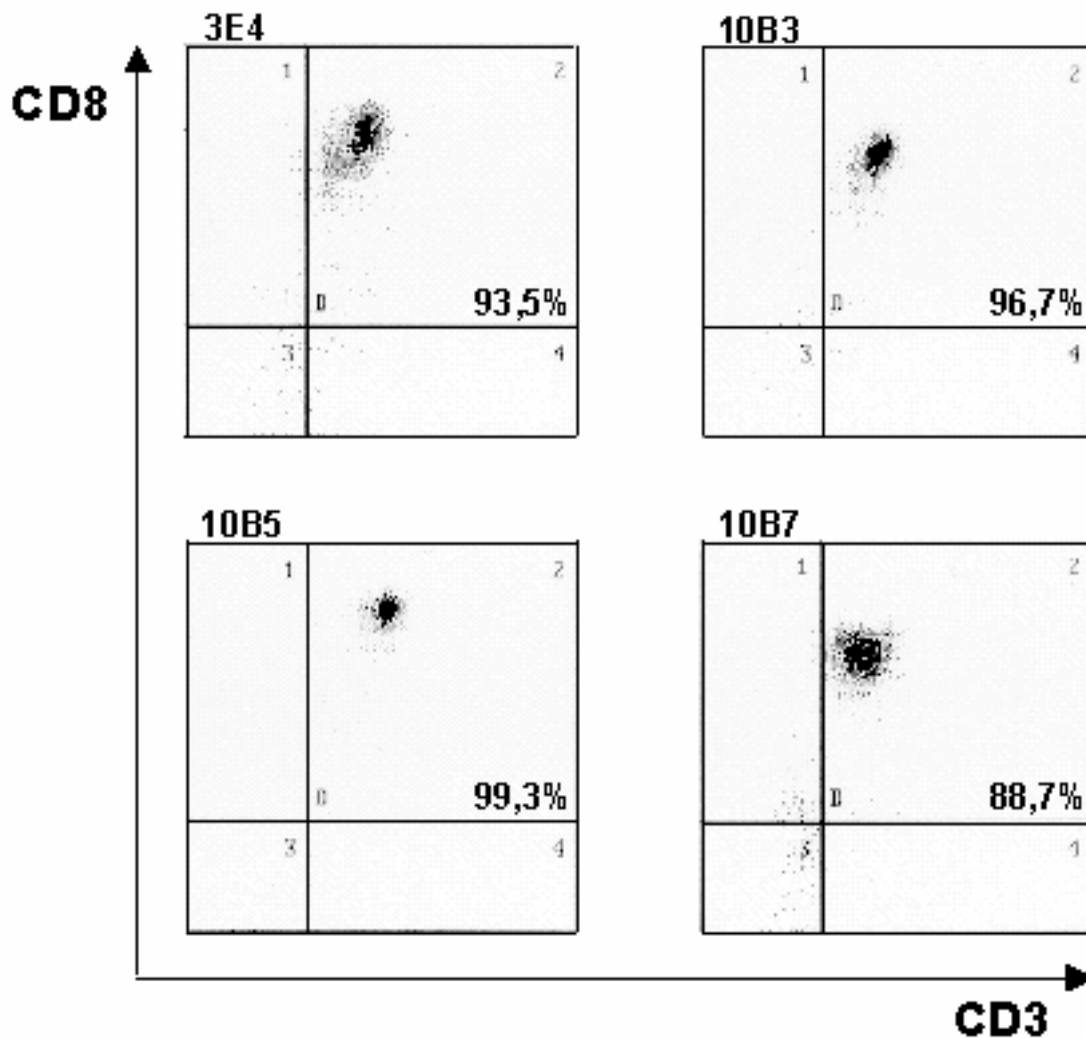


Abbildung 4.4: Etablierte T-Zelllinien exprimieren CD3- und CD8-Antigene. Vier repräsentative Histogramme von Zweifachdetektionen der T-Zelloberflächenantigene CD3 und CD8 auf den T-Zelllinien 3E4, 10B3, 10B5 und 10B7. Jeweils $2,5 \times 10^5$ T-Zellen wurden mit mAk spezifisch für CD3 und CD8, die mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluoresceinisothiocyanat (FITC) bzw. Phycoerythrin (PE) konjugiert waren, inkubiert. In durchflusszytometrischen Messungen wurde der prozentuale Anteil von CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen ermittelt. Auf der x-Achse sind die logarithmischen Messwerte der CD3- und auf der y-Achse die der CD8-Antikörper-Detektion aufgetragen, wobei die zweifach angefärbten T-Zellen im Quadranten rechts oben dargestellt sind.

Wie in Abbildung 4.4 gezeigt, war die Frequenz von CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen bei allen T-Zelllinien größer als 88 %. Im Einzelnen jedoch variiert ihr prozentualer Anteil an der jeweiligen Gesamtpopulation. So enthalten die T-Zelllinien 3E4 93,5 %, 10B3 96,7 %, 10B5 99,3 % und 10B7 88,7 % CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen.

4.1.3 Konstruktion der cDNS-Expressionsbibliothek MZ1851RC

Es wurde eine cDNS-Expressionsbibliothek aus der NZK-Zelllinie MZ1851RC hergestellt, die aus einer Anzahl von 500 Plasmid-Filialgruppen mit jeweils 200 verschiedenen cDNS-rekombinanten Expressionsplasmiden besteht. Jede Plasmid-Filialgruppe wurde zusammen mit einem Expressionsplasmid, das für das HLA-A2 Restriktionselement eines NZK-spezifischen ZTL kodiert, in SV40 immortalisierte COS7 Zellen transient kotransfiziert, um die Expression der antigenkodierenden cDNS durch die Zytokinfreisetzung des NZK-spezifischen ZTL nachzuweisen.

4.1.3.1 Wahl des cDNS-Expressionsplasmids

Die Ausgangsbasis für die cDNS-Expressionsklonierung bildeten drei verschiedene Expressionsplasmide, die zur Verfügung gestellt wurden (3.1.17, Abb. 3.4). Diese Plasmide unterscheiden sich durch verschiedene regulatorisch wirksame DNS-Abschnitte, den Replikationsursprung aus dem DNS-Affenvirus Simian Virus (SV) 40 und einer nicht-kodierenden Intronsequenz aus dem humanen HLA-A*0201-Allel.

Um die Expressionsleistung der zur Verfügung gestellten Plasmide zu evaluieren, wurde das für die Luciferase kodierende Reportergen aus dem Plasmid pGL3-Enhancer (3.1.17, Abb.3.3) isoliert und in das Expressionsplasmid p85 ligiert. Anschließend wurde aus diesem Plasmid p85/Luc das Luciferase-Gen als 1699 Bp großes DNS-Fragment herausgespalten und gerichtet in die Expressionsplasmide p2 und p81 ligiert, sodass es in gleicher Orientierung und Entfernung zum jeweiligen CMV-Promotor positioniert war. Die Expressionsplasmide p2/Luc, p81/Luc, p85/luc wurden zusammen mit pSV-beta-Gal in Kotransfektionsexperimenten eingesetzt (siehe Abbildung 4.5).

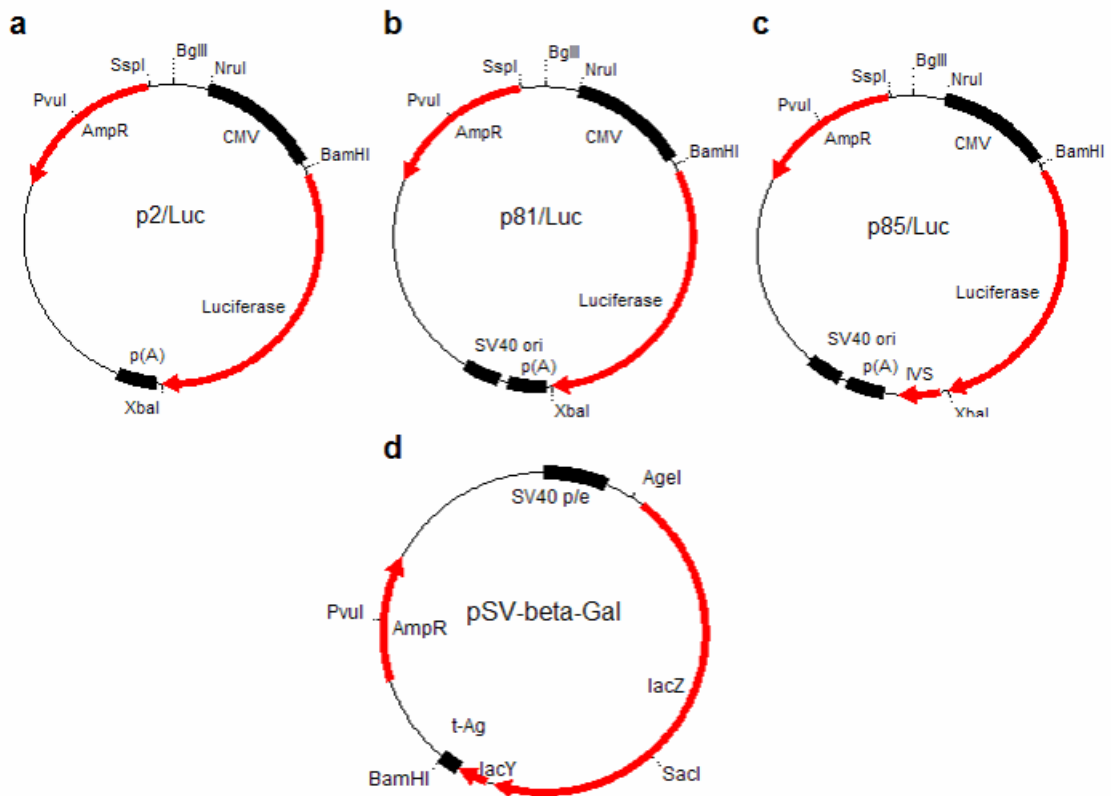


Abbildung 4.5: Für Reportergenanalysen verwendete Expressionsplasmide Übersicht über die Expressionsplasmide (a) p2/Luc, (b) p81/Luc und (c) p85/Luc, die für das *Renilla-Luciferase*-Gen kodieren und zusammen mit dem Expressionsplasmid (d) pSV-beta-Gal, das als interne Transfektionskontrolle fungierte, kotransfiziert wurden.

Es ist zu sehen, dass die Luciferase-kodierenden Plasmide p2/Luc, p81/Luc und p85/Luc sich nur minimal voneinander unterscheiden (Abbildung 4.5). Das ursprüngliche Plasmidrückgrat enthält das Plasmid p2/Luc (a). Das Plasmid p81/Luc (b) unterscheidet sich von p2/Luc durch die Insertion des Replikationsursprungs des Simian Virus 40 (SV 40 ori), der dem Polyadenylierungssignal p(A) unmittelbar nachgeschaltet ist. Das Plasmid p85/Luc ist eine Weiterentwicklung des Plasmids p81/Luc und enthält ein Intron (engl. „intervening sequence“, IVS) unmittelbar vor der Polyadenylierungsstelle. Jedes dieser Expressionsplasmide wurde zusammen mit dem Expressionsplasmid pSV-beta-Galaktosidase, das für das Reportergen β -Galaktosidase kodiert, transient in COS7 Zellen kotransfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurde mittels der in den Zellextrakten enthaltenen β -Galaktosidase-Aktivität die durch die Luciferaseaktivität bei Umsatz des Substrates Lumilite™ erzeugte Biolumineszenz als relative Lumineszenzintensität berechnet. Die transiente Transfektion von 1 μ g des ursprünglichen Expressionsplasmids p2/Luc diente als Referenzwert (100 %) für alle weiteren Transfektionen (Abbildung 4.6).

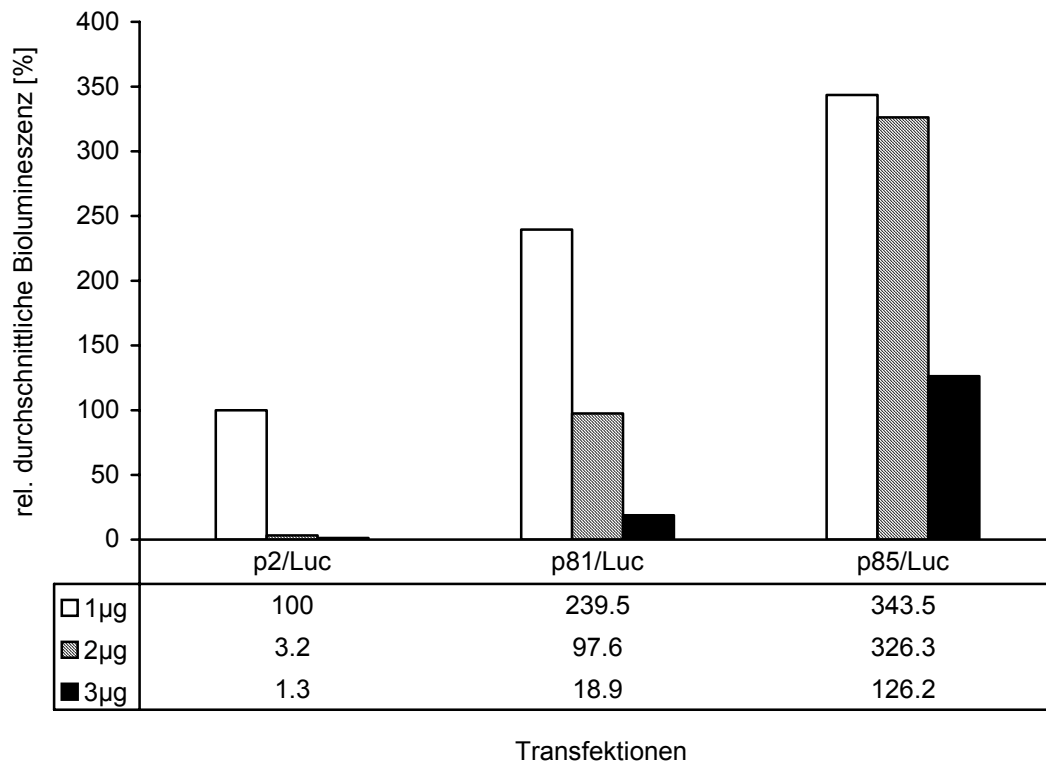


Abbildung 4.6: Luciferase-Aktivität in p2/Luc, p81/Luc und p85/Luc-Transfektanden. Dargestellt ist die durch die Luciferaseaktivität bei Substratumsatz erzeugte Biolumineszenz. Die Luciferase kodierenden Expressionsplasmide p2/Luc, p81/Luc und p85/Luc wurden mit pSV-beta-Gal in einem Mischungsverhältnis von 9 : 1 in Mengen zu 1 µg, 2 µg und 3 µg in COS 7 Zellen kotransfiziert. Nach 48 Stunden wurde die Luciferase-Aktivität in den Zellextrakten der transient transfizierten COS 7 Zellen mittels Biolumineszenz ermittelt. Der Transfektionsansatz Ansatz 1 µg von Expressionsplasmid p2/Luc wurde als Referenzwert verwendet.

Wie in Abbildung 4.6 dargestellt, wurde die Luciferase-Aktivität durch die bei Umsatz des Lumilite-Substrates emittierte Biolumineszenz nachgewiesen. Im Einzelnen zeigte sich, dass die Luciferase-Aktivität (i) von der Menge des transfizierten Expressionsplasmids und (ii) von den regulatorisch wirksamen Elementen der Plasmide abhängig war. Für alle Aktivitätsbestimmungen diente der 1 µg-Transfektionsansatz von p2/Luc als Referenzwert. Bei der transienten Transfektion von 1 µg Plasmid wurde die maximale Luciferaseaktivität für jedes Plasmid beobachtet. Für die Plasmide p81/Luc und p85/Luc wurden Werte von 240 % bzw. 343 % ermittelt. Nach transienter Transfektion größerer Plasmidmengen von 2 µg bzw. 3 µg nahm der Substratumsatz wieder ab. Für das Referenzplasmid p2/Luc fiel der Substratumsatz auf 3,2 % (2 µg) bzw. auf 1,3 % (3 µg) der beobachteten Referenzaktivität ab. Auch für die Plasmide p81/Luc und p85/luc wurde eine Verringerung der Luciferaseaktivität beobachtet. Dabei fiel die Luciferaseaktivität für das Plasmid p81/Luc auf 97,6 % (2 µg) bzw. auf 18,9 % (3 µg) und für das Plasmid p85/luc auf 326,3 % (2 µg) bzw. auf 126,2 % (3 µg)

der Referenzaktivität ab. Damit wurde für das Plasmid p85/Luc neben der besten Expressionsleistung in COS 7 Zellen auch die beste Dosisverträglichkeit beobachtet. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das Plasmid p85 für die Herstellung von cDNS-Expressionsbibliotheken zur Identifizierung von exprimierten TAA ausgewählt.

4.1.3.1.1 Insertion eines „Stufferfragmentes“

Zur besseren Aufreinigung des zu präparierenden Expressionsplasmids p85 wurde für das sich anschließende cDNS-Ligationsverfahren ein 600 Bp langes „Stufferfragment“ in die Restriktionsschnittstellen BstXI und NotI des Polylinkers inseriert, die zugleich die Schlüssel-Restriktionsenzyme für die gerichtete Klonierung der cDNS-Fragmente waren. Dieses neue Plasmid p100 wurde für die cDNS-Insertion aktiviert, nachdem durch die Restriktionsendonukleasen BstXI und NotI das „Stufferfragment“ herausgespalten wurde (Abbildung 4.7).

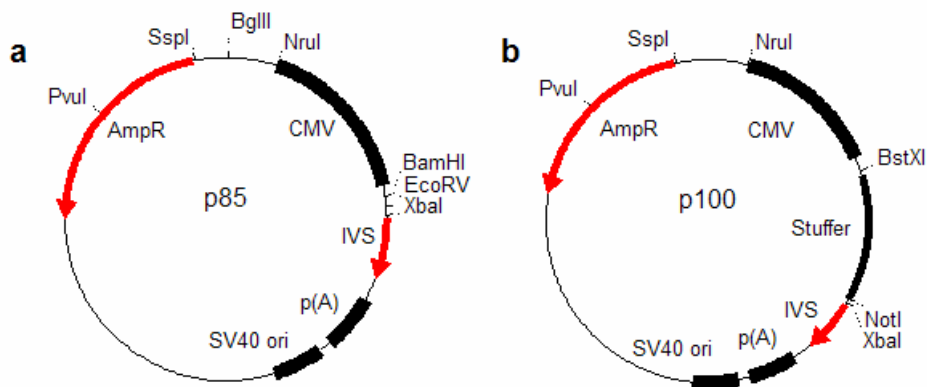


Abbildung 4.7: Die cDNS-Expressionsplasmide p85 und p100. Dargestellt sind die beiden Expressionsplasmide p85 und p100, die zur Herstellung von cDNS-Expressionsbibliotheken verwendet wurden. Das durch die Restriktionsendonukleasen BstXI und NotI gesplante Plasmid wurde durch eine Kalium-Acetat-Dichtegradienten-Zentrifugation (3.2.7.5) von unvollständig gesplante Plasmidsequenzen, die im Agarosegel als größere Fragmente optisch zu unterscheiden waren, abgetrennt.

4.1.3.1.2 Plasmidaufreinigung über den Kalium-Acetat-Dichtegradienten

Durch dieses Verfahren wurde die beste Aufreinigung des verdauten Plasmids bzw. des herausgesplante „Stufferfragments“ erzielt und die geringste Anzahl von Plasmidreliqaten beobachtet. Durch die Verwendung des kontinuierlichen Kalium-Acetat-Dichtegradienten (5 - 20 %) wurde die Plasmid-DNS nach der Ultrazentrifugation aus Fraktionen zu 300 µl, wie in (3.2.7.4) beschrieben, präzipitiert (Abbildung 4.8).

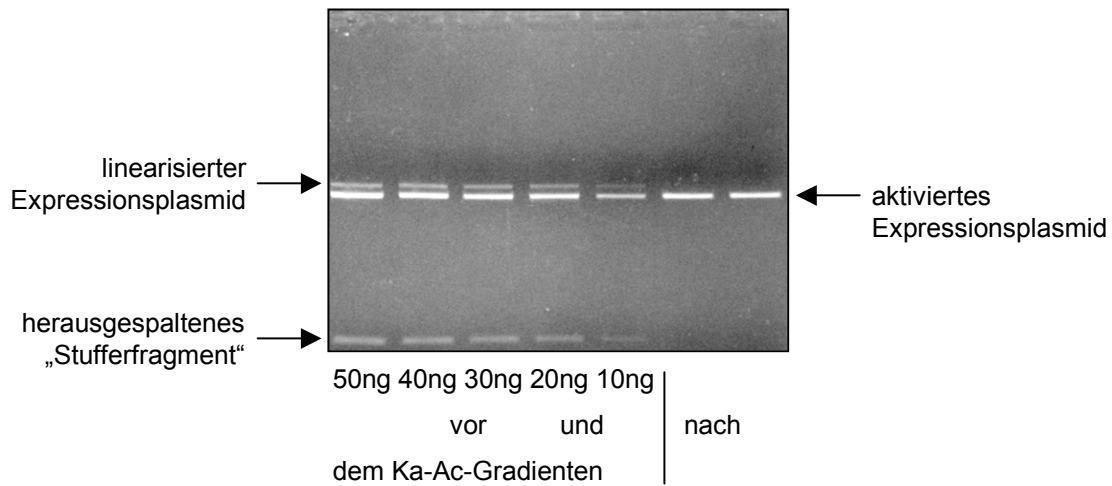


Abbildung 4.8: Über Kalium-Acetat-Dichtegradienten aufgereinigtes Expressionsplasmid. Ein 1 %iges Agarosegel mit dem die Präparation und Aufreinigung des Expressionsplasmis p100 dokumentiert wurde. Das Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen BstXI und NotI verdaut. Es ist zu sehen, dass nach der anschließenden Aufreinigung über den Kalium-Acetat-Dichtegradienten eine Abtrennung des aktivierten Expressionsplasmids von unvollständig verdautem Plasmid bzw. herausgespaltenem Stufferfragment ermöglichte.

Wie in Abbildung 4.8 gezeigt, wurde eine Abtrennung des linearisierten Plasmids und des „Stufferfragments“ vom aktivierten Expressionsplasmid durch Fraktionierung eines kontinuierlichen Kalium-Acetat-Dichtegradienten erzielt. Zur Abschätzung der aufgereinigten Plasmidmenge wurde eine Verdünnungsreihe von 50 ng bis 10 ng des gleichen Plasmids, diesmal jedoch unvollständig mit den Restriktionsenzymen BstXI und NotI gespalten und nicht aufgereinigt, erstellt.

4.1.3.2 Synthese und Fraktionierung von cDNS

Mit aufgereinigter poly(A)⁺ mRNA (3.2.7.1) wurde nach einem von Gubler und Hofmann (1983) entwickelten Verfahren die cDNS hergestellt (3.2.7.2). In einem Reaktionsansatz wurden 5 µg mRNA durch die AMV Reverse Transkriptase mittels eines Oligo(dT)-„Primer-adaptors“ in cDNS umgeschrieben. Etwa 2 µg der hergestellten cDNS wurden auf einen kontinuierlichen Kalium-Acetat-Dichtegradienten geschichtet und ihrem Molekulargewicht entsprechend durch Ultrazentrifugation im Gradienten aufgetrennt (3.2.7.4). Anschließend wurden 300 µl große Fraktionen des Gradienten aufgefangen und die darin enthaltene cDNS durch eine Fällungsreaktion präzipitiert (3.2.5.6). Jeweils ein Viertel des cDNS-Gehaltes der Fraktionen 7-11 wurde gelelektrophoretisch charakterisiert (Abbildung 4.9).

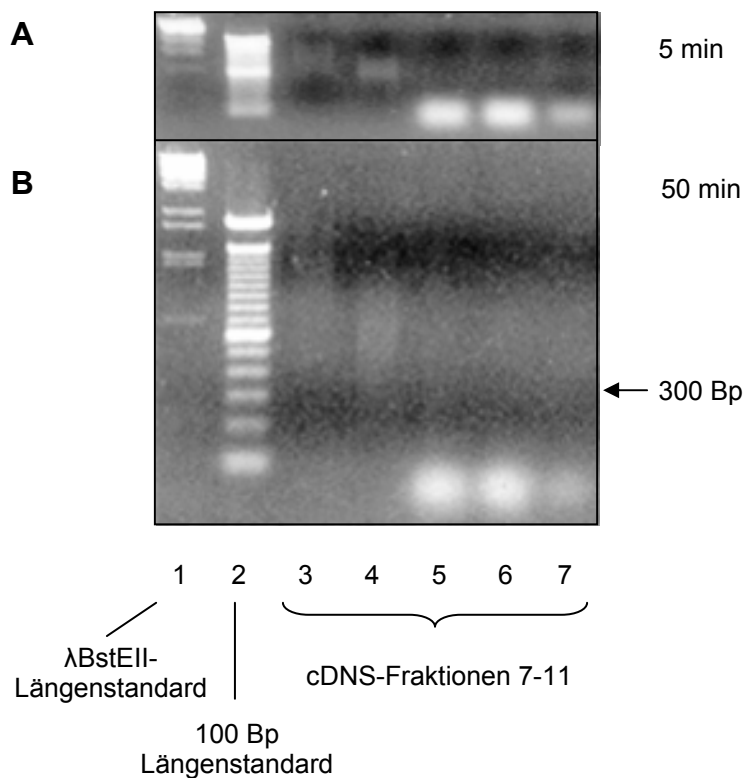


Abbildung 4.9: Darstellung der cDNS-Fractionen nach Ka-Acetat-Gradienten. Ein Viertel (7,5 μ l) des Volumens der Fractionen 7 bis 11 des kontinuierlichen die cDNS enthaltenden Kalium-Acetat-Dichtegradienten wurden auf einem 1 %igen EtBr-Agarosegel in Gegenwart eines λ BstEII Markers (500 ng) und eines 100 Bp Markers (1 μ g) gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.2.5.3). Im zeitlichen Abstand von 45 min wurde das Gel zweimal fotografiert. In den Spuren 3 und 4 ist die größtenfraktionierte cDNS zu erkennen.

Wie in Abbildung 4.9 dargestellt, enthielten die im Gradienten aufsteigenden Fraktionen immer kleinere cDNS-Moleküle. Die Fraktionen 7 und 8 enthielten cDNS-Fragmente mit einer im Agarosegel sichtbaren Länge von etwa 300 Bp bis 1,5 kB. Für die Herstellung der cDNS-Expressionsbibliothek wurden die nicht dargestellten Fraktionen 1 bis 6 vereinigt, um cDNS-Moleküle, die kleiner als 300 Bp waren, zu diskriminieren. Anschließend wurde die cDNS-Konzentration in einem Tüpfeltest abgeschätzt. Insgesamt wurden von der NZK-Zelllinie MZ1851RC zwei größtenfraktionierte cDNS-Präparationen hergestellt. Davon wurden jeweils 10 ng in PCR-Amplifikationen eingesetzt, um Transkriptionsprodukte von (i) Haushaltsgenen, wie z. B. β -Aktin, und (ii) TAA, wie z. B. RAGE1, zu detektieren. Parallel dazu wurde das TAA Tyrosinase, dessen Transkriptionsprodukt nicht in der mRNA von MZ1851RC detektiert wurde, als Negativkontrolle mitgeführt (Abbildung 4.10; Neumann et al., 1998).

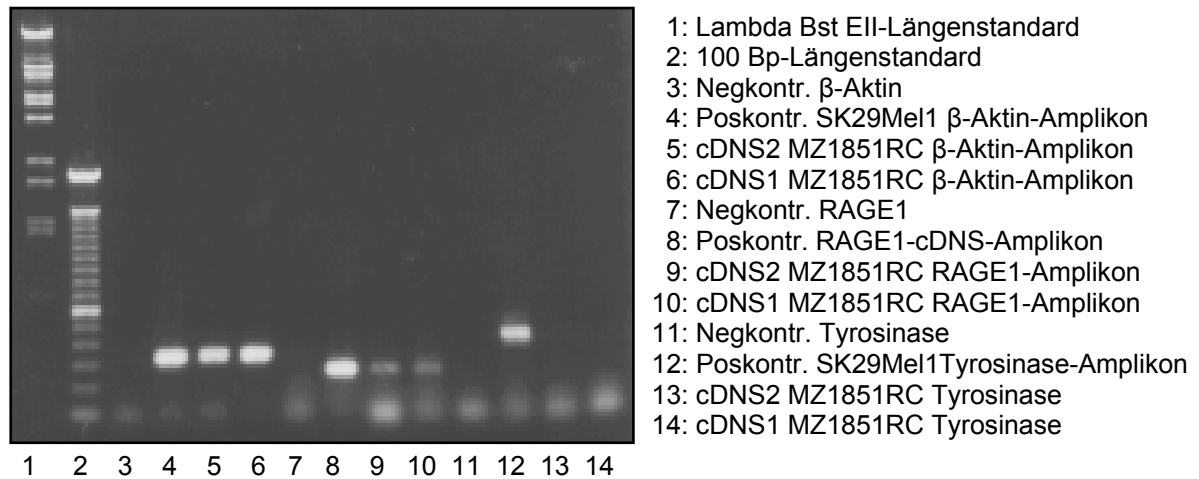


Abbildung 4.10: Nachweis von TAA in zwei cDNS-Präparaten von MZ1851RC. Gelelektrophoretische Auftrennung von Amplikons in einem 1%igen Agarosegel, die mit genspezifischen Primern für β -Aktin, RAGE1 und Tyrosinase hergestellt wurden (3.2.6.1).

Wie in Abbildung 4.10 zu sehen ist, wurden in den beiden hergestellten cDNS-Präparaten der NZK-Zelllinie MZ1851RC Matrizen von β -Aktin (Spuren 5 und 6) und RAGE1 (Spuren 9 und 10), jedoch nicht von Tyrosinase (Spuren 13 und 14), durch PCR-Amplifikation nachgewiesen. Damit wurden frühere molekularbiologische Untersuchungen hinsichtlich der Expression der beiden verschiedenen TAA bestätigt (Neumann et al., 1998). Die Präsenz des TAA RAGE1 wurde als Qualitätsmerkmal angesehen, um eine cDNS-Expressionsbibliothek herzustellen, die cDNS-Moleküle potentieller TAA enthält.

4.1.3.3 Klonierung von cDNS-Fragmenten in das Expressionsplasmid

Für jede cDNS wurde ein optimales Mischungsverhältnis mit dem Expressionsplasmid in Transformationsexperimenten mit kompetenten *E. coli* DH5 α ermittelt. Die Ligationsansätze lieferten jeweils 15.000 unabhängige Bakterienkolonien pro 20 ng eingesetztes Expressionsplasmid. Durch mehrere Ligations- und Transformationsansätze wurden 100.000 unabhängige Bakterienklone hergestellt, die zu 500 Plasmid-Filialgruppen von jeweils 200 unabhängigen Bakterienklonen je 3 ml Flüssigkultur portioniert wurden. Von einem Ausstrich einer 1 : 100 Verdünnung eines Transformationsansatzes wurden aus 50 Bakterienkolonien Plasmidpräparationen durchgeführt, um die Rekombinationsfrequenz für die in das Expressionsplasmid integrierte cDNS abzuschätzen (Abbildung 4.11).

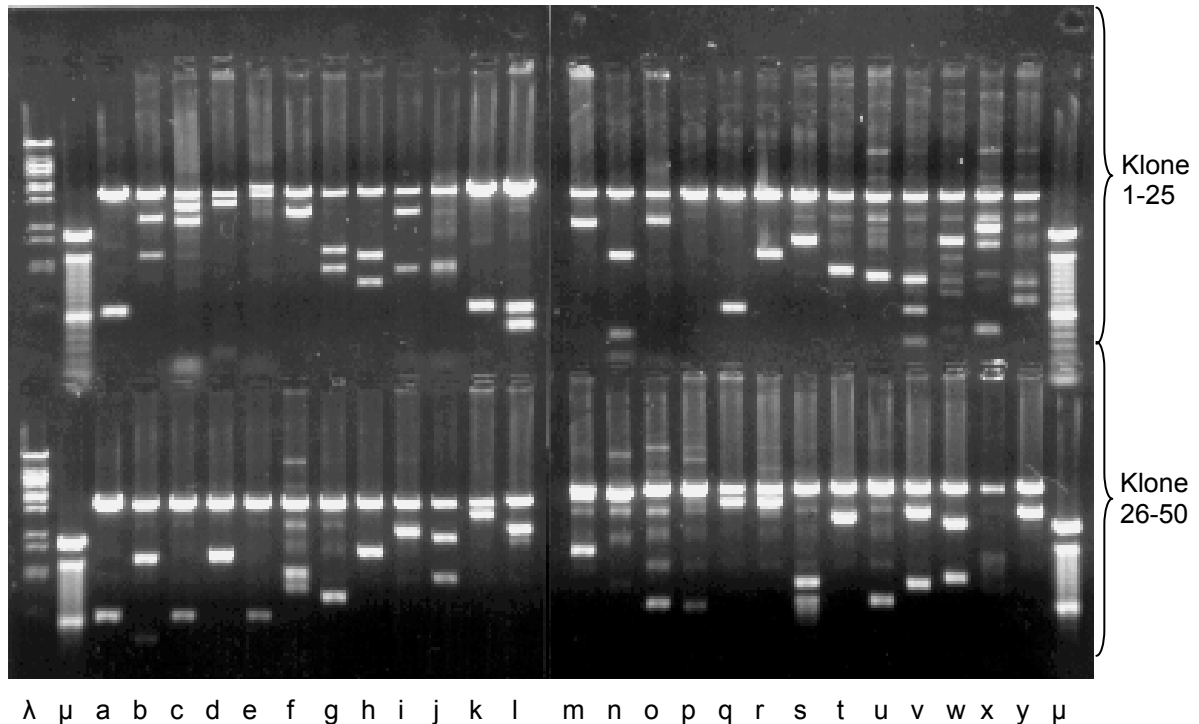


Abbildung 4.11: cDNS-Rekombinationsfrequenz in der Expressionsbibliothek MZ1851RC. Gelelektrophoretische Auftrennung von hydrolysierten cDNS-rekombinanten Expressionplasmiden nach Mini-Plasmid-Präparationen von 50 unabhängigen DH5 α -Kulturen einer 1 : 100 Verdünnung eines Transformationsansatzes. 2 μ l jeder Plasmidlösung wurden in einem 10 μ l DNS-Spaltungsansatz für 2,5 Stunden mit den Restriktionsenzymen BamHI und XbaI bei 37°C inkubiert und in den Spuren a-y auf zwei 1 %igen TAE-EtBr-Agarosegelen für 40 min mit 5 V/cm aufgetrennt. Parallel dazu wurden der Lambda-BstEII- (Spur λ) und ein 100 Bp- (Spur μ) Längenstandard aufgetrennt.

Wie in Abbildung 4.11 dargestellt, enthielten von 50 Plasmidpräparationen (i) zwei (16 p und 49 x) kein Integrat und (ii) acht Religate von Plasmid und „Stufferfragment“ z. B. A1, K11, Q17. Deshalb wurde angenommen, dass etwa 40 der 50 Plasmide (80 %) rekombinant für cDNS-Fragmente bzw. etwa 80.000 cDNS-rekombinante Plasmide in der cDNS-Expressionsbibliothek vorhanden sind. Bei der derzeitigen Abschätzung, dass etwa 25.000 verschiedene Gene im Genom des Menschen aktiv transkribiert werden, wurde eine dreifache Redundanz für die cDNS-Expressionsbibliothek MZ1851RC kalkuliert. 480 Plasmid-Filialgruppen wurden zu 10 übergeordneten Plasmid-Parentalgruppen mit jeweils etwa 7680 cDNS-rekombinanten Expressionplasmiden für weitere analytische Verfahren vereinigt. Die Fragmentlängen der cDNS-Integrate wurden durch PCR-Techniken mittels genspezifischer Oligonukleotide abgeschätzt.

4.1.3.4 Abschätzen der Fragmentlängen von cDNS-Integraten

Für dieses Verfahren wurden zwei kodierende Sequenzen gewählt, die konstitutiv von eukaryotischen Zellen exprimiert werden. Hierbei handelt es sich um die transkribierten Gene für Dynein und β -Aktin. Zum Nachweis von cDNS-Sequenzen beider Gene

wurde jeweils ein sequenzspezifisches Oligonukleotidpaar in PCR-Reaktionen verwendet, das selektiv die 5'-orientierten bzw. die 3'-orientierten Sequenzabschnitte der offenen Leseraster detektiert. Die entstandenen Amplifikate wurde mittels Gelelektrophorese größenfraktioniert und dargestellt, siehe Abbildung 4.12.

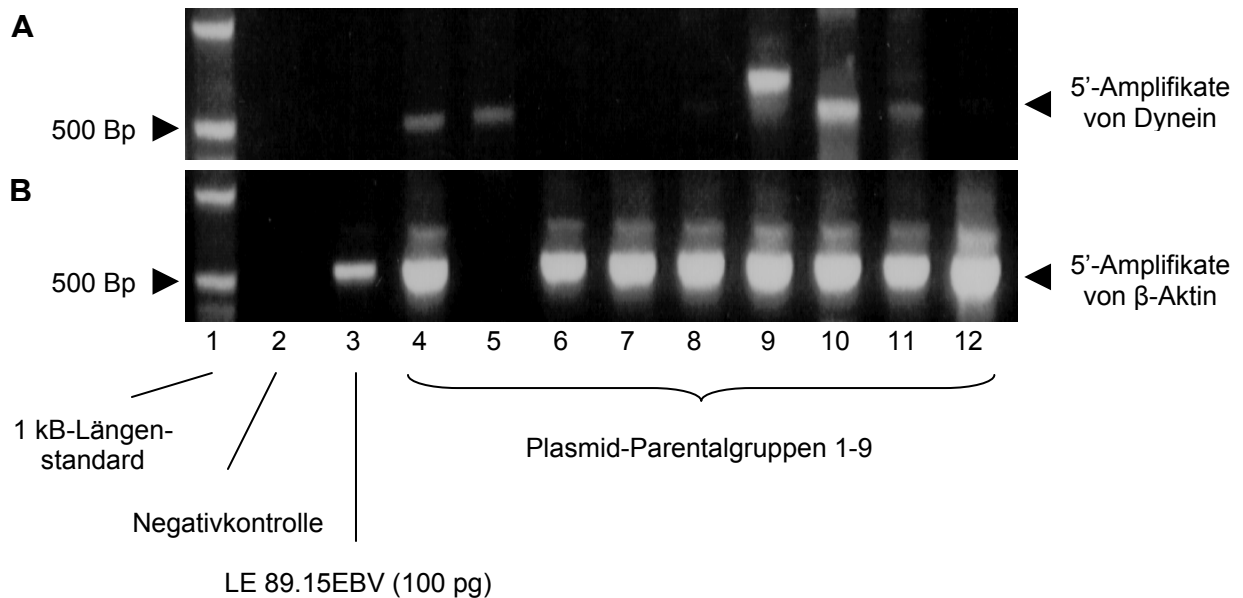


Abbildung 4.12: Dynein- und β -Aktin-Amplikons in den cDNS-Plasmid-Parentalgruppen. Gelelektrophoretische Auftrennung von jeweils 10 μ l der PCR-Ansätze zur Detektion von Dynein- und β -Aktin-Sequenzen in der cDNS-Expressionsbibliothek MZ1851RC in einem 1 % TAE-EtBr-Agarosegel. 100 pg cDNS der B-Zelllinie LE89.15EBV bzw. 500 ng Plasmid-DNS jeder Plasmid-Parentalgruppe wurden für die PCR-Amplifikationen eingesetzt. Als Negativkontrolle fungierte zweifach destilliertes Wasser.

In Abbildung 4.12 ist zu erkennen, dass 5'-Amplifikate der Dynein-Sequenz mit der zu erwartenden Fragmentgröße von 560 Bp nicht in der als Kontrolle mitgeführten Gesamt-cDNS der Zelllinie LE89.15 EBV-B-LCL (100 pg), jedoch in den vier verschiedenen Plasmid-Parentalgruppen 1, 2, 7 und 8 detektiert wurden. Darüber hinaus wurde in Gruppe 6 ein größeres Amplifikat nachgewiesen, dessen Sequenz jedoch nicht näher untersucht wurde. Parallel dazu wurde in 8 von 9 Plasmid-Parentalgruppen 5'-Amplifikate der β -Aktin-Sequenz nachgewiesen. Nachdem ein Längenpolymorphismus der klonierten cDNS-Sequenzen von maximal etwa 8 kB (5'-Amplikon Dynein) bis 3 kB (5'-Amplikon β -Aktin) beobachtet wurde, wurde die Präsenz der RAGE1-Sequenz in den übergeordneten Plasmid-Parentalgruppen untersucht. Hierzu wurden 100 ng Plasmid-DNS als Matrize in RAGE1-spezifischen PCR-Reaktionen verwendet (Abbildung 4.13).

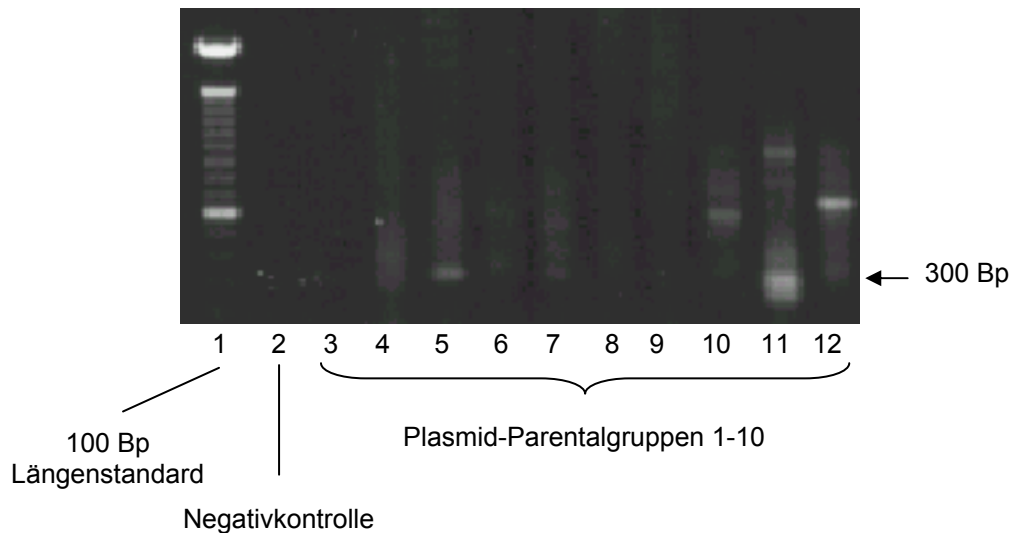


Abbildung 4.13: RAGE1-Detektion in Plasmid-Parentalgruppen der cDNS-Bibliothek MZ1851RC. Gelelektrophoretische Auftrennung in einem 1 %igen Agarosegel von Amplikons, die mit RAGE1-spezifischen Primern in zehn verschiedenen cDNS-Plasmid-Parentalgruppen der cDNS-Expressionsbibliothek MZ1851RC vervielfältigt wurden.

Wie Abbildung 4.13 zeigt, wurden in den Plasmid-Parentalgruppen Nr. 3, 8, 9, 10 Amplikons unterschiedlicher Fragmentlänge hergestellt, jedoch enthielten nur die Plasmid-Parentalgruppen Nr. 3 und 9 ein Produkt mit der rechnerisch zu erwartenden Fragmentlänge von 300 Bp. Aufgrund des Nachweises der RAGE1-kodierenden cDNS in der cDNS-Expressionsbibliothek MZ1851RC wurde die Expressionsklonierung zur Identifikation eines NZK-spezifischen TAA mit einem HLA-A2-restringierten ZTL begonnen.

4.1.4 cDNS-Expressionsklonierung

Hierzu wurde etwa 150 ng Plasmid-DNS von 480 verschiedenen Plasmid-Filialgruppen zusammen mit 100 ng eines HLA-A2-rekombinanten Plasmids vermischt und mittels Transfektionreagens in COS 7 Zellen kotransfiziert (3.2.3.1.1). Bislang wurden drei unabhängige Kotransfektionen vorgenommen. 48 Stunden nach Transfektionsbeginn wurden zu den transfizierten COS 7 Zellen NZK-spezifische, HLA-A2-restringierte ZTL hinzugegeben, die die NZK-Zelllinien MZ1257RC und MZ1851RC lysieren und nach Antigenkontakt TNF- α sezernieren. Nach 20-stündiger Inkubation wurde aus den Transfektionsansätzen jeweils 50 μ l des zellfreien Überstandes entnommen und der Gehalt von TNF- α in einem „TNF-Bioassay“ mittels TNF-sensitiven WEHI-164-Zellen nachgewiesen, die innerhalb von 20 Stunden in Apoptose gingen (3.2.4.3). Durch das farbgebende Stoffwechselsubstrat MTT wurden apoptotische Kulturen ausgelesen und die entsprechenden rekombinanten Plasmid-Filialgruppen wurden erneut transient in COS 7 Zellen transfiziert. Bisher wurde keine Plasmid-Filialgruppe identifiziert, die die cDNS für das ZTL-definierte TAA enthält.

4.2 Etablierung von Nierenzellkarzinom (NZK)-Systemen

Eine zellbiologische Charakterisierung von Tumoren und die Isolierung und Generierung von ZTL wird erst durch die Etablierung von permanenten Tumorzelllinien möglich. Eine permanente autologe Tumorzelllinie ist ein wichtiges zellbiologisches *in vitro* Modellsystem, das über charakteristische Tumoreigenschaften, u. a. tumorassoziierte antigene Peptide, die im Komplex mit HLA Klasse I-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert werden, verfügt. Zur umfassenden Definition eines Tumormodells ist es essentiell, eine permanente Zelllinie aus dem gesunden autologen Gewebe zu etablieren, um die Tumorspezifität der generierten T-Zellen abzusichern. Erst durch die vergleichende Charakterisierung von normalen und Tumorzellen können Unterschiede einen Einblick in die Komplexität der Tumorentartung bieten.

Für die Etablierung von *in vitro* NZK-Systemen wurde nach Nephrektomie aus der abgegrenzten Tumorfront von Nierenzellkarzinomen und aus dem gesunden Nierenepithel Biopsiematerial entnommen (3.2.2.2). Aus den Tumorerläsionen wurden Tumorzellen und TIL isoliert und *in vitro* expandiert (3.2.2.1.1 und 3.2.2.3), während aus den Biopsien des gesunden Nierenepithels zunächst Primärkulturen angelegt wurden. Die isolierten NZK-Zellen- und Nierenzellen wuchsen adhärent und bildeten konfluente Zellmonolayer. Die Primärkulturen der Nierenzellen wurden für spätere Anwendungen kryokonserviert. Hingegen wurden die NZK-Zellen zur Etablierung von permanenten NZK-Zelllinien als Dauerkulturen gehalten. Bisher wurden 15 permanente NZK-Zelllinien nach einer eigens dafür entwickelten Anleitung (engl. „standard operating procedure“, SOP) etabliert, ihr HLA-Phänotyp und ihre Zelloberflächenexpression von immunologisch relevanten Molekülen charakterisiert. Die folgende Tabelle 4.3 gibt einen Überblick über die etablierten NZK-Zelllinien.

Tabelle 4.3: Etablierte NZK-Systeme

Tumorzelllinie	HLA-Phänotyp	Nierenzelllinie
MZ2733RC	A1, -2, B7, -49, Cw4, -w7	MZ2733NN
MZ2789RC	A11, -26, B18, 38, Cw7, -12	MZ2789NN
MZ2858RC	A2, -11, B7, -15, Cw3, -w7	MZ2858NN
MZ2861RC	A3, -29, B7, -44, Cw7, -16	MZ2861NN
MZ2862RC	A2, -26, B38, -56, Cw1, -12	MZ2862NN
MZ2865RC	A2, B8, -44, Cw5, -w7	MZ2865NN
MZ2872RC	A1, B8, Cw7	MZ2872NN
MZ2875RC	A3, B7, -51, Cw7, -14	MZ2875NN
MZ2877RC	A1, -3, B8, -38, Cw7, -12	MZ2877NN
MZ2885RC	A3, B7, Cw7	MZ2885NN
MZ2901RC	A2, -26, B55, -56, Cw1, -w3	MZ2902NN
MZ2902RC	A1, -2, B8, -55, Cw3, -w7	MZ2902NN
MZ2904RC	A-2, -11, B35, -40, Cw3, -w7	MZ2904NN
MZ2905RC	A3, B7, -18, Cw7, -12	MZ2905NN
MZ2907RC	A3, -29, B7, -44, Cw7, -16	MZ2907NN

Die etablierten NZK-Systeme bestehen aus permanenten NZK-Zelllinien und Kurzzeitkulturen von Nierenzellen. Die NZK-Zelllinien wurden für zellbiologische/immunologische Anwendungen HLA-phänotypisiert.

Alle proliferierenden NZK-Zelllinien wurden auf die Zelloberflächenexpression von Molekülen, die an Interaktionen von T-Zellen mit APZ beteiligt sind, untersucht. Dabei wurde mittels Durchflusszytometrie (3.2.4.4) eine differentielle konstitutive Proteinexpression von HLA Klasse I-, CD54/ICAM-1- und CD58/LFA-3-Molekülen beobachtet. Repräsentative Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 4.14 dargestellt.

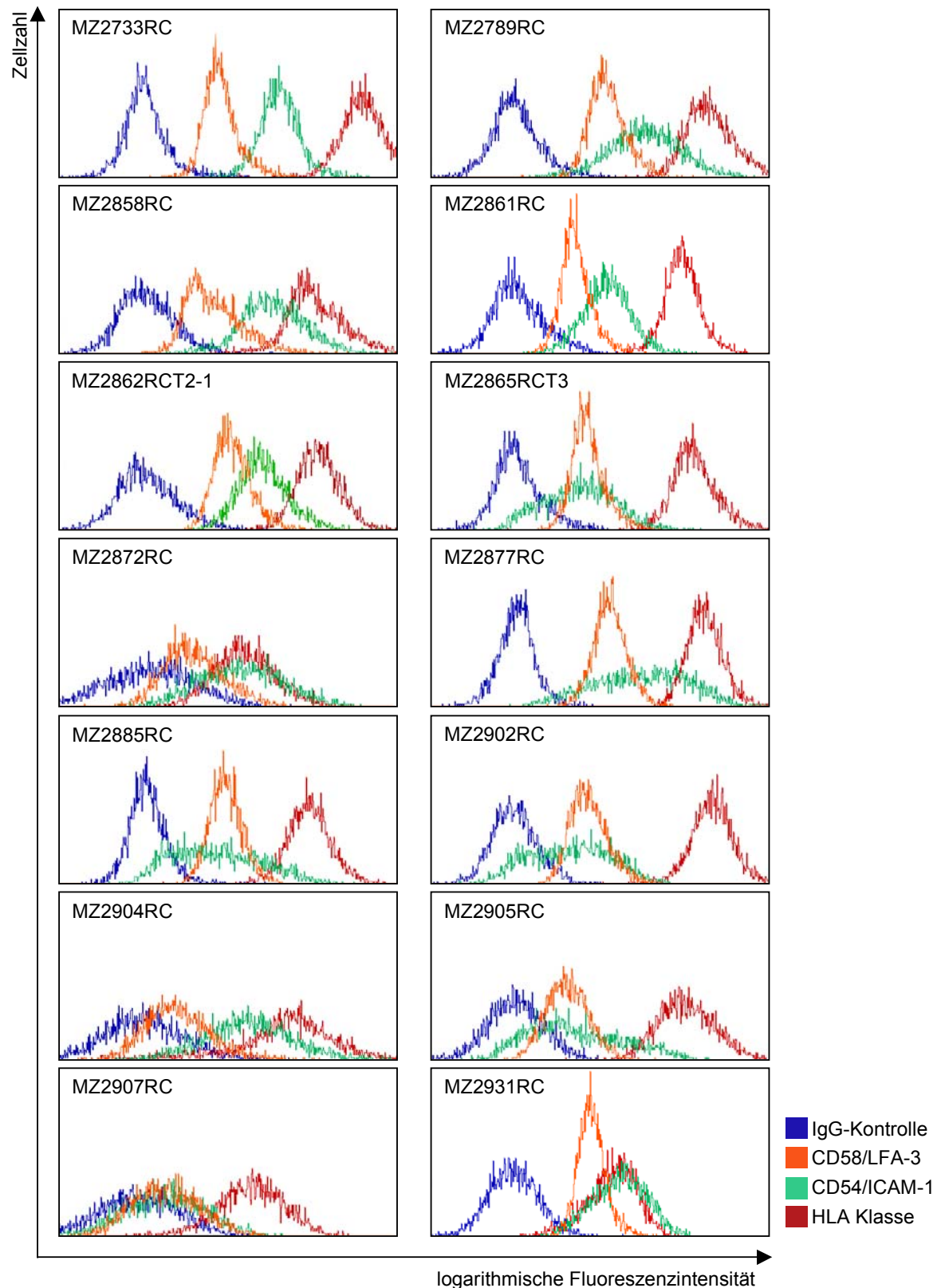


Abbildung 4.14: Heterogene Zelloberflächenexpression von NZK-Zellen. Jeweils 2×10^5 Zellen von 14 etablierten NZK-Zelllinien wurden mit mAk spezifisch für HLA Klasse I- (rot) , CD54- (grün), CD58- (orange) Moleküle und einem unspezifischen Isotypkontroll-Antikörper inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Entlang der x-Achse ist die mittlere logarithmische Fluoreszenzintensität und entlang der y-Achse die Anzahl der fluoreszierenden Zellen wiedergegeben.

Wie in Abbildung 4.14 gezeigt, wurden die einzelnen NZK-Zelllinien durchflusszytometrisch analysiert, wobei vergleichend die unspezifische Detektion (Isotypkontrolle, blau), der spezifischen Detektion von CD54- (grün), CD58- (orange) und der HLA Klasse I-Moleküle (rot) gegenübergestellt wurde. Es wurde ein individuelles Expressionsmuster für jede Zelllinie und eine große Variabilität in der Expression der untersuchten Epitope beobachtet. Auf allen NZK-Zelllinien mit Ausnahme von MZ2872RC und MZ2931RC wurde die größte Proteinexpression für HLA Klasse I-Moleküle, gefolgt von CD54 und CD58, beobachtet. Für das Epitop CD54 wurde die größte Variabilität der Expression in den Zelllinien beobachtet, die von hohen Expressionsraten, z. B. MZ2733RC, zu niedrigen Expressionsraten, z. B. MZ2907RC, reicht. Darüber hinaus wurde auch für das Epitop CD58 eine Variabilität mit sehr geringen Expressionsraten in den Zelllinien MZ2872RC, MZ2904RC und MZ2907RC beobachtet.

Aufgrund dieser durchflusszytometrischen Analysen wurde die NZK-Zelllinie mit der höchsten HLA Klasse I- sowie CD54- und CD58-Expression, MZ2733RC, für die Generierung autologer, tumorspezifischer T-Zellen verwendet.

4.3 Das NZK-System MZ2733RC

Die NZK-Zelllinie MZ2733RC wurde aus einer Biopsie des primären Nierentumors eines 38-jährigen, männlichen NZK-Patienten, kaukasischen Phänotyps etabliert und *in vitro* expandiert. Der Primärtumor wurde von der Pathologie als klarzelliges Nierenzellkarzinom mit dem „Staging“ pT3b, pNx, pMx und dem Differenzierungsgrad G3 klassifiziert (Wittekind et al., 2002).

Verschiedene *in vitro* angelegte Zellkulturen des Tumors MZ2733 wuchsen zu konfluenten Zellmonolayern heran. Diese Kulturen wurden in Passage 5 zu einer „Bulk“-Kultur vereinigt, die fortan als NZK-Zelllinie MZ2733RC bezeichnet und als Dauerkultur über einen Zeitraum von mehr als zwei Jahren kontinuierlich *in vitro* gezogen wurde.

Zu einer zytogenetischen Chromosomenanalyse wurden Metaphasenpräparate von Tumorzellen aus Passage 7, 12 Wochen nach der Tumoraufarbeitung, hergestellt. Die Auszählung der Chromosomen der Tumorzellen ergab, dass der natürlich vorkommende diploide Chromosomensatz von 46 Chromosomen bei weitem deutlich überschritten wurde. Es wurden 56 bis 74 Chromosomen gezählt. Die folgende Abbildung 4.15 zeigt die Chromosomenauszählung eines repräsentativen Metaphasenpräparates.

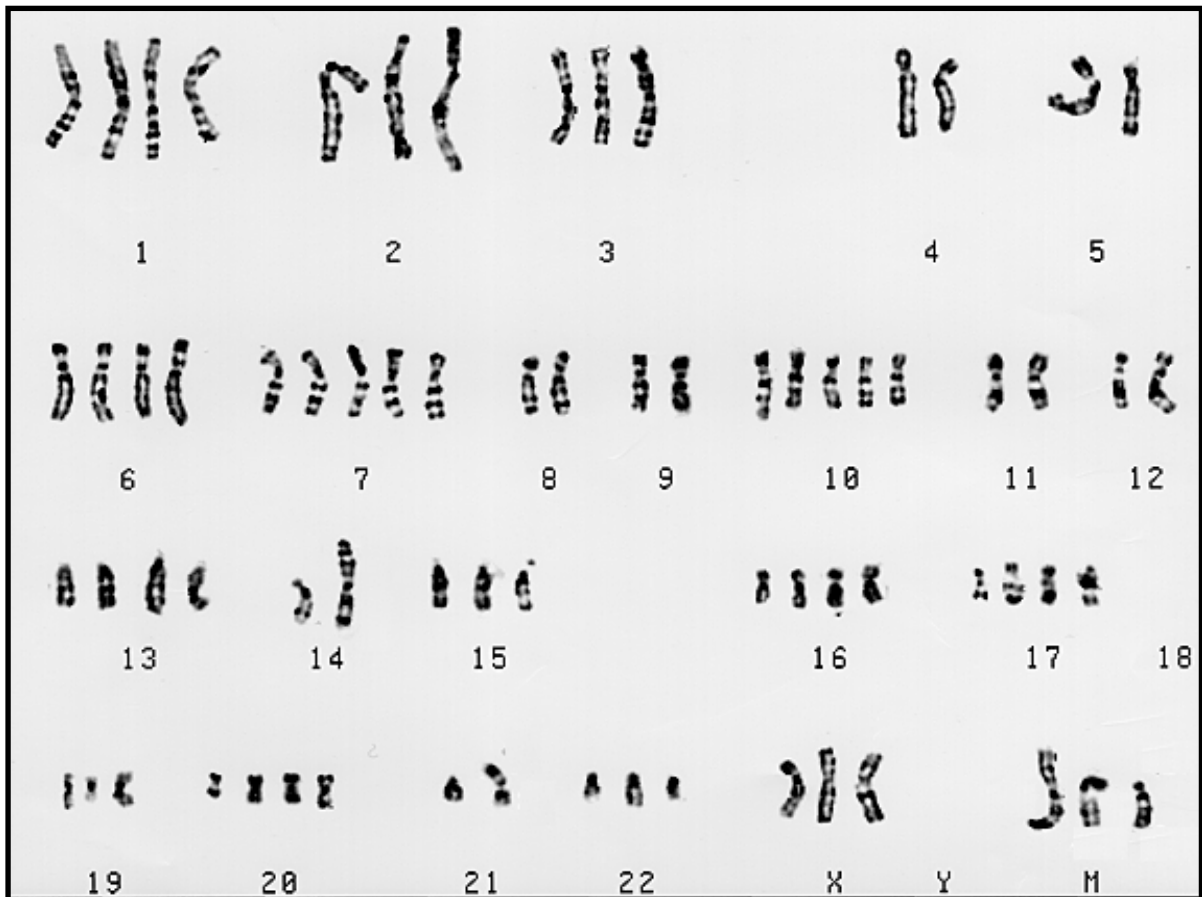


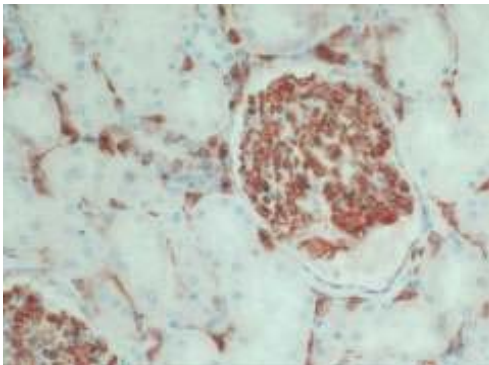
Abbildung 4.15: Chromosomen eines Metaphasenpräparates der NZK-Zelllinie MZ2733RC. Ein repräsentatives Metaphasenpräparat aus Passage 7 der NZK-Zelllinie MZ2733RC wurde analysiert und die Chromosomen entsprechend ihrer Häufigkeit angeordnet.

In Abbildung 4.15 ist zu sehen, dass es in den Tumorzellen zu Amplifikationen und Deletionen einzelner Chromosomen kommt. Im Einzelnen wurden Trisomien bis Pentamerien der Chromosomen 1, 2, 3, 6, 7, 10, 13, 15, 16, 17, 19, 20, 22 und des X-Chromosoms beobachtet. Außerdem wurden weder das Chromosom 18 noch das Y-Chromosom nachgewiesen. Insgesamt wurden 3 Chromosomen, die unter M aufgeführt sind, nicht zugeordnet. Der typische Verlust des Y-Chromosoms wiederum bestätigte die pathologische Befundung des Tumors als klarzelliges NZK.

4.3.1 *In Situ* und *in vitro* Nachweis von MHC-Komponenten

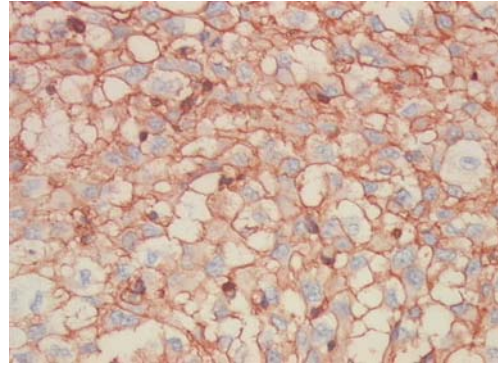
Eine Charakterisierung von einzelnen Komponenten des HLA Klasse I-Prozessierungs- und -Präsentationsweges wurde immunhistochemisch auf Schnittpräparaten des Tumors und des Nierenepithels im NZK-System MZ2733RC durchgeführt. Im Einzelnen wurde die Expression von HLA Klasse I-Molekülen, der TAP1-Untereinheit des heterodimeren Peptidtransporters und die IFN- γ -induzierbare Proteasomenuntereinheit LMP7 mit spezifischen mAk immunhistochemisch nachgewiesen, siehe Abbildung 4.16.

MZ2733NN

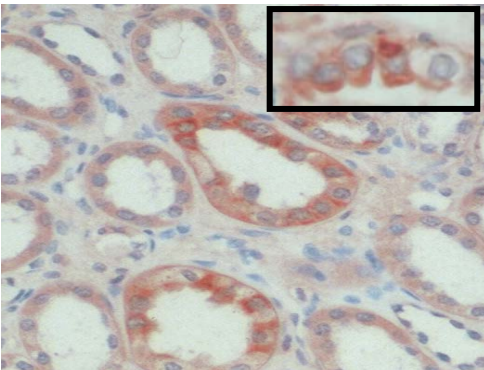


HLA I, 200x

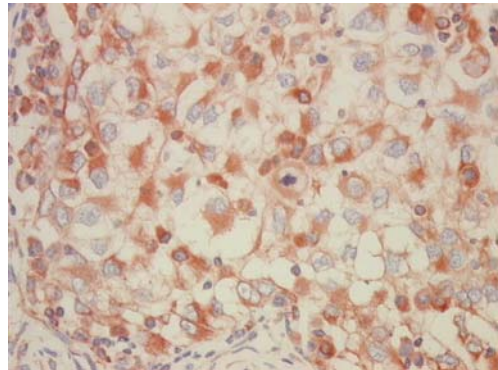
MZ2733RC



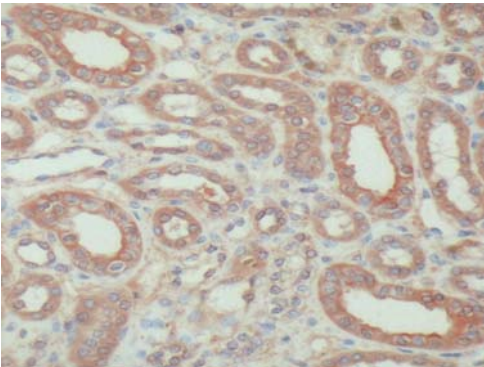
HLA I, 400x



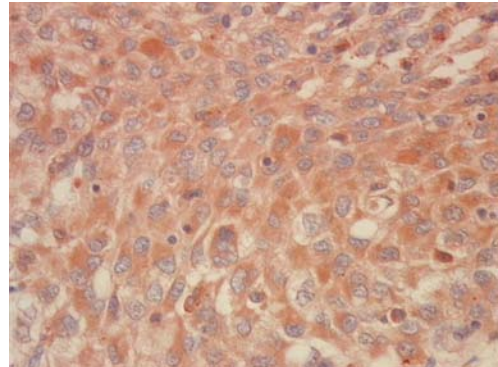
TAP1 200x, inset 900x



TAP 1, 400x



LMP7, 200x



LMP7, 400x

Abbildung 4.16: Immunhistochemischer *in situ* Nachweis von APM-Komponenten. Schnittpräparate von Nierengewebe und korrespondierenden Tumorkläsionen wurden zunächst mit monoklonalen Antikörpern, spezifisch für die schwere Kette von HLA Klasse I-Molekülen (HC10), für TAP1 (148.3) und für LMP7 (Affinity, Mamhead, GB) detektiert und danach mit sekundären AP-konjugierten antimurinen mAk dargestellt (Atkins et al., 2004).

Der Vergleich der Schnittpräparate des gesunden Nierenepithels und des Tumors in Abbildung 4.16 zeigt ein geordnetes, strukturiertes Nierenepithel, das von einem Gefäßgeflecht durchzogen und das deutlich von der struktur- und gefäßlosen, massigen Erscheinung des Tumors abzugrenzen ist. Außerdem ist zu sehen, dass die

HLA Klasse I-Moleküle, die TAP1-Untereinheit des heterodimeren Peptidtransporters und die Proteasomenuntereinheit LMP7 *in situ* im Nierenepithel insbesondere von Zellen, die an der Gefäßorganisation beteiligt sind und von allen Tumorzellen exprimiert werden. Im Einzelnen ist zu erkennen, dass HLA Klasse I-Moleküle auf Tumor- und Nierenzellen in gleicher Intensität detektiert werden. Der intrazelluläre Nachweis von TAP1 zeigt, dass es zu einer charakteristischen Anfärbung des endoplasmatischen Retikulums kommt, das als Kranzstruktur den blau eingefärbten Zellkern umgibt. Hierbei weisen sowohl die Nierenepithel- als auch die Tumorzellen das gleiche Färbungsmuster mit vergleichbarer Intensität auf. Ähnliches ergibt sich für den Nachweis von LMP7. Im Zytoplasma von Nierenepithel- und Tumorzellen kann LMP7 deutlich nachgewiesen werden, dabei scheint die Proteinexpressionsrate von LMP7 in den Tumorzellen, dokumentiert durch eine intensivere spezifische Anfärbung, höher zu sein. Durch diese Ergebnisse wurde gezeigt, dass in diesem Nierenzellkarzinom keine Defizienzen von wesentlichen Komponenten des Antigenpräsentations- und -prozessierungsweges vorliegen. Diese immunhistochemischen Ergebnisse wurden durch durchflusszytometrische Analysen der Immun-Phänotypen der *in vitro* etablierten Zelllinien im NZK-System MZ2733RC ergänzt.

Die Expression von HLA Klasse I-Molekülen und von kostimulierenden Zelloberflächenantigenen wurde auf der NZK-Zelllinie MZ2733RC, einer mit dem SV40 T-Antigen transduzierten NZK-Sublinie MZ2733RCSV und einer autologen SV40 T-Antigen transduzierten Nierenzelllinie MZ2733NNSV mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Hierzu wurden die Epitope auf unbehandelten oder auf mit IFN- γ vorbehandelten Zellen (3.2.2.8) mit spezifischen, Fluoreszenz markierten Antikörpern detektiert und repräsentativ einander gegenübergestellt (Abbildung 4.17).

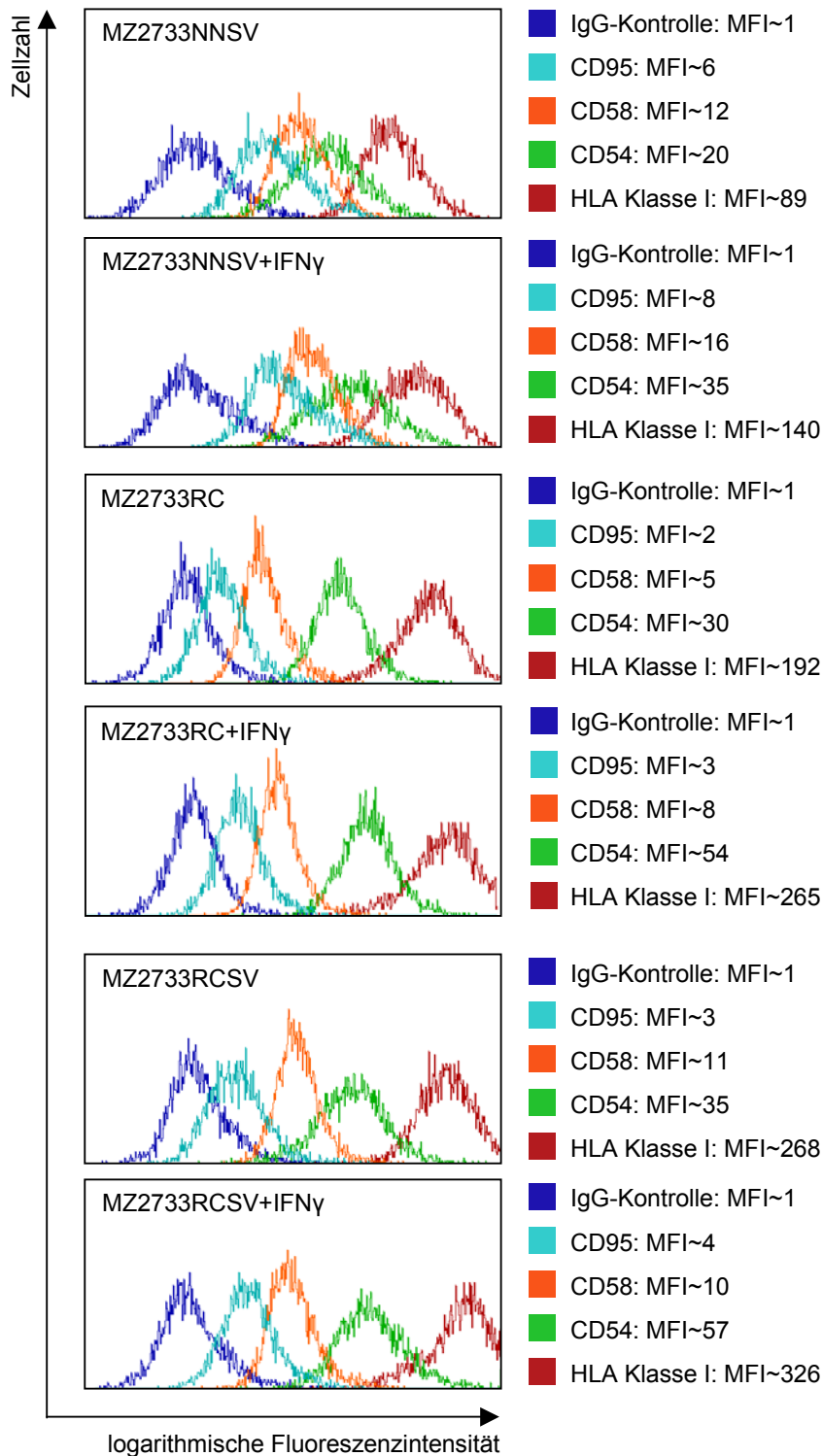


Abbildung 4.17: IFN γ -Induktion von Zelloberflächenantigenen in Zelllinien des NZK-Systems MZ2733. Repräsentative Epitopdetektion von Zelloberflächenantigenen auf den Zelllinien MZ2733NNSV, MZ2733RC und MZ2733RCSV. Die Zellen wurden *in vitro* ohne oder mit IFN- γ (300 IU/ml, 48 Stunden) kultiviert, bevor $2 - 5 \times 10^5$ Zellen mit dem Isotyp-Kontrollantikörper (blau) oder spezifischen mAk für HLA Klasse I-Moleküle (rot), für CD54 (grün), CD58 (orange) und CD95 (hellblau) inkubiert wurden. Die mittels Durchflusszytometrie gemessenen Werte, aufgeführt in der rechten Spalte, geben die mittlere logarithmische Fluoreszenzintensität (MFI) wieder.

Wie in der Abbildung 4.17 dargestellt, kommt es infolge der IFN- γ -Behandlung bezogen auf den Isotyp-Kontrollantikörper zu einer Induktion der Expression der beobachteten Epitope. Im Einzelnen ist zu sehen, dass durch IFN- γ die Expression von CD54- und HLA Klasse I-Molekülen in allen Zelllinien stark induziert wird. Die Induktion für CD54 beträgt 75 % in den Nierenzellen MZ2733NNSV, 80 % in den NZK-Zellen MZ2733RC und 63 % in den SV40-transduzierten MZ2733RCSV-Zellen. Für HLA Klasse I-Moleküle beträgt die Induktion 57 % in den Nierenzellen, 38 % in den NZK-Zellen und 22 % in den MZ2733RCSV-Zellen.

Die NZK-Zelllinie MZ2733RC und die davon abgeleiteten mit dem T-Antigen immortalisierten Zellen MZ2733RCSV besitzen gegenüber den immortalisierten autologen Nierenzellen eine etwa 116 % bzw. 200 % höhere konstitutive und eine um 89 % bzw. 133 % höhere IFN- γ induzierte HLA Klasse I-Molekülexpression. Außerdem ist die CD54-Expression in beiden NZK-Zelllinien um etwa 50 % bzw. 75 % höher als in den Nierenzellen.

Im Gegensatz dazu exprimieren beide NZK-Zelllinien etwa 50 % weniger Fas-Rezeptoren auf der Zelloberfläche als die Nierenzellen MZ2733NNSV. Auch die CD58-Expression ist in der NZK-Zelllinie MZ2733RC geringer als in den Nierenzellen MZ2733NNSV. Die ursprünglichen MZ2733RC-Zellen wurden aufgrund der hohen HLA Klasse I- und der CD54-Expression zur *in vitro* Sensibilisierung von autologen peripheren T-Zellen, die aus dem Blut des Patienten isoliert wurden, verwendet.

4.3.2 Immortalisierung von Zelllinien mit dem SV 40 T-Antigen

Für aufwendigere zelluläre Untersuchungen im NZK-System MZ2733RC wurden Langzeitkulturen der Nierenzellen MZ2733NN durch Immortalisierung mit dem großen T-Antigen von SV40 etabliert. Die Immortalisierungen der Zelllinien wurden im Labor von Herrn Prof. Dr. Blankenstein (MDC, Berlin) durchgeführt. Die transduzierten Zellen wurden nach negativer Virustitertestung zur Verfügung gestellt. Zur stabilen Translation des großen T-Antigens wurden die Zellen unter Selektionsdruck mit dem Antibiotikum Hygromycin (0,6 mg/ml) expandiert und für vergleichende Analysen verwendet. Ebenfalls immortalisierte autologe Tumorzellen dienten als Kontrollzelllinie für die Immortalisierung mit dem großen T-Antigen, siehe Abbildung 4.18.

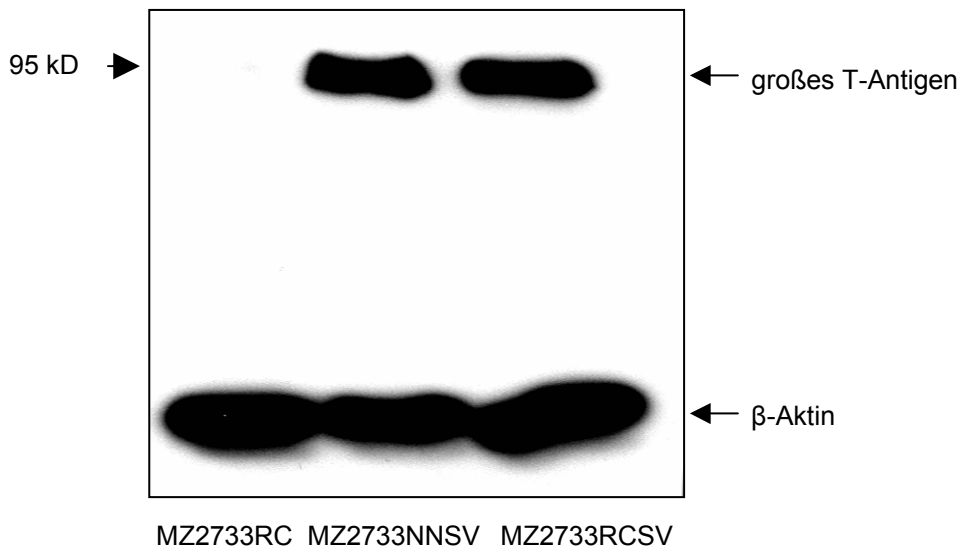


Abb 4.18: Nachweis des T-Antigens in den transduzierten Zelllinien. 20 µg Protein aus dem Zelllysate jeder Zelllinie wurden nach gelelektrophoretischer Größenfraktionierung im PAA-Gel auf eine Nylonmembran transferiert. Der Western Blot wurde mit dem SV40-T-Antigen-spezifischen mAk Pab101 (Pharmingen) und dem β-Aktin-spezifischen mAk (Abcam) inkubiert. Der Nachweis der spezifischen Detektion erfolgte durch einen Kaninchen-anti-Maus-IgG gerichteten Sekundärantikörper, an den Meerrettichperoxidase gekuppelt war (DAKO, Hamburg; 3.1.12.2, Tab. 3.12).

Wie in Abbildung 4.18 dargestellt, wurde das 95 kD große T-Antigen mit dem spezifischen mAk Pab101 (Pharmingen, Wiesbaden) auf dem Western Blot in den Zelllysaten der transduzierten Zelllinien MZ2733NNSV und MZ2733RCSV, jedoch nicht in der ursprünglichen NZK-Zelllinie MZ2733RC nachgewiesen. Der gleichzeitige Nachweis von β-Aktin diente als Beladungskontrolle.

4.3.3 Generierung von autologen T-Zelllinien im NZK-System MZ2733RC

Aus Heparinblut des NZK-Patienten MZ2733, das intraoperativ im August 1998 bzw. postoperativ an verschiedenen nachfolgenden Zeitpunkten erhalten wurde (Tabelle 4.4), wurden PBL isoliert (3.2.2.1). Die über Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isolierten Lymphozyten wurden mittels Dreifarbanalysen in der Durchflusszytometrie auf das Vorhandensein verschiedener Zelloberflächenantigene charakterisiert. Die folgende Tabelle 4.4 gibt die prozentualen Zellzahlen der einzelnen Lymphozytenpopulationen im peripheren Blut des Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten während des Krankheitsverlaufs wieder.

Tabelle 4.4: Longitudinaluntersuchungen von PBL des NZK-Patienten MZ2733RC

T-Zell-Oberflächenmoleküle	August 98*	Mai 99**	Juni 99***	August 00
CD3/CD4	56	50	50	45
CD3/CD8	28	26	33	22
CD8/CD56	0	8	3	0
CD16	1	2	0	0
CD56	0	5	5	24
TZR α/β	85	76	84	67
TZR γ/δ	8	10	8	0

*Zeitpunkt der OP; ** Diagnose von Fernmetastasen; *** Zeitpunkt der IFN- α -Therapie

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Nephrektomie wurde die Verteilung charakteristischer lymphozytärer Zelloberflächenantigene in der Population peripherer Blutlymphozyten des NZK-Patienten MZ2733RC ermittelt.

Die in der Tabelle aufgeführte Verteilung der Lymphozytenpopulationen zeigt zum einen, dass es im Zeitraum von bis zu zwei Jahren nach Nephrektomie zu einer prozentualen Veränderung der Zusammensetzung der PBL kam. Im Einzelnen wurde eine Verringerung der CD3⁺/CD4⁺-T-Zellen von 56 % im August 1998 auf 45 % im August 2000 beobachtet wurde. Parallel dazu verringerte sich auch der prozentuale Anteil der CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen von 28 % im August 1998 auf 22 % im August 2000. Außerdem wurden im Juni 1999 und im August 2000 keine CD3⁻/CD16⁺-NK-Zellen im peripheren Blut nachgewiesen. Im Gegensatz dazu stieg die Frequenz der CD56⁺-Lymphozyten, die zum Zeitpunkt der Nephrektomie nicht nachweisbar waren, auf einen Wert von 24 % an der Gesamtpopulation der Lymphozyten im August 2000. Die prozentuale Verteilung der TZR α/β -T-Zellen entspricht über den beobachteten Zeitraum der Summe der CD3⁺/CD4⁺- und CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen. Darüber hinaus wurden im peripheren Blut des Patienten MZ2733 auch TZR γ/δ (8 % - 10 %) von August 1998 bis Mai 1999, aber nicht mehr im August 2000 detektiert.

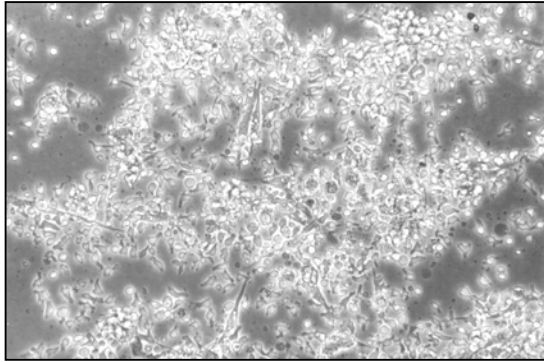
Insgesamt kam es im Beobachtungszeitraum zu einer prozentualen Abnahme der Gesamtzahl an T-Zellen und zu einem prozentualen Zugewinn von NK-Zellen, wobei der Verlust von T-Zellen in etwa dem Zugewinn von NK-Zellen entspricht.

4.3.3.1 Isolation und Expansion von TIL

Ein in der Literatur beschriebenes Stimulationsverfahren zur Expansion von TIL wurde adaptiert (Sica et al., 1993). In den *in vitro* gezogenen primären Tumorkulturen wurden vitale Lymphozyten mit einer Zytokinkombination von 100 IU IL-2/ml und 10 ng IL-7/ml zur Proliferation angeregt. Dabei wurde im NZK-System MZ2907RC beobachtet, dass der von den Tumorzellen gebildete konfluente Zellmonolayer in

Gegenwart der proliferierenden TIL verschwand. An Tag 14 wurden nur noch wenige adhärenzte NZK-Zellen beobachtet. Stellvertretend für alle primären *in vitro* Kulturen sind die Primärkulturen von Tumorkläsion und Nierenepithel des NZK-Systems MZ2907RC in Abbildung 4.19 dargestellt.

(A) Tumor/TIL-Kultur an Tag 14



(B) Nierenepithelzellen an Tag 14

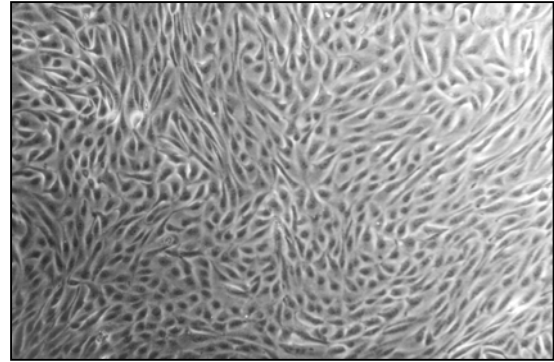


Abbildung 4.19: *In Vitro* Kulturen von Tumor- und Nierenzellen im NZK-System MZ2907RC. Repräsentative Darstellung der primären Tumor/TIL- und Nierenzellkulturen. (A) Eine Einzelzellkultur der Tumorkläsion MZ2907RC mit einer massiven Expansion von TIL an Tag 14 nach Stimulationsbeginn mit IL-2/IL-7. (B) Autologe Primärkultur des Nierenepithels MZ2907NN, die wie die Tumorkultur stimuliert wurde.

Wie in der repräsentativen Abbildung 4.19A zu sehen ist, wurde nur in Tumor/TIL-Kulturen, jedoch nicht in der Nierenepithelkultur eine Proliferation der Lymphozyten durch Zugabe der Zytokine erzielt. Nach 21 Tagen wurde die Expression von T-Zelloberflächenantigenen in den expandierten TIL mittels Durchflusszytometrie untersucht.

4.3.3.2 Charakterisierung der TIL im NZK-System MZ2733RC

Nach durchflusszytometrischen Analysen wurde die Expression charakteristischer T-Zelloberflächenantigene von *in vitro* expandierten TIL und autologen peripheren Blutlymphozyten (PBL) des NZK-Patienten MZ2733RC gegenübergestellt, siehe Tabelle 4.5.

Tabelle 4.5: Frequenz von T-Zelloberflächenantigenen in PBL und TIL MZ2733

Markermoleküle	TIL [%]	PBL [%]
CD3	91	85
CD4	58	56
CD8	35	29
CD56	10	9
CD45RA	2	59
CD45R0	97	41
CD95	97	10
TCR α/β	93	81
TCR ζ	5	14

Intraoperativ abgenommene PBL und *in vitro* expandierte TIL wurden, wie in (3.2.4.4) beschrieben, mit spezifischen mAk für verschiedene charakteristische T-Zelloberflächenantigene inkubiert und in der Durchflusszytometrie analysiert. Angegeben ist die prozentuale Verteilung der T-Zelloberflächenantigene.

Es zeigte sich, dass sich TIL und PBL in der Frequenz verschiedener T-Zelloberflächenantigene und dadurch in ihren Lymphozytenpopulationen voneinander unterscheiden, siehe Tabelle 4.5. Die *in vitro* expandierten TIL trugen vor allem die T-Zelloberflächenantigene CD3 (91 %), CD4 (58 %) und CD8 (35 %). Außerdem exprimierten 97 % aller CD3⁺ TIL das Gedächtnis-T-Zellantigen CD45R0 bzw. das Aktivierungsantigen CD95. Schließlich wurde auf 93 % aller TIL ein TCR α/β -Komplex nachgewiesen. In der Population der PBL wurden die T-Zelloberflächenantigene mit ähnlicher prozentualer Häufigkeit wie in den TIL beobachtet: CD3 (85 %), CD4 (56 %), CD8 (29 %) und CD56 (9 %). Im Gegensatz dazu wurden deutliche Unterschiede in der Expression von CD45RA- und CD45R0-Molekülen beobachtet. Das CD45RA-Molekül ist ein charakteristisches Molekül für naive T-Zellen und wird von etwa 2 % aller TIL jedoch von 59 % aller peripheren T-Zellen exprimiert. Im Gegensatz dazu wird das Gedächtnis-T-Zellantigen CD45R0 auf 41 % aller peripheren T-Zellen, aber auf 97 % aller TIL nachgewiesen. Analog dazu wurde auf 97 % aller TIL und nur auf 10 % aller peripheren T-Zellen die Expression des CD95/Fas-Rezeptors, ein Aktivierungsantigen sensibilisierter T-Zellen, nachgewiesen.

Eine weitere Möglichkeit, den Aktivierungsstatus von T-Zellen zu charakterisieren, besteht in der intrazellulären Darstellung der an der TZR-Signalkaskade beteiligten TZR- ζ -Kette. In den überwiegend naiven peripheren T-Zellen ist die Expression der TZR- ζ -Kette mit einer MFI von 14 höher als in den aktivierten TIL (MFI von 5). Insgesamt unterscheiden sich PBL bzw. TIL in der Expression der beobachteten Aktivierungs-

antigene. Da 97 % der *in vitro* expandierten TIL aktiviert waren, wurden zytotoxische Effektorfunktionen gegenüber der autologen Tumorzelllinie MZ2733RC und gegen die NK-sensitiven K562-Zellen untersucht, siehe Abbildung 4.20.

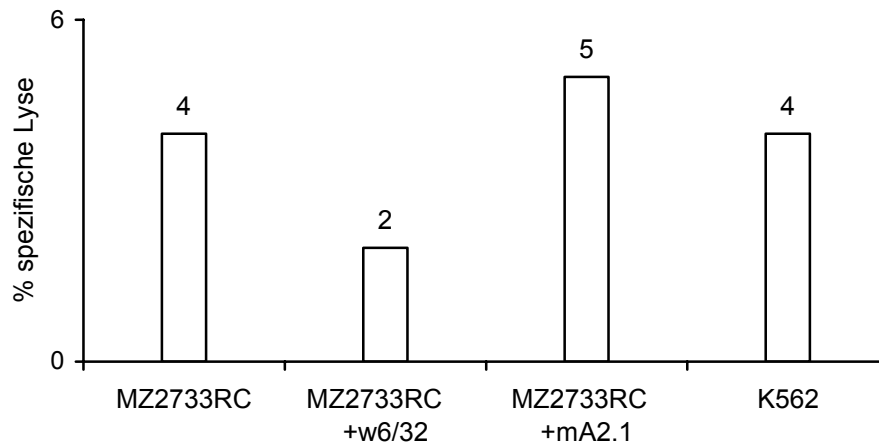


Abbildung 4.20: Expandierte TIL2733 besitzen keine Effektoreigenschaften In Blockierungsversuchen wurden radioaktiv mit $^{51}\text{Chrom}$ -markierte Tumorzellen ohne oder mit den mAk w6/32 und mA2.1 inkubiert und anschließend mit TIL in „Effektor : Target“-Verhältnissen von 30 : 1 inkubiert.

Wie in Abbildung 4.20 dargestellt, besitzen die expandierten TIL2733 keine Effektoreigenschaften gegenüber der autologen NZK-Zelllinie MZ2733RC. Es kann auch keine Aussage bezüglich ihrer HLA-Restriktion gemacht werden, die mit den mAk w6/32 und mA2.1 in Blockierungsexperimenten untersucht wurde. Ebenso wurde keine unspezifische, NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegenüber der NK-sensitiven Zelllinie K562 beobachtet. Alternativ zu den TIL wurden auch autologe periphere Blutlymphozyten mit Tumorzellen in sog. „mixed lymphocyte tumour culture“ (MLTC) *in vitro* sensibilisiert.

4.3.3.3 Charakterisierung *in vitro* sensibilisierter T-Zelllinien

Aufgereinigte PBL wurden mit Zellen der etablierten autologen Tumorzelllinie MZ2733RC in wöchentlichen Intervallen *in vitro* sensibilisiert (3.2.2.1.3). Nach drei Stimulationszyklen in Gegenwart von IL-2 wurden $\text{CD3}^+/\text{CD8}^+$ -T-Zellen durch eine Antikörper-Selektionstechnik (CD8^+ -T-cell Isolation Kit, Miltenyi, Mönchengladbach) angereichert, zur Klonierung in Verdünnungsreihen (engl. „limiting dilution assay“, LDA) ausgesät und in Gegenwart der „Feeder“-Zelllinie 48221/1998, eine allogene EBV-immortalisierte lymphoblastoide B-Zelllinie, wöchentlich mit bestrahlten autologen Tumorzellen restimuliert. Nach drei Stimulationsintervallen wurden vier proliferierende T-Zelllinien XIE6, XIIF8, XIVEI und XVD6 selektiert.

Die Charakterisierung der T-Zelllinien hinsichtlich spezifischer Zelloberflächenantigene erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Dabei wurden verschiedene T-Zellpopulationen mit antigenspezifischen monoklonalen Antikörpern in den untersuchten T-Zelllinien nachgewiesen und ihre Frequenz den peripheren T-Zellen und den TIL gegenübergestellt (Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6: Frequenz von Zelloberflächenantigenen in einzelnen T-Zellpopulationen

Zelloberflächenantigen	T-Zelllinien					
	PBL	TIL	XIE6	XIIF8	XIVE1	XVD6
CD3	85	83	99	99	99	99
CD4	56	58	26	0	95	99
CD8	29	35	74	99	5	0
CD56	9	10	99	99	99	0
CD45RA	59	2	10	0	0	0
CD45R0	41	97	90	98	99	99
CD95	10	97	99	99	99	99
TZR α/β	85	93	99	99	99	99
TZR ζ	14	5	1	7	8	9

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Frequenz von verschiedenen Zelloberflächenantigenen in PBL, TIL und den T-Zelllinien XIE6, XIIF8, XIVE1 und XVD6 bestimmt. Die TZR- ζ -Kette wurde intrazellulär detektiert.

Wie in Tabelle 4.6 zusammengestellt, enthalten die *in vitro* expandierten T-Zelllinien zu 99% CD3⁺-T-Zellen, von denen alle den TZR α/β exprimieren. Im Gegensatz dazu ist die Frequenz von CD3⁺-T-Zellen in PBL (85 %) und TIL (83 %) deutlich geringer. In den klonierten T-Zelllinien XVD6 und XIIF8 wurden ausschließlich die TZR-assoziierten Korezeptoren CD4 bzw. CD8 detektiert. Im Gegensatz dazu wurden in den T-Zelllinien XIE6 und XIVE1 gemischte T-Zellpopulationen aus CD3⁺/CD4⁺- und CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen nachgewiesen. Die T-Zelllinien XIE6, XIIF8 und XIVE1, jedoch nicht die CD3⁺/CD4⁺-T-Zelllinie XVD6, exprimieren das Zelloberflächenantigen CD56, das nur auf 10 % der PBL und auf 10 % der TIL detektiert wird. Überraschenderweise exprimiert die T-Zelllinie XIE6 das Antigen CD45RA, das charakteristisch für naive T-Zellen ist, mit einer Frequenz von 10 % bei einer gleichzeitigen Frequenz von 90 % für das T-Zellantigen CD45R0, das charakteristisch für Gedächtnis-T-Zellen ist. Außerdem wurde der CD95/Fas-Rezeptor von allen T-Zelllinien mit einer Frequenz von 99 % exprimiert.

Darüber hinaus exprimieren von allen untersuchten Lymphozytenpopulationen die PBL mit einer MFI von etwa 14 die größten Mengen der TZR- ζ -Kette. Im Vergleich

dazu haben die TIL und die peripheren T-Zelllinien eine geringere Expression mit einer MFI von 7 - 9. Interessanterweise hat die T-Zelllinie XIE6 die geringste TZR- ζ -Ketten-Expression mit einer MFI von etwa 1.

4.3.3.4 Effektoreigenschaften der verschiedenen T-Zelllinien

Der beobachtete Aktivierungsstatus der generierten T-Zelllinien wurde durch eine sukzessive Analyse der Effektoreigenschaften näher untersucht. Zunächst wurden die zytotoxischen Effektoreigenschaften in Zytotoxizitätsversuchen mit autologen Tumorzellen MZ2733RC ermittelt (3.2.4.1). Da keine Reaktivität der T-Zelllinien XIII F8, XIV E1 und XV D6 in 4- bis 6-stündigen Zytotoxizitätsversuchen nachgewiesen wurde, wurde die Versuchsdauer auf 24 Stunden erhöht.

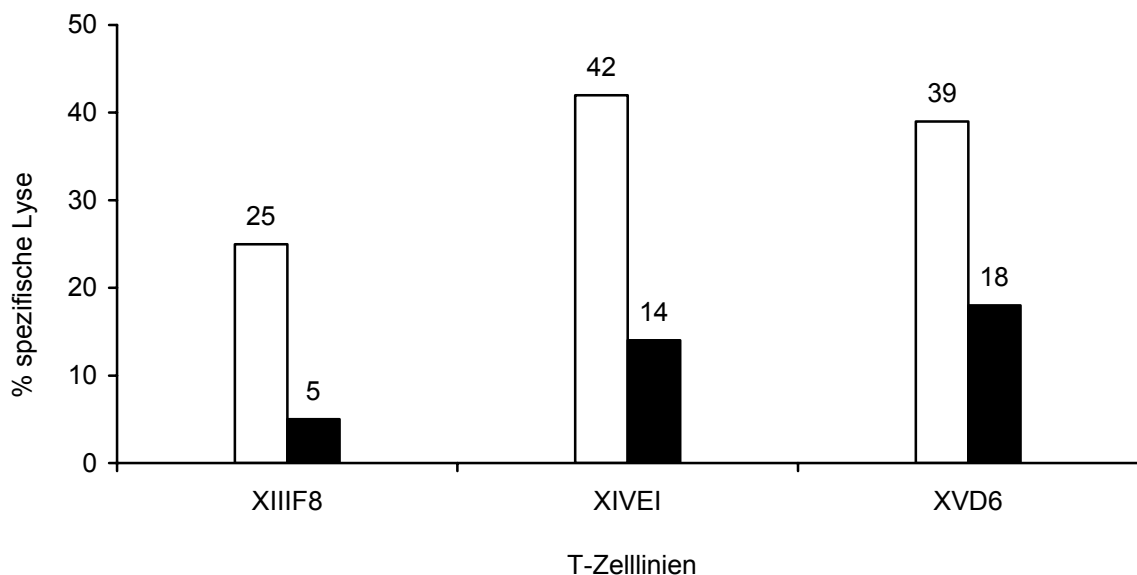


Abbildung 4.21: Zytotoxizität der T-Zelllinien XIII F8, XIV E1 und XV D6. Mit $^{51}\text{Chrom}$ -markierte Tumorzellen (weiße Balken) und die NK-sensitive Erythroleukämiezelllinie K562 (schwarze Balken) wurden, wie in (3.2.4.1) beschrieben, mit einem 30-fachen Überschuss von T-Zellen der T-Zelllinien XIII F8, XIV E1 und XV D6 für 24 Stunden inkubiert.

Für die T-Zelllinien wurden im Einzelnen folgende Lyseraten für Tumorzellen bzw. K562 Zellen ermittelt: (i) XIII F8 25 % bzw. 5 %, (ii) XIV E1 42 % bzw. 14 % und (iii) XV D6 39 % bzw. 18 %, siehe Abbildung 4.21. Da während der Versuchsdauer alle T-Zelllinien die NK-sensitiven K562-Zellen lysierten, wurde von einer näheren Charakterisierung der HLA-Restriktion dieser T-Zelllinien abgesehen.

Im Gegensatz zu diesen drei T-Zelllinien wurde eine zytotoxische, HLA-restringierte Effektoreigenschaft der T-Zelllinie XIE6 in 4-stündigen Blockierungsversuchen mit HLA-spezifischen mAk beobachtet, die nicht gegen K562-Zellen gerichtet ist, siehe Abbildung 4.22.

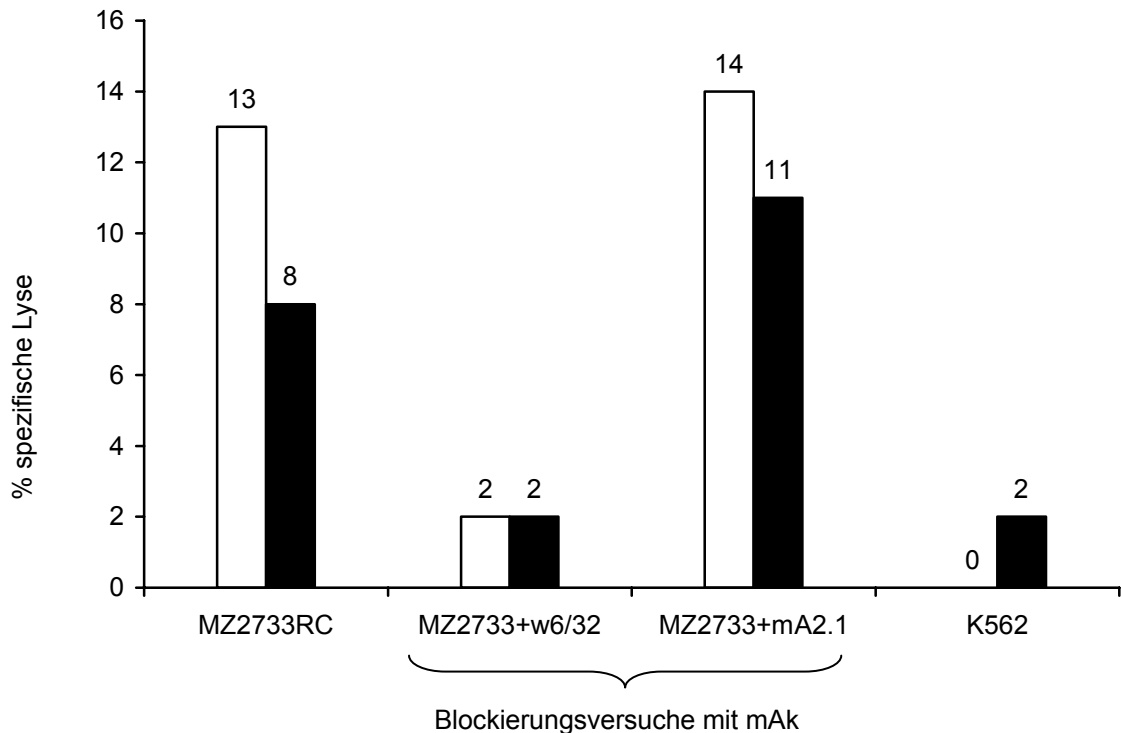


Abbildung 4.22: T-Zelllinie XIE6 ist HLA Klasse I, aber nicht HLA-A2 restringiert. Zusammenfassung verschiedener Blockierungsversuche mit dem HLA Klasse I-spezifischen mAk w6/32 und dem HLA-A2-spezifischen mAk mA2.1. Sowohl nicht markierte als auch mit den mAk w6/32 bzw. mA2.1 markierte Tumorzellen wurden zusammen mit den Effektoren XIE6 in „Effektor : Target“-Verhältnissen von 30 : 1 (weiße Balken) und 10 : 1 (schwarze Balken) zu Zytotoxizitätsversuchen inkubiert. Als unspezifische Kontrolle wurden K562-Zellen, die keine HLA Klasse I Allele auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, mitgeführt.

Wie in Abbildung 4.22 dargestellt, lysierte die T-Zelllinie XIE6 die autologen NZK-Zellen MZ2733RC bei einem „Effektor : Target“-Verhältnis von 30 : 1 zu 14 %. Durch eine Vorinkubation der Tumorzellen mit dem HLA Klasse I-spezifischen mAk w6/32 (30 min, 2 µg/ml) wurde diese Lyserate auf 2 % gesenkt. Im Gegensatz dazu zeigte die Vorinkubation der Tumorzellen mit dem HLA-A2-spezifischen mAk mA2.1 (30 min, 2 µg/ml) keinerlei Effekt auf die von den T-Zellen vermittelte Lyse. Die als Kontrolle mitgeführten HLA Klasse I-negativen K562-Zellen wurden nicht lysiert. In weiteren Zytotoxizitätsversuchen wurden aufgereinigte CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen aus der T-Zelllinie XIE6 verwendet.

Zunächst wurde die Spezifität der CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen gegenüber allen verfügbaren Zelllinien des NZK-Systems MZ2733RC untersucht: (i) autologe Nierenzellen MZ2733NN und (ii) die immortalisierte Nierenzelllinie MZ2733NNSV, (iii) die ursprüngliche Tumorzelllinie MZ2733RC und (iv) die davon abgeleitete immortalisierte NZK-Zelllinie MZ2733RCSV, siehe Abbildung 4.23.

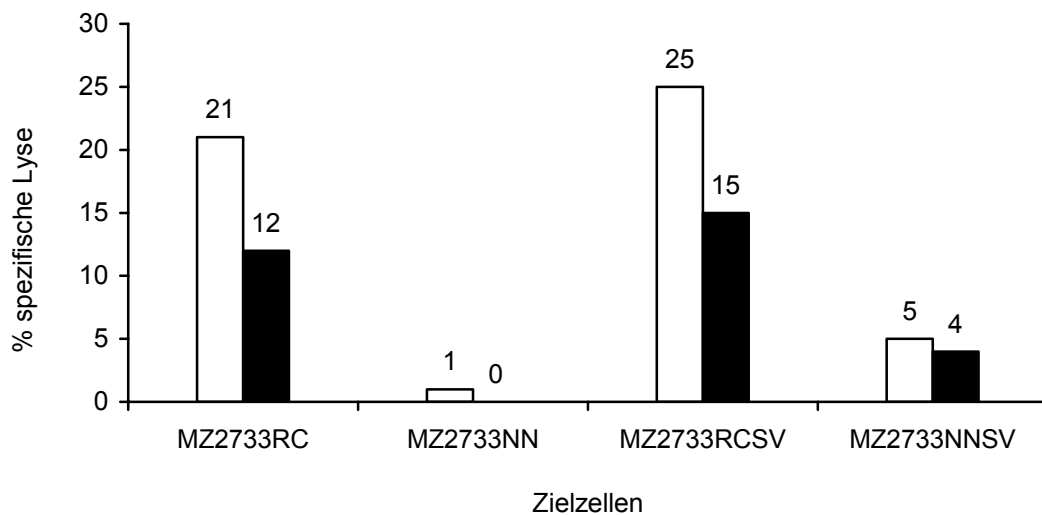


Abbildung 4.23: T-Zelllinie XIE6 ist tumorspezifisch. 1×10^3 radioaktiv markierte Zellen von MZ2733RC, MZ2733NN, MZ2733RCSV und MT2733NNSV wurden zu $CD3^+/CD8^+$ -T-Zellen gegeben und für 4 Stunden inkubiert. Die dargestellten spezifischen Lysen entsprechen der freigesetzten Radioaktivität, die für die „Effektor : Target“-Verhältnisse von 30 : 1 (weiße Balken) bzw. 10 : 1 (schwarze Balken) ermittelt wurden.

Bei den in Abbildung 4.23 dargestellten „Effektor : Target“-Verhältnissen von 30 : 1 bzw. von 10 : 1 werden weder die autologen Wildtyp Nierenzellen MZ2733NN noch die mit dem T-Antigen transduzierten Nierenzellen MZ2733NNSV von den T-Zellen lysiert. Im Gegensatz dazu werden die *in vitro* kultivierten NZK-Zellen MZ2733RC und MZ2733RCSV-Zellen bei „Effektor : Target“-Verhältnissen von 30 : 1 bzw. von 10 : 1 mit 21 % bis 25 % bzw. 12 % bis 15 % lysiert.

Um die HLA-Restriktion und die Verbreitung des von der T-Zelllinie XIE6 erkannten Epitops zu untersuchen, wurden allogene NZK-Zelllinien (Tabelle 4.7) und Tumorzelllinien anderer Ätiologien (Tabelle 4.8) in Zytotoxizitätsversuchen als Zielzellen verwendet. Sie wurden so ausgewählt, dass sie mehrere oder nur einzelne Übereinstimmungen zu HLA-Allelen der NZK-Zelllinie MZ2733RC aufwiesen.

Tabelle 4.7: HLA-Phänotypen von allogenen NZK-Zelllinien

Zelllinie	Ätiologie	HLA-Phänotyp
MZ2733NN	Nierenepithel	A1, -2, B7, -49, Cw4, -7
MZ2786NN	Nierenepithel	A1, -A2, B41, -49, Cw4, -7
MZ2733RC	Nierenzellkarzinom	A1, -2, B7, -49, Cw4, -7
MZ1846RC	Nierenzellkarzinom	A2, -11, B7, -15, Cw7, -10
MZ1851RC	Nierenzellkarzinom	A1, -2, B7, -44, Cw7
MZ1879RC	Nierenzellkarzinom	A1, -2, B8, -18, Cw7
MZ1940RC	Nierenzellkarzinom	A1, -23, B37, -50, Cw6
MZ1973 10-4RC	Nierenzellkarzinom	A1, B8, Cw7, -17
LE89.15RC	Nierenzellkarzinom	A1, B37, Cw6

Charakterisierung der HLA-Restriktion der T-Zelllinie XIE6 durch die Verwendung von allogenen NZK-Zelllinien mit individuellen HLA Klasse I-Phänotypen.

Zunächst wurden zur Verfügung stehende verschiedene NZK-Zelllinien aus Mainz und aus Leiden (Niederlande) sowie Tumorzelllinien folgender Ätiologien Kolon, Lunge, Melanom, Pankreas, Zervix verwendet, um die Verbreitung des von der T-Zelllinie XIE6 erkannten Peptids nachzuweisen, siehe Tabelle 4.8.

Tabelle 4.8: HLA-Phänotypen von Tumorzelllinien anderer Ätiologie

Zelllinie	Ätiologie	HLA-Phänotyp
HT3	Zervixkarzinom	A1, -3, B27, -52, Cw2, -12
Me180	Zervixkarzinom	A1, -32, B8, -44, Cw5, -w7
Mel624	Melanom	A2, -3, B7, -14, Cw7, -w8
SW480	Lungenkarzinom	A2, -24, B7, -15, Cw7
Colo206F	Kolonkarzinom	A1, -2, B7, -8, Cw7
CX1	Kolonkarzinom	A1, -24, B35, -44, Cw4
Pankreas 1	Pankreaskarzinom	A1, -11, B8, -35, Cw4, -7
818.4	Pankreaskarzinom	A2, -11, B40, -44, Cw5, -10

Aufgelistet sind allogene Tumorzelllinien verschiedener Ätiologien, die in Zytotoxizitätsversuchen verwendet wurden, um eine spezifische Erkennung durch die T-Zelllinie XIE6 zu ermitteln.

Die in Tabelle 4.8 aufgelisteten Tumorzelllinien wurden in Zytotoxizitätsversuchen auf eine spezifische Erkennung durch die T-Zelllinie XIE6 charakterisiert. Mit Ausnahme der Zervixkarzinomzelllinie HT3 wurden die Tumorzelllinien in Tabelle 4.8 nicht von

den T-Zellen lysiert. Die folgende Abbildung 4.24 zeigt die beobachtete spezifische Zytotoxizität der T-Zelllinie XIE6 gegen die verschiedenen Tumorzellen.

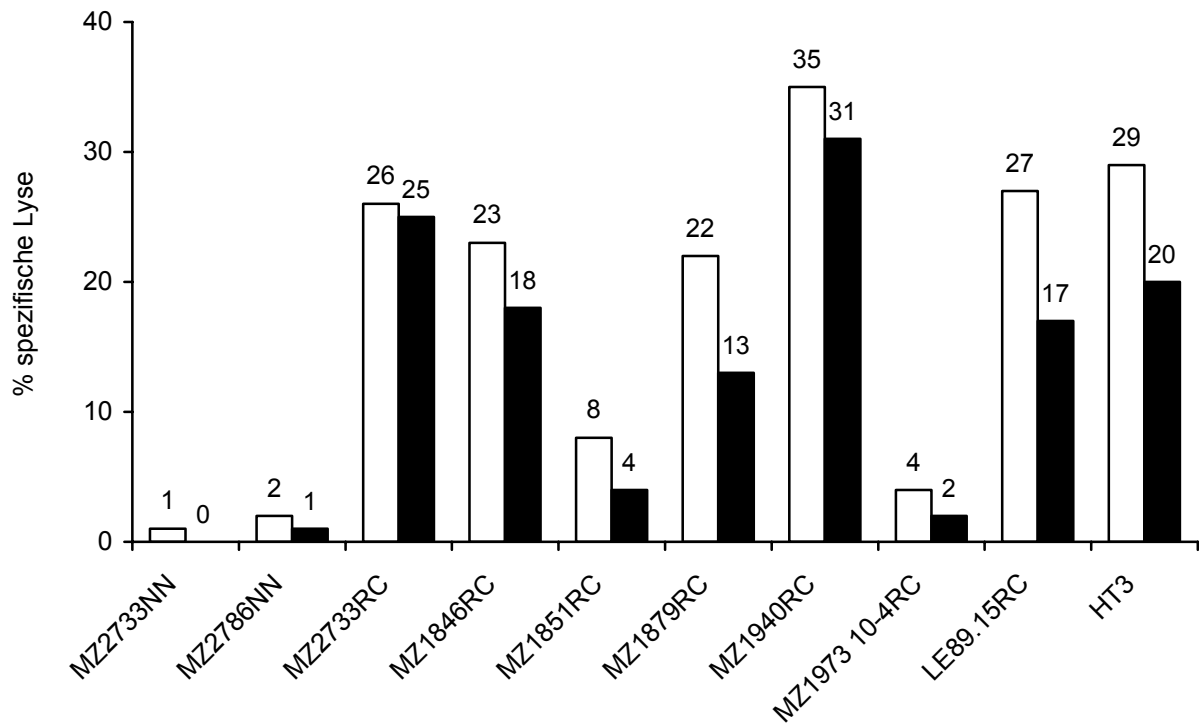


Abbildung 4.24: T-Zelllinie XIE6 lysiert allogene Tumorzelllinien. Jeweils 5×10^6 Zellen von zwei primären Nierenepithelkulturen, sieben verschiedenen NZK-Zelllinien und einer Zervixkarzinomzelllinie mit differierenden HLA-Phänotypen wurden mit radioaktivem $^{51}\text{Chrom}$ markiert (3.2.4.1). Jeweils 1×10^3 Tumorzellen wurden mit $\text{CD}3^+/\text{CD}8^+$ -T-Zellen XIE6 in „Effektor : Target“-Verhältnissen von 30 : 1 (weiße Balken) bzw. 10 : 1 (schwarze Balken) für 4 bis 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die freigesetzte Radioaktivität ermittelt (3.2.4.1).

In Abbildung 4.24 sind verschiedene Zytotoxizitätsversuche der T-Zelllinie XIE6 zusammengefasst. Wie zu sehen, wurden bevorzugt NZK-Zelllinien in Zytotoxizitätsversuchen lysiert. Hierbei zeigte sich, dass in allen Ansätzen die Lyseraten der Tumorzellen mit der Anzahl der eingesetzten T-Zellen titriert wurde. Im Einzelnen wurden die HLA-A1-Allel exprimierenden (HLA-A1^+) NZK-Zelllinien MZ1879RC, MZ1940RC, LE89.15RC und die HLA-A11 $^+$ NZK-Zelllinie MZ1846RC sowie die autologe NZK-Zelllinie MZ2733RC spezifisch mit Lyseraten zwischen 22 % und 35 % lysiert. Im Gegensatz dazu wurden die beiden HLA-A1 $^+$ NZK-Zelllinien MZ1851RC und MZ1973-10-4RC mit einer Lyse von 8 % und 4 % schlecht oder gar nicht lysiert. Ebenso wurden zur Kontrolle mitgeführte HLA-A1 $^+$ primäre Nierenzellen, die autologen MZ2733NN- sowie die allogene MZ2786NN-Zellen, nicht lysiert. Die einzige Tumorzelllinie nierenfremder Ätiologie, die mit einer 29 %igen Lyserate genauso gut wie die autologe NZK-Zelllinie MZ2733RC erkannt wurde, ist die HLA-A1 $^+$ Zervix-

karzinomzelllinie HT3. Da die allogene NZK-Zelllinie MZ1940RC stets besser als die autologe Tumorzelllinie MZ2733RC erkannt wurde, wurde sie in weiteren Zytotoxizitätsversuchen als Positivkontrolle mitgeführt.

4.3.3.5 HLA-Restriktion der T-Zelllinie XIE6

In Blockierungsexperimenten mit HLA-Allel spezifischen monoklonalen Antikörpern (mAk) wurde die allogene NZK-Zelllinie MZ1940RC verwendet, die stets besser als die autologe NZK-Zelllinie MZ2733RC erkannt wurde. Radioaktiv markierte Tumorzellen wurden mit verschiedenen mAk inkubiert, die alle HLA Klasse I-Moleküle (mAk w6/32) bzw. spezifisch HLA-A1-Moleküle (mAk LGIII-147.4.1) oder lokusspezifisch HLA-B- und -C-Moleküle (mAk B1.23.2) erkennen, bevor sie mit einem Effektor : Target -Verhältnis von 30 : 1 mit der T-Zelllinie XIE6 kokubiert wurden, siehe Abbildung 4.25.

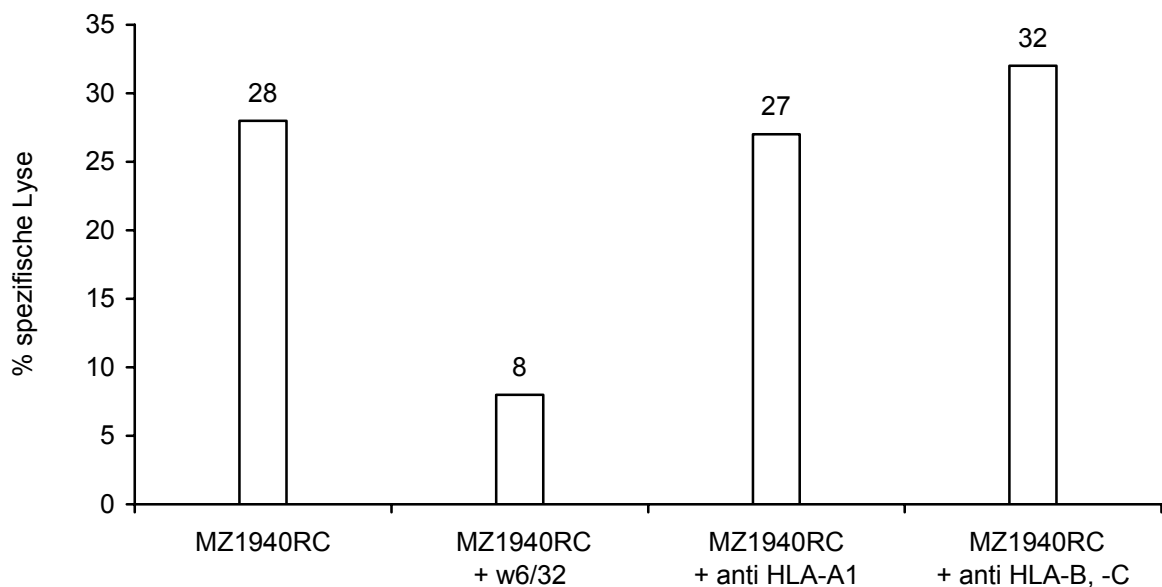


Abbildung 4.25: Blockierungsversuche mit HLA-A1 und HLA-B, -C spezifischen mAk. 5×10^6 mit IFN- γ behandelte MZ1940RC-Zellen wurden radioaktiv mit $^{51}\text{Chrom}$ markiert und mit verschiedenen HLA-Allel spezifischen mAk inkubiert, bevor sie mit der T-Zelllinie XIE6 kokubiert wurden. Die Durchführung der Zytotoxizitätsversuche erfolgte wie in (3.2.4.1) beschrieben.

Wie in Abbildung 4.25 zu sehen, wurde die von der T-Zelllinie XIE6 vermittelte Lyse von MZ1940RC-Zellen nach Vorinkubation der Tumorzellen mit dem HLA Klasse I-spezifischen mAk w6/32 deutlich von 28 % auf 8 % reduziert. Im Vergleich dazu hatten die Vorinkubationen mit HLA-A1- und HLA-B, -C-spezifischen mAk keinen Einfluss auf die ursprüngliche Erkennung. Die für diese Ansätze ermittelte Lyse blieb mit Werten von 27 % bis 32 % unverändert und entsprach der beobachteten Kontrollreaktivität.

4.3.3.6 T-Zelllinie XIE6 sezerniert Zytokine nach Antigenstimulation

Zytotoxische CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen werden in zwei verschiedene Klassen von Effektorzellen, sog. Tc1- bzw. Tc2-Zellen gegliedert. Tc1-phänotypische T-Zellen sind potente Effektorzellen, die proinflammatorische Zytokine, wie z. B. TNF- α und IFN- γ nach Antigenstimulation sezernieren. Im Vergleich dazu besitzen Tc2-phänotypische T-Zellen eine verminderte zytotoxische Effektorfunktion und sezernieren antiinflammatorische Zytokine, wie z. B. IL-10.

Das Zytokinprofil für die T-Zelllinie XIE6 wurde nach der spezifischen Antigenstimulation mit autologen NZK-Zellen MZ2733RC untersucht. Hierfür wurden T-Zellen mit bestrahlten Tumorzellen 36 Stunden lang koinkubiert und die in den Überstand abgegebenen Zytokine mittels ELISA (3.2.8.8) nachgewiesen. Es wurden Zytokinprofile für TNF- α , IFN- γ , GM-CSF nach IL-2- (500 IU/ml) und IL-2/IL-12-Stimulation (500 IU/ml und 5 ng/ml), siehe Abbildung 4.26, bzw. von IL-10 nach IL-2/IL-12-Stimulation untersucht, siehe Abbildung 4.27.

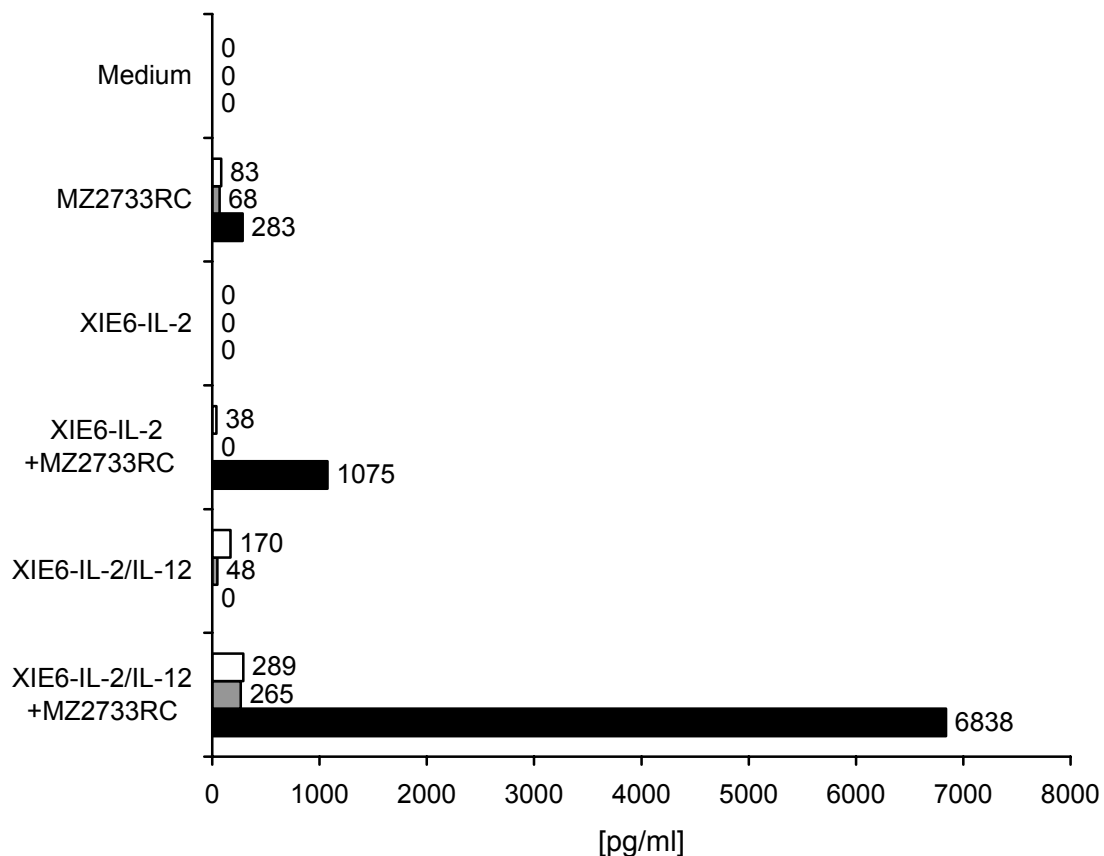


Abbildung 4.26: Zytokinprofil der T-Zelllinie XIE6. 1×10^4 T-Zellen wurden im „Effektor : Target“ - Verhältnis von 1 : 1 36 Stunden lang mit Tumorzellen inkubiert. Im zellfreien Überstand wurde TNF- α (weiße Balken) IFN- γ (graue Balken) und GM-CSF (schwarze Balken) mittels ELISA (3.2.8.8) nachgewiesen.

Wie in Abbildung 4.26 dargestellt, besaßen die mit IL-2 kultivierten T-Zellen (Ansatz XIE6-IL-2) vor Beginn der Antigenstimulation mit autologen NZK-Zellen MZ2733RC keine Eigenproduktion von TNF- α , IFN- γ und GM-CSF. Im Gegensatz dazu produzierten die einmalig mit IL-2/IL-12 vorstimulierten T-Zellen (Ansatz XIE6-IL-2/IL-12) bereits 170 pg/ml TNF- α , 48 pg/ml IFN- γ , jedoch kein GM-CSF. Nach 36-stündiger Koinkubation mit NZK-Zellen MZ2733RC wurden im Überstand der IL-2 stimulierten T-Zellen 38 pg/ml TNF- α und 1075 pg/ml GM-CSF, jedoch kein IFN- γ nachgewiesen. Im Gegensatz dazu produzierten die mit IL-2/IL-12 vorstimulierten T-Zellen während der Antigenstimulation 289 pg/ml TNF- α , 265 pg/ml IFN- γ und 6838 pg/ml GM-CSF. Parallel dazu wurden im Überstand der NZK-Zellen MZ2733RC 83 pg/ml TNF- α , 68 pg/ml IFN- γ und 283 pg/ml GM-CSF nachgewiesen. Nur nach Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-12 wurde die Sezernierung von TNF- α und IFN- γ in den T-Zelllinie XIE6 beobachtet. Um den vermuteten Tc2-Phänotyp der T-Zelllinie XIE6 zu verifizieren, wurde die Sezernierung von IL-10 untersucht, siehe Abbildung 4.27.

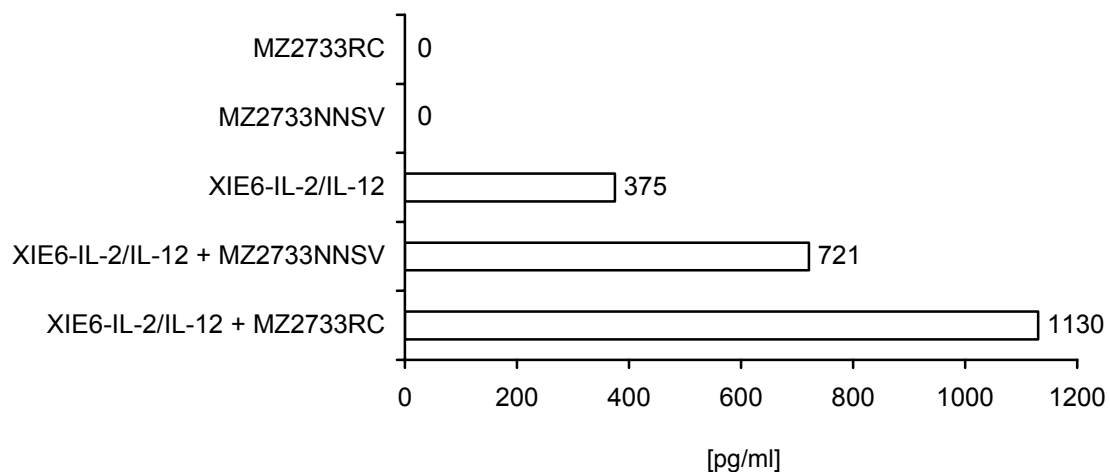


Abbildung 4.27: IL-10-Produktion der T-Zelllinie XIE6. 1×10^4 T-Zellen wurden mit Tumorzellen im „Effektor : Target“ -Verhältnis von 1 : 1 36 Stunden lang inkubiert. Im zellfreien Überstand wurde IL-10 mittels ELISA (3.2.8.8) nachgewiesen.

Wie in Abbildung 4.27 zu sehen ist, sezernierten die mit IL-2/IL-12 kultivierten T-Zellen XIE6 bereits zu Versuchsbeginn 375 pg/ml IL-10. Nach der 36-stündigen Koinkubation mit autologen immortalisierten Nierenzellen MZ2733NNSV und mit autologen NZK-Zellen MZ2733RC wurde eine Induktion der IL-10-Produktion auf 721 pg/ml bzw. 1130 pg/ml beobachtet.

4.3.3.7 Analyse des CD3-TZR-Längenpolymorphismus

Da jede T-Zelle nur einen spezifischen TZR, der aus einer V α - und einer V β -Kette gebildet wird, auf ihrer Zelloberfläche exprimiert, können verschiedene Populationen von T-Zellen innerhalb einer T-Zelllinie aufgrund der Variabilität ihrer TZR voneinander unterschieden werden.

In TZR-Analysen von PBL2733, TIL2733 und den verschiedenen T-Zelllinien wurde das Repertoire von prominent exprimierten TZR-Familien untersucht (3.2.6.3). Aufgrund der regelmäßig zu beobachteten Variabilität in den Transkriptlängen der CD3-TZR-Ketten wurden die verschiedenen V α -Ketten und V β -Ketten zu sog. TZR V α -Ketten- bzw. TZR V β -Ketten-Familien in Tabelle 4.9 zusammengefasst.

Tabelle 4.9: TZR V α - und V β -Ketten-Familien in autologen TIL

	PBL	CD4 ⁺ TIL	CD8 ⁺ TIL
V α	24	5, 6, 8, 12, 22, 23, 25	1, 6, 8, 9, 17, 20, 22, 25, 26, 28, 29, 30
V β		5, 6, 7, 10, 12, 19	5, 6, 12, 13, 17, 22

TIL wurden durch ein Separationsverfahren mit spezifischen mAk in Populationen von CD3⁺/CD4⁺- und CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen aufgetrennt. Aus 1x10⁶ Zellen wurde die RNA isoliert, revers transkribiert und zur Bestimmung des V α -Ketten und V β -Ketten TZR-Längenpolymorphismus, wie in (3.2.6.3) beschrieben, verwendet.

Die Tabelle 4.9 gibt alle variablen TZR-V α - und -V β -Ketten wieder, die in den *in vitro* expandierten und nach CD3⁺/CD4⁺- und CD3⁺/CD8⁺- getrennten T-Zellen der TIL nachgewiesen wurden. Hierbei wurden in der Population der CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen deutlich mehr verschiedene variable V α -Ketten nachgewiesen als in der Population der CD3⁺/CD4⁺-T-Zellen. Anschließend wurden die Ergebnisse dieser molekularen Charakterisierung mit einer durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD3⁺/CD8⁺ TIL verglichen.

Das Vorhandensein prominenter Transkripte von variablen TZR-Ketten ist nicht notwendigerweise mit der Bildung eines funktionellen, auf der Zelloberfläche exprimierten TZR verknüpft. Durch spezifische mAk wurde die Zelloberflächenexpression der variablen TZR-V β -Ketten-Familien in CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen nachgewiesen (Abbildung 4.28).

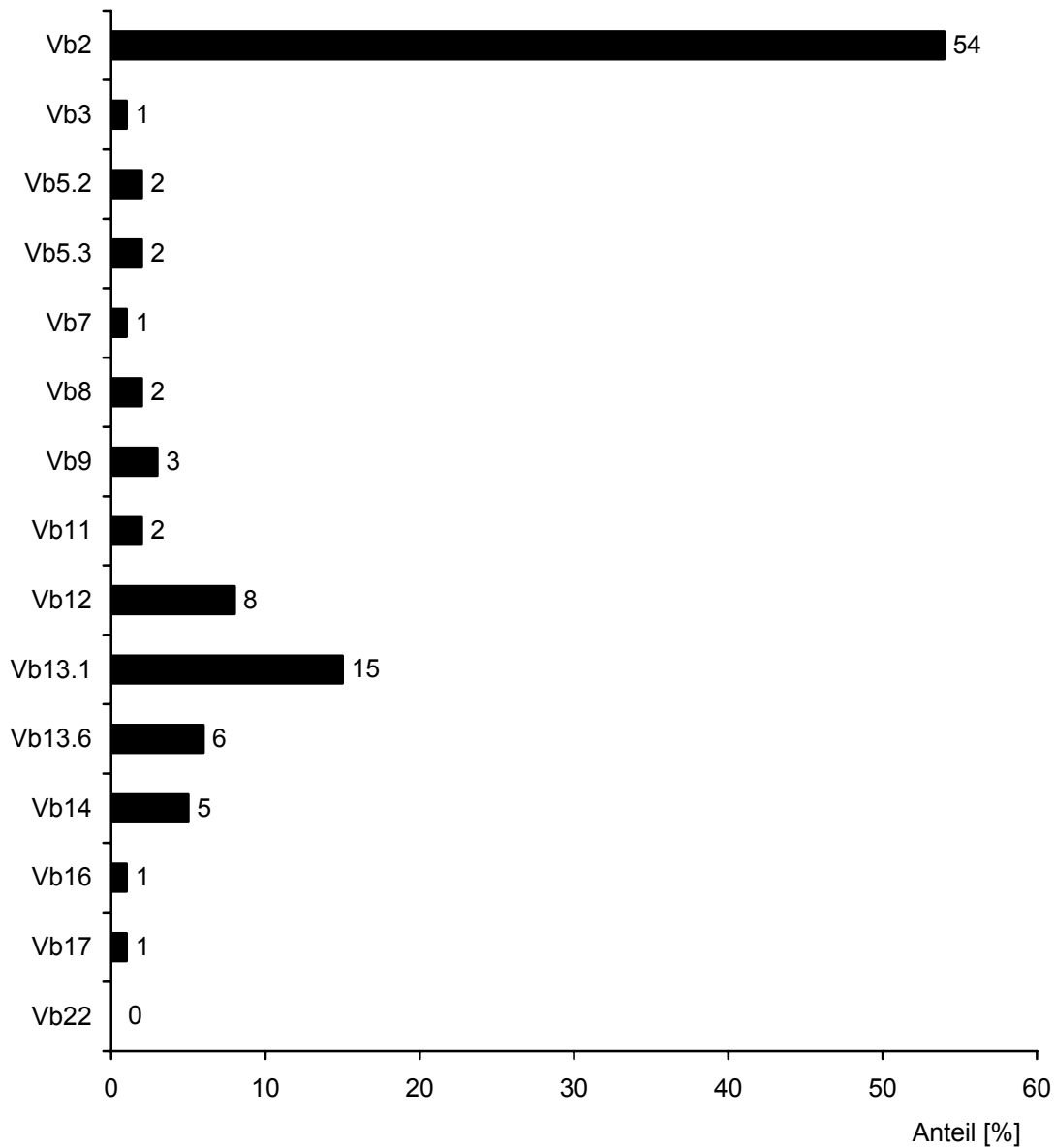


Abbildung 4.28: Frequenz der exprimierten TZR-Vβ-Ketten der CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen in TIL2733. 5 x 10⁶ CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen wurden aufgereinigt und mit mAk spezifisch für verschiedene TZR-Vβ-Ketten-Familien inkubiert und durchflusszytometrisch vermessen.

In den *in vitro* expandierten TIL des Patienten MZ2733 wurden verschiedene TZR-Vβ-Ketten-Familien nachgewiesen, die mit unterschiedlicher Frequenz exprimiert wurden, siehe Abbildung 4.28. Mit 54 %igem Anteil wird die TZR-Vβ-Ketten-Familie Vβ2 am häufigsten exprimiert, gefolgt von Vβ13.1 mit 15 %, Vβ12 mit 8 %, Vβ13.6 mit 6 % und Vβ14 mit 5 %. Im Gegensatz dazu wurde in den PBL des Tumorpatienten nur die prominente TZR-Vα-Ketten-Familie Vα24 und keine prominente Vβ-Ketten-Familie detektiert. Ein Vergleich der Analyse des CD3-Rezeptor-Längenpolymorphismus mit der durchflusszytometrischen Charakterisierung zeigte zudem, dass nur einige der

molekularbiologisch nachgewiesenen Transkripte auch als Bestandteil funktioneller CD3-TZR-Komplexe vorkommen. Zudem wurden die TZR-Analysen auf die autologen T-Zelllinien ausgeweitet, siehe Tabelle 4.10.

Tabelle 4.10: Variable TZR-Familien der *in vitro* generierten T-Zelllinien

	T-Zelllinien			
	XIE6	XIIIF8	XIVE1	XVD6
V α	2, 7, 19, 22	7	3, 15	4
V β	1, 13	6, 9	9, 17, 22	9, 17

Die T-Zelllinien XI E6, XIII F8, XIV EI, XV D6 exprimieren verschiedene TZR-V α - und V β -Ketten-Familien. Aus 1×10^6 Zellen wurde RNA isoliert, revers transkribiert und zur Bestimmung des V α -Ketten und V β -Ketten TZR-Längenpolymorphismus mit spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert.

Die T-Zelllinien XIE6, XIIIF8, XVD6 exprimieren die Transkripte von je zwei verschiedenen und die T-Zelllinie XIVE1 von mindestens drei verschiedenen TZR-V β -Ketten-Familien. Gleichzeitig ergab die V α -Ketten-Analyse, dass bis zu vier verschiedene TZR-V α -Ketten-Familien in XIE6 (V α 2, V α 7, V α 19, V α 22) und zwei verschiedene TZR-V α -Ketten-Familien in XIVE1 (V α 3, V α 15) gleichzeitig transkribiert werden. In der parallel dazu analysierten cDNS aus PBL wurden keine dominant transkribierten V β -Ketten detektiert. Ein Vergleich der Variabilität von V α - und V β -Ketten ergab, dass die V β -Kette 9 (V β 9) und die V β -Kette 17 (V β 17) in drei bzw. zwei T-Zelllinien detektiert wurden. Im Gegensatz dazu variierten die V α -Ketten stärker und wurden jeweils nur einmal in den verschiedenen T-Zelllinien nachgewiesen. Mittels spezifischer mAk wurde die Zelloberflächenexpression der verschiedenen TZR-Familien überprüft.

4.3.3.8 Charakterisierung der TZR-V β -Ketten-Familien der T-Zelllinie XIE6

Mittels Durchflusszytometrie wurden die variablen TZR-V β -Ketten-Familien in der T-Zelllinie XIE6 detektiert. Zum Zeitpunkt der Analyse enthielt sie 7 % CD3⁺/CD4⁺-T-Zellen und 93 % CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen. Nach Trennung der CD3⁺/CD4⁺- und CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen durch CD8⁺-spezifische mAk (3.1.7) wurden die T-Zellen mit verschiedenen mAk, die spezifisch für die variablen TZR-V β -Ketten V β 23, V β 1 und V β 21.3 sowie für V β 13.1, V β 8 und V β 13.6 sind, inkubiert. Die anschließende durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass sich die T-Zelllinie XIE6 aus zwei T-Zellpopulationen mit zwei verschiedenen TZR-V β -Ketten-Familien zusammensetzt, siehe Abbildung 4.29.

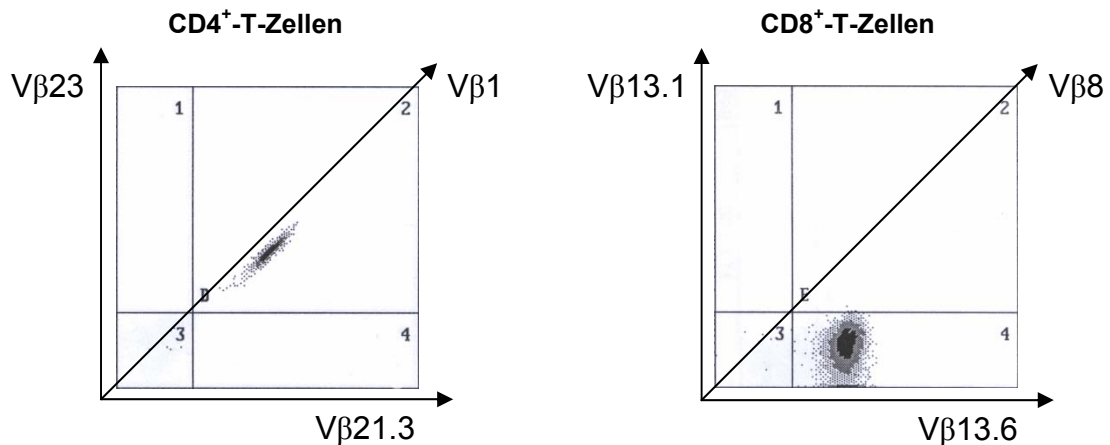


Abbildung 4.29 Charakterisierung der T-Zellpopulationen von XIE6. Jeweils $2,5 \times 10^5$ $CD3^+/CD4^+$ - bzw. $CD3^+/CD8^+$ -T-Zellen wurden mit $V\beta 1$ -, $V\beta 21.3$ -, $V\beta 23$ - bzw. mit $V\beta 8$ -, $V\beta 13.1$ - und $V\beta 13.6$ -spezifischen mAk inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

Die dargestellten Histogramme in Abbildung 4.29 zeigen die Zusammensetzung der T-Zelllinie XIE6. Von den $CD3^+/CD4^+$ -T-Zellen wird die variable TZR-V β -Ketten-Familie $V\beta 1$ und von den $CD3^+/CD8^+$ -T-Zellen die variable TZR-V β -Ketten-Familie $V\beta 13.6$ auf der Zelloberfläche exprimiert.

Die aus den $CD3^+/CD8^+/V\beta 13.6^+$ -T-Zellen isolierte TZR-Sequenz (sel1518) wurde mit Sequenzen, die in der Genbank (NCBI des NIH, USA) abgelegt sind, verglichen, siehe Abbildung 4.30.

```

sel1518      1 -----
AF387743    1 gctgtgtggccttttctctctgtgggcaggctccagtgaatgctggtgtcactcagaccocccaaaatccgcacatctgaagataggacagagcatgacact
AY124792    1 gctgtgtggccttttctctctgtgggcaggctccagtgaatgctggtgtcactcagaccocccaaaatccgcacatctgaagataggacagagcatgacact
AF395523    1 gtgtatgctggtgtcactcagaccocccaaaatccgcacatctgaagatgggacagagcatgacactgcagtygtcccaggatagaacca-----
AJ430689    1 gctgtgtggccttttctctctgtgggcaggctccagtgaatgctggtgtcactcagaccocccaaaatccgcacatctgaagataggacagagcatgacact

sel1518      1 -----taactacatgtactggtatcgacaagaccaggcatggggctgaagctgatttattattcagttggctgctggatc
AF387743    101 gcagtygtcccaggatagaaccataaactacatgtactggtatcgacaagaccaggcatggggctgaagctgatttattattcagttggctgctggatc
AY124792    101 gcagtygtcccaggatagaaccataaactacatgtactggtatcgacaagaccaggcatggggctgaagctgatttattattcagttggctgctggatc
AF395523    90 -----taactacatgtactggtatcgacaagaccaggcatggggctgaagctgatttattattcagttggctgctggatc
AJ430689    101 gcagtygtcccaggatagaaccataaactacatgtactggtatcgacaagaccaggcatggggctgaagctgatttattattcagttggctgctggatc

sel1518      77 actgataaaggagaagtcocgaatggctacaacgtctccagatcaaccacagaggatttcccgcacaggctggagttggctgctccctcccagacatctg
AF387743    201 actgataaaggagaagtcocgaatggctacaacgtctccagatcaaccacagaggatttcccgcacaggctggagttggctgctccctcccagacatctg
AY124792    201 actgataaaggagaagtcocgaatggctacaacgtctccagatcaaccacagaggatttcccgcacaggctggagttggctgctccctcccagacatctg
AF395523    166 actgataaaggagaagtcocgaatggctacaacgtctccagatcaaccacagaggatttcccgcacaggctggagttggctgctccctcccagacatctg
AJ430689    201 actgataaaggagaagtcocgaatggctacaacgtctccagatcaaccacagaggatttcccgcacaggctggagttggctgctccctcccagacatctg

sel1518      177 tgtacttctgtgccagcagt-----taccagggtgggata-actga---agct-----tctttggacaaggcaccagactcacagttgttagaggacct
AF387743    301 tgtacttctgtgccagcagt-----gaagcgggggggagg-tcaga---tacgcag---tattttggccaggcaccggctgacagttgcccaggacct
AY124792    301 tgtacttctgtgccagcagt-----ctacaggg-ggagta-tctgcccagca-----t--ttgggtgatgggactcgaactctccatctcagaggacct
AF395523    266 tgtacttctgtgccagcagtaacaatacagggggccgtcacacaga---tacgcag---tattttggccaggcaccggctgacagttgaccaggacct
AJ430689    301 tgtacttctgtgccagcacc-----tcccgggtcccata-ggtac---agatgcgcagatattttggccaggcaccggctgacagttgctcaggacct

sel1518      262 gaacaaggtgttcccaccogaggtcgtgtgtttgagccatcagaagcagagatctcccacacccaaaa
AF387743    389 gaaaaacgtgttcccaccogaggtcgtgtgtttgagccatcagaagcagagatctcccacaccc----
AY124792    386 gaacaaggtgttcccaccogaggtcgtgtgtttgagccatcagaagcagagatctcccacaccc----
AF395523    360 gaaaaacgtgttccca-----
AJ430689    392 gaacaaggtgttcccaccogaggtcgtgtgtttgagccatcagaagcagagatctcccacaccc----

```

Abbildung 4.30: Sequenzhomologie des $V\beta 13.6^+$ -TZR-XIE6 zu TZR-V $\beta 13.6$ -Sequenzen. Die aus der T-Zelllinie XIE6 isolierte TZR-Sequenz der $CD3^+/CD8^+$ T-Zellen besitzt große Sequenzhomologien (blau) zu TZR-V $\beta 13.6$ -Sequenzen AF387743, AY124792, AF395523 und AJ430689, die in der Genbank (NCBI des NIH, USA) publiziert wurden.

Der Abbildung 4.30 ist zu entnehmen, dass die TZR-Sequenz der aus der T-Zelllinie XIE6 isolierten CD3⁺/CD8⁺/Vβ13.6⁺-T-Zellen große Ähnlichkeit zu den in der Genbank (NCBI, NIH, USA) publizierten TZR-Vβ13.6-Sequenzen AF387743, AY124792, AF395523 und AJ430689 besitzt.

Auf einen 197 Bp langen homologen 5'-Sequenzabschnitt folgt ein hochpolymorpher Sequenzabschnitt, der für die hypervariable Region der Vβ13.6-Ketten kodiert und in allen dargestellten Sequenzen verschieden ist. Ab dem Nukleotid 255 ist die TZR-Sequenz sel1518 wieder homolog zu den bereits besprochenen TZR-Vβ13.6 Sequenzen.

4.4 Nachweis des nicht klassischen HLA-G-Antigens im NZK

Aufgrund der Beobachtung von eingeschränkten zytotoxischen Effektorleistungen in NK- und T-Zellen der *in vitro* expandierten TIL2733, in *in vitro* sensibilisierten T-Zellen aus autologen PBL2733 und der Schwierigkeiten, zytotoxische autologe CD3⁺/CD8⁺-T-Zelllinien zu generieren, wurde die Expression und funktionelle Bedeutung des nicht-klassischen HLA-G-Antigens im NZK untersucht. Dabei wurde zunächst in DNaseI-behandelter Gesamt-RNS und in Proteinpräparationen von etablierten NZK-Zelllinien und NZK-Biopsiematerial von Tumorpatienten HLA-G nachgewiesen.

4.4.1 Analyse der Expression von HLA-G in NZK-Zelllinien

Für diese Untersuchung wurden zunächst die NZK-Zelllinien LE89.15RC und MZ2733RC verwendet, die von einem autologen zytotoxischen CD3⁺/CD8⁺-T-Zell-Klon (Brouwenstijn et al., 1996) bzw. von der autologen CD3⁺/CD8⁺-T-Zelllinie XIE6 lysiert wurden. Zudem wurde die korrespondierende Nierenzelllinie MZ2733NNSV mitgeführt. Als Positivkontrolle für die HLA-G-Analyse wurde die Chorionkarzinomzelllinie JEG3 verwendet, in der die HLA-G Proteinexpression erstmals nachgewiesen wurde (Ishitani et al., 1994). Der Nachweis der HLA-G-Transkription erfolgte mittels RT-PCR unter Verwendung von 100 ng Gesamt-RNS und der pan-HLA-G-spezifischen Oligonukleotide G.257 bzw. G.1225 (Real et al., 1999), die sequenzspezifisch zu DNS-Abschnitten in Exon 2 bzw. in der 3'-nichttranslatierten Region des HLA-G-Gens sind. Parallel dazu wurde eine RT-PCR-Analyse auf β-Aktin-Transkripte durchgeführt, um eine semiquantitative Abschätzung zu formulieren, siehe Abbildung 4.31.

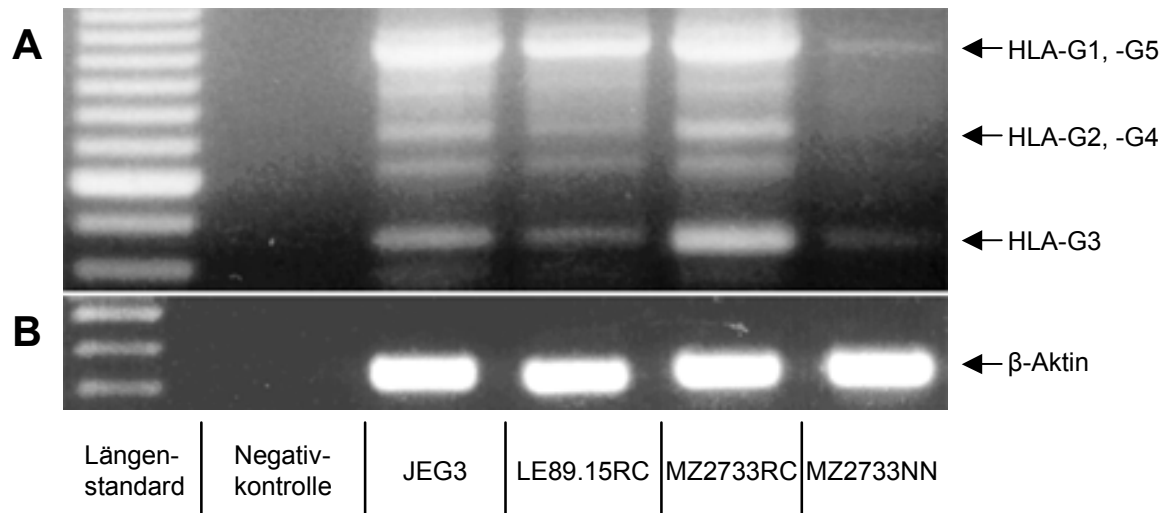


Abbildung 4.31: Detektion von verschiedenen HLA-G spezifischen Transkripten. Eine repräsentative RT-PCR-Analyse von HLA-G-Transkripten in der HLA-G⁺ Chorionkarzinomzelllinie JEG3, der NKZ-Zelllinien LE89.15RC, MZ2733RC und der korrespondierenden Nierenzelllinie MZ2733NNSV. Es wurden 100 ng von DNase I-vorbehandelter Gesamt-RNS zur Analyse der HLA-G- und β -Aktin-Transkription eingesetzt (3.2.6.2). **(A)** Ein 1%iges TAE-Agarosegel größenfraktionierter HLA-G-Amplifikons, die in Gegenwart eines 100 Bp-Längenstandards aufgetrennt wurden. Die Amplifikons entsprechen HLA-G1, -G5 (1 kB), -G2 und -G4 (750 Bp), -G3 (430 Bp). **(B)** Ein 1%iges TAE-Agarosegel korrespondierender β -Aktin-Amplifikons (330 Bp).

Die in Abbildung 4.31 A dargestellte Analyse zeigt, dass nach reverser Transkription und anschließender PCR in allen Zelllinien differentiell gespleißte HLA-G-Transkripte mit einer Größe von etwa 1 kB, 750 Bp sowie 430 Bp amplifiziert wurden. Diese HLA-G-Isoformen wurden für das Melanom beschrieben (Real et al., 1999). Zudem wurden weitere Amplifikate in der RNS der Chorionkarzinomzelllinie JEG3 und den beiden NZK-Zelllinien LE89.15RC und MZ2733RC detektiert, die eine Größe von 900 Bp sowie 650 Bp besitzen und noch nicht charakterisiert wurden. Obwohl gleiche Mengen von Gesamt-RNS eingesetzt wurden, wurden in den RT-PCR-Ansätzen der Chorionkarzinomzelllinie JEG3 und den beiden NZK-Zelllinien LE89.15RC und MZ2733RC mehr Amplifikate hergestellt als im Ansatz der Nierenzelllinie MZ2733NNSV. Im Gegensatz zur differentiellen Amplifikation von HLA-G-Transkripten wurde eine homogene reverse Transkription und Amplifikation von β -Aktin-RNS in allen vier Zelllinien beobachtet, siehe Abbildung 4.31 B.

4.4.2 Erweiterte HLA-G-Transkriptionsanalyse

Auf der Basis der HLA-G-Transkription in ausgewählten NZK-Zelllinien wurde die HLA-G-Analyse auf eine Serie von NZK-Zelllinien und auf NZK-Biopsiematerial eines größeren Patientenkollektivs ausgedehnt. Zunächst wurde die HLA-G-Transkription mit den pan-HLA-G-spezifischen Oligonukleotiden G.257 und G.1225 in dem NZK-System MZ2877RC durchgeführt. In diesem System ist es möglich, auf Biopsiema-

terial von Nierenepithel und Tumor sowie auf eine etablierte permanente NZK-Zelllinie zurückzugreifen, siehe Abbildung 4.32.

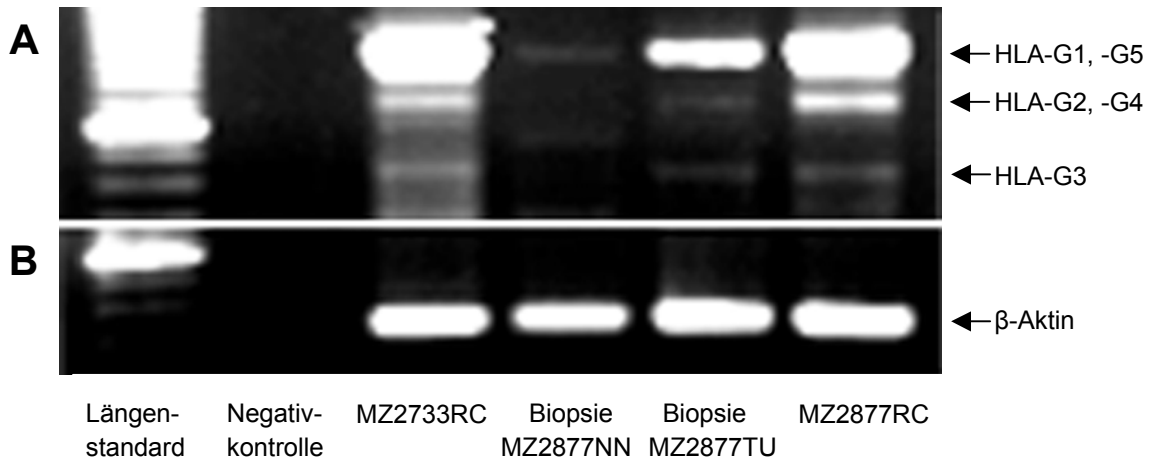


Abbildung 4.32: HLA-G-Transkripte in Tumorzelllinie und Biopsiematerial. Eine repräsentative RT-PCR-Analyse von HLA-G-Transkripten im NZK-System MZ2877RC. Von der HLA-G⁺ NZK-Zelllinie MZ2733RC (Positivkontrolle) und von Biopsiematerial und Zelllinie des NZK-Patienten MZ2877RC wurden 100 ng von DNase I-behandelter Gesamt-RNS zur Analyse der HLA-G- und β-Aktin-Transkription eingesetzt (3.2.6.2). **(A)** Ein 1%iges TAE-Agarosegel größenfraktionierter HLA-G-Amplifikons, die in Gegenwart eines 100 Bp-Längenstandards aufgetrennt wurden. Die Amplifikons HLA-G1, -G5 (~1 Kb), HLA-G2, -G4 (750 Bp) und HLA-G3 (430 Bp) sind sichtbar. **(B)** Ein 1%iges TAE-Agarosegel korrespondierender β-Aktin Amplifikons mit einer Größe von 330 Bp.

Wie Abbildung 4.32 A zeigt, wurden HLA-G-Amplifikons sowohl in der RNS von MZ2733RC als auch in den RNS-Präparationen des NZK-Systems MZ2877RC amplifiziert, jedoch unterscheiden sich die Mengen der hergestellten RT-PCR-Produkte. Nur marginale Mengen der HLA-G1/-G5 Amplifikons wurden in der Nierenepithelbiopsie MZ2877NN erhalten. Eine Induktion dieser beiden Transkripte wurde in der NZK-Biopsie MZ2877RC und in der NZK-Zelllinie MZ2877RC beobachtet. Darüber hinaus wurde auch die HLA-G2/-G4-Transkripte in der NZK-Zelllinie MZ2877RC nachgewiesen. Wie erwartet, wurden gleichgroße Mengen von β-Aktin-Amplifikons beobachtet. Aufgrund der differentiellen HLA-G-Transkription in den NZK-Systemen MZ2733RC und MZ2877RC wurde die HLA-G-mRNS-Expression in NZK-Zelllinien und Biopsien untersucht. Als Positivkontrolle diente die HLA-G⁺ NZK-Zelllinie MZ2733RC. Die Analyse erfolgte wiederum als RT-PCR unter Verwendung von pan-HLA-G-sequenzspezifischen Oligonukleotiden G.257 und G.1225. Um die Sequenzspezifität zu bestätigen, wurden die Amplifikate nach gelelektrophoretischer Größenfraktionierung auf eine Nylonmembran transferiert und anschließend mit der Exon 5-sequenzspezifi-

schen Sonde G.927 (Real et al., 1999) hybridisiert. Analog dazu erfolgte der Nachweis von β -Aktin, siehe Abbildung 4.33.

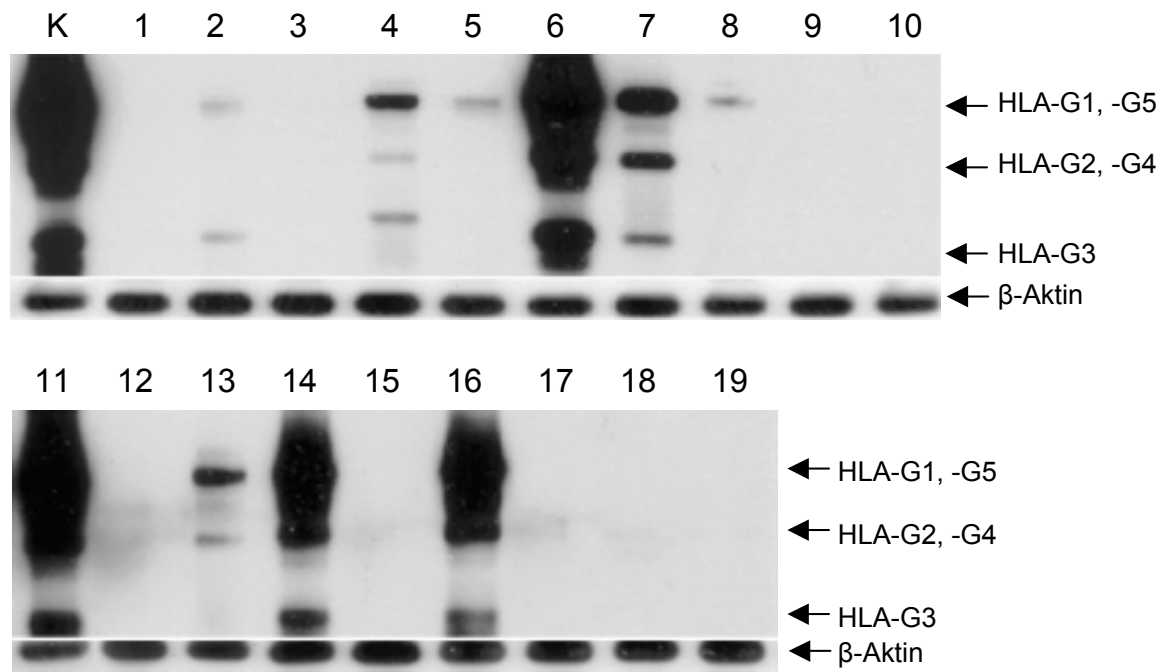


Abbildung 4.33: Detektion von HLA-G-Transkripten in NZK-Zelllinien. Southern Blot Detektionsverfahren von HLA-G- und β -Aktin-Transkripten in 19 verschiedenen NZK-Zelllinien. In jeweils 100 ng DNaseI-behandelte Gesamt-RNS wurden HLA-G- und β -Aktin-Transkripte in cDNS umgeschrieben und amplifiziert. Anschließend wurden die Amplikons auf einem 1 %igen Agarosegel größenfraktioniert, bevor sie auf eine Nylonmembran transferiert und mit der HLA-G-spezifischen Sonde G.927 hybridisiert wurden.

Wie in Abbildung 4.33 dargestellt, wurde in 10 von 19 untersuchten NZK-Zelllinien ein heterogenes HLA-G-Transkriptionsmuster nachgewiesen, wobei verschiedene HLA-G-Isoformen in den Zelllinien detektiert wurden. In den Zelllinien MZ1851RC, MZ2733RC, MZ2862RC-T2.1, MZ2877RC wurden die größten Mengen differentiell gespleißter HLA-G1/-G5-, -G2/-G4- und -G3-Transkripte detektiert, während in den Zelllinien MZ1795RC, MZ1851LN und MZ2861RC geringere Transkriptmengen von HLA-G1/-G5 bzw. -G2/-G4 und/oder -G3 nachgewiesen wurden. Im Gegensatz dazu wurde in den Zelllinien MZ1774RC, MZ1846RC, MZ1879RC nur marginale Mengen von HLA-G1/-G5- bzw. -G3-Transkripten detektiert. Um eine eventuelle Assoziation von HLA-G und klassischen HLA Klasse I-Allelen aufzuzeigen, wurde der HLA Klasse I-Phänotyp der NZK-Zelllinien bestimmt und der HLA-G-Expression gegenübergestellt, siehe Tabelle 4.11.

Tabelle 4.11: HLA-G-Transkriptionsmuster in NZK-Zelllinien

Nr.	Zelllinie	HLA- Klasse I Phänotyp	HLA-G-Transkripte
1	MZ1257RC	A2, A3, B4, B44, Cw5, Cw7	-
2	MZ1774RC	A11, A30, B13, B18, Cw5,Cw6	+
3	MZ1790RC	A25, B18, B44, Cw4, Cw12	-
4	MZ1795RC	A3, A29, B7, Cw7	++
5	MZ1846RC	A2, A11, B7, B15, Cw7, Cw10	+
6	MZ1851RC	A1, A2, B7, B44, Cw7	+++
7	MZ1851LN	A1, A2, B7, B44, Cw7	++
8	MZ1879RC	A1, A2, B8, B18, Cw7	+
9	MZ1940RC	A1, A23, B37, B5, Cw6	-
10	MZ1973RC	A1, A2, B8, B40, Cw7, Cw10	-
11	MZ2733RC	A1, A2, B7, B49, Cw4, Cw7	+++
12	MZ2858RC	A2, A11, B7, B15, Cw3, Cw7	-
13	MZ2861RC	A3, A29, B7, B44, Cw7, Cw16	++
14	MZ2862RCT2.1	A2, A26, B38, B56, Cw1, Cw12	+++
15	MZ2865RCT3	A2, B8, B44, Cw5, Cw7	-
16	MZ2877RC	A1, A3, B8, B38, Cw7, Cw12	+++
17	MZ2885RC	A3, B7, Cw7	-
18	MZ2902RC	A1, A2, B8, B55, Cw3, Cw7	+/-
19	MZ2905RC	A3, B7, B18, Cw7, Cw12	-

In der Tabelle sind von 19 analysierten NZK-Zelllinien die HLA Klasse I-Phänotypen und die Detektion von HLA-G-Transkripten gegenübergestellt.

Wie erwartet, besitzen die verschiedenen NZK-Zelllinien unterschiedliche HLA Klasse IPhänotypen, wobei die NZK-Zelllinien mit der stärksten HLA-G-Transkription HLA-A1- und/oder -A2-Allele exprimieren. Eine weitergehende Korrelation lässt sich nicht beobachten.

Die verschiedenen HLA-G-Spleißvarianten der einzelnen NZK-Zelllinien wurden mit sequenzspezifischen Hybridisierungssonden für die einzelnen Exons und Introns bestimmt, siehe (Tabelle 4.12).

Tabelle 4.12: HLA-G-spezifische Hybridisierungssonden

Hybridisierungssonde	Nachweis
GR	Exon 2
I2	Intron 2
G.526	Exon 3
I3	Intron 3
G.647	Exon 4
I4	Intron 4
G.927	Exon 5
I5	Intron 5

Im Einzelnen wurden die Sonden GR (Exon 2), Intron 2, G.526 (Exon 3), Intron 3, G.647 (Exon 4), Intron 4, G.927 (Exon 5) und Intron 5 verwendet (3.1.10). Die Ergebnisse der Analyse der verschiedenen Spleißvarianten des HLA-G-Allels in den NZK-Zelllinien ist in Tabelle 4.13 zusammengefaßt.

Tabelle 4.13: Differentielle HLA-G Spleißvarianten in NZK-Zelllinien

Nr.	Zelllinie	HLA-G1	HLA-G2	HLA-G3	HLA-G4	HLA-G5	HLA-G6	HLA-G7
1	MZ1774RC	+/-	-	+/-	-	-	-	-
2	MZ1795RC	+	+/-	+/-	-	-	-	-
3	MZ1846RC	+/-	-	-	-	-	-	-
4	MZ1851RC	+++	+++	+++	-	+++	+	++
5	MZ1851LN	+/-	++	+	-	-	+	-
6	MZ1879RC	+/-	-	-	-	-	-	+
7	MZ2733RC	+++	+++	+++	-	+++	+	++
8	MZ2861RC	++	+	+/-	-	+	-	-
9	MZ2862RCT2.1	+++	+++	++	-	+++	++	+/-
10	MZ2877RC	+++	+++	+	-	+++	++	+/-
11	MZ2902RC	+/-	-	-	-	-	-	-

Verteilung der verschiedenen HLA-G-Spleißvarianten in den HLA-G⁺ NZK-Zelllinien. Mit Exon- und Intron-spezifischen Hybridisierungssonden wurden verschiedene Spleißvarianten identifiziert und gemäß ihrer Amplifikationseffizienz charakterisiert als „-“ nicht nachweisbar; „+/-“ marginal, „+“ nachweisbar, „++“ gut nachweisbar, „+++“ sehr gut nachweisbar.

Wie in Tabelle 4.13 gezeigt, wurde in allen NZK-Zelllinien das HLA-G1-Transkript in unterschiedlichen Mengen und das HLA-G4-Transkript gar nicht nachgewiesen. In den NZK-Zelllinien MZ1851RC, MZ2733RC, MZ2862RC und MZ2877RC wurden mit Ausnahme von HLA-G4 sogar alle HLA-G-Transkripte nachgewiesen. Interessanterweise exprimiert die Lymphknotenmetastasen-Zelllinie MZ1851LN im Vergleich zur NZK-Zelllinie des Primärtumors MZ1851RC ein verändertes HLA-G-Transkriptionsmuster, wobei alle detektierten HLA-G-Transkripte schwächer exprimiert werden und das HLA-G7-Transkript nicht nachweisbar ist.

Es stellte sich die Frage, ob die *in vitro* Ergebnisse auch *in situ* in Biopsiematerial von Nierenzellkarzinomen beobachtet werden. Aus diesem Grunde wurde RNS aus 30 Nieren- und autologen NZK-Biopsien zur HLA-G-Analyse verwendet, siehe Abbildung 4.34.

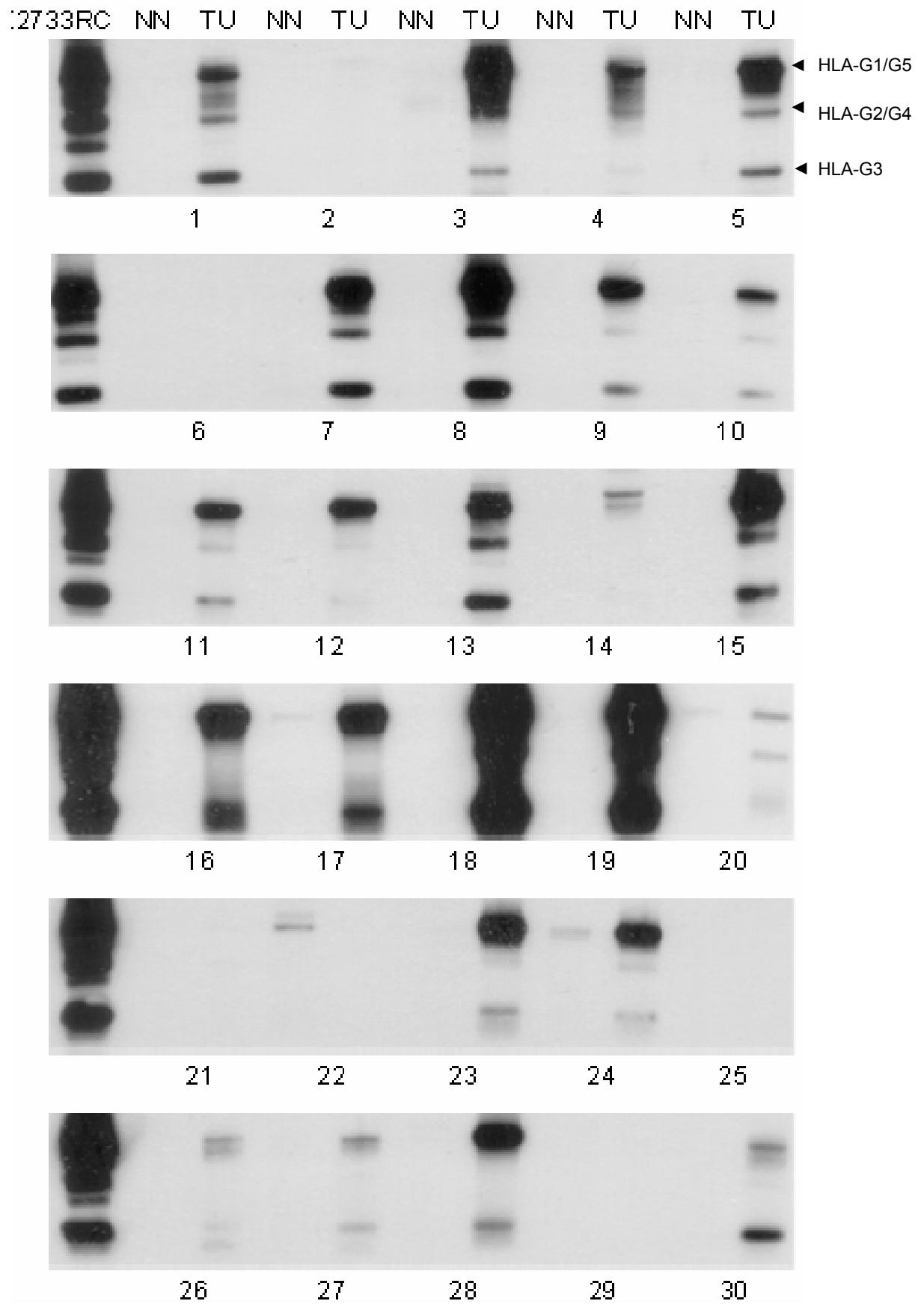


Abbildung 4.34: HLA-G-Detektion in Biopsiematerial von 30 NZK-Patienten. Jeweils 100 ng DNaseI-behandelte Gesamt-RNS von 30 autologen Biopsiepärchen von Nierenepithel (NN) und Tumorfrent (TU) von NZK-Patienten wurden zur HLA-G-spezifischen reversen Transkription und Amplifikation mit den Oligonukleotiden G.257 und G.1225 eingesetzt und 1/5 Volumen jedes Reaktionsansatzes wurde gelelektrophoretisch größenfraktioniert und auf Nylonmembran transferiert (3.2.6.6.1). Die Southern Blots wurden mit der Exon 5-spezifischen Sonde G.927 hybridisiert und durch ein Chemolumineszenzverfahren (3.2.6.6.4) dargestellt.

Wie in Abbildung 4.34 zu sehen, wurden in Biopsiepärchen von 30 NZK-Patienten HLA-G-Amplifikate in 24 Tumor- und in 4 Nierenbiopsien nachgewiesen, wobei verschiedene HLA-G-Amplifikate in unterschiedlicher Intensität beobachtet wurden. Im Detail wurden in allen HLA-G⁺ Biopsien HLA-G1/G5-Transkripte nachgewiesen, wobei die Nachweisintensität schematisch von „marginal“ bis „sehr gut nachweisbar“ auf eine 1 bis 15 minütige Film-Expositionszeit bezogen wurde. Zum Beispiel waren die Hybridisierungssignale für die HLA-G1/-G5 Amplifikate in den Nierenbiopsien der Tumorpatienten 17, 20, 22, 24 von marginaler Intensität. Im Gegensatz dazu waren diese Amplifikate in den Tumorbiopsien der Patienten 3, 8, 15, 18, 19 sehr gut nachweisbar.

Um die charakteristischen HLA-G-Spleißvarianten der HLA-G⁺ Nierentumore zu analysieren, wurden die mit den pan-HLA-G-spezifischen Oligonukleotiden G.257 und G.1225 hergestellten Amplifikate auf Nylonmembranen transferiert und mit den Exon- und Intron-spezifischen Sonden (Tabelle 4.12) hybridisiert. Die folgende Tabelle 4.14 fasst die Ergebnisse für die HLA-G⁺ NZK-Biopsien zusammen.

Tabelle 4.14: Detektion von HLA-G-Transkripten in HLA-G⁺ NZK-Biopsien

Nr.	HLA-G1	HLA-G2	HLA-G3	HLA-G4	HLA-G5	HLA-G6
1	++	+/-	++	+/-	+	+
2	+++	+	+	+/-	+++	+++
3	++	+/-	+/-	+/-	+	+
4	+++	+/-	+	+/-	++	++
5	+++	+	++	+/-	++	++
6	+++	++	+++	+/-	++	++
7	+++	+	+	+/-	++	++
8	++	+/-	+	+/-	+	+
9	+++	+/-	+	+/-	+	+
10	+++	-	+	+/-	++	+
11	+++	++	++	+/-	+	+
12	+	-	-	-	+	-
13	+++	++	++	+/-	++	++
14	++	-	++	-	+/-	-
15	++	-	++	-	+/-	-
16	++	++	+++	+/-	+	+
17	+++	++	+++	+/-	+/-	+
18	+	-	-	-	-	-
19	++	+	++	-	++	++
20	++	+	++	-	+	+
21	+	-	+	-	+	+
22	+	+/-	+	-	-	-
23	++	-	++	+/-	+/-	++
24	+	+	++	-	-	-
Σ	24	17	22	15	21	18

Die in den 24 verschiedenen HLA-G⁺ NZK-Biopsien nachgewiesenen HLA-G-Transkripte wurden mit verschiedenen Exon- und Intron-spezifischen Hybridisierungssonden nach Transfer auf Nylonmembran detektiert. Hierbei wurden differentielle HLA-G-Spleißmuster beobachtet, die sich in Zusammensetzung und Intensität der Detektion unterschieden: „-“ nicht nachweisbar, „+/-“ marginal, „+“ nachweisbar, „++“ gut nachweisbar, „+++“ sehr gut nachweisbar.

Gemäß Tabelle 4.14 wurden in den HLA-G⁺ NZK-Biopsien 6 verschiedene Spleißvarianten von HLA-G nachgewiesen, während die HLA-G7-spezifische Isoform nicht detektiert wurde. Insgesamt wurden in den verschiedenen Tumorbopsien mit hoher Frequenz die Transkripte von HLA-G1 (100 %), HLA-G3 (91 %) und HLA-G5 (88 %) detektiert. Seltener wurden die Transkripte HLA-G2 (71 %), HLA-G4 (63 %) und HLA-

G6 (75 %) nachgewiesen. Im Gegensatz zu den NZK-Zelllinien wurde das HLA-G4-Transkript in 63% aller NZK-Biopsien nachgewiesen.

4.4.3 Analyse der HLA-G-Translation in NZK-Zelllinien

Um die Ergebnisse der Transkriptionsanalysen mit einer möglichen HLA-G-Translation zu korrelieren, wurde die HLA-G-Proteinexpression mittels Immunpräzipitation in HLA-G⁺ und HLA-G⁻ NZK-Zelllinien untersucht. Dabei wurden die HLA-G⁺ NZK-Zelllinien MZ1851RC (Seliger et al., 1997), LE89.15RC (Brouwenstijn et al., 1996), MZ2733RC und die autologe HLA-G⁻ Nierenzelllinie MZ2733NNSV der Chorionkarzinomzelllinie JEG3, gegenübergestellt.

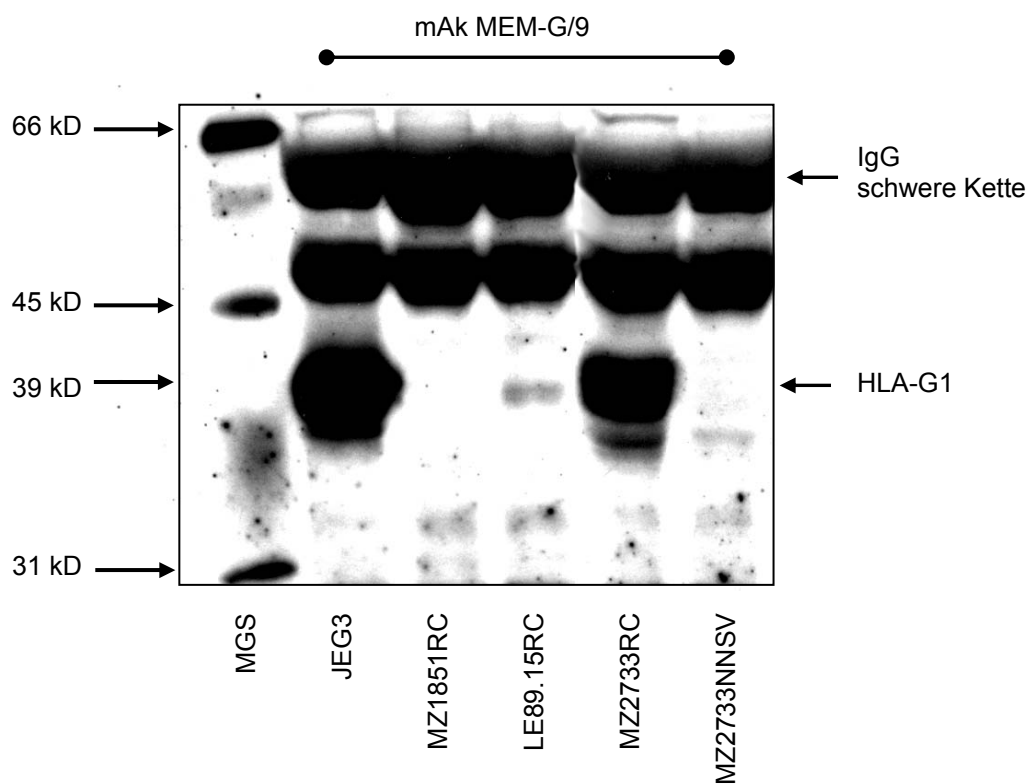


Abbildung 4.35: Detektion des HLA-G1-Moleküls in Immunpräzipitaten von NZK-Zelllinien.

Western Blot von Immunpräzipitaten mit dem HLA-G1-spezifischen mAk MEM-G/9 in TX114 Lysaten von 5×10^6 Zellen von HLA-G⁺ NZK-Zelllinien MZ1851RC, LE89.15RC und MZ2733RC sowie der Nierenzelllinie MZ2733NNSV. Die Chorionkarzinomzelllinie JEG3 diente als Positivkontrolle. Die Detektion von HLA-G1 auf dem Western Blot erfolgte mit dem mAk MEM-G/1. MGS: Molekulargewichtsstandard.

Der zur Detektion verwendete mit Meerrettichperoxidase konjugierte anti-Maus IgG Sekundärantikörper, erkennt die schweren Ketten der zur spezifischen Immunpräzipitation und anschließenden Detektion eingesetzten HLA-G-spezifischen mAk. HLA-G1-

spezifische Signale mit einer Größe von 39 kD wurden mit dem mAk MEM-G/1 in den Lysaten der HLA-G⁺ JEG3-, LE89.15RC- und MZ2733RC-Zellen detektiert. Im Gegensatz dazu wurde in den Immunpräzipitaten der HLA-G⁺ NZK-Zelllinie MZ1851RC und der HLA-G⁻ Nierenzelllinie MZ2733NNSV kein HLA-G1-Protein nachgewiesen.

Ob die verschiedenen detektierten Spleißvarianten in den HLA-G⁺ NZK-Zelllinie zur Expression alternativer Translationsprodukte führen, wurde in Immunpräzipitationen mit dem mAk HC-A2, der eine antigene Determinante der α 1-Domäne der schweren Kette des HLA-A1-Moleküls bindet und kreuzreaktiv für die schwere Kette des nicht-klassischen HLA-G-Moleküls ist (Sernee, et al., 1998), nachgewiesen.

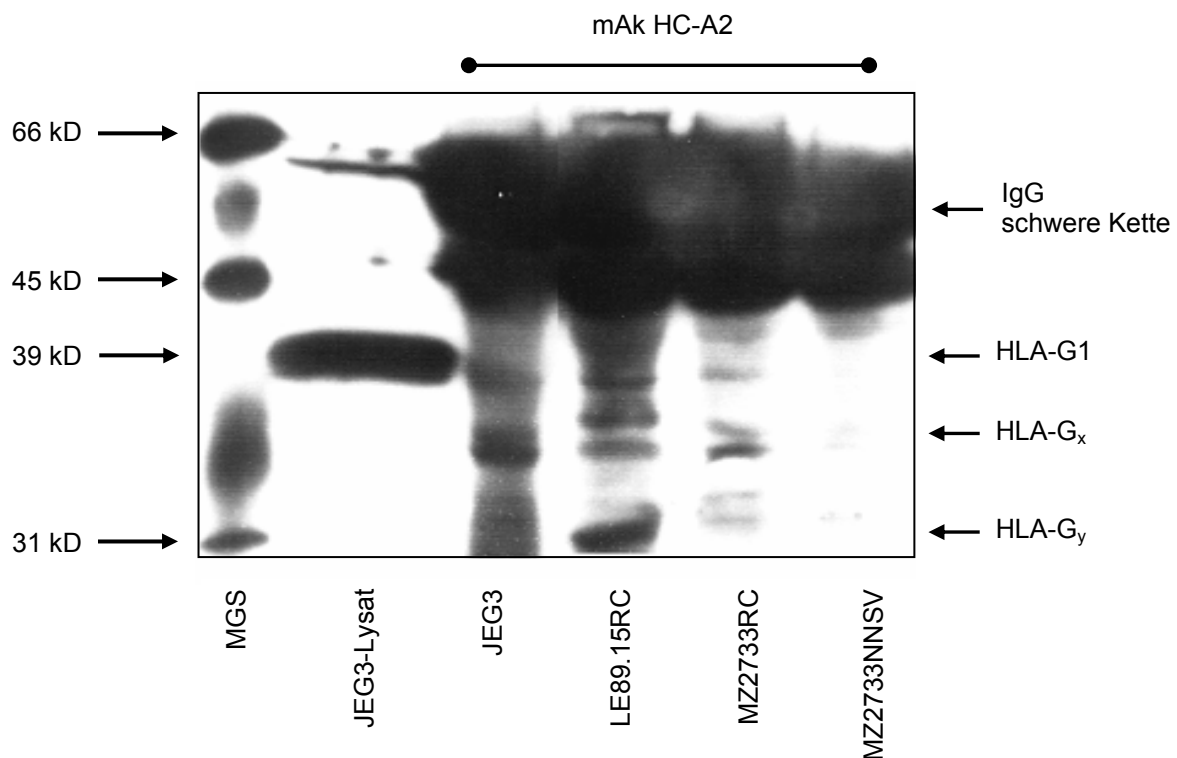


Abbildung 4.36: Nachweis von β_2 -Mikroglobulin-freien HLA-G-Molekülen in NZK-Zelllinien.

Western Blot von Immunpräzipitaten des mAk HC-A2 in TX114 Lysaten der Chorionkarzinomzelllinie JEG3, der NZK-Zelllinien LE89.15RC, MZ2733RC und der Nierenzelllinie MZ2733NNSV. Die Immunpräzipitate, ein Molekulargewichtsstandard (MGS) und ein Totallysat von JEG3-Zellen wurden in einem 10% igen PAA-Gel größenfraktioniert und auf eine PVDF-Membran transferiert (3.2.8.5). Mit dem HLA-G-spezifischen mAk MEM-G/1 wurden die HLA-G-Isoformen HLA-G1 und die nicht näher spezifizierbaren Moleküle HLA-G_x und HLA-G_y detektiert.

Wie in Abbildung 4.36 dargestellt, detektierte der Sekundärantikörper die schweren Ketten des zur Immunpräzipitation verwendeten mAb HC-A2 und des HLA-G-spezifischen mAk MEM-G/1. Aufgrund der unterschiedlichen Molekulargewichte sind die HLA-G-spezifischen Signale deutlich von der Hintergrundreaktion abzugrenzen. Ein

Zellysate von JEG3 Zellen wurde mitgeführt, um nicht immunpräzipitierte HLA-G1-Moleküle darzustellen. Aus TX114 Lysaten der HLA-G⁺ Tumorzelllinien JEG3, LE89.15RC und MZ2733RC wurden HLA-G-Proteine mit Molekulargewichten von 39 kD (HLA-G1), 35 kD (HLA-G_x) und 31 kD (HLA-G_y) detektiert. Es wurden keine HLA-G-Proteine in der Nierenzelllinie MZ2733NNSV nachgewiesen.

4.4.4 HLA-G⁺ NZK-Zelllinien sezernieren lösliche HLA-G5-Moleküle

Aus früheren Untersuchungen war bereits bekannt gewesen, dass die Chorionkarzinomzelllinie JEG3 die drei löslichen HLA-G-Isoformen HLA-G-5, -6, -7 ins Zellkulturmedium sezerniert (Fujii et al., 1994; Paul et al., 2000). Auf Basis der bisherigen Ergebnisse wurde mittels Immunpräzipitation (3.2.8.7) untersucht, ob auch in den Zellkulturüberständen der HLA-G⁺ NZK-Zelllinien lösliche HLA-G-Moleküle nachzuweisen sind, siehe Abbildung 4.37.

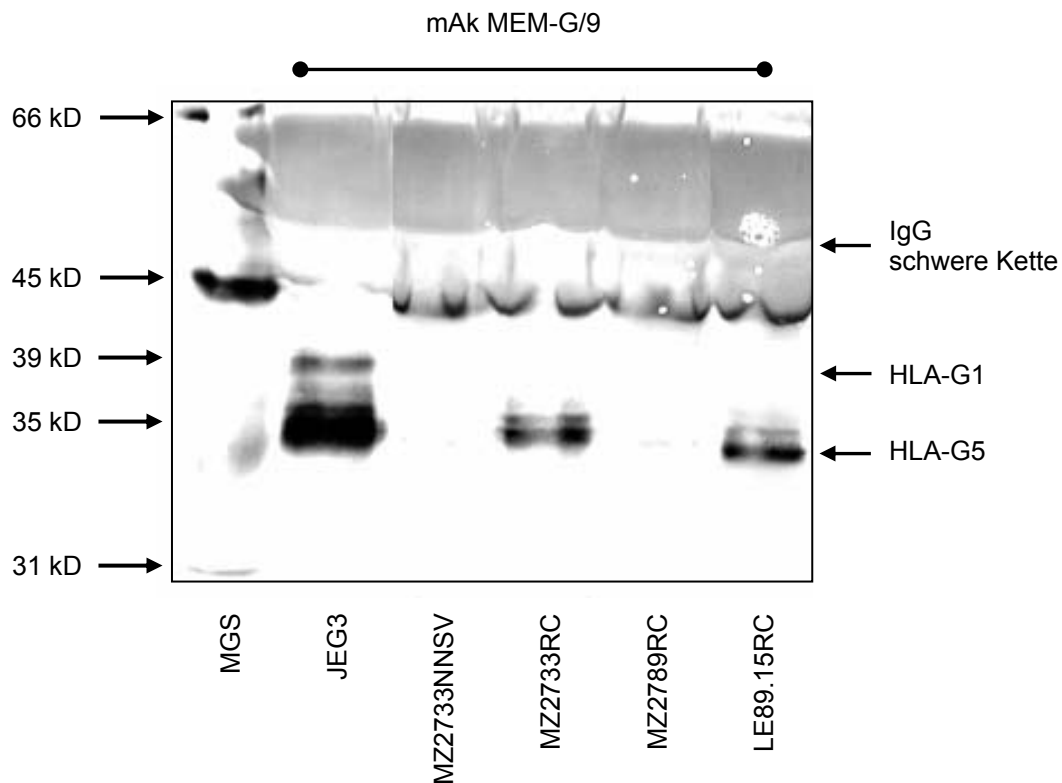


Abbildung 4.37: Nachweis von HLA-G5-Molekülen im Überstand von HLA-G⁺ NZK-Zelllinien.

Western Blot von Immunpräzipitaten des HLA-G-spezifischen mAk MEM-G/9 aus 6 ml Zellkulturüberstand konfluent bewachsener Zellkulturschalen von HLA-G⁺ Tumorzelllinien JEG3, LE89.15RC und MZ2733RC, der Nierenzelllinie MZ2733NNSV und der HLA-G⁻ NZK-Zelllinie MZ2789RC. Die Immunpräzipitate wurden zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard (MGS) mittels PAGE größenfraktioniert und auf eine PVDF-Membran transferiert. Auf dem Western Blot wurden die HLA-G5 Moleküle mit dem HLA-G-spezifischen mAk MEM-G/1 detektiert.

Wie Abbildung 4.37 zeigt, wurden mit dem mAk MEM-G/9 sezernierte HLA-G5-Moleküle mit einem ungefähren Molekulargewicht von 35 kD aus dem Überstand von konfluenten Kulturen der HLA-G⁺ JEG3-, LE89.15RC- und MZ2733RC-Zellen jedoch nicht aus Überständen der HLA-G⁻ NZK-Zelllinie MZ2789RC und der Nierenzelllinie MZ2733NNSV immunpräzipitiert.

4.4.5 HLA-G⁺ NZK-Zelllinien präsentieren HLA-G1-Antigene

Nach dem Nachweis von verschiedenen HLA-G-Genprodukten in den untersuchten HLA-G⁺ NZK-Zelllinien LE89.15RC und MZ2733RC wurde eine Lokalisation von HLA-G1-Molekülen auf der Zelloberfläche mittels des mAk MEM-G/9 (Fournel et al., 2000) untersucht. Dabei interessierte besonders die Frage der Induzierbarkeit der HLA-G1-Präsentation nach 48-stündiger Behandlung der Zellen mit dem Zytokin IFN- γ , siehe Abbildung 4.38. Die Untersuchung folgte dem Verfahren, das zur Untersuchung der klassischen HLA Klasse I-Präsentation in NZK-Zelllinien beschrieben wurde (Seliger et al., 1997).

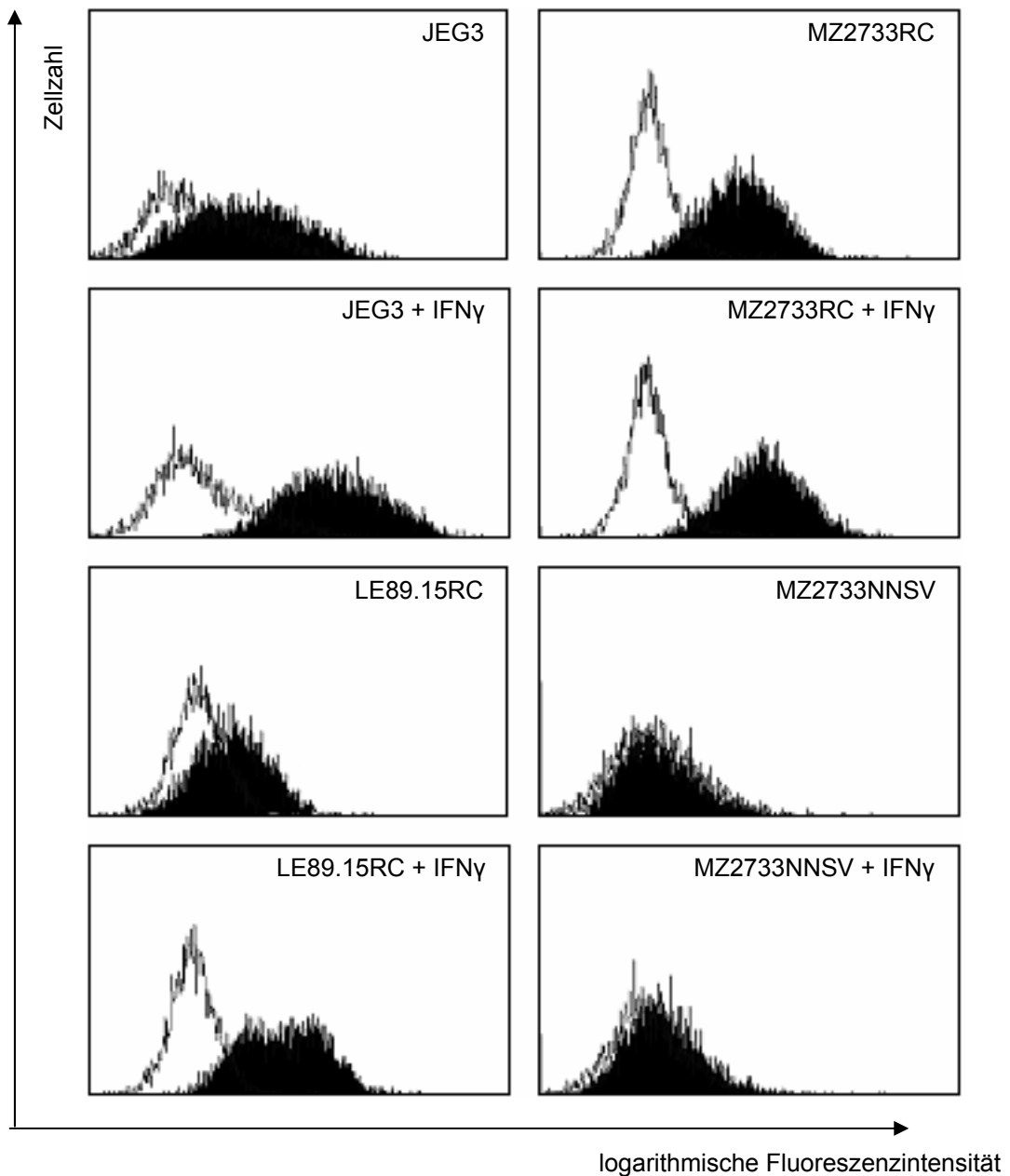


Abbildung 4.38: Konstitutive und IFN- γ -induzierte HLA-G1-Präsentation. Repräsentative durchflusszytometrische Analysen der HLA-G1 Zelloberflächenlokalisierung von unbehandelten oder für 48 Stunden mit IFN- γ vorbehandelten JEG3-, LE89.15-, MZ2733RC- und MZ2733NNSV-Zellen. Jeweils 2×10^5 wurden mit dem HLA-G-spezifischen mAK MEM-G/9 bzw. einem murinen Isotypkontroll-Antikörper inkubiert. Die Detektion von HLA-G1 wurde mit einem gegen murines IgG gerichteten Sekundärantikörper, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC konjugiert war, nachgewiesen. Weiße Gipfel: IgG-unspezifische Detektion, schwarze Gipfel HLA-G-spezifische Detektion. Die Werte auf der x-Achse sind ein Maß für die gemessene logarithmische Fluoreszenzintensität, die Werte auf der y-Achse geben die Zellzahl wieder.

Wie Abbildung 4.38 zeigt, wurden auf der Zelloberfläche von JEG3-, LE89.15RC- und MZ2733RC-Zellen, jedoch nicht auf MZ2733NNSV-Zellen HLA-G1-Moleküle mit dem

mAk MEM-G/9 detektiert. Auf MZ2733RC-Zellen wurde eine mit JEG3-Zellen vergleichbare konstitutive HLA-G1-Präsentation beobachtet. Durch die 48-stündige Inkubation mit IFN- γ wurde die HLA-G1-Präsentation auf JEG3-, LE89.15RC- und MZ2733RC-Zellen, jedoch nicht auf MZ2733NNSV-Zellen induziert.

4.4.6 Inhibition von Effektorzellen durch HLA-G⁺ MZ2733RC-Zellen

In früheren Experimenten wurde gezeigt, dass eine HLA-G1-Präsentation zu einer Inhibition von peptidspezifischen zytotoxischen T-Zellen führt (Le Gal et al., 1999). Analog hierzu wurde die physiologische Relevanz der HLA-G1-Präsentation im NZK-System MZ2733RC in Zytotoxizitätsexperimenten untersucht. Hierfür wurde in Parallelansätzen die Sensitivität von HLA-G⁻ MZ2733NNSV- und HLA-G⁺ MZ2733RC-Zellen gegenüber verschiedenen zellulären Effektorpopulationen wie NK-Zellen, Lymphokin-aktivierte Killer (LAK)-Zellen und ZTL charakterisiert.

4.4.6.1 Verringerte ZTL-vermittelte Zytotoxizität

Da sowohl die HLA-G⁺ MZ2733RC- als auch HLA-G⁻ MZ2733NNSV-Zellen HLA-A2-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, wurde zur Evaluation einer antigenspezifischen, ZTL-vermittelten, zellulären Immunantwort das Tyrosinaseantigen als Surrogatmarker verwendet. Hierzu wurden die jeweiligen Zellen mit einem rekombinanten modifizierten Vaccinia Virus Ankara (rMVV), das die cDNS des humanen Tyrosinasegens trägt (rMVA-tyr), infiziert. Als Positivkontrolle wurden Tyrosinase exprimierende HLA-A2⁺ NA8-Melanomzellen, sowie als Negativkontrolle die allogenen HLA-A2⁻ MZ2789NNSV-Zellen mitgeführt. Die jeweiligen Zellen wurden unbehandelt oder mit dem rekombinanten Virus infiziert und in Zytotoxizitätsversuchen eingesetzt. Als Effektoren wurden tyrosinasespezifische, HLA-A2 restringierte zytotoxische T-Zellen verwendet (Wölfel et al., 1994).

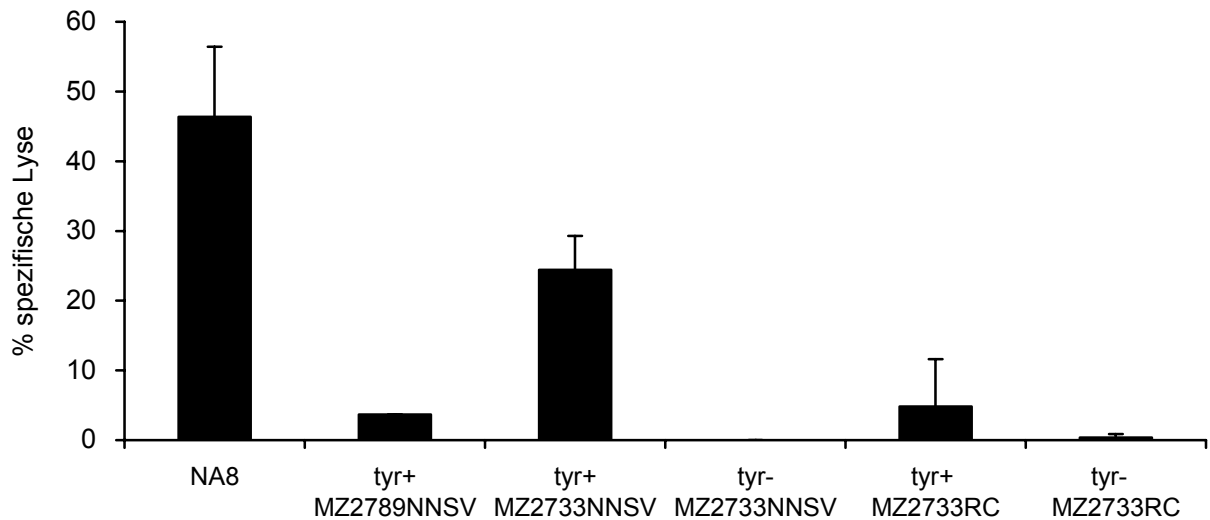


Abbildung 4.39: Spezifische Lyse von Tyrosinase exprimierenden Zelllinien. Radioaktiv mit $^{51}\text{Chrom}$ markierte Tyrosinase exprimierende HLA-A2⁺ NA8-Melanomzellen, rMVA-tyr infizierte HLA-A2⁻ MZ2789NNSV-Zellen und MVA-tyr infizierte bzw. virusfreie HLA-A2⁺ MZ2733NNSV- und HLA-A2⁺ MZ2733RC-Zellen wurden 4 Stunden lang mit tyrosinasespezifischen, zytotoxischen T-Zellen inkubiert. Die in den Überstand freigesetzte Radioaktivität wurde ermittelt (3.2.4.1).

Die tyrosinasespezifischen zytotoxischen T-Zellen lysierten die HLA-A2⁺ NA8-Zellen zu 46 ± 10 %, die rMVA-tyr infizierten HLA-A2⁺ MZ2733NNSV-Zellen zu 24 ± 5 % und HLA-A2⁺ MZ2733RC-Zellen zu 5 ± 7 %. Im Gegensatz dazu wurden die allogenen, rMVA-tyr infizierten HLA-A2⁻ MZ2789NNSV-Zellen zu 4 ± 0 % und die nicht-infizierten HLA-A2⁺ MZ2733NNSV-Zellen und HLA-A2⁺ MZ2733RC-Zellen nicht lysiert. Damit fiel die Lyse der MVA-tyr infizierten HLA-A2⁺, HLA-G⁺ NZK-Zellen MZ2733RC im Vergleich zur Lyse der autologen rMVA-tyr infizierten HLA-A2⁺, HLA-G⁻ MZ2733NNSV-Zellen deutlich geringer aus.

4.4.6.2 Inhibition der LAK-Zell-vermittelten Zytotoxizität

Um die Sensitivität der HLA-G⁺ MZ2733RC- und der HLA-G⁻ MZ2733NNSV-Zellen gegenüber *in vitro* LAK-Zellen zu untersuchen, wurden *in vitro* IL-2-aktivierte LAK-Zellen von zehn verschiedenen, gesunden HLA-A1⁺- und HLA-A2⁺-identischen Spendern generiert. Die *in vitro* generierten LAK-Zellen zählen zu den potentesten Effektorzellen und sind in der Lage, nicht-professionelle APZ trotz einer Zelloberflächenexpression von HLA Klasse I-Molekülen unspezifisch zu lysieren. Die HLA Klasse I-defizienten K562-Zellen und die HLA-G⁺ JEG3-Zellen wurden als Negativ- bzw. Positivkontrolle in Zytotoxizitätsversuchen mitgeführt, siehe Abbildung 4.40.

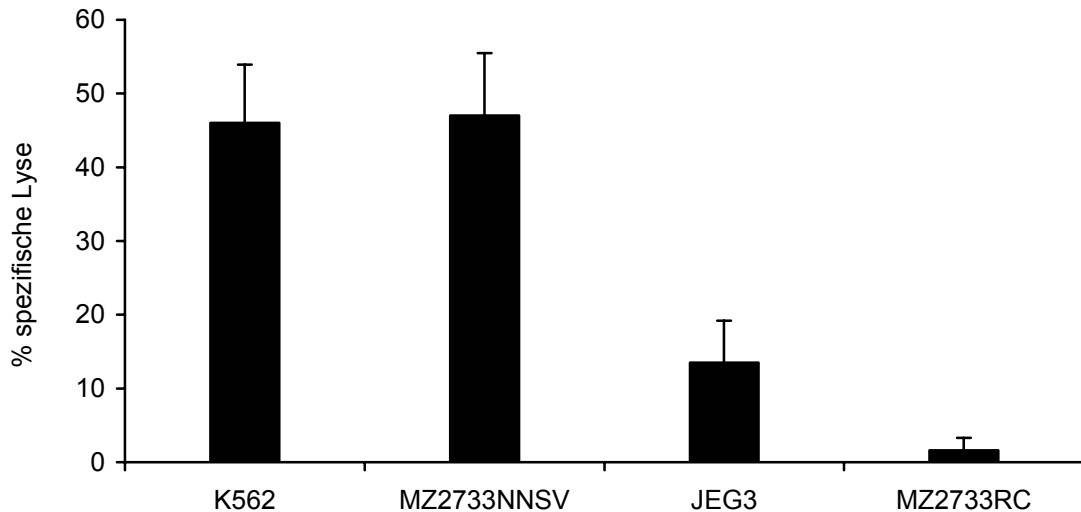


Abbildung 4.40: Verringerte LAK-Zell-Sensitivität von HLA-G⁺ Zelllinien. Nach radioaktiver Markierung wurden K562-, MZ2733NNSV-, JEG3- und MZ2733RC-Zellen mit LAK-Zellen von zehn verschiedenen HLA-A1⁺/A2⁺ Spendern in einem das „Effektor : Target“-Verhältnis von 30 : 1 in Zytotoxizitätsversuchen, wie in M&M beschrieben, inkubiert. Dargestellt ist die über die freigesetzte Radioaktivität berechnete spezifische Lyse.

Die in Abbildung 4.40 zusammengefassten Beobachtungen zur LAK-Zell-Sensitivität der untersuchten Zelllinien waren sehr unterschiedlich. Die *in vitro* mit IL-2 aktivierten LAK-Zellen von zehn verschiedenen, gesunden, HLA-A1 und -A2 identischen Spendern lysierten sehr effizient sowohl die LAK-Zell-sensitiven, HLA⁻ K562-Zellen (46 ± 8 %) als auch die HLA-G⁻, HLA Klasse I⁺ MZ2733NNSV-Zellen (47 ± 8 %). Im Gegensatz dazu wurden die HLA-G⁺ JEG3- und die HLA-G⁺ MZ2733RC-Zellen schlechter von den LAK-Zellen lysiert, wobei die Lyse signifikant (p<0,005) reduziert war und sich im Mittel auf 14 ± 6 % für die JEG3- und auf 2 ± 2 % für die MZ2733RC-Zellen belief. Um die Effizienz der LAK-Zell-vermittelten Zytotoxizität mit primären NK-Zellen zu vergleichen, wurden LAK- und NK-Zellen von zwei gesunden Spendern aufgereinigt.

4.4.6.3 Verringerte NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität

In Zytotoxizitätsversuchen wurde sowohl die LAK-Zell-Sensitivität als auch die NK-Zell-Sensitivität von HLA Klasse I⁻ K562-, HLA-G⁻, HLA Klasse I⁺ MZ2733NN- und HLA-G⁺ MZ2733RC-Zellen untersucht und miteinander verglichen. Dafür wurden von zwei gesunden Spendern NK-Zellen aus PBL durch Negativselektion mittels mAk, die mit Magnetpartikeln konjugiert waren, nach Angaben des Herstellers (Myltenyi, Mönchengladbach) aufgereinigt, über Nacht in Gegenwart von 500 IU/ml IL-2 kultiviert und vor Beginn der Zytotoxizitätsversuche mittels Durchflusszytometrie auf die NK- und T-Zelloberflächenantigene CD56 und CD3 untersucht, siehe Abbildung 4.41.

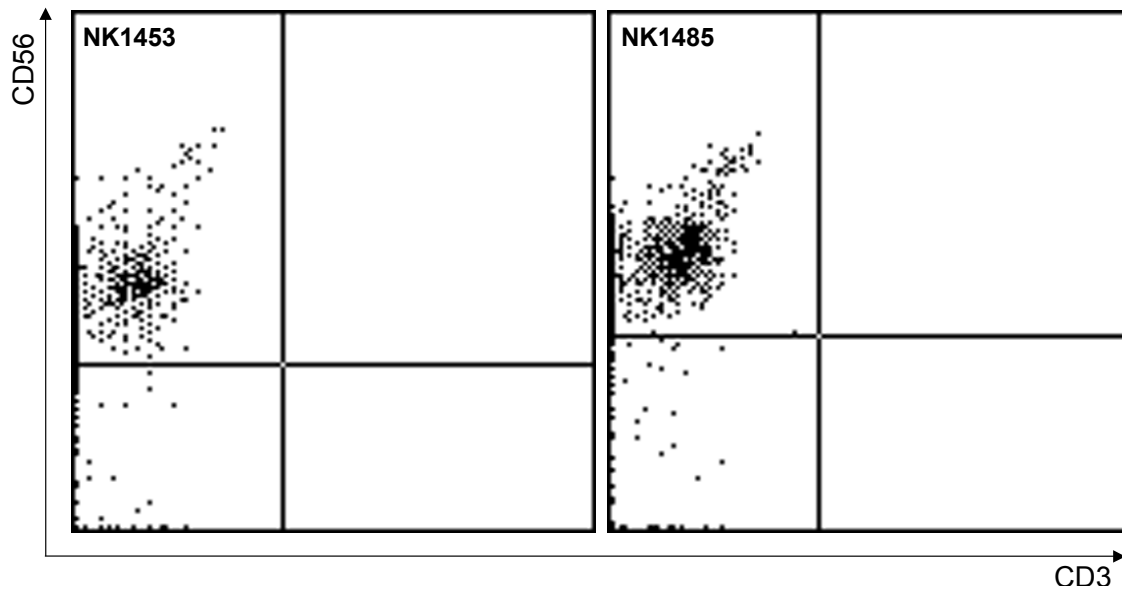


Abbildung 4.41: Aufgereinigte NK-Zellen von zwei gesunden Spendern. Aus je 6×10^7 PBL von zwei gesunden Spendern Donor 1453/2001 und Donor 1485/2001 wurden NK-Zellen durch Negativselektion nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt (Myltenyi, Mönchengladbach). 1×10^5 Zellen wurden mit mAk spezifisch für die NK- und T-Zell-Antigene CD3 und CD56, die mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC und PE angefärbt waren, inkubiert (3.2.4.4.2). Auf der x-Achse wurde die CD3-Detektion und auf der y-Achse die CD56-Detektion dargestellt. Aufgereinigte NK-Zellen waren $CD3^-$ und $CD56^+$ und wurden im linken oberen Sektor dargestellt.

Die in Abbildung 4.41 dargestellten Histogramme dokumentieren die durch die Negativselektion aufgereinigten $CD3^-/CD56^+$ NK-Zellen. Ihre Reinheit betrug mehr als 95 %. Die aufgereinigten NK-Zellen wurden *in vitro* in Gegenwart von 500 IU/ml IL-2 inkubiert und anderntags in Zytotoxizitätsversuchen eingesetzt, siehe Abbildung 4.42.

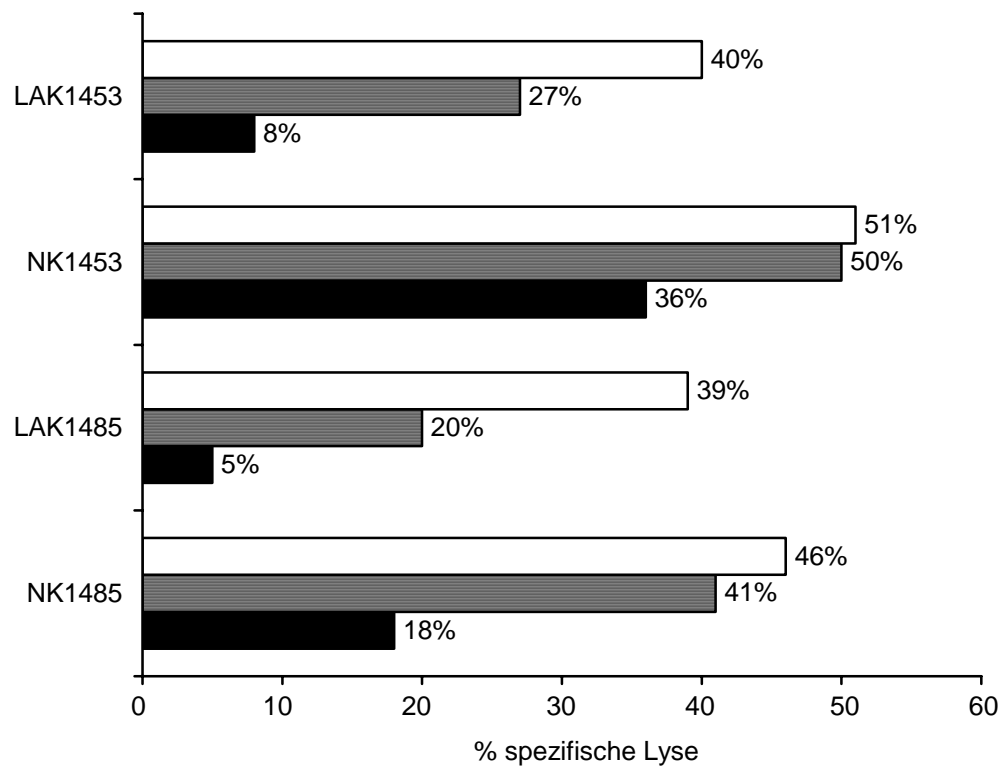


Abbildung 4.42: Vergleich von NK-Zell- und LAK-Zell-vermittelter Lyse. Dargestellt ist die Lyse von K562- (weiße Balken), MZ2733NNSV- (gestrichelte Balken) und MZ2733RC-Zellen (schwarze Balken) durch die LAK-Zellen LAK1453 und LAK1485 in „Effektor : Target“-Verhältnissen von 30 : 1 bzw. durch die NK-Zellen NK1453 und NK1485 in „Effektor : Target“-Verhältnis von 10 : 1. Die Generierung der verschiedenen Effektorzellen und die Durchführung der Zytotoxizitätsversuche erfolgte wie in (3.2.4.1) beschrieben.

Obwohl aufgereinigte NK-Zellen in einem geringeren „Effektor : Target“-Verhältnis von 10 : 1 eingesetzt wurden, lysierten diese Zellen effizienter als die in einem „Effektor : Target“-Verhältnis von 30 : 1 eingesetzten *in vitro* aktivierten LAK-Zellen. Die NK-Zellen beider Spender lysierten die K562- und die MZ2733NN-Zellen in einer Größenordnung von 41 % bis 51 %, während die Lyse der Tumorzellen mit 18 % bis 36 % deutlich verringert war.

Die Lyse aller drei Zelllinien durch die LAK-Zellen beider Spender fiel insgesamt geringer aus. Während die Lyse der K562-Zellen Werte von 39 bzw. 40 % erreichten, betrug sie für die Nierenzellen 27 % (LAK1453) bzw. 20 % (LAK1485). Im Gegensatz dazu war die Effektorleistung der LAK-Zellen gegen die HLA-G⁺ MZ2733RC-Zellen nochmals deutlich reduziert, wobei die Lyse zwischen 8 % (LAK1453) und 5 % (LAK1485) lag.

4.4.6.4 Rekonstitution der LAK-Zell-vermittelten Zytotoxizität

Signalpeptide von klassischen und nicht-klassischen HLA Klasse I-Molekülen stabilisieren die Zelloberflächenexpression von HLA-E-Molekülen. Diese werden ihrerseits und unabhängig von den ebenfalls auf der Zelloberfläche exprimierten HLA-G1-Molekülen durch den heterodimeren KIR CD94/NKG2A gebunden und führen zu einer Inhibition der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität. Aufgrund einer noch nicht auf translationaler Ebene nachweisbaren HLA-E-Expression musste ausgeschlossen werden, dass es sich bei den bisherigen Beobachtungen um eine Überlagerung von inhibitorischen Effekten von exprimierten HLA-G1- und HLA-E-Molekülen handelte. In Blockierungsversuchen mit für NK-Zell-Rezeptoren und nicht-klassischen HLA-G1-Molekülen spezifischen mAk wurde deren Einfluss auf die spezifische Lyse von HLA-G⁺ MZ2733RC-Zellen untersucht. Zur Blockade von HLA-G1 wurde der HLA-G1-spezifische mAk MEM-G/9 und zur Blockade von CD94/NKG2A wurde der mAk Z199 verwendet, der gegen eine antigene Determinante von NKG2A gerichtet ist, jedoch keine Inhibition der Effektoreigenschaften von NK-Zellen vermittelt, siehe Abbildung 4.43.

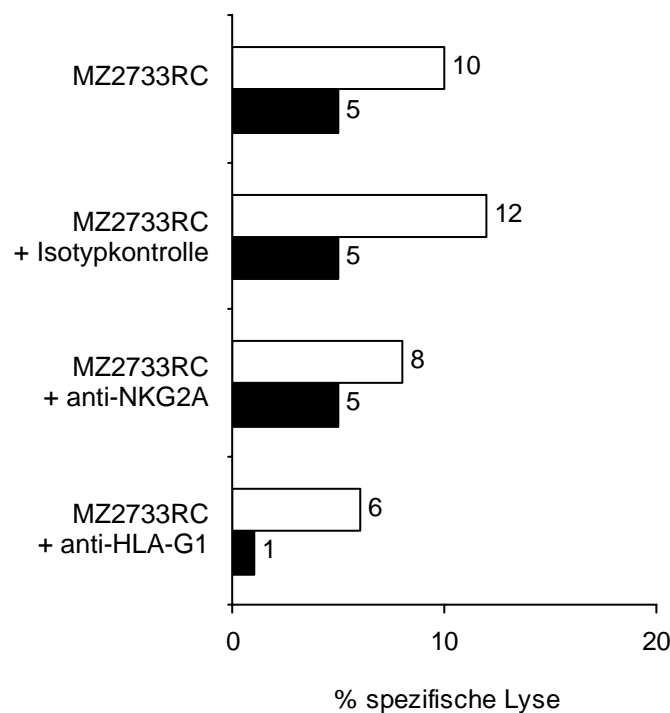


Abbildung 4.43: Von HLA-G1- und NKG2A- unabhängige LAK-Zell-vermittelte Zytotoxizität.

Dargestellt sind die Ergebnisse von initialen Blockierungsversuchen mit dem NKG2A blockierenden mAk Z199 und dem HLA-G1 spezifischen mAk MEM-G/9. Die NZK-Zellen MZ2733RC wurden entweder unbehandelt, mit 2 µg/ml mAk MEM-G/9 oder mit 2 µg/ml einer murinen Isotypkontrolle für 30 min vorinkubiert. Alternativ dazu wurden die LAK-Zellen unbehandelt oder mit 2 µg/ml mAk Z199 oder einem Isotypkontroll-Antikörper für 30 min vorinkubiert. Die Zytotoxizitätsversuche wurden mit „Effektor : Target“-Verhältnissen von 30 : 1, wie in (3.2.4.2) beschrieben, durchgeführt.

Der Abbildung 4.43 ist zu entnehmen, dass die Blockierungsversuche von heterodimeren KIR CD94/NKG2A der LAK-Zellen mit dem mAk Z199 und der HLA-G1-Moleküle mit dem mAk MEM-G/9 zu keiner Induktion der LAK-Sensitivität der HLA-G⁺ NZK-Zellen MZ2733RC führte.

Um herauszufinden, ob die LAK- und NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegenüber den HLA-G⁺ NZK-Zellen MZ2733RC induziert werden kann, wurden Blockierungsversuche mit dem HLA Klasse I-spezifischen mAk w6/32 durchgeführt. Im Einzelnen wurden LAK-Zellen von drei verschiedenen allogenen Spendern generiert, die mit HLA-G⁻ MZ2733NNSV- und HLA-G⁺ MZ2733RC-Zellen, die ohne oder mit blockierenden Konzentrationen des HLA-Klasse I bindenden mAk w6/32 markiert worden waren, in Zytotoxizitätsversuchen koinkubiert. Als Kontrolle wurden aufgereinigte NK-Zellen zweier Spender mitgeführt, um eine Antikörper-abhängige Zelllyse von Nierenzellen zu dokumentieren.

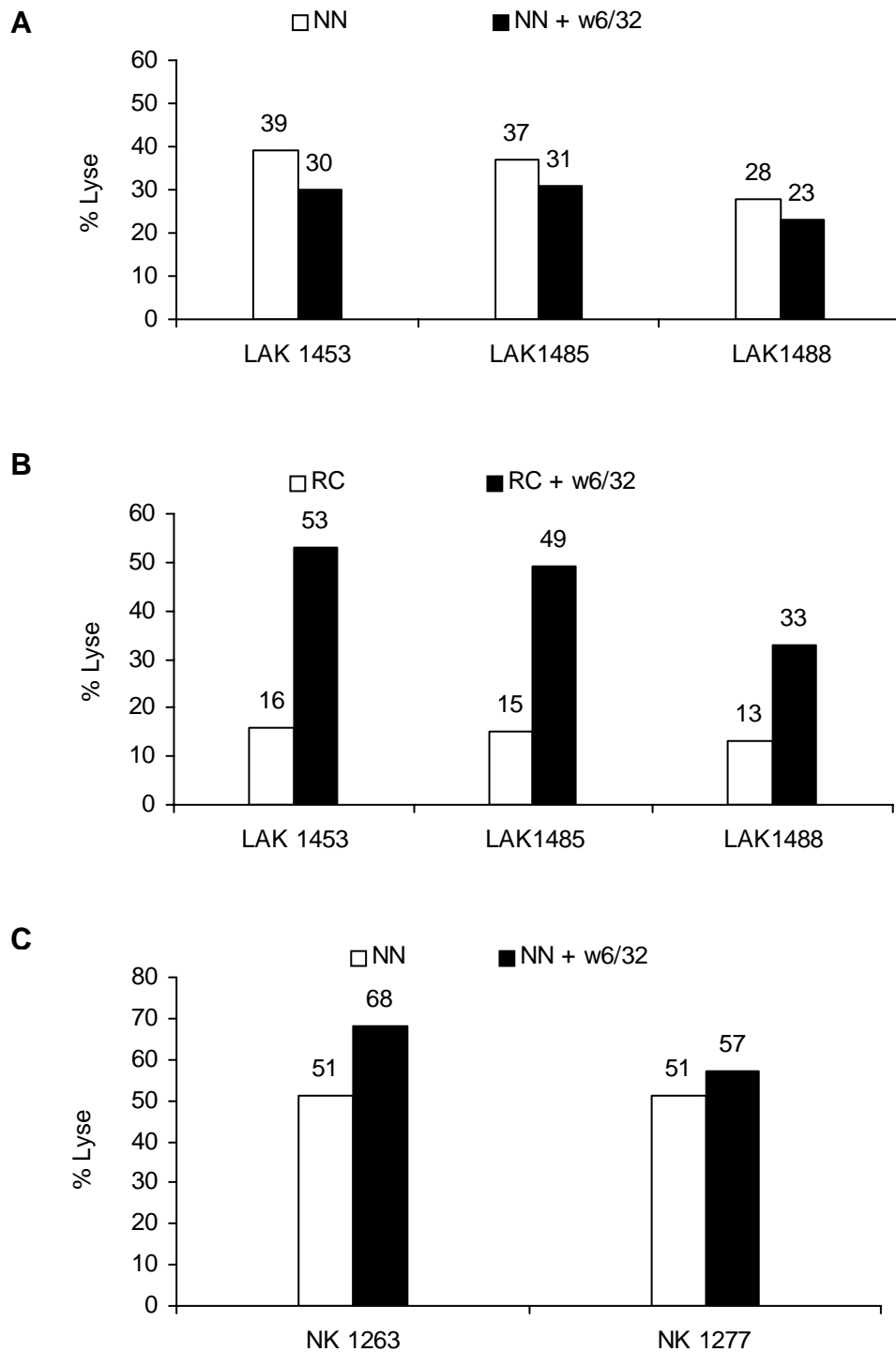


Abbildung 4.44: Rekonstitution der LAK-Zell-vermittelten Lyse von HLA-G⁺ MZ2733RC-Zellen. Dargestellt sind Blockierungsexperimente mit dem HLA Klasse I spezifischen mAk w6/32. **(A)** und **(C)** MZ2733NNSV-Zellen und **(B)** MZ2733RC-Zellen wurden radioaktiv markiert und anschließend mit sättigenden Konzentrationen (20 µg/ml) des mAk w6/32 inkubiert, bevor sie **(A)** und **(B)** mit LAK-Zellen dreier Spender (LAK1453, LAK1485 und LAK1488) in einem „Effektor : Target“-Verhältnis von 30 : 1 oder mit **(C)** NK-Zellen zweier Spender (NK1263 und NK1277) in einem „Effektor : Target“-Verhältnis von 20 : 1 für 4 Stunden inkubiert wurden.

In Abbildung 4.44 A ist zu sehen, dass die LAK-Zellen der drei verschiedenen Spender die immortalisierten Nierenzellen MZ2733NNSV mit Werten zwischen 28 % und 39 % lysierten. Nach Blockade der HLA Klasse I-Moleküle durch den mAK w6/32 verringerte sich die Lyse auf Werte zwischen 23 % und 31 %.

Parallel dazu wurden, wie in Abbildung 4.44 B dargestellt, HLA Klasse I-Moleküle von HLA-G⁺ MZ2733RC-Zellen mit mAk w6/32 blockiert. Die nicht-markierten Tumorzellen wurden schlechter lysiert als die in Abbildung 4.44 A aufgeführten, nicht-markierten Nierenzellen MZ2733NNSV. Die Lyse lag dabei zwischen 13 % und 16 %. Sobald die HLA Klasse I-Moleküle auf der Zelloberfläche der Tumorzellen durch den mAk w6/32 blockiert waren, wurde bei den drei verwendeten LAK-Kulturen eine Induktion der LAK-Zell-vermittelten Lyse mit einem Anstieg auf Werte zwischen 33 % und 53 % beobachtet. Dadurch wurden die Tumorzellen besser lysiert als die immortalisierten nicht-markierten Nierenzellen, siehe Abbildung 4.44 A.

In parallel durchgeführten Kontrollversuchen mit aufgereinigten NK-Zellen (Abbildung 4.44 C) wurde eine durch den mAk w6/32 bedingte, Antikörper-abhängige Lyse der Nierenzellen untersucht. Diese sollte nachweisen, dass (i) der mAk w6/32 an die Zielzellen band, und (ii) in den verwendeten LAK-Kulturen 1453, 1485 und 1488 keine dominante NK-Aktivität vorhanden war. Die allogenen NK-Zellen lysierten bei einem „Effektor : Target“-Verhältnis von 20 : 1 die unbehandelten Nierenzellen mit einem Wert von 51 % deutlich besser als die in Abbildung 4.44 A dargestellten LAK-Zellen (28 % bis 39 %). Durch die Inkubation der Nierenzellen MZ2733NNSV mit mAk w6/32 wurde eine Induktion und damit eine Antikörper-abhängige Lyse beobachtet, die auf Werte zwischen 57 % (1277) und 68 % (1263) anstieg.

5. Diskussion

5.1 Immortale NZK-Zelllinien – *In Vitro*-Modelle für NZK-Läsionen ?

Normale, humane epitheliale Zellen besitzen eine finite Lebensspanne, die nach etwa 60 Zellteilungen in einem Stadium der Seneszenz endet, in der sie ihre Teilungsfähigkeit verlieren (MacDonald, 1990; Hayflick, 1965; Vojta et al., 1995; Smith et al., 1996; Counter, 1996). Dabei wird ihre Teilungsfähigkeit von der Anzahl der möglichen DNA-Replikationszyklen kontrolliert, die ihrerseits durch die Länge der chromosomalen Telomere vorgegeben ist. Bei jedem Replikationszyklus werden die Telomere verkürzt. Im Gegensatz zu den normalen Zellen häufen sich in Tumorzellen verschiedene Mutationen und neoplastische Veränderungen an, die dafür verantwortlich gemacht werden, dass Tumorzellen das Stadium der Seneszenz umgehen und dadurch *in vitro* permanente Tumorzelllinien etabliert werden können. Es wird angenommen, dass nahezu alle Tumorzellen eine unkontrollierte Teilungsfähigkeit erlangen und immortal werden (Stamps et al., 1992; Newbold et al., 1982, 1983 und 1985; Rhyu, 1995; Namba et al., 1996; Weinberg, 1998). Diese Beobachtungen führten zu der formalen Definition von immortalisierten Zelllinien, die die Fähigkeit zur unbegrenzten Proliferation besitzen (Stewart und Weinberg, 2002; Hahn und Weinberg, 2003; Hahn, 2003).

Die Etablierung von *in vitro* permanent wachsenden Tumorzelllinien ist zeitaufwendig und besitzt eine relativ geringe Erfolgsquote, die von der Tumorentität abhängig ist. Am leichtesten lassen sich permanente Tumorzelllinien aus Melanomen, mit einer Erfolgsrate von etwa 50 %, gefolgt von Metastasen (20 - 50 %) und primären soliden Tumoren, wie z. B. dem NZK (10 - 25 %) generieren (Moor et al., 1997; Wilson et al., 1997).

Die Inhibition von Tumorsuppressor-Genen und ihrer Genprodukte, zu denen u. a. p53, Retinoblastom (Rb) und VHL zählen, ermöglicht zunächst eine Evasion vor der Zellzykluskontrolle (Hanahan und Weinberg, 2000). Im NZK ist der Verlust oder die Inaktivierung des VHL-Gens in mehr als 80 % aller Tumoren beobachtet worden (Gallou et al., 1999). Somit kann angenommen werden, dass die Inaktivierung dieser Tumorsuppressor-Aktivitäten ein initiales Ereignis für die Immortalisierung von NZK-Zellen darstellt. Trotz dieser Veränderungen bestehen nach wie vor große Schwierigkeiten, Tumorzelllinien aus primären Tumoren zu etablieren. Dies führte zu Überlegungen, dass möglicherweise nicht alle Tumorzellen *in vivo* immortalisiert sind (O'Hare, 1991; Stamps et al., 1992).

Auf diese Beobachtungen können auch die Schwierigkeiten zurückzuführen sein, die mit der Etablierung der NZK-Zelllinien zu überwinden waren. Bei der Erarbeitung eines standardisierten Protokolls zur Etablierung von NZK-Zelllinien (engl. „standard operating procedure“, SOP) wurden verschiedene Präparationstechniken, einzelne

operative Schritte und die verwendeten Materialien variiert. Im Gegensatz zu früheren Protokollen wurde insbesondere auf die Qualität und die sofortige Präparation des zur Verfügung stehenden Biopsiematerials geachtet. Bei der Erarbeitung der SOP wurde beobachtet, dass (i) nur vitales, gut durchblutetes Biopsiematerial des Tumors, (ii) eine ausreichende Biopsiemenge zur Verfügung stehen und (iii) innerhalb von 24 Stunden nach Nephrektomie eine Primärkultur *in vitro* angelegt sein muss, um eine permanente NZK-Zelllinie zu etablieren. Dies stellt eine Beschleunigung eines früher beschriebenen Verfahrens von Angevin und Koautoren (1997) dar. Die besten Erfolge wurden durch die Verknüpfung der manuellen Schnittpräparation mit einer sich anschließenden enzymatischen Dissoziation erreicht. Dabei konnte auf das Enzym Hyaluronidase V, das von verschiedenen Gruppen verwendet wird, gänzlich verzichtet werden (Beldegrun et al., 1988; Schendel et al., 1993). Stattdessen war die Reinheit der Kollagenase und der DNase I für die Präparation entscheidend.

Das manuelle Verfahren war einer maschinellen Aufbereitung des Biopsiematerials, (Medimachine, Dako, Hamburg) die von anderen Arbeitsgruppen favorisiert wird, aber zu einer Verringerung des vitalen Materials und zu einem schnellen Adhärenzverlust der *in vitro* kultivierten Tumorzellen führt, deutlich überlegen.

Die hergestellten Primärkulturen der Tumoren waren nahezu frei von „Fibroblasten“. Auftretende Kontaminationen wurden durch Subklonierungen von Tumorzellen beseitigt (Lindl, 2003). Dies war zwar aufwendiger, aber erfolgreicher als die Verwendung des Zellkulturzusatzes von D-Valin, das selektiv die Proliferation von Fibroblasten inhibiert (Gilbert und Migeon, 1975). Parallel zu Primärkulturen des Tumors wurden auch Primärkulturen aus Biopsiematerial des tumorentfernten Nierengewebes angelegt. Dabei zeigte sich, dass mehr Primärkulturen aus Nierenepithel (> 90 %) als aus Nierentumor (70 %) zu konfluenten Zellmonolayern heranwachsen. Dies stimmt mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen überein, die berichtet haben, dass es viel schwieriger ist, Tumorzellen als epitheliale Zellen des gesunden Gewebes *in vitro* zu kultivieren (O'Hare, 1991).

Mit dem entwickelten SOP-Protokoll wurden 15 verschiedene NZK-Zelllinien aus 50 % aller Tumorbiopsien etabliert, die mehr als 20 Passagenzyklen bzw. mindestens ein halbes Jahr kontinuierlich *in vitro* wuchsen, ohne ihr Proliferationsvermögen zu verlieren. Diese Erfolgsquote übersteigt die anderer Berichte, wonach etwa 10 % der angelegten Primärkulturen von Tumoren zu permanenten Zelllinien heranwachsen (Moor et al., 1997; Wilson et al., 1997).

5.2 Immortalisiert das SV40-T-Antigen Nierenzelllinien?

Im Gegensatz zu den Tumorzellen können epitheliale humane Zellen nur über einen begrenzten Zeitraum *in vitro* kultiviert werden. Sie verlieren nach und nach ihre Fähig-

keit zu replizieren und treten in eine Seneszenz-Phase ein, in deren Verlauf sich ihre Morphologie verändert und ihre Fähigkeit zur Adhärenz verloren geht. Deshalb wurden gesunde Nierenzellen als Kurzzeitkulturen für ein bis zwei Passagen gehalten, kryokonserviert und/oder immortalisiert.

Ein Schwerpunkt in der Etablierung gewebsspezifischer, permanenter Zelllinien ist die gezielte Immortalisierung durch verschiedene Verfahren, wie z. B. die Behandlung mit kanzerogenen Chemikalien, die Transduktion von Zellen mit immortalisierenden DNS-Viren, z. B. Eppstein-Barr-Virus (EBV), Papillom-Viren, und dem Affenvirus SV40, oder der Gentransfer von Onkogenen, wie z. B. myc und ras. Außerdem werden auch Zellfusionen von B-Zellen mit Myelomzellen durchgeführt, um immortale Antikörperproduzierende Hybridom-Zelllinien zu generieren (Katakura et al., 1998).

Die Immortalisierung mit dem großen T-Antigen von SV40 ist eine erfolgreiche und weit verbreitete Methode zur Etablierung permanenter Zelllinien (Manfredi und Prives, 1994; Bryan und Reddel, 1994). Da verschiedene humane Tumorzellen, darunter auch NZK-Zellen nach Immortalisierung mit dem großen T-Antigen von SV40 keine Veränderungen in der Expression epithelialer Antigene zeigten (Pantel et al., 1995), wurden die Nierenepithelzellen MZ2733NN mit dem T-Antigen von SV40 transduziert. Die resultierenden Nierenzellen MZ2733NNSV wurden nicht immortalisiert, besaßen jedoch durch die Expression des T-Antigens ein beschleunigtes Wachstum über einen Zeitraum von etwa 25 Passagen, bis sie eine Krise erreichten und ihr Wachstum vorübergehend einstellten. Dies genügte, um große Zellzahlen für zellbiologische Anwendungen zu züchten. Die Beobachtungen zum Proliferationsverhalten der Nierenzellen MZ2733NNSV stimmen mit dem Zwei-Phasen-Modell der Seneszenz und Immortalisierung SV40-transduzierter humaner Fibroblasten überein (Wright et al., 1989; Shay et al., 1991; Wright und Shay, 1992). Hierbei kommt es als Folge der Transduktion mit dem großen T-Antigen zu einer initial verlängerten Lebensdauer von epithelialen Zellen. Jedoch verlieren die Zellen ihre Proliferationsfähigkeit und erreichen eine als „Krise“, oder von Seneszenz geprägte erste Mortalitätsphase (M1), in der Zellteilung und Zelltod ausbalanciert erscheinen (Bryan and Reddel, 1994). Mit dem großen T-Antigen transduzierte Zellen, die diese Phase überleben, proliferieren für weitere 20-30 Zellteilungen und erreichen eine zweite „Krise“ oder Mortalitätsphase (M2), und nur wenige Zellen ($<1 \times 10^{-7}$), die diese Phase durchschreiten, bilden permanente Zelllinien (Wright et al., 1989; Shay et al., 1989; Wright und Shay, 1992). Jedoch wird von einigen Autoren angezweifelt, dass die Transduktion des SV40-T-Antigens per se eine Immortalisierung von epithelialen Zellen initiiert (Neufeld et al., 1987).

Das große T-Antigen des SV40-Virus ist ein nukleär lokalisiertes Phosphoprotein. Das 708 Aminosäuren lange Molekül besitzt einige funktionelle Domänen, die verschiede-

ne biochemische Funktionen ausführen, vor allem aber transformierende Eigenschaften vermitteln: (i) Die aminoternale, transformierende Domäne As 1-82 bindet das Protein p300, die DNA-Polymerase- α und das Hitzeschockprotein p73. (ii) Die Retinoblastom-bindende Region As 101-118 bindet das Retinoblastomprotein (RB/p16) und das Protein p107, (iii) ein nukleäres Lokalisationssignal As 126-132, (iv) die p53-Bindungsdomänen As 351-450 und 533-626 (Shay et al., 1991; Conzen und Cole, 1995).

In der ersten Phase M1 ist die Bindung des großen T-Antigens an die Tumorsuppressorproteine p53 und RB/p16 für die Proliferation verantwortlich (Shay et al., 1991; Shay, 1995; Bond et al., 1994; Gao et al., 1996). Des Weiteren wird angenommen, dass die zweite Phase der Immortalisierung ein weiteres unabhängiges Signal erfordert (Shay et al., 1995). Möglicherweise ist die Beobachtung der Telomeraseaktivität während dieses Zeitraums der entscheidende Schritt zur Immortalisierung einer Zelllinie (Kim et al., 1994; Rhyu 1995; Noble et al., 1996). Es wurde beschrieben, dass in 85 % bis 90 % aller *in vitro* etablierten permanenten Zelllinien eine Induktion der Telomeraseaktivität beobachtet wurde (Shay und Bacchetti, 1997). Somit kann angenommen werden, dass die beobachtete Seneszenz von T-Antigen-transduzierten Nierenzellen MZ2733NNSV mit der Verkürzung der Telomere in Zusammenhang steht (Holt et al., 1996; Bodnar et al., 1996).

Eine Telomeraseaktivität könnte demnach den Vorgang der Telomerverkürzung stoppen oder sogar umkehren (Bodnar et al., 1998). Eine konstitutive Expression eines transfizierten Telomerasegens genügt jedoch nicht, um Zellen zu immortalisieren, obwohl die Telomere für eine Immortalisierung notwendig sind (Bryan et al., 1995; Holliday et al., 1996). Nach Weinberg und Koautoren (1999) müssen mindestens zwei synergistisch wirkende Ereignisse eintreten, (i) eine onkogene Veränderung oder eine Inhibition eines konstitutiv exprimierten Tumorsuppressorgens und (ii) eine permanente Aktivierung der Telomerase, um eine Immortalisierung von epithelialen Zellen auszulösen. Somit sollte eine zusätzliche Einführung der cDNS des Telomerasegens in die mit dem großen T-Antigen transduzierten Nierenzellen MZ2733NNSV zu einer endgültigen Immortalisierung und einer permanenten Nierenzelllinie führen. Nach Vandewalle und Koautoren (1999) muss jedoch damit gerechnet werden, dass die mit dem T-Antigen transduzierten epithelialen Zellen zur Dedifferenzierung neigen und gewebsspezifische Funktionen nach vielen Passagen verlieren können.

5.3 Besitzen NZK-Zelllinien defizitäre Immunphänotypen?

Die etablierten NZK-Zelllinien wurden auf die Expression verschiedener Zelloberflächenmoleküle mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierbei waren vor allem Moleküle von Interesse, die an Interaktionen von T-Zellen und antigenpräsentierenden

Zellen involviert und für die Bildung einer T-Zell-Synapse notwendig sind (Monks et al., 1998; Grakoui et al., 1999). Im Einzelnen wurde die Zelloberflächenexpression von (i) HLA Klasse I-Molekülen, (ii) „intercellular adhesion molecule“ 1 und 3 (ICAM-1/CD54 und ICAM-3/CD50), (iii) Lymphozyten Funktions-assoziiertem Antigen Typ 3 (LFA3/CD58) und von (iv) CD28-Liganden CD80/B7-1, CD86/B7-2 und CD152/CTLA-4 untersucht. Im Gegensatz zur konstitutiven aber differentiellen Expression von HLA Klasse I-, CD54- und CD58-Molekülen wurde keine konstitutive Expression der Moleküle CD50, CD80, CD86 und CD152 nachgewiesen.

Die beobachtete differentielle Expression von HLA Klasse I-Molekülen in den untersuchten NZK-Zelllinien variierte von einer hohen (MZ2733RC) bis hin zu einer marginalen Expression (MZ2907RC) und bestätigte frühere durchflusszytometrische Untersuchungen zu einer verringerten konstitutiven HLA Klasse I-Expression von NZK-Zelllinien (Seliger et al., 1996a; Seliger et al., 2003a).

Da die HLA Klasse I-Molekülexpression eine funktionierende Antigenprozessierung und einen intakten Peptidtransport zur Voraussetzung hat, kann ihre Verringerung Hinweise auf Fehlregulationen und Defizienzen geben (Seliger et al., 1996a; 1996b; 2000; García-Lora et al., 2003a). Gleichzeitig könnte sie ein Abbild der HLA Klasse I-Expression des ursprünglichen Tumors sein und damit auf einen möglichen Immunevasionsmechanismus *in situ* hinweisen (García-Lora et al., 2001; Ruiz-Cabello et al., 2002). Die beobachtete Varianz von HLA Klasse I-Epitopmengen auf den NZK-Zelllinien findet ihre Entsprechung in einer Vielzahl von immunhistochemischen Untersuchungen, die an Schnittpräparaten verschiedener Tumoren mit monoklonalen Antikörpern, die allelspezifische HLA Klasse I-Moleküle detektieren, gemacht wurden (Ferrone und Marincola, 1995; Seliger et al., 2003b; García-Lora et al., 2003a; Atkins et al., 2004). Dabei wurde gezeigt, dass *in situ* in 25 % bis 75 % von primären Tumoren, die unterschiedlichsten Histologien entstammen, Anomalien in der HLA Klasse I-Zelloberflächenexpression existieren. Hierbei ist die Expression der HLA Klasse I-Moleküle im Vergleich zu den korrespondierenden Normalgeweben in 39 % bis 88 % deutlich verringert oder defizitär (Garrido et al., 1997; Garrido und Algarra, 2001). Aufgrund seiner Studien hat Garrido (1997) eine Klassifikation von vier verschiedenen HLA Klasse I-Phänotypen von Tumoren vorgeschlagen. Tumore mit einem Phänotyp I besitzen einen kompletten Verlust von HLA Klasse I-Molekülen auf der Zelloberfläche. Dies kann auf die Selektion von Tumorzellen zurückzuführen sein, die (i) infolge einer Mutation eine defekte β_2 -Mikroglobulin-Synthese (D'Urso et al., 1991; Bicknell et al., 1996; Benitez, 1998; Khong et al., 2004), (ii) strukturelle Defekte des TAP1/TAP2-Peptidtransporters (Cromme et al., 1994; Kaklamanis et al., 1994; Ritz et al., 2001) oder (iii) Defizienzen von Tapasin besitzen (Momburg und Tan, 2002). Bei Tumoren des Phänotyps II werden Verluste des HLA-Haplotyps

nachgewiesen (Boon et al., 1994; Browning et al., 1993; Torres et al., 1996). Als Ursache werden chromosomale Aberrationen vermutet. Im Gegensatz dazu zeigen Tumore des Phänotyps III einen Expressionsverlust eines einzigen HLA Klasse I-Lokus. In verschiedenen Tumoren wurden Verluste von HLA-A-Allelen (3 - 19 %) und HLA-B-Allelen (5 - 19 %) beobachtet. Dabei scheint der zugrunde liegende Mechanismus transkriptionellen Ursprungs zu sein, da in einigen Tumoren entweder Promotorsequenzen oder Transkriptmengen einiger HLA Klasse I-Allele im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe verändert sind. So ist beispielsweise in Melanomzelllinien selektiv die Expression von HLA-B-Allelen vermindert. Sie korreliert invers mit einer erhöhten Transkriptionsrate des Onkogens c-myc, wobei die myc-Expression über einen bisher noch nicht definierten Mechanismus zu einer Verringerung bzw. zu einem Verlust der HLA-B-Expression führt (Versteeg et al., 1989; Peltenburg et al. 1994). Im Gegensatz dazu zeigen die Tumore des Phänotyps IV eine selektiv verminderte Expression verschiedener HLA Klasse I-Allele, die möglicherweise auf Punktmutationen oder partielle Deletionen von HLA Klasse I-Genen zurückgehen (Browning et al., 1993), oder durch somatische Rekombinationen oder Chromosomenbrüche entstehen können (Browning et al., 1996). Dieser HLA-Haplotyp-Verlust assoziiert mit einem Verlust der Heterozygotie (engl. „loss of heterozygosity“, LOH) von Chromosom 6p21 ist ein weit verbreiteter Mechanismus, der in vielen epithelialen Tumoren (Feenstra et al., 2000; Koopman et al., 2000; Maleno et al., 2002), jedoch nur selten im NZK auftritt (Maleno et al., 2004). Bisher wurde eine Serie von NZK-Läsionen untersucht und nur im primären NZK MZ2733RC wurde ein LOH-Verlust auf Chromosom 6q beobachtet (Maleno et al., 2004). Ob sich dieser auch in der etablierten NZK-Zelllinie MZ2733RC wiederfindet, und ob die anderen NZK-Zelllinien LOH-Verluste besitzen, wird zu untersuchen sein.

Des Weiteren werden Tumore charakterisiert, die komplexe HLA Klasse I-Phänotypen besitzen, und nicht durch die o. g. Kategorien beschrieben werden können. So wurden z. B. allelische HLA Klasse I-Veränderungen in zwei verschiedenen Metastasen eines Melanompatienten isoliert, die in einem zeitlichen Abstand von fünf Jahren diagnostiziert wurden. Zudem wurde beobachtet, dass tumorspezifische ZTL des Patienten den Primärtumor, jedoch nicht die von der späteren Metastase abgeleitete Zelllinie zerstörten (Lehmann et al., 1995). Diese Veränderungen der HLA Klasse I-Expression in der Chronologie des Krankheitsverlaufs lassen die Vermutung zu, dass es *in vivo* zu einer fortdauernden Immunselektion von Tumorzellen kommt, die für die besprochenen Phänotypen verantwortlich ist (Algarra et al., 2004). Unterstützt wird diese Beobachtung durch Untersuchungen von Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen von Zervix-Karzinompatientinnen. Hier wurde eine verringerte HLA Klasse I-Molekülex-

pression in Lymphknotenmetastasen, jedoch nicht in den Primärtumoren beobachtet (Cromme et al., 1995). Die Stärke der HLA Klasse I-Expression kann die Präsentation und somit die Immunogenität von ZTL-Epitopen und die Modulation von NK-Zell-Antworten beeinflussen (Levitsky et al., 1996; Ugolini und Vivier, 2001).

In diesen Zusammenhang muss auch die differentielle Zelloberflächenexpression von HLA Klasse I-Molekülen der etablierten NZK-Zelllinien gesehen werden. Dabei könnte die beobachtete HLA Klasse I-Molekülexpression Hinweise auf die Immunogenität bzw. die Immunevasionsmechanismen des ursprünglichen Tumors zum Zeitpunkt der Nephrektomie geben. Es darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass durch die *in vitro* Kultur möglicherweise Selektionsvarianten gezogen werden, die *in vivo* nur eine Nebenrolle spielen. Dass *in vivo* Selektionsvarianten von Tumoren mit veränderten Antigenprozessierungs- und -präsentationseigenschaften entstehen, wurde in Tiermodellen der Maus beobachtet (Algarra et al., 2004). Hierbei entwickelte ein primärer MHC Klasse I-negativer Tumorklon unterschiedliche Immunphänotypen in Abhängigkeit von der Immunkompetenz des Wirtstieres, wobei diese Immunphänotypen durch T-Zell-vermittelte Mechanismen selektioniert bzw. induziert wurden (Garrido et al., 1986; Algarra et al., 1991; García-Lora et al., 2001; Algarra et al., 2004).

Nach einer dogmatischen Lehrmeinung sollen Tumorzellen, die keine HLA Klasse I-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, automatisch zu Zielzellen einer NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität werden (Pende et al., 1998; Lanier et al., 2001). In den letzten Jahren bildeten sich jedoch Zweifel an dieser Aussage, nicht zuletzt deshalb, weil überraschenderweise Tumorzelllinien beschrieben wurden, die trotz HLA-Defizit nicht von NK-Zellen lysiert werden (García-Lora et al., 2003; Gati et al., 2004).

Die Suszeptibilität einiger Tumorzellen gegenüber einer T- bzw. NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität scheint von HLA Klasse I-Molekülen und akzessorischen, auf der Zelloberfläche exprimierten Molekülen, wie z. B. CD54 und CD58, abhängig zu sein. Darüber hinaus wird ein Zusammenspiel von verschiedenen aktivierenden und inhibierenden „killer immunoglobuline-like“-Rezeptoren angenommen, die sowohl von NK-Zellen als auch von aktivierten zytotoxischen T-Zellen exprimiert werden (Dunn et al., 2002). Zusätzlich sind in die Regulation die MHC-Klasse I-verwandten ULBP- und MIC-Proteine involviert, die spezifisch von CD94/NKG2D-Rezeptoren erkannt werden. Letztere fördern eine zytotoxische Aktivierung oder wirken kostimulatorisch (Bauer et al., 1999; Ugolini und Vivier, 2001; Seliger et al., 2003a; Lopez-Botet et al., 2004).

Auf der Basis dieser Ergebnisse muss daher angenommen werden, dass im Verlauf einer progressiven Tumorerkrankung ein ständiger Immunselektionsdruck herrscht, der nicht nur zu einem Verlust von HLA-Allelen, sondern auch zu einem Verlust oder zu einer Verminderung der Zelloberflächenexpression von kostimulierenden Rezeptoren bzw. von Liganden von aktivierenden „killer immunoglobuline-like“-Rezeptoren

und akzessorischen Molekülen auf Tumorzellen und damit zu einer fortschreitenden Beeinträchtigung der zellulär-vermittelten zytotoxischen Tumorreaktivität von Immunzellen führt (Dunn et al., 2002; Khong und Restifo, 2002; Pende et al., 2002).

Die differentielle CD54-Epitopdetektion, die mittels Durchflusszytometrie auf den verschiedenen NZK-Zelllinien nachgewiesen wurde, gibt möglicherweise einen Hinweis auf eine *in vivo* stattgefundenene Immunselektion, die auch bei Läsionen von Melanompatienten beobachtet wurde. Diese ist in die Suppression von zytotoxischen TIL involviert. So wurden für Kolon-, Magenkarzinome und für Melanome Expressionsverluste von membranständigem CD54 beschrieben (Wimmenauer et al., 1997; Anichini et al., 1990). Überdies besitzt CD54 in Gegenwart einer HLA Klasse I-Expression eine kostimulierende Funktion in der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität (Chong et al., 1994). Soluble CD54-Moleküle, die in erhöhter Konzentration in Seren von Magenkarzinom- und Melanompatienten beobachtet wurden, inhibieren eine NK-Zell-vermittelte Lyse von K562-Zellen (Kaijara et al., 1998; Vigano et al., 2001).

Außerdem wurde gezeigt, dass eine Blockade von CD54-Molekülen durch monoklonale Antikörper die NK-Zell-vermittelte Lyse von HLA Klasse I-negativen K562-Zellen inhibiert (Papa et al., 1994).

Wie die differentielle Zelloberflächenexpression von HLA Klasse I- und CD54-Molekülen kann auch die differentielle CD58-Epitopdetektion in den etablierten NZK-Zelllinien einem ähnlichen Immunselektionsdruck unterliegen. Im Gegensatz zu CD54 besitzt CD58 eine kostimulierende Funktion in der Zytokinsekretion und in der Vermittlung von zytotoxischen Effektoreigenschaften von T-Zellen (van de Wiel-van Kamenade et al., 1992; de Waal Malefyt et al., 1993; Le Guiner et al., 1998). So korrelierte beispielsweise bei Zytomegalievirus-infizierten Zellen die NK-Zell-vermittelte Lyse nicht mit der Virus-induzierten Verringerung der HLA Klasse I-Expression, sondern mit der Virus-induzierten CD58/LFA-3-Zelloberflächenexpression (Fletcher et al., 1998).

5.4 Tumorprogression in Gegenwart von aktivierten Lymphozyten

NZK sind generell von Lymphozyten infiltriert, wobei diese Infiltrate nachweislich Teil einer tumorspezifischen Immunantwort des Patienten darstellen (Gaudin et al., 1995; Mitropoulos et al., 1994). In Infiltraten werden T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile und manchmal B-Zellen nachgewiesen (Kiessling et al., 1999). Dabei scheint vor allem der Grad der Lymphozyteninfiltration und die Aktivierung der Lymphozyten für den Krankheitsverlauf entscheidend zu sein (Dunn et al., 2002). In statistischen Untersuchungen an Tumorpatienten mit verschiedenen Karzinomen wurde herausgefunden, dass mit der Zunahme und Intensität dieser Lymphozyteninfiltration die Lebenserwartung der Patienten signifikant ansteigt (Dunn et al., 2002).

In TIL von NZK werden außer tumorreaktiven CD3⁺/CD4⁺- und CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen (Beldegrun et al., 1988; Thiounn et al., 1994) auch NK-Zellen beobachtet, die eine zytotoxische Aktivität gegen NZK-Zellen entwickeln (Robertson und Ritz, 1990). Dies lässt darauf schließen, dass eine Anhäufung von NK- und T-Zellen in einem Tumor und ihre *in vitro* beobachtete Reaktivität gegenüber frisch isolierten Tumorzellen oder permanenten Tumorzelllinien koinzident mit einer gleichzeitigen unspezifischen bzw. Antigen-spezifischen Erkennung ist (Schendel et al., 1993; Finke et al., 1994; Brouwenstijn et al., 1996; Caignard et al., 1996; Whiteside, 1999). Die einzelnen Mechanismen des *in vivo* stattfindenden T-Zell-vermittelten „Tumorkillings“ sind noch nicht genau charakterisiert. Jedoch sezernieren tumorreaktive T-Zellen verschiedene Zytokine, die (i) zytolytische oder zytostatische Wirkungen auf Tumorzellen ausüben, wie z. B. TNF- α , oder (ii) Makrophagen und NK-Zellen aktivieren, wie z. B. GM-CSF und IFN- γ . Außerdem bewirken die sezernierten Zytokine IL-12 und IFN- γ eine Veränderung der Vaskularisierung des Tumors und besitzen einen indirekten Einfluss auf die Ausbreitung von malignen Zellen, indem sie die gefäßbildende Wirkung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (engl. „vascular endothelial growth factor“, VEGF) antagonisieren (Voest et al., 1995; Radoja und Frey, 2000).

Überraschenderweise wurde in Mausmodellen und später bei Prostatakarzinompatienten gezeigt, dass tumorreaktive T-Zellen existieren, die Teil einer Th2/Tc2-Antwort sind und IL-4, jedoch kein IFN- γ sezernieren. Somit ist IFN- γ nicht immer eine Voraussetzung für eine antitumorale Immunantwort (Dobrzanski et al., 2000 und 2004), hat aber eine entscheidende Bedeutung bei der Bildung einer tumorspezifischen T-Zell-vermittelten Th1-Gedächtnisantwort (Nishimura et al., 1999; Seo et al., 2002; Blankenstein et al., 2003) und bietet in Tiermodellen der Maus im Gegensatz zu einer Tc2-Antwort einen effizienten Schutz vor einer Tumorprogression (Kemp und Ronchese, 2001).

Außerdem wurde in Tumorpatienten die Existenz von zirkulierenden tumorreaktiven IgG-Antikörpern nachgewiesen (Kotera et al., 1994; Stockert et al., 1998), die möglicherweise auf eine vom Komplementsystem vermittelte Zytolyse von Tumorzellen hinweist.

5.5 Tumor-induzierte anergische TIL2733 und anergisierte PBL

Obwohl Tumore immunogene Antigene exprimieren, die eine Immunantwort induzieren, wird meistens eine Progression der Tumorerkrankung beobachtet (Kiessling et al., 1999). Dabei ist bei Tumorpatienten mit weit fortgeschrittenen Erkrankungsstadien eine systemische Immunsuppression mittels eines „DTH-Tests“ (engl. „delayed type hypersensitivity“), einer T-Zell-vermittelten Th1-Gedächtnisantwort gegenüber Peptidantigenen nachweisbar (Kiessling et al., 1999; Reuben und Hersh, 1984). Diese wird

jedoch nicht während eines frühen Tumorstadiums beobachtet. Möglicherweise existiert zu diesem Zeitpunkt nur eine lokale Inhibition der tumorspezifischen Immunantwort (Sogn et al., 1998; Finke et al., 1999). Immunhistochemische Analysen von *in situ* Schnittpräparaten von Tumorerläsionen und durchflusszytometrische Charakterisierungen von frisch isolierten TIL zeigten, dass gleichzeitig Gedächtnis-T-Zellen und Effektor-T-Zellen vorkommen; so wurden z. B. die T-Zell-Oberflächenantigene CD44, CD45RA, CD45RO und CD62 sowie CD28, CD69, FasL und HLA-DR detektiert (Alexander et al., 1993; Luscher et al., 1994; Van den Hove et al., 1997; Angevin et al., 1997; Lopez et al., 1998). Allerdings lassen die verschiedenen Isoformen von CD45 keine eindeutige Differenzierung von naiven und Gedächtnis-T-Zellen zu, da CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen, die spezifisch für das Melanom-assoziierte Tumorantigen Melan A oder spezifisch für EBV-Virus-Peptide sind, phänotypisch CD45RO oder CD45RA exprimieren und *in vitro* die Isoformen gegeneinander austauschen können (Rothstein et al., 1991; Hargreaves et al., 1997; Callan et al., 1998; Tan et al., 1999; Dunbar et al., 2000). Um in Zukunft den Aktivierungsgrad von T-Zellen zu analysieren, sollte die Kombination der Zelloberflächenantigene „chemokine-receptor 7 (CCR7)“ und der CD45-Isoformen verwendet werden, da nur naive T-Zellen CCR7 exprimieren (Sallusto et al., 1999).

In TIL werden sehr frühe Aktivierungsmoleküle, wie z. B. CD69, und späte, wie z. B. CD25/IL-2-Rezeptor- α -Kette, CD28, CD71, CD122/IL-2-Rezeptor- β -Kette, FasL und HLA-DR, nachgewiesen, wobei der letztgenannte am häufigsten und stärksten exprimiert wird (Radoja und Frey, 2000). Im Gegensatz dazu werden die IL-2-Rezeptorketten marginal oder gar nicht exprimiert. Dies stimmt mit Beobachtungen überein, dass TIL auch nach einer *in vitro* stattgefundenen Aktivierung keine oder nur marginale IL-2-Mengen sezernieren, die unterhalb der sezernierten IL-2-Menge von *in vitro* aktivierten autologen PBL liegt (Alexander et al., 1993; Nakagomi et al., 1995; Wang et al., 1995; Coventry et al., 1996; Rabinowich et al., 1996; Van den Hove et al., 1997). Da IL-2 die Expression des eigenen Rezeptors induziert, bedeutet dies gleichzeitig, dass die Expression des IL-2-Rezeptors bzw. die geringen IL-2-Mengen Hinweise für eine nicht vollständige Aktivierung oder eine vom Tumor induzierte, verminderte Aktivierung sind (Radoja und Frey, 2000). Diese Defizienzen sind mit einer verringerten Proliferationsinduktion und Effektorfunktion assoziiert und stimmen mit Beobachtungen für TIL aus NZK überein (Alexander et al., 1993; Finke et al., 1993; Kudoh et al., 1994; Tartour et al., 1995; Kolenko et al., 1997; Reichert et al., 1998). TIL mit einer verminderten Proliferationsfähigkeit und einer verringerten oder fehlenden zytotoxischen Effektorleistung werden deshalb als „anergisch“ bezeichnet (Whiteside et al., 1999). Anergische *in vitro* kultivierte TIL von Melanom-, NZK-Patienten und Zervixkarzinompatientinnen besitzen nach einer unspezifischen TZR-Stimula-

tion eine verringerte Produktion der Zytokine IFN- γ und IL-2, die überdies mit einer verringerten Expression der TZR- ζ -Kette und einer schlechten Prognose für den Krankheitsverlauf korreliert ist (Zea et al., 1995; Kono et al., 1996).

Die aus dem primären NZK MZ2733RC isolierten TIL2733 wurden *in vitro* mit den Zytokinen IL-2 und IL-7 stimuliert, um eine verstärkte Proliferation und eine Th1-Induktion von zytotoxischen NK- und LAK-Zellen zu erzielen (Ditunno et al., 1992; Sica et al., 1993). Die zytotoxischen Effektorfunktionen von Lymphokin-aktivierten, propagierten NK-Zellen werden von exklusiven NK-Zell-Rezeptoren, wie z. B. NKp36, NKp40 und IL-2 induzierten NKp44, vermittelt und geben Auskunft über die NK-Zell-Aktivität (Schleypen et al., 2003; Gati et al., 2004). Gleichzeitig wirkt IL-7 anti-apoptotisch und dadurch einem durch Aktivierung induzierten Zelltod von T-Zellen entgegen (Tsuda et al., 2000; Sade und Sarin, 2003). Die *in vitro* propagierten TIL2733 enthielten nach der dreiwöchigen Expansionsdauer neben CD3⁺/CD4⁻, CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen auch NK-Zellen. Die T-Zellen exprimierten den TZR α/β und die Oberflächenantigene CD45R0 und CD95. Außerdem wurde durch einen Vergleich mit autologen PBL eine verringerte Expression der TZR- ζ -Kette in aktivierten TIL nachgewiesen. Die TIL2733 wurden zur Bestimmung ihrer zellulär-vermittelten Zytotoxizität zusammen mit der HLA Klasse I-negativen, NK-Zell-sensitiven Erythroleukämie-Zelllinie K562 oder der autologen NZK-Zelllinie MZ2733RC inkubiert. Jedoch wurde weder eine NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegenüber K562-Zellen, noch eine T-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegenüber den autologen NZK-Zellen MZ2733RC beobachtet. Somit förderte der verwendete Zytokincocktail aus IL-2/IL-7 die Proliferation von TIL, induzierte jedoch keine zellulär-vermittelte zytotoxische Immunantwort. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu früheren Beobachtungen (Sica et al., 1993) und könnte einen Hinweis auf den vom NZK MZ2733RC verwendeten Immunevasionsmechanismus liefern.

Eine bessere Induktion von zytotoxischen T-Zellen in TIL von NZK soll mit einem Zytokincocktail eines PHA-Überstandes gelingen. Jedoch wurden in einer diesbezüglichen Studie NZK-Patienten mit einer IL-2-Therapie behandelt, in deren Verlauf bei einigen Patienten partielle Remissionen vorhandener Metastasen beobachtet wurden (Brouwenstijn et al., 1996). Schließlich wurden aus den TIL dieser „Responder“-Patienten tumorspezifische, zytotoxische T-Zellen isoliert. Im Gegensatz dazu war der NZK-Patient MZ2733RC zuvor nicht therapiert worden.

In durchflusszytometrischen Untersuchungen von PBL des NZK-Patienten MZ2733RC, die zum Zeitpunkt der Nephrektomie und konsekutiv danach durchgeführt wurden, wurden Auffälligkeiten in der Population der CD3⁺/CD16⁺-NK-Zellen beobachtet. Zum Zeitpunkt der Nephrektomie wurden keine CD3⁺/CD16⁺-NK-Zellen im peripheren Blut detektiert. Interessanterweise jedoch repopulierten diese NK-Zellen nach Resektion des primären NZK MZ2733RC im August 1998 wieder das periphere Blut

des Patienten und wurden im Mai 1999, unmittelbar nach Indikation von Fernmetastasen in der Lunge und der Leber des Patienten, nachgewiesen. Mit der Progression der Metastasen verschwanden diese NK-Zellen sukzessive wieder aus der Zirkulation und wurden im August 2000, zwei Jahre nach Nephrektomie, nicht mehr detektiert. Da nach Entfernung des Primärtumors der Tumor-induzierte Effekt so stark reduziert wurde, dass wieder NK-Zellen im peripheren Blut detektiert wurden, deuten diese Beobachtungen auf einen Tumorevasionsmechanismus hin, der bereits zum Zeitpunkt der Nieren-OP systemisch wirkte und möglicherweise zur Depletion von NK-Zellen in der Peripherie führte.

Interessanterweise wurden von anderen Arbeitsgruppen nur Defizienzen in der TZR- ζ -Ketten-, der NK-Rezeptor- ζ -Ketten-Expression, in der NF- κ B-Signalkaskade und nach antigenspezifischer Stimulation eine veränderte mRNS-Transkription von Zytokinen bzw. deren verringerte Produktion beschrieben. Dabei wurde insbesondere eine verringerte IFN- γ -Produktion von *in vitro* stimulierten PBL bei Patienten mit Blasen-, Nierenzell- und Kolorektalkarzinomen nachgewiesen (Kadish et al., 1981; Elsässer-Beile et al., 1992, 1993a, 1993b, 2000; Kono et al., 1996; Matsuda et al., 1995). Jedoch wurden bisher keine Auswirkungen von Tumor induzierten Evasionsmechanismen auf die Population von peripheren CD3⁻/CD16⁺-NK-Zellen *in vivo* charakterisiert.

Ein möglicher Erklärungsversuch ergibt sich vielleicht aus Beobachtungen, die zeigen, dass es *in vitro* nach einer gezielten Aktivierung von Makrophagen und den dadurch induzierten oxidativen Stress, zu einer Apoptose in CD3⁻/CD56⁺ NK-Zellen kommt, die durch Histamin antagonisierbar ist (Hansson et al., 1996 und 1998; Hellstrand et al., 1998). So ist nicht auszuschließen, dass aktivierte infiltrierende und zirkulierende Monozyten/ Makrophagen durch die Freisetzung von Wasserstoffperoxid zu einem transienten Verlust der CD3⁻/CD16⁺-NK-Zellen in der Zirkulation des NZK-Patienten MZ2733RC beitragen. Ebenso wird auch durch den oxidativen Stress eine Verringerung der ζ -Kette in T- und NK-Zellen induziert, die die zellulär-vermittelten zytotoxischen Effektorfunktionen inhibiert (Kono et al., 1996).

Die beobachtete kontinuierliche Reduktion der CD3⁺/CD4⁺-T-Zell-Frequenz im peripheren Blut des NZK-Patienten MZ2733RC, die von August 1998 bis August 2000 beobachtet wurde, kann möglicherweise auch auf eine Aktivierung von zirkulierenden Monozyten/Makrophagen zurückzuführen sein (Kiessling et al., 1999). Da die CD3⁺/CD4⁺-T-Zellen für die Generierung von zytotoxischen CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen essentiell sind, muss angenommen werden, dass durch ihren fortschreitenden Verlust immer weniger Effektor-CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen generiert wurden und dadurch bedingt eine weitere Tumorprogression stattfand. Ob die NZK-Zelllinie MZ2733RC in der Lage ist, Monozyten/Makrophagen zu aktivieren und eine Freisetzung von Wasserstoff-

peroxid zu induzieren, die Effektorfunktionen von NK-Zellen und T-Zellen inhibieren, müssen zukünftige *in vitro* Experimente zeigen.

5.6 Spezifität der T-Zelllinie XIE6

Früher beschriebene Th1-spezifische CD3⁺/CD8⁺-ZTL-Linien vermitteln *in vitro* Effektorfunktionen gegen NZK-Zellen (Finke et al., 1990; Beldegrun et al., 1988; Thiounn et al., 1994) und sind meist spezifisch für ein HLA-Allel (Koo et al., 1991; Schendel et al., 1993; Finke et al., 1994; Bernhard et al., 1994; Brouwenstijn et al., 1996). In einem beschriebenen NZK-System wurden mehrere ZTL-Linien mit verschiedenen HLA Klasse I-Restriktionen charakterisiert, die die autologe NZK-Zelllinie lysierten. Dies gibt möglicherweise einen Hinweis darauf, dass NZK zugleich mehrere immunogene ZTL-definierte TAA exprimieren (Brouwenstijn et al., 1998; Neumann et al., 1998). Überdies wurden mit einigen aus TIL generierten CD3⁺/CD8⁺-ZTL-Linien TAA charakterisiert, die als individuelle oder ubiquitäre TAA klassifiziert wurden (Gaugler et al., 1996; Ronsin et al., 1999; Gaudin et al., 1999; Probst-Kepper et al., 2001; van der Bruggen, 2002). Erst in einem einzigen Fall gelang die Charakterisierung eines NZK-spezifischen TAA mit einem aus PBL generierten ZTL-Klon (Brändle et al., 1996). Analog zu TIL2733 besaßen diese autologen TIL eine verringerte Expression der TZR- ζ -Kette und entwickelten keine Zytotoxizität gegen die autologe NZK-Zelllinie. Jedoch wurden verschiedene zytotoxische CD3⁺/CD8⁺-T-Zellklone aus PBL generiert, die spezifisch für das gleiche antigene Peptid waren (Brändle et al., 1996).

Aufgrund der Beobachtungen, dass Tumor-induzierte T-Zelldefizienzen in frühen Tumorstadien auf den Tumor begrenzt sind, defiziente T-Zellen der Zirkulation durch IL-2-Stimulation *in vitro* ihre ursprüngliche Reaktivität wieder erlangen und aus PBL tumorreaktive T-Zellklone generiert werden können (Kieśliling et al., 1999; Lai et al., 1996; Matsuda et al., 1995; Brändle et al., 1996; Mulder et al., 1997), wurden autologe PBL des NZK-Patienten MZ2733RC zur *in vitro* Sensibilisierung verwendet. Die Grundlage für die Isolierung von autologen tumorspezifischen T-Zellen bildete dabei die etablierte NZK-Zelllinie MZ2733RC, die als „Antigentträger“ zur Stimulation von peripheren T-Zellen verwendet wurde (Brouwenstijn et al., 1996; Hérin et al., 1997).

Dabei wurden erst in Gegenwart unphysiologisch großer IL-2-Mengen (500 IU/ml) „Responder“-Kulturen erhalten, aus denen mittels Klonierungsanalyse („limiting dilution analysis“, LDA) T-Zelllinien mit EBV-immortalisierten lymphoblastoiden B-Zelllinien (EBV-B-LCL) als „Feeder“-Zellen propagiert wurden (van Elsas et al., 1996; Brouwenstijn et al., 1996; Hérin et al., 1997). Es wurden vier stabile T-Zelllinien etabliert. Davon entwickelten die T-Zelllinien XIIF8, XIVEI und XVD6 Effektoreigenschaften gegen die autologe Tumorzelllinie MZ2733RC, die in 20-stündigen Zytotoxizitätsversuchen zu einer Tumorzelllyse in Höhe von 25 % bis 42 % führten. Es ist

nicht auszuschließen, dass die langsame Reaktionskinetik möglicherweise einer Fas-FasL-Interaktion folgte, da der CD95/Fas-Rezeptor auf der Zelloberfläche von MZ2733RC-Zellen detektiert wurde.

Im Gegensatz dazu wurde die lytische Aktivität und die HLA Klasse I-Restriktion der T-Zelllinie XIE6 in herkömmlichen vier- bis sechsstündigen Zytotoxizitätsversuchen und davon abgeleiteten Blockadeexperimenten ermittelt. Die beobachtete Effektorfunktion wurde durch Depletion der CD3⁺/CD4⁺-T-Zellen induziert. Im Gegensatz zu früher charakterisierten NZK-spezifischen ZTL (Bernhard et al., 1994) wurde keine Autoreaktivität der T-Zelllinie XIE6 gegenüber Kurzzeitkulturen der autologen Nierenzellen oder davon abgeleiteten mit dem SV40-T-Antigen transduzierten Nierenzellen MZ2733NNSV beobachtet. Die Ermittlung der HLA-Allel-Spezifität der T-Zelllinie XIE6 erfolgte mit (i) monoklonalen Antikörpern, die verschiedene HLA-Allele detektieren, und (ii) allogenen NZK-Zelllinien bzw. Tumorzelllinien verschiedener histopathologischer Ursprünge, die individuelle HLA-Haplotypen exprimieren (Schendel et al., 1993; Brouwenstijn et al., 1996). Die Beurteilung dieser Versuche war jedoch nicht zufriedenstellend, da eine HLA-A1-Restriktion vermutet, aber eine HLA-Bw4-Restriktion nicht restlos ausgeschlossen werden kann. Diese Schwierigkeiten entstanden letztlich aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von blockierenden HLA Klasse I-spezifischen mAk. Bisher sind keine HLA-A1-blockierenden mAk bekannt, mit denen eine HLA-A1-restringierte T-Zell-vermittelte Lyse gezielt inhibiert werden kann. Die HLA-Allel-Spezifität wiederum ist notwendig, um ein von der T-Zelllinie XIE6 erkanntes Peptidantigen als ZTL-definiertes TAA des NZK zu identifizieren. Außerdem sind auch ausreichende Mengen eines von der T-Zelle nach Antigenkontakt sezernierten Zytokins notwendig, um durch das Verfahren der cDNS-Expressionsklonierung, das von der T-Zelllinie XIE6 erkannte TAA zu charakterisieren.

Von den im NZK-System MZ2733RC generierten T-Zelllinien wurden durch eingehende molekularbiologische und durchflusszytometrische Analysen die Expression von TZR-V β -Ketten-Familien charakterisiert. Dabei zeigte sich zunächst, dass in den TIL2733 mehrere prominente Transkripte von TZR-V β -Ketten-Familien synthetisiert werden. Mittels Durchflusszytometrie wurde eine T-Zellpopulation beobachtet, die die TZR-V β 2-Ketten-Familie exprimiert und 50 % aller Lymphozyten stellt. Ob die Proliferation dieser Population durch das Stimulationsverfahren *in vitro* selektiv induziert wurde, konnte nicht geklärt werden. Im Gegensatz zu den TIL2733 wurde in den etablierten T-Zelllinien die Expression von zwei bis drei verschiedenen Transkripten von TZR-V β -Ketten-Familien detektiert und dadurch nachgewiesen, dass die generierten T-Zelllinien polyklonal sind. Bei der Analyse der T-Zelllinie XIE6 wurden die Transkripte der TZR-V β 1-Ketten-Familie auf CD3⁺/CD4⁺-T-Zellen und der TZR-V β 13.6-

Ketten-Familie auf CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen nachgewiesen. Die isolierte TZR-Sequenz der CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen hat große Identität zu TZR-Vβ13.6-Ketten-Familien anderer CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen, die u. a. aus TIL von Melanompatienten isoliert wurden und in der NCBI-Genbank des NIH der USA veröffentlicht wurden.

5.7 T-Zelllinie XIE6 - anergische Tc1- oder Tc2-Zellen ?

Die nach Antigenkontakt von der T-Zelllinie XIE6 freigesetzten Zytokine wurden mittels ELISA untersucht. Dabei wurden von den Th1-Zytokinen TNF-α und IFN-γ marginale Mengen nachgewiesen. Dies wurde aufgrund der unphysiologisch großen IL-2-Mengen (500 IU/ml), die zur T-Zell-Sensibilisierung / –Generierung notwendig war, erwartet. Indirekt wurde dadurch vielleicht eine bereits vorhandene, verminderte IL-2-Sensitivität der autologen PBL beobachtet, die mit einer veränderten Expression des IL-2-Rezeptors in Verbindung gebracht werden kann und möglicherweise durch den Tumor induziert wurde (Alexander et al., 1993). Jedoch wurden von den CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen nach Antigenkontakt größere Mengen des Zytokins GM-CSF sezerniert, das zur Identifikation von TAA in cDNS-Expressionsklonierungsverfahren eingesetzt werden kann, wie es bei der Charakterisierung des Melanom-spezifischen Antigens TRP-2 erfolgte (Wang et al., 1996). Somit kann vielleicht auch im NZK-System MZ2733RC mit der Identifizierung des ZTL-definierten TAA, das von der T-Zelllinie XIE6 erkannt wird, begonnen werden.

Die weitergehenden Untersuchungen zur Sezernierung von Zytokinen zeigten, dass die T-Zelllinie XIE6 nach Antigenkontakt das Zytokin IL-10 sezerniert und in Verbindung mit der beobachteten IL-2-Insensitivität und der geringen zytotoxischen Effektor-eigenschaft eher anergisierten Tc2-Zellen als Tc1-Zellen zugeordnet werden kann. Die Tc2-Zellen zeichnen sich in erster Linie durch die Sezernierung von IL-4 aus (Li et al., 1997; Sato et al., 2000; Seo et al., 2002), das nicht von der T-Zelllinie XIE6 produziert wurde. In einer früheren Publikation wurde berichtet, dass in IL-2 kultivierten TIL eine Induktion der zytotoxischen Effektorfunktion durch einen Zytokincocktail aus IL-2 und IL-12 induziert wurde (Steger et al., 1997). Zur Überprüfung dieser Beobachtung wurde die T-Zelllinie XIE6 ebenfalls mit diesem Zytokincocktail stimuliert. Jedoch wurde die zytotoxische Effektorfunktion nicht induziert. Dafür wurde eine marginale transiente Induktion der IFN-γ- und TNF-α-Sezernierung nach erneutem Antigenkontakt nachgewiesen. Analog zu den beschriebenen Beobachtungen verloren die mit IL-2/IL-12 behandelten T-Zellen nach einer erneuten Restimulation mit autologen Tumorzellen in Gegenwart von IL-2/IL-12 ihre Proliferationsfähigkeit (Steger et al., 1997).

In einzelnen Berichten wurden CD3⁺/CD4⁺-Th2-Zellen beschrieben, die nach unspezifischer Stimulation mit Lektinen sowohl IL-4 als auch IFN- γ sezernierten, wobei beide Zytokine die Differenzierung von CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen in Tc1- oder Tc2-Zellen induzieren können (Erard et al., 1993; Croft et al., 1994; Sad et al., 1995a). Nach ihrer Differenzierung sezernieren zytotoxische T-Zellen ein definiertes Zytokinmuster vom Tc1- oder vom Tc2-Phänotyp, das wiederum durch die Wirkung von exogenen Zytokinen beeinflusst werden kann. So wird durch die Wirkung des Zytokins IL-12 eine transiente IFN- γ -Synthese und -Sekretion in humanen CD3⁺/CD4⁺-T-Zell-Klonen vom Th2-Typ hervorgerufen (Manetti et al., 1993; Yssel et al., 1994; Mocci et al., 1995). Anderen Berichten zufolge sollen Th2/Tc2-Zellen jedoch insensitive gegenüber einer IL-12-Stimulation werden, da sie nur eine marginale Expression der β 2-Untereinheit des IL-12-Rezeptors besitzen (Szabo et al., 1995; Szabo et al., 1997). Vice versa induziert IL-4 in differenzierten zytotoxischen Tc1-Zellen eine transiente IL-4-Produktion, eine verringerte IL-2-Synthese, reduziert die Proliferationsfähigkeit und vermindert die zytotoxischen Effektorfunktionen (Sad et al., 1995b; Sad et al., 1997).

5.8 Soluble HLA Klasse I-Moleküle – ein Immunevasionsmechanismus

Der Verlust bzw. die Verringerung der zytotoxischen Effektorfunktionen von TIL2733 und von der T-Zelllinie XIE6, die bei beiden beobachtet gegenüber den autologen PBL verringerte TZR- ζ -Ketten-Expression und die Schwierigkeiten mittels IL-2-Stimulation zytotoxische T-Zellen aus autologen PBL zu generieren, sind möglicherweise auf Defizienzen in der Signalkaskade der Effektorzellen zurückzuführen (Morford et al., 1999). Der beobachtete Verlust von NK-Zellen in der Zirkulation zeigt möglicherweise einen weiteren vom Tumor induzierten Evasionsmechanismus auf, der gezielt NK-Zellen eliminiert.

Die vom Tumor MZ2733RC vermittelten Evasionsmechanismen müssen so effizient sein, dass sie den Tumorzellen eine im Vergleich zu den SV40-T-Antigen transduzierten autologen Nierenzellen um 50 % höhere HLA Klasse I-Epitopdichte erlauben. Scheinbar unterliegen die Tumorzellen keinem nennenswerten Immunselektionsdruck, der nach der Charakterisierung der Immunphänotypen der etablierten NZK-Zelllinien und *in situ* bei anderen Tumorentitäten durch die Verringerung von kostimulierenden CD54-, CD58- und HLA Klasse I-Molekülen angenommen wurde (Kaklamanis und Hill, 1992; Melero et al., 1997; Hicklin et al., 1999; Khong und Restifo, 2002). Im Gegensatz zu einer verringerten Zelloberflächenexpression von HLA Klasse I-Molekülen, die oft als ursächlich für eine ineffiziente T-Zellaktivierung angesehen wird, kann auch eine Freisetzung von löslichen HLA Klasse I-Molekülen von der Zelloberfläche der Tumorzellen für defiziente Effektoreigenschaften und eine Apoptoseinitiation in aktivierten T- und NK-Zellen verantwortlich sein (Zavazava et al., 1996; Maccalli et al., 1999; Spaggiari et al., 2002). Dabei werden in Serum von erkrankten Patienten höhere

Spiegel von löslichen HLA Klasse I-Molekülen als in gesunden Spendern beobachtet (Puppo et al., 1995; Zavazava, 1998). Bei Melanompatienten wurde gezeigt, dass Defizienzen in der Signalkaskade der TZR-Aktivierung, insbesondere von Tyrosinkinase p56^{lck} und ZAP 70 durch lösliche, von der Zelloberfläche der Tumorzellen freigesetzte HLA Klasse I-Moleküle induziert wurden. Durch Depletion der löslichen HLA Klasse I-Moleküle wurden die Funktionen der Tyrosinkinasen rekonstituiert. Darüber hinaus wurde die ebenfalls in diesen TIL beobachtete, reduzierte TZR- ζ -Ketten-Expression durch eine Surrogatstimulation mit spezifischen mAk für TZR-V β -Ketten und für den kostimulierenden CD28-Rezeptor rekonstituiert (Maccali et al., 1999). Im Gegensatz zur LFA-1/CD54- soll die CD28/CD80-Kostimulation die Sensitivität von T-Zellen für ternäre HLA Klasse I/Peptidkomplexe erhöhen und eine stärkere TZR-Aktivierung induzieren, gleichzeitig anti-apoptotisch einem durch Aktivierung induzierten Zelltod entgegen wirken (Noel et al., 1996; Kirchhoff et al., 2000).

Tatsächlich wurden mit dem mAk MEM-G/9 im Überstand der NZK-Zelllinie MZ2733RC lösliche nicht-klassische HLA-G1/G5-Moleküle immunpräzipitiert. Diese Moleküle induzieren wie die klassischen HLA Klasse I-Moleküle nach Interaktion mit dem CD8-Rezeptor (i) eine Apoptose in CD3⁺/CD8-T-Zellen und NK-Zellen und (ii) eine IFN- γ -Produktion in NK-Zellen und CD3⁺/CD8-T-Zellen (Rajagopalan et al., 2001; Contini et al., 2003; Spaggiari et al., 2003) und (iii) inhibieren die zytotoxische NK- und T-Zellaktivität durch Vernetzung des CD8-Korezeptors (Contini et al., 2003). Die gleichzeitige Expression von inhibierenden HLA Klasse I-spezifischen KIR CD158 und CD94/NKG2 inhibieren die Apoptoseinduktion und die IFN- γ -Produktion (Spaggiari et al., 2003). Darüber hinaus inhibieren sie die Zytotoxizität von NK- und T-Zellen. Ihre Blockade jedoch rekonstituiert die IFN- γ -Freisetzung von NK-Zellen und T-Zellen (Guerra et al., 2002; Spaggiari et al., 2003), führt zu einer selektiven Vernetzung von löslichen HLA Klasse I-Molekülen mit aktivierenden KIR, induziert die Effektoreigenschaften und die Expression des löslichen Fas-Liganden. In den aktivierten Effektorzellen wird nach der CD95/Fas-FasL-Interaktionen eine Apoptose eingeleitet (Spaggiari et al., 2002; Gati et al., 2003). Somit wirken die inhibierenden KIR CD158 nicht nur deaktivierend, sondern auch anti-apoptotisch und sichern das Überleben von aktivierten Effektorzellen, indem sie das TZR-Signal und damit einen durch Aktivierung induzierten Zelltod inhibieren (Spaggiari et al., 2002; Gati et al., 2003). Analoge Beobachtungen wurden auch für zytotoxische CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen beschrieben, die aus TIL von NZK generiert wurden. Es wurde u. a. gezeigt, dass (i) die zytotoxischen Eigenschaften und die Zytokinproduktion von CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen durch HLA Klasse I-spezifische inhibierende KIR CD158 supprimiert werden (Phillips et al., 1995; D'Andrea et al., 1996; Ikeda et al., 1997), (ii) inhibierende KIR CD158 die TZR-induzierte Phosphorylierung der ZAP-70 Tyrosinkinase reduzieren und dadurch die

Phosphorylierung von LAT und die nachgeschaltete Signalkaskade inhibieren (Guerra et al., 2002). Dadurch wird auch die Expression des TZR und der assoziierten ζ -Kette fehlreguliert (Dumont et al., 2002). Diese Beobachtungen liefern möglicherweise eine Erklärung für den Verlust der NK-Zell- und T-Zell-vermittelten Zytotoxizität der proliferierenden TIL2733 und der T-Zelllinie XIE6.

5.9 Zytokine - Mediatoren der Immunevasion von MZ2733RC ?

Eine Vielzahl von weiteren Immunevasionsmechanismen wurde charakterisiert, die für defiziente Immunantworten verantwortlich sein können. Hierbei könnten Phänomene, wie z. B. ein Verlust der Antigenexpression des Tumors (Maeurer et al., 1996), eine immunologische Ignoranz (Ochsenbein et al., 1999), die Induktion von regulatorischen T-Zellen mit einem supprimierenden Phänotyp (North et al., 1990) und die Reduktion des Repertoires von hochaffinen T-Zell-Klonen, die modifizierte Selbstpeptide erkennen und während der T-Zellreifung im Thymus eliminiert werden (Targoni et al., 1998), durchaus dazu beitragen haben, dass der Tumor MZ2733RC der Immunantwort entkommt.

Viel häufiger jedoch werden Immunevasionsmechanismen beschrieben, die durch Zytokine oder immunmodulatorisch wirksame Moleküle induziert werden. Davon sind z. B. IL-10 (Matsuda et al., 1994) und TGF β -1 (Inge et al., 1992; Ruffini et al., 1993) mit dem NZK assoziiert. Ebenso werden hohe IL-10-Mengen im Serum von Tumorpatienten mit fortgeschrittenem Krankheitsbild nachgewiesen.

Das Zytokin hat vielfältige regulatorische Eigenschaften: (i) Es unterdrückt die DZ-Differenzierung aus Stammzell-Vorläuferzellen und deren Ausreifung, (ii) inhibiert die Antigenpräsentation, indem es die Transkription von HLA Klasse I-, HLA Klasse II-Molekülen und des TAP-Peptidtransporter vermindert, (iii) verringert die Expression des akzessorischen Moleküls CD54 (Yue et al., 1997), (iv) antagonisiert die IL-12-Produktion und (v) supprimiert die Induktion der Th1-Antwort *in vivo* (De Smet et al., 1997; Sharma et al., 1999), indem es die Aktivierung, Proliferation und Aktivität von Th1-Lymphozyten inhibiert (Fontana et al., 1989).

Die Tumorzelllinie MZ2733RC sezerniert kein IL-10. Jedoch wird IL-10 nach erfolgreichem Antigenkontakt von der T-Zelllinie XIE6 sezerniert. Da alle Effektorzellen vom Th1/Tc1- und Th2/Tc2-Phänotyp nach spezifischem Antigenkontakt IL-10 produzieren, um sich vor einem durch Aktivierung induzierten Zelltod zu schützen, ist es schwierig, die induzierte IL-10-Produktion als einen Tumor-induzierten Immunevasionsmechanismus anzusprechen. Klarheit können möglicherweise die immunhistochemischen Untersuchungen von *in situ* Schnittpräparaten des Tumors MZ2733RC bringen. Hier wurden keine Expressionsunterschiede für IL-10-sensitive Komponenten der Antigen-Prozessierung/Präsentation zwischen Tumor und autologem gesunden Nierenepithel nachgewiesen. Vielmehr wurde hier ebenso wie bei den *in vitro* kultivierten Zelllinien

eine verstärkte Expression von Komponenten der Antigen-Prozessierung/Präsentation im NZK im Vergleich zum Nierenepithel beobachtet.

5.10 Immunevasion vor einer natürlichen und spezifischen Immunität

Der Untersuchung der Transkription und Translation von nicht-klassischen HLA-G- und HLA-E-Genen in Biopsiematerial von NZK, dem korrespondierenden gesunden Nierenepithel sowie von etablierten NZK-Zelllinien waren Schwierigkeiten bei *in vitro* Sensibilisierungen von zytotoxischen T-Zellen aus autologen PBL im etablierten NZK-Zellsystem MZ2733RC vorausgegangen. Die Tumorzelllinie MZ2733RC wurde aufgrund ihrer hohen HLA Klasse I-Zelloberflächenexpression und der Expression der kostimulierenden Moleküle CD54/ICAM-1 und CD58/LFA-3, die in durchflusszytometrischen Analysen zum Immunphänotyp nachgewiesen wurden, ausgewählt. Hierbei zeigte sich, dass auf der Zelloberfläche der Tumorzellen MZ2733RC mehr HLA Klasse I-Moleküle detektiert werden als auf der Zelloberfläche von autologen, mit dem SV40-T-Antigen transduzierten Nierenzellen MZ2733NNSV. Da eine intakte HLA Klasse I-Präsentation auf der Zelloberfläche nur peptidabhängig erfolgt (Yewdell et al., 1999) und damit eine Antigenprozessierung und einen anschließenden Antigen-transport zur Voraussetzung hat (Neefjes et al., 2002), sollte es in diesem NZK-System möglich sein, eine T-Zell-Antwort *in vitro* zu induzieren. Die Beobachtungen zur HLA Klasse I-Präsentation auf der Zelloberfläche im NZK-System MZ2733RC unterscheiden sich von anderen NZK-Zelllinien, für die verminderte HLA Klasse I-Expressionen beschrieben wurden (Seliger et al., 1996a). Interessanterweise wurden dort Defizienzen in der Expression des TAP1/TAP2-Peptidtransporters und/oder dessen posttranskriptionelle Fehlregulationen für die Verminderung der HLA Klasse I-Präsentation angenommen, die dann zu einem Immunevasionsmechanismus der Tumoren geführt hätten. Diese Beobachtung könnte auch für die etablierten NZK-Zelllinien MZ2872RC und MZ2907RC zutreffen, die zudem eine geringere CD54- und CD58-Molekülexpression besitzen. Da aus früheren Untersuchungen von Seliger und Koautoren (1996a) eine hohe HLA Klasse I-Epitopdichte als notwendig für die effiziente Induktion einer T-Zellantwort angenommen wurde, wurde bei der Auswahl der NZK-Zelllinie MZ2733RC möglicherweise die Überlegung übergangen, dass die etablierten Tumorzellen über einen effizienten Immunevasionsmechanismus verfügen, der die HLA Klasse I-abhängige Mehr-Präsentation von Antigen negieren kann, wie dies für ein *in vitro* Modell des Melanoms von Riteau und Koautoren (2001) beschrieben wurde. Bringt man dies in Zusammenhang mit der Beobachtung, dass in den konsekutiv durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen von autologen peripheren Lymphozyten zum Zeitpunkt der Nephrektomie keine CD3⁺/CD16⁺ NK-Zellen nachgewiesen wurden, kann ein möglicher Evasionsmechanismus des metastasierenden NZK MZ2733RC existieren, der trotz intakter Antigenpräsentation zu einer Reduktion der

Effektorzellen der zellulären Immunantwort führt. Diese Beobachtungen wurden mit einem *in vitro* Modellsystem des Melanoms in Verbindung gebracht. Hierbei wurde gezeigt, dass die Expression von nicht-klassischen HLA-G1-Molekülen auf der Zelloberfläche von Melanomzellen zu einer (i) von der Peptidkonzentration abhängigen Inhibition von virusspezifischen zytotoxischen T-Zellen (Riteau et al., 1999) bzw. zu einer Inhibition von NK-Zellen führt (Paul et al., 1998; Le Gal et al., 1999). Diese Berichte bildeten die Basis der HLA-G-Untersuchungen im NZK. In den etablierten NZK-Zelllinien wurde eine Transkription des HLA-G-Gens nachgewiesen, wenn gleichzeitig eine höhere HLA Klasse I-Epitopdichte beobachtet wurde. Ob der Nachweis verschiedener HLA-G-Transkripte schon ein Anzeichen für eine transkriptionelle Fehlregulation des HLA-Lokus ist, muss noch näher untersucht werden. Sicher hingegen scheint, dass ein verändertes Methylierungsmuster im HLA-G-Promotor eine HLA-G-Transkription induziert (Moreau et al., 2003).

Der Einfluss der Zelloberflächenexpression von HLA-G1 auf eine zellulär-vermittelte Immunantwort wurde im NZK-System MZ2733RC mittels verschiedener zytotoxischer Effektorpopulationen untersucht. Obwohl MZ2733RC-Zellen eine im Vergleich zu den Nierenzellen MZ2733NNSV größere HLA Klasse I-Epitopdichte auf ihrer Zelloberfläche aufweisen, inhibieren sie die zytotoxischen Effektorleistungen von allogenen tyrosinasespezifischen ZTL, NK-Zellen und LAK-Zellen. Dieses Phänomen kann möglicherweise auf der Expression von HLA-G-Proteinisoformen in den HLA-G⁺ MZ2733RC-Zellen beruhen, da dies das einzige bisher untersuchte nicht-klassische HLA-Molekül ist, durch das sich die autologen Nierenzellen MZ2733NNSV und NZK-Zellen MZ2733RC in ihrer Proteinexpression unterscheiden. Dass die inhibierende Funktion von einem HLA Klasse I-Molekül ausgeübt wurde, bestätigten Blockierungsversuche mit dem pan-HLA Klasse I-spezifischen mAk w6/32. Hierbei wurde die LAK-Zell-vermittelte Zytotoxizität rekonstituiert und die Tumorzellen genauso effizient wie die Nierenzellen MZ2733NNSV lysiert. Daher wird angenommen, dass membranständige HLA-G1- und lösliche HLA-G5-Moleküle den beobachteten inhibierenden Effekt vermitteln. Eine eindeutige Klärung könnte durch die stabile Transfektion der HLA-G1/G5-cDNA-Fragmente in die zu immortalisierenden Nierenzellen MZ2733NNSV erzielt werden.

5.11 HLA-G - ein TAA des Nierenzellkarzinoms

Da in den NZK-Systemen MZ2733RC und MZ2877RC ein differentielles HLA-G-Transkriptionsmuster mit den sequenzspezifischen pan-HLA-G-Oligonukleotiden G.257 und G.1225 (Kirszenbaum et al., 1994) sowohl für die NZK-Zelllinien als auch für die entsprechenden NZK-Biopsien MZ2733RC und MZ2877RC nachgewiesen wurde, wurden die biochemischen und die funktionellen Eigenschaften einer HLA-G-Transkription für 19 verschiedene NZK-Zelllinien und 30 verschiedene Tumorbiopsien

und korrespondierendes Nierenepithel analysiert. Die Untersuchung war analog zu HLA-G-Transkriptionsstudien, die zuvor für das Melanom und andere Tumorentitäten durchgeführt worden waren (Real et al., 1999a; Real et al., 1999b).

In der RNS von 11 etablierten NZK-Zelllinien wurden heterogene HLA-G-Spleißmuster anhand von Größenunterschieden der synthetisierten RT-PCR-Amplifikate nachgewiesen. Dabei variierten die HLA-G-Isoformen und ihre semiquantitativ nachgewiesene Transkriptmenge. Der eigentliche Spezifitätsnachweis für die HLA-G-Amplikate erfolgte mit sequenzspezifischen Hybridisierungs sonden. In den Tumorzelllinien wurden mit Ausnahme von HLA-G4 alle bisher beschriebenen HLA-G-Transkripte identifiziert, wobei jede NZK-Zelllinie ein individuelles alternatives Spleißmuster herstellt.

Aufgrund von unterschiedlichen Transkriptmengen wurde das Detektionsverfahren zum HLA-G-Nachweis mit einer Zeitkinetik geführt. In NZK-Zelllinien und Tumorbiopsien, die HLA-G stark transkribieren, wurden fast alle HLA-G-Transkripte innerhalb von 5-10 Sekunden mit einem nicht-radioaktiven Verfahren dargestellt. Wurde eine geringere HLA-G-Transkription beobachtet, so wurde die Inkubationsdauer des Darstellungsverfahrens verlängert. Waren innerhalb von 15 min Expositionszeit keine Hybridisierungssignale zu beobachten, wurden Zelllinien und Biopsiematerial als HLA-G-negativ klassifiziert. Insgesamt wurden in den NZK-Biopsien alle bisher beschriebenen HLA-G-Transkripte detektiert. Das HLA-G1-Transkript wurde in allen HLA-G⁺ NZK-Zelllinien und HLA-G⁺ Biopsien nachgewiesen. Dadurch wurden Ergebnisse anderer Studien, die im Melanom und im Glioblastom durchgeführt wurden, ergänzt (Paul et al., 1999; Real et al., 1999b; Wiendl et al., 2002).

Erstmals wurde das HLA-G7-Transkript mit einer Intron-2-spezifischen Sonde in fünf von 11 NZK-Zelllinien und vier von 24 NZK-Biopsien detektiert. HLA-G7 wurde bisher nur in primären Melanomen, Hautmetastasen und Lymphknotenmetastasen von Melanompatienten nachgewiesen und kodiert für ein HLA-G-Molekül, das der α 1-Domäne des HLA-G1-Moleküls gleicht (Paul et al., 2000a). Die physiologische Bedeutung dieses Moleküls ist wie die der anderen HLA-G-Isoformen mit Ausnahme der solublen und membranständigen HLA-G1/G5-Moleküle noch nicht aufgeklärt (Bainbridge et al., 2000). Es wird aber mit einer Inhibition der zytotoxischen Effektorfunktion von T-Zellen in Verbindung gebracht (Paul et al., 2000a).

In 3 von 30 Nierenbiopsien und in der Nierenzelllinie MZ2733NNSV wurde eine marginale HLA-G1-Transkription nachgewiesen. Dies bestätigt wiederum frühere Untersuchungen, die zeigten, dass eine rudimentäre HLA-G1-Transkription in verschiedenen epithelialen Geweben nachweisbar ist (Onno et al., 1994). Ob mit dieser HLA-G1-Transkription auch eine physiologische Funktion assoziiert ist, wurde jedoch nicht beschrieben.

Mittels der Chorionkarzinomzelllinie JEG3 wurden vergleichende durchflusszytometrische Analysen zur Zelloberflächenexpression in den HLA-G⁺ NZK-Zelllinien geführt. Hierbei wurde mit dem mAk MEM-G/9 (Fournel et al., 2000) die konstitutive und die durch IFN- γ -induzierbare HLA-G1-Zelloberflächenexpression in den NZK-Zelllinien LE89.15RC und MZ2733RC nachgewiesen. Dies widerspricht einigen Beobachtungen, die eine IFN- γ -Regulation von HLA-G1 in Frage stellen (Gobin et al., 2002).

Zunächst schien die Translation im NZK-System MZ2733RC von der Menge der konstitutiven HLA-G1-Transkription abhängig zu sein, da die in den Nierenzellen MZ2733NNSV beobachtete marginale HLA-G1-Transkription koinzident mit einer fehlenden Molekülexpression auf der Zelloberfläche war. Erst durch die HLA-G1-spezifischen Immunpräzipitationsversuche wurde gezeigt, dass in der NZK-Zelllinie MZ1851RC, die eine starke HLA-G1-Transkription besitzt, keine Assoziation zwischen Transkriptmenge und Molekülexpression besteht. Vermutlich existiert ein posttranskriptioneller Mechanismus, der die Molekülexpression regulieren kann.

Im Gegensatz dazu wurde für die Induktion der HLA-G-Transkription in Tumorzellen epithelialen Ursprungs eine epigenetische Hypomethylierung von sog. CpG-Inseln innerhalb des HLA-G-Promotors verantwortlich gemacht (Moreau et al., 2003). Veränderungen im Methylierungsmuster werden immer wieder in Tumoren beobachtet und scheinen mit der Tumorentstehung und -Progression assoziiert zu sein (Hanahan und Weinberg, 2000). Durch veränderte Methylierungsmuster in der DNS von Tumorzellen kommt es möglicherweise zu fehlgeleiteten epigenetischen Kontroll- und Differenzierungsmechanismen (Rouas-Freiss et al., 2003).

Dass HLA-G1/Peptidkomplexe auf der Zelloberfläche von Tumorzellen exprimiert werden, sollte in Analogie zur Expression von klassischen HLA Klasse I-Molekülen eher einen stimulierenden Effekt auf Lymphozyten ausüben. Beispielhaft wurde gezeigt, dass die Interaktion von CD8-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von NK- und T-Zellen zu einer Stimulation der IFN- γ -Produktion und damit zu einer Induktion einer Th1-Antwort führt (Spiaggiari et al., 2003). Im Verlauf einer zellulär-vermittelten Immunreaktion würde dann ein Immunselektionsdruck auf die Tumorzellen ausgeübt, der zu einem *in vivo* beobachteten Verlust von HLA Klasse I-Molekülen, und auch von HLA-G1-Molekülen führt. Dass dies nicht so ist, zeigen Expressionsanalysen zu HLA-G1 im NZK. Werden die Frequenzen einer HLA-G1-Transkription und -Molekülexpression zugrunde gelegt, so können diese einen Aufschluss darüber geben, dass eine *in vivo* voranschreitende Immunselektion möglicherweise zu einem Erwerb der HLA-G1-Transkription und -Translation führt. Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass in 80 % aller untersuchten NZK-Biopsien eine HLA-G1-Transkription in unterschiedlichem Umfang existiert, die deutlich die Frequenz von 10 %, die im Nierenepithel beobachtet wird, überschreitet. Im Gegensatz dazu wird eine HLA-G1-Molekülex-

pression *in situ* an Schnittpräparaten von NZK mit einer Frequenz von 20 %, jedoch nicht im gesunden Nierenepithel, nachgewiesen (Ibrahim et al., 2001). Es kann daher angenommen werden, dass es zu einem Erwerb der HLA-G-Transkription im NZK und nicht zu einem selektiven Verlust im gesunden Nierenepithel kommt. Die Diskrepanz zwischen HLA-G-Transkription und -Translation in NZK-Biopsien könnte wiederum auf eine posttranskriptionelle Regulation der HLA-G-Proteinbiosynthese hindeuten (Real et al., 1999).

Schließlich wurde gezeigt, dass *in vitro* in 11 etablierten permanenten NZK-Zelllinien die Frequenzen der HLA-G1-Transkription und der HLA-G1-Molekülexpression auf 58 % bzw. 12 % zurückgehen. Die *in vitro* beobachtete Reduktion der HLA-G1-Frequenz kann vielleicht dadurch erklärt werden, dass *in vitro* keine Immunselektion existiert, und somit die Notwendigkeit für eine HLA-G1/-G5-Expression nicht mehr vorhanden ist. Möglicherweise kommt es aufgrund der hohen genetischen Instabilität von NZK-Zelllinien *in vitro* zu einer Reduktion bzw. zu einem Verlust der HLA-G1-Expression oder zu einer Anreicherung von Tumorzellen, die kein HLA-G1 exprimieren.

Anhand der HLA-G-transkribierenden NZK-Zelllinien MZ1851RC, LE89.15RC, MZ2733RC, der Nierenzelllinie MZ2733NNSV und der für eine HLA-G-Transkription negativen NZK-Zelllinie MZ2789RC wurde gezeigt, dass die Expression von HLA-G-Genprodukten vergleichbar ist mit derjenigen der Chorionkarzinomzelllinie JEG3, aus der erstmals HLA-G1-Moleküle charakterisiert wurden. Darüber hinaus wurden in Immunpräzipitaten von TX114-Lysaten HLA-G1/Peptidkomplexe mit dem mAk MEM-G/9 in den NZK-Zelllinien LE89.15RC und MZ2733RC, jedoch nicht in der HLA-G transkribierenden NZK-Zelllinie MZ1851RC und in den Nierenzellen MZ2733NNSV nachgewiesen und damit einerseits vorherige durchflusszytometrische Untersuchungen bestätigt. Außerdem wurden mit dem für die α 1-Domäne des HLA-A- und HLA-G-Allels kreuzspezifischen mAk HC-A2 weitere aberrante HLA-G-Isoformen immunpräzipitiert, die möglicherweise alternative HLA-G-Proteinisoformen darstellen, deren biologische Funktion in weiteren Experimenten aufgeklärt werden sollte. Aufgrund der prominenten HLA-G-Expression, die im NZK beobachtet wurde, kann HLA-G als TAA des NZK bezeichnet werden.

6. Ausblick

Nach Stimulation von autologen PBL mit CD80/B7-1 modifizierten MZ1257RC-Zellen wurde eine Vielzahl von zytotoxischen CD3⁺/CD8⁺-T-Zelllinien generiert, die IFN- γ sezernieren und neben den CD80/B7-1 modifizierten auch die parentalen MZ1257RC-Zellen lysieren. Diese T-Zelllinien sollen näher charakterisiert und wie der früher etablierte zytotoxische, HLA-A2 restringierte T-Zellklon (Bernhard et al., 1994) zur Identifizierung von TAA verwendet werden. Unterdessen wird die begonnene Identifizierung des ZTL-definierten TAA des HLA-A2 restringierten T-Zellklons, der neben den autologen MZ1257RC-Zellen, die autologen Nierenepithelzellen und die allo-genen MZ1851RC-Zellen lysiert, mittels der hergestellten cDNS-Expressionsbibliothek fortgesetzt werden.

Analog dazu soll die genetische CD80/B7-1-Modifikation von HLA-G⁺ MZ2733RC-Zellen durchgeführt werden. In *in vitro* Sensibilisierungsexperimenten soll ihr Einfluss auf die Proliferation von allo-genen und autologen T-Zellen untersucht werden. Möglicherweise induziert diese Modifikation trotz der konstitutiven und immunsupprimierend wirkenden Expression von HLA-G-Molekülen auch die Generierung von peripheren autologen Th1-typischen, zytotoxischen CD3⁺/CD8⁺-T-Zelllinien. Von besonderem Interesse wären die molekularen Vorgänge, die nach Stimulation mit den CD80/B7-1 modifizierten oder den parentalen MZ2733RC-Zellen in der T-Zell-Signaltransduktionskaskade der stimulierten T-Zellen stattfinden.

Des Weiteren sollte überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der verringerten Expression der TZR- ζ -Kette und solublen HLA Klasse I-Molekülen insbesondere HLA-G-Molekülen besteht. Überdies sollte in Blockierungsexperimenten mit HLA-G1 spezifischen monoklonalen Antikörpern gezeigt werden, dass es nach Blockade von HLA-G1 zu einer Rekonstitution der Sensitivität der HLA-G⁺ MZ2733RC-Zellen kommt, wie sie in Blockierungsexperimenten mit w6/32 beobachtet wurde. Alternativ dazu könnte die inhibierende Funktion einzelner HLA-G-Proteinisofomen dadurch charakterisiert werden, dass sie stabil in den inzwischen immortalisierten autologen Nierenzellen MZ2733NNSV exprimiert werden. Hierzu müsste ihre Proteinexpression nachgewiesen und ihr Einfluss auf eine zellulär-vermittelte Immunantwort untersucht werden. Von besonderem Interesse ist dabei die HLA-G7-Isoform, die eine aberrante Form der α 1-Domäne des HLA-G1-Moleküls darstellt und von mehreren NZK-Zelllinien konstitutiv exprimiert wird.

7. Zusammenfassung

Die Etablierung von NZK-Systemen bietet neue Ansatzpunkte zur Aufklärung der Pathophysiologie von Nierenzellkarzinomen und ermöglicht die Charakterisierung von tumorspezifischen Indikatoren, insbesondere von tumorassoziierten Antigenen. Dabei können die 15 etablierten NZK-Zelllinien als repräsentative *in vitro* Modelle für die *in vivo* entstandenen Primärtumoren angesehen werden.

Mit den zur Verfügung stehenden analytischen Methoden wurden zunächst individuell verschiedene Immunphänotypen der etablierten NZK-Zelllinien aufgrund der Präsentation von HLA Klasse I/Peptidkomplexen und Adhäsionsmolekülen charakterisiert. Die beobachtete Verringerung oder der Verlust der untersuchten Antigene kann dabei Hinweise für eine *in vivo* stattgefundene Immunselektion geben. Des Weiteren wurde beispielhaft im NZK-System MZ2733RC gezeigt, dass NZK-Zelllinien auch dann eingeschränkt immunogen sind, wenn sie eine hohe Epitopdichte von HLA Klasse I/Peptid-Komplexen und kostimulierenden Adhäsionsmolekülen auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Interessanterweise ist dies vergleichbar mit dem NZK-System MZ1257RC. Eine verringerte Antigenpräsentation der NZK-Zelllinie MZ1257RC wurde erst durch die genetische Modifikation mit dem kostimulierenden Molekül CD80/B7-1 kompensiert und führte zu einer Induktion zytotoxischer, IFN- γ produzierender autologer T-Zelllinien. Die in diesem NZK-System durchgeführte cDNS-Expressionsklonierung zur Identifikation des TAA eines HLA-A2 restringierten zytotoxischen T-Zellklons erbrachte bislang kein eindeutiges Ergebnis, obwohl in der hergestellten cDNS-Expressionsbibliothek u. a. die RAGE1-cDNS enthalten ist.

Die im NZK-System MZ2733RC generierte zytotoxische T-Zelllinie XIE6 lysiert die autologe NZK-Zelllinie MZ2733RC, allogene NZK-Zellen und eine Zervixkarzinomzelllinie, jedoch nicht autologe Nierenzellen im Kontext einer HLA-A1/Bw4-Restriktion. Als Antwort auf eine Antigenstimulation sezernieren die T-Zellen die Th2-typischen Zytokine GM-CSF und IL-10 und exprimieren die TZR-V β -Ketten-Familie 13.6, deren Sequenz charakterisiert wurde. Eine Untersuchung mit allogenen LAK-, NK-, und zytotoxischen tyrosinasespezifischen T-Zellen ergab, dass die NZK-Zelllinie MZ2733RC weniger sensitiv gegenüber Effektorzellen ist, als die autologe Nierenzelllinie MZ2733NN. Jedoch führte die Blockade der präsentierten HLA Klasse I-Moleküle durch den mAk w6/32 zu einer Rekonstitution der LAK-Zell-vermittelten Zytotoxizität. In Verbindung mit einer fehlenden NK-Zellaktivität in TIL2733 wurde ein Immunevasionsmechanismus vermutet, der nicht-klassischen HLA Klasse Ib-Molekülen, insbesondere HLA-G1/G5 zugeschrieben wird, und deren Transkripte mittels RT-PCR im NZK-System MZ2733RC nachgewiesen wurden.

In der anschließenden Studie wurden HLA-G-Spleißvarianten in 11 von 19 NZK-Zelllinien, in 24 von 30 NZK-Biopsien jedoch nur in 3 von 30 autologen Nierenepithelien

nachgewiesen. Die sensible Detektion durch RT-PCR wurde durch nachfolgendes Southern Blotting und durch sequenzspezifische Hybridisierungssonden verifiziert. Demzufolge ist eine Assoziation von Malignität und HLA-G-Transkription zu beobachten. In den HLA-G⁺ Nierenzellkarzinomen wurden neben prominenten HLA-G1/G5-Transkripten erstmals HLA-G7-Transkripte und keine HLA-G4-Transkripte nachgewiesen. Schließlich wurde eine HLA-G1-Proteinexpression in NZK-Biopsien und NZK-Zelllinien nach Immunpräzipitation detektiert. Darüber hinaus korreliert die konstitutive HLA-G1-Proteinexpression mit derjenigen von HLA Klasse I-Molekülen. Eine Behandlung von HLA-G1⁺ NZK-Zelllinien mit IFN- γ führt zu einer Erhöhung der Proteinexpression, die konsistent mit der Erhöhung der HLA Klasse I-Präsentation ist. Aufgrund der Korrelation der HLA-G-Expression mit der Malignität der NZK-Karzinome kann HLA-G als tumorassoziiertes Antigen bezeichnet werden.

8. Literaturverzeichnis

- Abril, E., Mendez, R. E., Garcia, A., Serrano, A., Cabrera, T., Garrido, F., Ruiz-Cabello, F. (1996). Characterization of a gastric tumor cell line defective in MHC class I inducibility by both alpha- and gamma-interferon. *Tissue Antigens* 47, 391-398.
- Adrian-Cabestre, F., Moreau, P., Riteau, B., Ibrahim, E. C., Le Danff, C., Dausset, J., Rouas-Freiss, N., Carosella, E. D., and Paul, P. (1999). HLA-G expression in human melanoma cells: protection from NK cytotoxicity. *J Reprod Immunol* 43, 183-193.
- Alegre, M. L., Frauwirth, K. A., Thompson, C. B. (2001). T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol*, 220-228.
- Alexander, J. P., Kudoh, S., Melsop, K. A., Hamilton, T. A., Edinger, M. G., Tubbs, R. R., Sica, D., Tuason, L., Klein, E., Bukowski, R. M., and et al. (1993). T-cells infiltrating renal cell carcinoma display a poor proliferative response even though they can produce interleukin 2 and express interleukin 2 receptors. *Cancer Res* 53, 1380-1387.
- Algarra, I., Gaforio, J. J., Garrido, A., Mialdea, M. J., Perez, M., Garrido, F. (1991). Heterogeneity of MHC-class-I antigens in clones of methylcholanthrene-induced tumors. Implications for local growth and metastasis. *Int J Cancer Suppl.* 6, 73-81.
- Algarra, I., Garcia-Lora, A., Cabrera, T., Ruiz-Cabello, F., and Garrido, F. (2004). The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother.*
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-10.
- Amiot, L., Onno, M., Drenou, B., le Marchand, B., Lamy, T., Semana, G., and Fauchet, R. (1996). Distribution of HLA-G alternative mRNAs including soluble forms in normal lymphocytes and in lymphoid cell-derived leukemia. *Eur J Immunogenet* 23, 311-320.
- Amiot, L., Onno, M., Drenou, B., Monvoisin, C., and Fauchet, R. (1998). HLA-G class I gene expression in normal and malignant hematopoietic cells. *Hum Immunol* 59, 524-528.
- Androlewicz, M. J., Ortmann, B., van Endert, P. M., Spies, T., Cresswell, P. (1994). Characteristics of peptide and major histocompatibility complex class I/beta 2-microglobulin binding to the transporters associated with antigen processing (TAP1 and TAP2). *Proc Natl Acad Sci USA.* 91, 12716-12720.
- Androlewicz, M. J., and Cresswell, P. (1994). Human transporters associated with antigen processing possess a promiscuous peptide-binding site. *Immunity* 1, 7-14.
- Angevin, E., Kremer, F., Gaudin, C., Hercend, T., and Triebel, F. (1997). Analysis of T-cell immune response in renal cell carcinoma: polarization to type 1-like differentiation pattern, clonal T-cell expansion and tumor-specific cytotoxicity. *Int J Cancer* 72, 431-440.
- Anichini, A., Mortarini, R., Supino, R., and Parmiani, G. (1990). Human melanoma cells with high susceptibility to cell-mediated lysis can be identified on the basis of ICAM-1 phenotype, VLA profile and invasive ability. *Int J Cancer* 46, 508-515.
- Aruffo, A., and Seed, B. (1987). Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 8573-8577.
- Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2, 420-30.
- Atkins, D., Ferrone, S., Schmahl, G. E., Storkel, S., and Seliger, B. (2004). Down-regulation of HLA class I antigen processing molecules: an immune escape mechanism of renal cell carcinoma? *J Urol* 171, 885-889.

- Atzpodien, J., Korfer, A., Palmer, P. A., Franks, C. R., Poliwoda, H., Kirchner, H. (1990). Treatment of metastatic renal cell cancer patients with recombinant subcutaneous human interleukin-2 and interferon-alpha. *Ann Oncol* 1, 377-378.
- Atzpodien, J., Kirchner, H., Jonas, U., Bergmann, L., Schott, H., Heynemann, H., Fornara, P., Loening, S. A., Roigas, J., Muller, S. C., Bodenstein, H., Pomer, S., Metzner, B., Rebmann, U., Oberneder, R., Siebels, M., Wandert, T., Puchberger, T., Reitz, M. (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.
- Bain, C., Merrouche, Y., Puisieux, I., Duc, A., Colombo, M. P., and Favrot, M. (1996). B7.1 gene transduction of human renal-cell-carcinoma cell lines restores the proliferative response and cytotoxic function of allogeneic T cells. *Int J Cancer* 67, 769-776.
- Bainbridge, D., Ellis, S., Le Bouteiller, P., and Sargent, I. (2001). HLA-G remains a mystery. *Trends Immunol* 22, 548-552.
- Banat, G. A., Christ, O., Cochlovius, B., Pralle, H. B., and Zoller, M. (2001). Tumour-induced suppression of immune response and its correction. *Cancer Immunol Immunother* 49, 573-586.
- Barnstable, C. J., Bodmer, W. F., Brown, G., Galfre, G., Milstein, C., Williams, A. F., and Ziegler, A. (1978). Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell* 14, 9-20.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 727-729.
- Becker, J. C., Termeer, C., Schmidt, R. E., Brocker, E. B. (1993). Soluble intercellular adhesion molecule-1 inhibits MHC-restricted specific T cell/tumor interaction. *J Immunol* 151, 7224-7232.
- Belldegrun, A., Muul, L. M., and Rosenberg, S. A. (1988). Interleukin 2 expanded tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell cancer: isolation, characterization, and antitumor activity. *Cancer Res* 48, 206-214.
- Benitez, R., Godelaine, D., Lopez-Nevot, M. A., Brasseur, F., Jimenez, P., Marchand, M., Oliva, M. R., van Baren, N., Cabrera, T., Andry, G., Landry, C., Ruiz-Cabello, F., Boon, T., Garrido, F. (1998). Mutations of the beta2-microglobulin gene result in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue Antigens* 52, 520-529.
- Bernhard, H., Karbach, J., Wolfel, T., Busch, P., Storkel, S., Stockle, M., Wolfel, C., Seliger, B., Huber, C., Meyer zum Buschenfelde, K. H., and et al. (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.
- Berridge, M. V., Tan, A. S. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303, 474-482.
- Biassoni, R., Cantoni, C., Marras, D., Giron-Michel, J., Falco, M., Moretta, L., Dimasi, N. (2003). Human natural killer cell receptors: insights into their molecular function and structure. *J Cell Mol Med* 7, 376-387.
- Bicknell, D. C., Kaklamanis, L., Hampson, R., Bodmer, W. F., Karran, P. (1996). Selection for beta 2-microglobulin mutation in mismatch repair-defective colorectal carcinomas. *Curr Biol* 6, 1695-1697.
- Bird, C. H., Sutton, V. R., Sun, J., Hirst, C. E., Novak, A., Kumar, S., Trapani, J. A., Bird, P. I. (1998). Selective regulation of apoptosis: the cytotoxic lymphocyte serpin proteinase inhibitor 9 protects against

- granzyme B-mediated apoptosis without perturbing the Fas cell death pathway. *Mol Cell Biol* 18, 6387-6398.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acid Res* 7, 1513-1523
- Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., Wiley, D. C. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329, 506-512.
- Bjorkman, P. J., Davis, M. M. (1989). Model for the interaction of T-cell receptors with peptide/MHC complexes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54, 365-73.
- Bjornsson, J., Short, M. P., Kwiatkowski, D. J., Henske, E. P. (1996). Tuberous sclerosis-associated renal cell carcinoma. Clinical, pathological, and genetic features. *Am J Pathol* 149, 1201-1208.
- Blankenstein, T., Schuler, T. (2002). Cross-priming versus cross-tolerance: are two signals enough? *Trends Immunol*, 171-173.
- Blankenstein, T., Qin, Z. (2003). The role of IFN-gamma in tumor transplantation immunity and inhibition of chemical carcinogenesis. *Curr Opin Immunol* 15, 148-154.
- Bleumer, I., Knuth, A., Oosterwijk, E., Hofmann, R., Varga, Z., Lamers, C., Kruit, W., Melchior, S., Mala, C., Ullrich, S., *et al.* (2004). A phase II trial of chimeric monoclonal antibody G250 for advanced renal cell carcinoma patients. *Br J Cancer* 90, 985-990.
- Bodnar, A. G., Kim, N. W., Effros, R. B., Chiu, C. P. (1996). Mechanism of telomerase induction during T cell activation. *Exp Cell Res* 228, 58-64.
- Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S., Wright, W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349-352.
- Bond, J. A., Wyllie, F. S., Wynford-Thomas, D. (1994). Escape from senescence in human diploid fibroblasts induced directly by mutant p53. *Oncogene* 9, 1885-1889.
- Boon, T., Cerottini, J. C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., and Van Pel, A. (1994). Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 12, 337-365.
- Boon, T., van der Bruggen, P. (1996). Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med* 183, 725-729.
- Borrego, F., Ulbrecht, M., Weiss, E. H., Coligan, J. E., Brooks, A. G. (1998). Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med* 187, 813-818.
- Borrego, F., Kabat, J., Kim, D. K., Lieto, L., Maasho, K., Pena, J., Solana, R., and Coligan, J. E. (2002). Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol* 38, 637-660.
- Boyington, J. C., and Sun, P. D. (2002). A structural perspective on MHC class I recognition by killer cell immunoglobulin-like receptors. *Mol Immunol* 38, 1007-1021.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brändle, D., Bresseur, F., Weynants, P., Boon, T., and Van den Eynde, B. (1996). A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma. *J Exp Med* 183, 2501-2508.

- Brauch, H., Weirich, G., Brieger, J., Glavac, D., Rodl, H., Eichinger, M., Feurer, M., Weidt, E., Puranakanittha, C., Neuhaus, C., Pomer, S., Brenner, W., Schirmacher, P., Störkel, S., Rotter, M., Masera, A., Gugeler, N., Decker, H. J. (2000). VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation. *Cancer Res* 60, 1942-1948.
- Braud, V. M., Allan, D. S., O'Callaghan, C. A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., Lazetic, S., Young, N. T., Bell, J. I., Phillips, J. H., Lanier, L. L., McMichael, A. J. (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391, 795-799
- Braud, V. M., Allan, D. S., and McMichael, A. J. (1999). Functions of nonclassical MHC and non-MHC-encoded class I molecules. *Curr Opin Immunol* 11, 100-108.
- Brenner, W., Farber, G., Herget, T., Lehr, H. A., Hengstler, J. G., and Thuroff, J. W. (2002). Loss of tumor suppressor protein PTEN during renal carcinogenesis. *Int J Cancer* 99, 53-57.
- Brossart, P., Stuhler, G., Flad, T., Stevanovic, S., Rammensee, H. G., Kanz, L., and Brugger, W. (1998). Her-2/neu-derived peptides are tumor-associated antigens expressed by human renal cell and colon carcinoma lines and are recognized by in vitro induced specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 58, 732-736.
- Brouwenstijn, N., Gaugler, B., Kruse, K. M., van der Spek, C. W., Mulder, A., Osanto, S., van den Eynde, B. J., and Schrier, P. I. (1996). Renal-cell carcinoma-specific lysis by cytotoxic T-lymphocyte clones isolated from peripheral blood lymphocytes and tumor-infiltrating lymphocytes. *Int J Cancer* 68, 177-182.
- Brouwenstijn, N., Hoogstraten, C., Verdegaal, E. M., Van der Spek, C. W., Deckers, J. G., Mulder, A., Osanto, S., and Schrier, P. I. (1998). Definition of unique and shared T-cell defined tumor antigens in human renal cell carcinoma. *J Immunother* 21, 427-434.
- Browning, M. J., Krausa, P., Rowan, A., Hill, A. B., Bicknell, D. C., Bodmer, J. G., Bodmer, W. F. (1993). Loss of human leukocyte antigen expression on colorectal tumor cell lines: implications for anti-tumor immunity and immunotherapy. *J Immunother* 14, 163-168.
- Browning, M., Petronzelli, F., Bicknell, D., Krausa, P., Rowan, A., Tonks, S., Murray, N., Bodmer, J., Bodmer, W. (1996). Mechanisms of loss of HLA class I expression on colorectal tumor cells. *Tissue Antigens* 47, 364-371.
- Bryan, T. M., Reddel, R. R. (1994). SV40-induced immortalization of human cells. *Crit Rev Oncog* 5, 331-357.
- Bryan, T. M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S., Reddel, R. R. (1995). Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J* 14, 4240-4248.
- Buggins, A. G., Hirst, W. J., Pagliuca, A., Mufti, G. J. (1998). Variable expression of CD3-zeta and associated protein tyrosine kinases in lymphocytes from patients with myeloid malignancies. *Br J Haematol* 100, 784-792.
- Bukowski, R. M., Rayman, P., Uzzo, R., Bloom, T., Sandstrom, K., Peereboom, D., Olencki, T., Budd, G. T., McLain, D., Elson, P., Novick, A., Finke, J. H. (1998). Signal transduction abnormalities in T lymphocytes from patients with advanced renal carcinoma: clinical relevance and effects of cytokine therapy. *Clin Cancer Res* 4, 2337-2347.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112, 195-203.
- Caignard, A., Guillard, M., Gaudin, C., Escudier, B., Triebel, F., and Dietrich, P. Y. (1996). In situ demonstration of renal-cell-carcinoma-specific T-cell clones. *Int J Cancer* 66, 564-570.

- Cahill, D. P., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Lengauer, C. (1999). Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol* 9, M57-M60.
- Callan, M. F., Annels, N., Steven, N., Tan, L., Wilson, J., McMichael, A. J., Rickinson, A. B. (1998). T cell selection during the evolution of CD8⁺ T cell memory in vivo. *Eur J Immunol* 28, 4382-4390.
- Cantoni, C., Biassoni, R., Pende, D., Sivori, S., Accame, L., Pareti, L., Semenzato, G., Moretta, L., Moretta, A., and Bottino, C. (1998a). The activating form of CD94 receptor complex: CD94 covalently associates with the Kp39 protein that represents the product of the NKG2-C gene. *Eur J Immunol* 28, 327-338.
- Cantoni, C., Verdiani, S., Falco, M., Pessino, A., Cilli, M., Conte, R., Pende, D., Ponte, M., Mikaelsson, M. S., Moretta, L., and Biassoni, R. (1998b). p49, a putative HLA class I-specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin superfamily. *Eur J Immunol* 28, 1980-1990.
- Cantoni, C., Falco, M., Pessino, A., Moretta, A., Moretta, L., and Biassoni, R. (1999). P49, a putative HLA-G1 specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin Superfamily. *J Reprod Immunol* 43, 157-165.
- Cardi, G., Heaney, J. A., Schned, A. R., Phillips, D. M., Branda, M. T., and Ernstoff, M. S. (1997). T-cell receptor zeta-chain expression on tumor-infiltrating lymphocytes from renal cell carcinoma. *Cancer Res* 57, 3517-3519.
- Carosella, E. D., Paul, P., Moreau, P., and Rouas-Freiss, N. (2000). HLA-G and HLA-E: fundamental and pathophysiological aspects. *Immunol Today* 21, 532-534.
- Chambers, C. A., Kuhns, M. S., Egen, J. G., and Allison, J. P. (2001). CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 19, 565-594.
- Chen, H. L., Gabilovich, D., Tampe, R., Girgis, K. R., Nadaf, S., Carbone, D. P. (1996). A functionally defective allele of TAP1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer. *Nat Genet* 13, 210-213.
- Chen, S., Paucha, E. (1990). Identification of a region of simian virus 40 large T antigen required for cell transformation. *J Virol* 64, 3350-3357.
- Chirathaworn, C., Kohlmeier, J. E., Tibbetts, S. A., Rumsey, L. M., Chan, M. A., and Benedict, S. H. (2002). Stimulation through intercellular adhesion molecule-1 provides a second signal for T cell activation. *J Immunol* 168, 5530-5537.
- Chirgwin, J. M., Przybla, A. E., Mac Donald, R. J., and Rutter, W. J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem* 18, 5294-5299.
- Chong, A. S., Boussy, I. A., Jiang, X. L., Lamas, M., Graf, L. H., Jr. (1994). CD54/ICAM-1 is a costimulator of NK cell-mediated cytotoxicity. *Cell Immunol* 157, 92-105.
- Chouaib, S., Thiery, J., Gati, A., Guerra, N., El Behi, M., Dorothee, G., Mami-Chouaib, F., Bellet, D., and Caignard, A. (2002). Tumor escape from killing: role of killer inhibitory receptors and acquisition of tumor resistance to cell death. *Tissue Antigens* 60, 273-281.
- Colonna, M., and Samaridis, J. (1995). Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science* 268, 405-408.
- Colonna, M. (1997). Specificity and function of immunoglobulin superfamily NK cell inhibitory and stimulatory receptors. *Immunol Rev* 155, 127-133.
- Colonna, M., Navarro, F., Bellon, T., Llano, M., Garcia, P., Samaridis, J., Angman, L., Cella, M., and Lopez-Botet, M. (1997). A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med* 186, 1809-1818.

- Colonna, M., Nakajima, H., Navarro, F., and Lopez-Botet, M. (1999). A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells. *J Leukoc Biol* 66, 375-381.
- Contini, P., Ghio, M., Poggi, A., Filaci, G., Indiveri, F., Ferrone, S., and Puppo, F. (2003). Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. *Eur J Immunol* 33, 125-134.
- Conzen, S. D., Cole, C. N. (1995). The three transforming regions of SV40 T antigen are required for immortalization of primary mouse embryo fibroblasts. *Oncogene* 11, 2295-2302.
- Coral, S., Sigalotti, L., Altomonte, M., Engelsberg, A., Colizzi, F., Cattarossi, I., Maraskovsky, E., Jager, E., Seliger, B., and Maio, M. (2002). 5-aza-2'-deoxycytidine-induced expression of functional cancer testis antigens in human renal cell carcinoma: immunotherapeutic implications. *Clin Cancer Res* 8, 2690-2695.
- Counter, C. M. (1996). The roles of telomeres and telomerase in cell life span. *Mutat Res* 366, 45-63.
- Coventry, B. J., Weeks, S. C., Heckford, S. E., Sykes, P. J., Bradley, J., Skinner, J. M. (1996). Lack of IL-2 cytokine expression despite IL-2 messenger RNA transcription in tumor-infiltrating lymphocytes in primary human breast carcinoma: selective expression of early activation markers. *J Immunol* 156, 3486-3492.
- Croft, M., Carter, L., Swain, S. L., Dutton, R. W. (1994). Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *J Exp Med* 180, 1715-1728.
- Cromme, F. V., van Bommel, P. F., Walboomers, J. M., Gallee, M. P., Stern, P. L., Kenemans, P., Helmerhorst, T. J., Stukart, M. J., and Meijer, C. J. (1994). Differences in MHC and TAP-1 expression in cervical cancer lymph node metastases as compared with the primary tumours. *Br J Cancer* 69, 1176-1181.
- D'Andrea A, Chang C, Phillips JH, Lanier LL. Regulation of T cell lymphokine production by killer cell inhibitory receptor recognition of self HLA class I alleles. *J Exp Med*. 1996;184(2):789-94.
- Davies, B., Hiby, S., Gardner, L., Loke, Y. W., and King, A. (2001). HLA-G expression by tumors. *Am J Reprod Immunol* 45, 103-107.
- Davis, D. M. (2002). Assembly of the immunological synapse for T cells and NK cells. *Trends Immunol* 23, 356-363.
- Deeths, M. J., Mescher, M. F. (1999). ICAM-1 and B7-1 provide similar but distinct costimulation for CD8+ T cells, while CD4+ T cells are poorly costimulated by ICAM-1. *Eur J Immunol* 29, 45-53.
- Demetz, S., Grey, H. M., Sette, A. (1990). The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science* 249, 1028-1030.
- de Waal Malefyt, R., Verma, S., Bejarano, M. T., Ranes-Goldberg, M., Hill, M., Spits, H. (1993). CD2/LFA-3 or LFA-1/ ICAM-1 but not CD28/B7 interactions can augment cytotoxicity by virus-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 23, 418-424.
- de Waal Malefyt, R., Yssel, H., de Vries, J. E. (1993). Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol* 150, 4754-4765.
- Dietrich, J., Cella, M., Colonna, M. (2001). Ig-like transcript 2 (ILT2)/leukocyte Ig-like receptor 1 (LIR1) inhibits TCR signaling and actin cytoskeleton reorganization. *J Immunol* 166, 2514-2521.

- Ditonno, P., Tso, C. L., Sakata, T., deKernion, J. B., and Beldegrun, A. (1992). Regulatory effects of interleukin-7 on renal tumor infiltrating lymphocytes. *Urol Res* 20, 205-210.
- Dobrzanski, M. J., Reome, J. B., and Dutton, R. W. (2000). Type 1 and type 2 CD8+ effector T cell subpopulations promote long-term tumor immunity and protection to progressively growing tumor. *J Immunol* 164, 916-925.
- Dobrzanski, M. J., Reome, J. B., Hollenbaugh, J. A., and Dutton, R. W. (2004). Tc1 and Tc2 effector cell therapy elicit long-term tumor immunity by contrasting mechanisms that result in complementary endogenous type 1 antitumor responses. *J Immunol* 172, 1380-1390.
- Doherty, D. G., Penzotti, J. E., Koelle, D. M., Kwok, W. W., Lybrand, T. P., Masewicz, S., Nepom, G. T. (1998). Structural basis of specificity and degeneracy of T cell recognition: pluriallelic restriction of T cell responses to a peptide antigen involves both specific and promiscuous interactions between the T cell receptor, peptide, and HLA-DR. *J Immunol* 161, 3527-3535.
- Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., Roche, P. C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., *et al.* (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8, 793-800.
- Dovhey, S. E., Ghosh, N. S., and Wright, K. L. (2000). Loss of interferon-gamma inducibility of TAP1 and LMP2 in a renal cell carcinoma cell line. *Cancer Res* 60, 5789-5796.
- Drexler, I., Antunes, E., Schmitz, M., Wolfel, T., Huber, C., Erfle, V., Rieber, P., Theobald, M., and Sutter, G. (1999). Modified vaccinia virus Ankara for delivery of human tyrosinase as melanoma-associated antigen: induction of tyrosinase- and melanoma-specific human leukocyte antigen A*0201-restricted cytotoxic T cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 59, 4955-4963.
- Drouet, M., Aussel, L., Drenou, B., Fauchet, R. (1995). Quantification and molecular analysis of plasmatic HLA-BCw molecules with a locus B and Cw HLA specific mAb (B1.23.2 mAb). *Eur J Immunogenet* 22, 363-370.
- Dumont, C., Blanchard, N., Di Bartolo, V., Lezot, N., Dufour, E., Jauliac, S., Hivroz, C. (2002). TCR/CD3 down-modulation and zeta degradation are regulated by ZAP-70. *J Immunol* 169, 1705-1712.
- Dunbar, P. R., Smith, C. L., Chao, D., Salio, M., Shepherd, D., Mirza, F., Lipp, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., Evans, A., *et al.* (2000). A shift in the phenotype of melan-A-specific CTL identifies melanoma patients with an active tumor-specific immune response. *J Immunol* 165, 6644-6652.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3, 991-998.
- D'Urso, C. M., Wang, Z. G., Cao, Y., Tataka, R., Zeff, R. A., Ferrone, S. (1991). Lack of HLA class I antigen expression by cultured melanoma cells FO-1 due to a defect in B2m gene expression. *J Clin Invest* 87, 284-292.
- Eleuteri, A. M., Kohanski, R. A., Cardozo, C., Orlowski, M. (1997). Bovine spleen multicatalytic proteinase complex (proteasome). Replacement of X, Y, and Z subunits by LMP7, LMP2, and MECL1 and changes in properties and specificity. *J Biol Chem* 272, 11824-11831.
- Elliott, L. H., Brooks, W. H., Roszman, T. L. (1990). Inability of mitogen-activated lymphocytes obtained from patients with malignant primary intracranial tumors to express high affinity interleukin 2 receptors. *J Clin Invest* 86, 80-86.
- Elliott, T., Cerundolo, V., Elvin, J., Townsend, A. (1991). Peptide-induced conformational change of the class I heavy chain. *Nature* 351, 402-406.
- Elsässer-Beile, U., von Kleist, S., Fischer, R., Monting, J. S. (1992). Impaired cytokine production in whole blood cell cultures from patients with colorectal carcinomas as compared to benign colorectal tumors and controls. *J Clin Lab Anal* 6, 311-314.

- Elsässer-Beile, U., von Kleist, S., Sauther, W., Gallati, H., Monting, J. S. (1993a). Impaired cytokine production in whole blood cell cultures of patients with gynaecological carcinomas in different clinical stages. *Br J Cancer* 68, 32-36.
- Elsässer-Beile, U., von Kleist, S., Fischer, R., Martin, M., Wetterauer, U., Gallati, H., Monting, J. S. (1993b). Impaired cytokine production in whole blood cell cultures of patients with urological carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 119, 430-433.
- Elsässer-Beile, U., Rindsfuser, M., Grussenmeyer, T., Schultze-Seemann, W., and Wetterauer, U. (2000). Enhanced expression of IFN-gamma mRNA in CD4(+) or CD8(+) tumour-infiltrating lymphocytes compared to peripheral lymphocytes in patients with renal cell cancer. *Br J Cancer* 83, 637-641.
- Erard, F., Garcia-Sanz, J. A., Moriggi, R., and Wild, M. T. (1999). Presence or absence of TGF-beta determines IL-4-induced generation of type 1 or type 2 CD8 T cell subsets. *J Immunol* 162, 209-214.
- Espevik, T., Nissen-Meyer, J. (1986). A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Methods* 95, 99-105.
- Falk, K., Rotzschke, O., Deres, K., Metzger, J., Jung, G., and Rammensee, H. G. (1991). Identification of naturally processed viral nonapeptides allows their quantification in infected cells and suggests an allele-specific T cell epitope forecast. *J Exp Med* 174, 425-434.
- Fan, Q. R., Wiley, D. C. (1999). Structure of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-Cw4, a ligand for the KIR2D natural killer cell inhibitory receptor. *J Exp Med* 190, 113-123.
- Feenstra, M., Bakema, J., Verdaasdonk, M., Rozemuller, E., van den Tweel, J., Slootweg, P., de Weger, R., Tilanus, M. (2000). Detection of a putative HLA-A*31012 processed (intronless) pseudogene in a laryngeal squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 27, 26-34.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7413-7417.
- Ferrone, S., Marincola, F. M. (1995). Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today* 16, 487-494.
- Finke, J. H., Rayman, P., Alexander, J., Edinger, M., Tubbs, R. R., Connelly, R., Pontes, E., Bukowski, R. (1990). Characterization of the cytolytic activity of CD4+ and CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 50, 2363-2370.
- Finke, J. H., Zea, A. H., Stanley, J., Longo, D. L., Mizoguchi, H., Tubbs, R. R., Wiltout, R. H., O'Shea, J. J., Kudoh, S., Klein, E., and et al. (1993). Loss of T-cell receptor zeta chain and p56lck in T-cells infiltrating human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 53, 5613-5616.
- Finke, J. H., Rayman, P., Hart, L., Alexander, J. P., Edinger, M. G., Tubbs, R. R., Klein, E., Tuason, L., and Bukowski, R. M. (1994). Characterization of tumor-infiltrating lymphocyte subsets from human renal cell carcinoma: specific reactivity defined by cytotoxicity, interferon-gamma secretion, and proliferation. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 15, 91-104.
- Finke, J., Ferrone, S., Frey, A., Mufson, A., Ochoa, A. (1999). Where have all the T cells gone? Mechanisms of immune evasion by tumors. *Immunol Today* 20, 158-160.
- Fishelson, Z., Donin, N., Zell, S., Schultz, S., Kirschfink, M. (2003). Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol Immunol* 40, 109-123.

- Fletcher, J. M., Prentice, H. G., and Grundy, J. E. (1998). Natural killer cell lysis of cytomegalovirus (CMV)-infected cells correlates with virally induced changes in cell surface lymphocyte function-associated antigen-3 (LFA-3) expression and not with the CMV-induced down-regulation of cell surface class I HLA. *J Immunol* *161*, 2365-2374.
- Fontana, A., Frei, K., Bodmer, S., Hofer, E., Schreier, M. H., Palladino, M. A., Jr., Zinkernagel, R. M. (1989). Transforming growth factor-beta inhibits the generation of cytotoxic T cells in virus-infected mice. *J Immunol* *143*, 3230-3234.
- Foster, K., Prowse, A., van den Berg, A., Fleming, S., Hulsbeek, M. M., Crossey, P. A., Richards, F. M., Cairns, P., Affara, N. A., Ferguson-Smith, M. A. (1994). Somatic mutations of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene in non-familial clear cell renal carcinoma. *Hum Mol Genet* *3*, 2169-2173.
- Fournel, S., Aguerre-Girr, M., Huc, X., Lenfant, F., Alam, A., Toubert, A., Bensussan, A., and Le Bouteiller, P. (2000a). Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8. *J Immunol* *164*, 6100-6104.
- Fournel, S., Huc, X., Aguerre-Girr, M., Solier, C., Legros, M., Praud-Brethenou, C., Moussa, M., Chaouat, G., Berrebi, A., Bensussan, A., *et al.* (2000b). Comparative reactivity of different HLA-G monoclonal antibodies to soluble HLA-G molecules. *Tissue Antigens* *55*, 510-518.
- Frumento, G., Franchello, S., Palmisano, G. L., Nicotra, M. R., Giacomini, P., Loke, Y. W., Geraghty, D. E., Maio, M., Manzo, C., Natali, P. G., and Ferrara, G. B. (2000). Melanomas and melanoma cell lines do not express HLA-G, and the expression cannot be induced by gammaIFN treatment. *Tissue Antigens* *56*, 30-37.
- Fujii, T., Ishitani, A., and Geraghty, D. E. (1994). A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. *J Immunol* *153*, 5516-5524.
- Gallou, C., Joly, D., Mejean, A., Staroz, F., Martin, N., Tarlet, G., Orfanelli, M. T., Bouvier, R., Droz, D., Chretien, Y., Marechal, J. M., Richard, S., Junien, C., Beroud, C. (1999). Mutations of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: definition of a risk factor for VHL patients to develop an RCC. *Hum Mutat* *13*, 464-475.
- Gao, Q., Hauser, S. H., Liu, X. L., Wazer, D. E., Madoc, J. H., und Band, V. (1996). Mutant p53-induced immortalization of primary human mammary epithelial cells. *Cancer Res* *56*, 3129-3133.
- Garcia, K. C., Degano, M., Stanfield, R. L., Brunmark, A., Jackson, M. R., Peterson, P. A., Teyton, L., Wilson, I. A. (1996). An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* *274*, 209-219.
- Garcia, K. C., Scott, C. A., Brunmark, A., Carbone, F. R., Peterson, P. A., Wilson, I. A., Teyton, L. (1997). CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes. *Nature* *387*, 634.
- Garcia, P., Llano, M., de Heredia, A. B., Willberg, C. B., Caparros, E., Aparicio, P., Braud, V. M., and Lopez-Botet, M. (2002). Human T cell receptor-mediated recognition of HLA-E. *Eur J Immunol* *32*, 936-944.
- Garcia-Lora, A., Algarra, I., Gaforio, J. J., Ruiz-Cabello, F., Garrido, F. (2001). Immunoselection by T lymphocytes generates repeated MHC class I-deficient metastatic tumor variants. *Int J Cancer* *91*, 109-119.
- Garcia-Lora, A., Algarra, I., and Garrido, F. (2003a). MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol* *195*, 346-355.
- Garcia-Lora, A., Martinez, M., Algarra, I., Gaforio, J. J., and Garrido, F. (2003b). MHC class I-deficient metastatic tumor variants immunoselected by T lymphocytes originate from the coordinated downregulation of APM components. *Int J Cancer* *106*, 521-527.

- Garrett TP, Saper MA, Bjorkman PJ, Strominger JL, Wiley DC. (1989). Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68. *Nature* 342, 692-696.
- Garrido, M. L., Perez, M., Delgado, C., Rojano, J., Algarra, I., Garrido, A., Garrido, F. (1986). Immunogenicity of H-2 positive and H-2 negative clones of a mouse tumour, GR9. *J Immunogenet* 13, 159-167.
- Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., Perez-Villar, J. J., Lopez-Botet, M., Duggan-Keen, M., and Stern, P. L. (1997). Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 18, 89-95.
- Garrido, F., and Algarra, I. (2001). MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res* 83, 117-158.
- Gati, A., Guerra, N., Giron-Michel, J., Azzarone, B., Angevin, E., Moretta, A., Chouaib, S., and Caignard, A. (2001). Tumor cells regulate the lytic activity of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by modulating the inhibitory natural killer receptor function. *Cancer Res* 61, 3240-3244.
- Gati, A., Guerra, N., Gaudin, C., Da Rocha, S., Escudier, B., Lecluse, Y., Bettaieb, A., Chouaib, S., and Caignard, A. (2003). CD158 receptor controls cytotoxic T-lymphocyte susceptibility to tumor-mediated activation-induced cell death by interfering with Fas signaling. *Cancer Res* 63, 7475-7482.
- Gati, A., Da Rocha, S., Guerra, N., Escudier, B., Moretta, A., Chouaib, S., Angevin, E., and Caignard, A. (2004). Analysis of the natural killer mediated immune response in metastatic renal cell carcinoma patients. *Int J Cancer* 109, 393-401.
- Gaudin, C., Dietrich, P. Y., Robache, S., Guillard, M., Escudier, B., Lacombe, M. J., Kumar, A., Triebel, F., and Caignard, A. (1995). In vivo local expansion of clonal T cell subpopulations in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 55, 685-690.
- Gaudin, C., Kremer, F., Angevin, E., Scott, V., and Triebel, F. (1999). A hsp70-2 mutation recognized by CTL on a human renal cell carcinoma. *J Immunol* 162, 1730-1738.
- Gaugler, B., Brouwenstijn, N., Vantomme, V., Szikora, J. P., Van der Spek, C. W., Patard, J. J., Boon, T., Schrier, P., and Van den Eynde, B. J. (1996). A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma. *Immunogenetics* 44, 323-330.
- Genevee, C., Diu, A., Nierat, J., et al. (1992). An experimental validated panel of subfamily-specific oligonukleotide primers (Valpha 1-w29/V beta 1-w24) for the study of human T cell receptor variable V gene segment usage by polymerase chain reaction. *Eur J Immunol* 22, 1261-1269.
- Gilbert, S. F., Migeon, B. R. (1975). D-valine as a selective agent for normal human and rodent epithelial cells in culture. *Cell* 5, 11-17.
- Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175-182.
- Gnarra, J. R., Tory, K., Weng, Y., Schmidt, L., Wei, M. H., Li, H., Latif, F., Liu, S., Chen, F., Duh, F. M. (1994). Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* 7, 85-90.
- Gobin, S. J., Biesta, P., de Steenwinkel, J. E., Datema, G., and van den Elsen, P. J. (2002). HLA-G transactivation by cAMP-response element-binding protein (CREB). An alternative transactivation pathway to the conserved major histocompatibility complex (MHC) class I regulatory routes. *J Biol Chem* 277, 39525-39531.
- Gonen-Gross, T., Achdout, H., Gazit, R., Hanna, J., Mizrahi, S., Markel, G., Goldman-Wohl, D., Yagel, S., Horejsi, V., Levy, O., Baniyash, M., Mandelboim, O. (2003). Complexes of HLA-G protein on the cell surface are important for leukocyte Ig-like receptor-1 function. *J Immunol* 171, 1343-1351.

- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
- Grakoui, A., Donermeyer, D. L., Kanagawa, O., Murphy, K. M., and Allen, P. M. (1999). TCR-independent pathways mediate the effects of antigen dose and altered peptide ligands on Th cell polarization. *J Immunol* 162, 1923-1930.
- Green, J. M., Zheng, X. G., Shimizu, Y., Thompson, C. B., Turka, L. A. (1994). T cell receptor stimulation, but not CD28 costimulation, is dependent on LFA-1-mediated events. *Eur J Immunol* 24, 265-272.
- Greenfield, E. A., Nguyen, K. A., Kuchroo, V. K. (1998). CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol* 18, 389-418.
- Groettrup, M., Soza, A., Eggers, M., Kuehn, L., Dick, T. P., Schild, H., Rammensee, H. G., Koszinowski, U. H., and Kloetzel, P. M. (1996). A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. *Nature* 381, 166-168.
- Groh, V., Wu, J., Yee, C., and Spies, T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419, 734-738.
- Gromme, M., Neefjes, J. (2002). Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol Immunol* 39, 181-202.
- Grundy, J. E., Pahal, G. S., Akbar, A. N. (1993). Increased adherence of CD2 peripheral blood lymphocytes to cytomegalovirus-infected fibroblasts is blocked by anti-LFA-3 antibody. *Immunology* 78, 413-420.
- Gubler, U. and Hofmann, B. I. (1983). A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25, 263-269.
- Guerra, N., Guillard, M., Angevin, E., Echchakir, H., Escudier, B., Moretta, A., Chouaib, S., and Caignard, A. (2000). Killer inhibitory receptor (CD158b) modulates the lytic activity of tumor-specific T lymphocytes infiltrating renal cell carcinomas. *Blood* 95, 2883-2889.
- Guerra, N., Michel, F., Gati, A., Gaudin, C., Mishal, Z., Escudier, B., Acuto, O., Chouaib, S., and Caignard, A. (2002). Engagement of the inhibitory receptor CD158a interrupts TCR signaling, preventing dynamic membrane reorganization in CTL/tumor cell interaction. *Blood* 100, 2874-2881.
- Guinan, P., Sobin, L. H., Algaba, F., Badellino, F., Kameyama, S., MacLennan, G., and Novick, A. (1997). TNM staging of renal cell carcinoma: Workgroup No. 3. Union International Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 80, 992-993.
- Hahn, W. C., Stewart, S. A., Brooks, M. W., York, S. G., Eaton, E., Kurachi, A., Beijersbergen, R. L., Knoll, J. H., Meyerson, M., Weinberg, R. A. (1999). Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med* 5, 1164-1170.
- Hahn, W. C., Weinberg, R. A. (2003). Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 348, 674.
- Hahn, W. C. (2003). Role of telomeres and telomerase in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 21, 2034-2043.
- Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L. E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J., Tschopp, J. (1996). Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274, 1363-1366.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

- Hansson, M., Asea, A., Hermodsson, S., Hellstrand, K. (1996). Histaminergic regulation of NK-cells: protection against monocyte-induced apoptosis. *Scand J Immunol* 44, 193-196.
- Hansson, M., Hermodsson, S., Brune, M., Mellqvist, U. H., Naredi, P., Betten, A., Gehlsen, K. R., Hellstrand, K. (1999). Histamine protects T cells and natural killer cells against oxidative stress. *J Interferon Cytokine Res* 19, 1135-1144.
- Harding, C. V., and Unanue, E. R. (1990). Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature* 346, 574-576.
- Hargreaves, M., Bell, E. B. (1997) Identical expression of CD45R isoforms by CD45RC⁺ 'revertant' memory and CD45RC⁺ naive CD4 T cells. *Immunology* 91, 323-330.
- Harlin, H., Artz, A. S., Mahowald, M., Rini, B. I., Zimmerman, T., Vogelzang, N. J., Gajewski, T. F. (2004). Clinical responses following nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation for renal cell carcinoma are associated with expansion of CD8⁺ IFN-gamma-producing T cells. *Bone Marrow Transplant* 33, 491-497.
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37, 614-636.
- Healy, C. G., Simons, J. W., Carducci, M. A., DeWeese, T. L., Bartkowski, M., Tong, K. P., Bolton, W. E. (1998). Impaired expression and function of signal-transducing zeta chains in peripheral T cells and natural killer cells in patients with prostate cancer. *Cytometry* 32, 109-119.
- Heinzer, H., Huland, E., Huland, H. (2004). [In Process Citation]. *Urologe A* 42, 1450-1452.
- Hellstrand, K., Hermodsson, S., Naredi, P., Mellqvist, U. H., Brune, M. (1998). Histamine and cytokine therapy. *Acta Oncol* 37, 347-353.
- Herin, M., Lemoine, C., Weynants, P., Vessiere, F., Van Pel, A., Knuth, A., Devos, R., and Boon, T. (1987). Production of stable cytolytic T-cell clones directed against autologous human melanoma. *Int J Cancer* 39, 390-396.
- Herman, J. G., Latif, F., Weng, Y., Lerman, M. I., Zbar, B., Liu, S., Samid, D., Duan, D. S., Gnarr, J. R., Linehan, W. M., and et al. (1994). Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9700-9704.
- Hicklin, D. J., Marincola, F. M., and Ferrone, S. (1999). HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol Med Today* 5, 178-186.
- Höhn, H., Neukirch, C., Freitag, K., Necker, A., Hitzler, W., Seliger, B., und Maeurer, M. (2002). Longitudinal analysis of the T-cell receptor (TCR)-VA and -VB repertoire in CD8⁺ T cells from individuals immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *Clin Exp Immunol* 129, 309-317.
- Holt, S. E., Shay, J. W., Wright, W. E. (1996). Refining the telomere-telomerase hypothesis of aging and cancer. *Nat Biotechnol* 14, 836-839.
- Hoon, D. S., Ando, I., Sviland, G., Tsuchida, T., Okun, E., Morton, D. L., and Irie, R. F. (1989). Ganglioside GM2 expression on human melanoma cells correlates with sensitivity to lymphokine-activated killer cells. *Int J Cancer* 43, 857-862.
- Hori, A., Kami, M., Kim, S. W., Makimoto, A., Tanosaki, R., Takae, Y. (2004). Balance between acute graft-versus-host disease and graft-versus-tumor effect after reduced-intensity transplantation for metastatic renal cell carcinoma. *Hematol J* 5, 276-278.
- Houchins, J. P., Lanier, L. L., Niemi, E. C., Phillips, J. H., and Ryan, J. C. (1997). Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C. *J Immunol* 158, 3603-3609.

- Huard, B., Karlsson, L. (2000). KIR expression on self-reactive CD8+ T cells is controlled by T-cell receptor engagement. *Nature* 403, 325-328.
- Hughes, E. A., and Cresswell, P. (1998). The thiol oxidoreductase ERp57 is a component of the MHC class I peptide-loading complex. *Curr Biol* 8, 709-712.
- Hutchinson, S. L., Wooldridge, L., Tafuro, S., Laugel, B., Glick, M., Boulter, J. M., Jakobsen, B. K., Price, D. A., Sewell, A. K. (2003). The CD8 T cell coreceptor exhibits disproportionate biological activity at extremely low binding affinities. *J Biol Chem* 278, 24285-24293.
- Ibrahim, E. C., Morange, M., Dausset, J., Carosella, E. D., and Paul, P. (2000). Heat shock and arsenite induce expression of the nonclassical class I histocompatibility HLA-G gene in tumor cell lines. *Cell Stress Chaperones* 5, 207-218.
- Ibrahim, E. C., Guerra, N., Lacombe, M. J., Angevin, E., Chouaib, S., Carosella, E. D., Caignard, A., and Paul, P. (2001). Tumor-specific up-regulation of the nonclassical class I hla-g antigen expression in renal carcinoma. *Cancer Res* 61, 6838-6845.
- Ibrahim el, C., Allory, Y., Commo, F., Gattegno, B., Callard, P., and Paul, P. (2003). Altered pattern of major histocompatibility complex expression in renal carcinoma: tumor-specific expression of the nonclassical human leukocyte antigen-G molecule is restricted to clear cell carcinoma while up-regulation of other major histocompatibility complex antigens is primarily distributed in all subtypes of renal carcinoma. *Am J Pathol* 162, 501-508.
- Ikeda, H., Lethe, B., Lehmann, F., van Baren, N., Baurain, J. F., de Smet, C., Chambost, H., Vitale, M., Moretta, A., Boon, T., and Coulie, P. G. (1997). Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* 6, 199-208.
- Inge, T. H., Hoover, S. K., Susskind, B. M., Barrett, S. K., and Bear, H. D. (1992). Inhibition of tumor-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by transforming growth factor beta 1. *Cancer Res* 52, 1386-1392.
- Inoue, K., Karashima, T., Chikazawa, M., Iiyama, T., Yoshikawa, C., Furihata, M., Ohtsuki, Y., and Shuin, T. (1998). Overexpression of c-met proto-oncogene associated with chromophilic renal cell carcinoma with papillary growth. *Virchows Arch* 433, 511-515.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L. E., Tschopp, J. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195.
- Ishitani, A., and Geraghty, D. E. (1992). Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3947-3951.
- Jabri, B., Selby, J. M., Negulescu, H., Lee, L., Roberts, A. I., Beavis, A., Lopez-Botet, M., Ebert, E. C., and Winchester, R. J. (2002). TCR specificity dictates CD94/NKG2A expression by human CTL. *Immunity* 17, 487-499.
- Jardetzky, O. (1996). Protein dynamics and conformational transitions in allosteric proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 65, 171-219.
- Jayson, G. C., Middleton, M., Lee, S. M., Ashcroft, L., Thatcher, N. (1998). A randomized phase II trial of interleukin 2 and interleukin 2-interferon alpha in advanced renal cancer. *Br J Cancer* 78, 366-369.
- Johannisson, A., Festin, R. (1995). Phenotype transition of CD4+ T cells from CD45RA to CD45RO is accompanied by cell activation and proliferation. *Cytometry* 19, 343-352.
- Jung, D., Hilmes, C., Knuth, A., Jaeger, E., Huber, C., and Seliger, B. (1999). Gene transfer of the Co-stimulatory molecules B7-1 and B7-2 enhances the immunogenicity of human renal cell carcinoma to a different extent. *Scand J Immunol* 50, 242-249.

- Kadish, A. S., Doyle, A. T., Steinhauer, E. H., Ghossein, N. A. (1981). Natural cytotoxicity and interferon production in human cancer: deficient natural killer activity and normal interferon production in patients with advanced disease. *J Immunol* 127, 1817-1822.
- Kageyama, S., Tsomides, T. J., Sykulev, Y., and Eisen, H. N. (1995). Variations in the number of peptide-MHC class I complexes required to activate cytotoxic T cell responses. *J Immunol* 154, 567-576.
- Kaihara, A., Iwagaki, H., Gouchi, A., Hizuta, A., Isozaki, H., Takakura, N., Tanaka, N. (1998). Soluble intercellular adhesion molecule-1 and natural killer cell activity in gastric cancer patients. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 100, 283-300.
- Kaklamanis, L., and Hill, A. (1992). MHC loss in colorectal tumours: evidence for immunoselection? *Cancer Surv* 13, 155-171.
- Kaklamanis, L., Townsend, A., Doussis-Anagnostopoulou, I. A., Mortensen, N., Harris, A. L., Gatter, K. C. (1994). Loss of major histocompatibility complex-encoded transporter associated with antigen presentation (TAP) in colorectal cancer. *Am J Pathol* 145, 505-509.
- Katakura, Y., Alam, S., Shirahata, S. (1998). Immortalization by gene transfection. *Methods Cell Biol* 57, 69-91
- Kellner, R., Lichtenfels, R., Atkins, D., Bukur, J., Ackermann, A., Beck, J., Brenner, W., Melchior, S., and Seliger, B. (2002). Targeting of tumor associated antigens in renal cell carcinoma using proteome-based analysis and their clinical significance. *Proteomics* 2, 1743-1751.
- Kemp, R. A., Ronchese, F. (2001). Tumor-specific Tc1, but not Tc2, cells deliver protective antitumor immunity. *J Immunol* 167, 6497-6502.
- Kennedy, S. M., Merino, M. J., Linehan, W. M., Roberts, J. R., Robertson, C. N., Neumann, R. D. (1990). Collecting duct carcinoma of the kidney. *Hum Pathol* 21, 449-456.
- Khong, H. T., Restifo, N. P. (2002). Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 3, 999-1005.
- Khong, H. T., Wang, Q. J., Rosenberg, S. A. (2004). Identification of multiple antigens recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a single patient: tumor escape by antigen loss and loss of MHC expression. *J Immunother* 27, 184-190.
- Kiessling, R., Wasserman, K., Horiguchi, S., Kono, K., Sjoberg, J., Pisa, P., and Petersson, M. (1999). Tumor-induced immune dysfunction. *Cancer Immunol Immunother* 48, 353-362.
- Kim, J., Modlin, R. L., Moy, R. L., Dubinett, S. M., McHugh, T., Nickoloff, B. J., Uyemura, K. (1995). IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response. *J Immunol* 155, 2240-2247.
- Kim, J. J., Tsai, A., Nottingham, L. K., Morrison, L., Cunning, D. M., Oh, J., Lee, D. J., Dang, K., Dentchev, T., Chalian, A. A., Agadjanyan, M. G., Weiner, D. B. (1999). Intracellular adhesion molecule-1 modulates beta-chemokines and directly costimulates T cells *in vivo*. *J Clin Invest* 103, 869-877.
- Kirchhoff, S., Muller, W. W., Li-Weber, M., Krammer, P. H. (2000). Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in CD28-costimulated human T cells. *Eur J Immunol* 30, 2765-2774.
- Kirszenbaum, M., Moreau, P., Gluckman, E., Dausset, J., and Carosella, E. (1994). An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcript in adult lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4209-4213.

- Kloetzel, P. M., and Ossendorp, F. (2004). Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 16, 76-81.
- Koga, F., Arai, K., Kamai, T., Abe, H., Yoshida, K. (2001). Fas labeling status does not correlate with apoptosis of renal cell carcinoma in vivo. *Anticancer Res* 21, 3193-3197.
- Kohlmeier, J. E., Rumsey, L. M., Chan, M. A., Benedict, S. H. (2003). The outcome of T-cell costimulation through intercellular adhesion molecule-1 differs from costimulation through leucocyte function-associated antigen-1. *Immunology* 108, 152-157.
- Kolenko, V., Wang, Q., Riedy, M. C., O'Shea, J., Ritz, J., Cathcart, M. K., Rayman, P., Tubbs, R., Edinger, M., Novick, A., *et al.* (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.
- Kono, K., Salazar-Onfray, F., Petersson, M., Hansson, J., Masucci, G., Wasserman, K., Nakazawa, T., Anderson, P., and Kiessling, R. (1996). Hydrogen peroxide secreted by tumor-derived macrophages down-modulates signal-transducing zeta molecules and inhibits tumor-specific T cell-and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol* 26, 1308-1313.
- Koo, A. S., Tso, C. L., Shimabukuro, T., Peyret, C., deKernion, J. B., and Beldegrun, A. (1991). Autologous tumor-specific cytotoxicity of tumor-infiltrating lymphocytes derived from human renal cell carcinoma. *J Immunother* 10, 347-354.
- Koopmann, J. O., Hammerling, G. J., and Momburg, F. (1997). Generation, intracellular transport and loading of peptides associated with MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* 9, 80-88.
- Koopman, L. A., Corver, W. E., van der Slik, A. R., Giphart, M. J., Fleuren, G. J. (2000). Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J Exp Med* 191, 961-976.
- Kotera, Y., Fontenot, J. D., Pecher, G., Metzgar, R. S., Finn, O. J. (1994). Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC-1 in sera from breast, pancreatic, and colon cancer patients. *Cancer Res* 54, 2856-2860.
- Krangel, M. S. (2003). Gene segment selection in V(D)J recombination: accessibility and beyond. *Nat Immunol* 4, 624-630.
- Krebs in Deutschland (2004). Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (Saarbrücken).
- Kudoh, S., Redovan, C., Rayman, P., Edinger, M., Tubbs, R. R., Novick, A., Finke, J. H., and Bukowski, R. M. (1997). Defective granzyme B gene expression and lytic response in T lymphocytes infiltrating human renal cell carcinoma. *J Immunother* 20, 479-487.
- Lafferty, K. J., Prowse, S. J., Simeonovic, C. J., Warren, H. S. (1983). Immunobiology of tissue transplantation: a return to the passenger leukocyte concept. *Annu Rev Immunol* 1, 143-173.
- Lai, P., Rabinowich, H., Crowley-Nowick, P. A., Bell, M. C., Mantovani, G., Whiteside, T. L. (1996). Alterations in expression and function of signal-transducing proteins in tumor-associated T and natural killer cells in patients with ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2, 161-173.
- Lamphear, J. G., Stevens, K. R., Rich, R. R. (1998). Intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte function-associated antigen-3 provide costimulation for superantigen-induced T lymphocyte proliferation in the absence of a specific presenting molecule. *J Immunol* 160, 615-623.
- Lanier, L. L. (2001). A renaissance for the tumor immunosurveillance hypothesis. *Nat Med* 7, 1178-1180.

- Le Bouteiller, P. (2000). HLA-G in the human placenta: expression and potential functions. *Biochem Soc Trans* 28, 208-212.
- Le Gal, F. A., Riteau, B., Sedlik, C., Khalil-Daher, I., Menier, C., Dausset, J., Guillet, J. G., Carosella, E. D., and Rouas-Freiss, N. (1999). HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* 11, 1351-1356.
- Le Guiner, S., Le Drean, E., Labarriere, N., Fonteneau, J. F., Viret, C., Diez, E., and Jotereau, F. (1998). LFA-3 co-stimulates cytokine secretion by cytotoxic T lymphocytes by providing a TCR-independent activation signal. *Eur J Immunol* 28, 1322-1331.
- Lee, L. G., Connell, C. R., Woo, S. L., Cheng, R. D., McArdle, B. F., Fuller, C. W., Halloran, N. D., Wilson, R. K. (1992). DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments. *Nucleic Acids Res* 20, 2471-2483.
- Lee, N., Malacko, A. R., Ishitani, A., Chen, M. C., Bajorath, J., Marquardt, H., and Geraghty, D. E. (1995). The membrane-bound and soluble forms of HLA-G bind identical sets of endogenous peptides but differ with respect to TAP association. *Immunity* 3, 591-600.
- Lee, N., Goodlett, D. R., Ishitani, A., Marquardt, H., and Geraghty, D. E. (1998). HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J Immunol* 160, 4951-4960.
- Lee, N., Geraghty, D. E. (2003). HLA-F surface expression on B cell and monocyte cell lines is partially independent from tapasin and completely independent from TAP. *J Immunol* 171, 5264-5271.
- Lee, S. J., Hori, Y., Groves, J. T., Dustin, M. L., and Chakraborty, A. K. (2002). Correlation of a dynamic model for immunological synapse formation with effector functions: two pathways to synapse formation. *Trends Immunol* 23, 492-499.
- Lefebvre, S., Berrih-Aknin, S., Adrian, F., Moreau, P., Poeta, S., Gourand, L., Dausset, J., Carosella, E. D., and Paul, P. (2001). A specific interferon (IFN)-stimulated response element of the distal HLA-G promoter binds IFN-regulatory factor 1 and mediates enhancement of this nonclassical class I gene by IFN-beta. *J Biol Chem* 276, 6133-6139.
- Lehmann, F., Marchand, M., Hainaut, P., Pouillart, P., Sastre, X., Ikeda, H., Boon, T., and Coulie, P. G. (1995). Differences in the antigens recognized by cytolytic T cells on two successive metastases of a melanoma patient are consistent with immune selection. *Eur J Immunol* 25, 340-347.
- Lehner, P. J., and Cresswell, P. (1996). Processing and delivery of peptides presented by MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* 8, 59-67.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M., and Boedtke, H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochem* 16, 4743-4751.
- Lenschow, D. J., Walunas, T. L., and Bluestone, J. A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14, 233-258.
- Levitsky, H. I., Montgomery, J., Ahmadzadeh, M., Staveley-O'Carroll, K., Guarnieri, F., Longo, D. L., and Kwak, L. W. (1996). Immunization with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced, but not B7-1-transduced, lymphoma cells primes idio-type-specific T cells and generates potent systemic antitumor immunity. *J Immunol* 156, 3858-3865.
- Li, J., Schuler-Thurner, B., Schuler, G., Huber, C., Seliger, B. (2001). Bipartite regulation of different components of the MHC class I antigen-processing machinery during dendritic cell maturation. *Int Immunol* 13, 1515-1523.

- Li, X., Liu, J., Park, J. K., Hamilton, T. A., Rayman, P., Klein, E., Edinger, M., Tubbs, R., Bukowski, R., Finke, J. (1994). T cells from renal cell carcinoma patients exhibit an abnormal pattern of kappa B-specific DNA-binding activity: a preliminary report. *Cancer Res* 54, 5424-5429.
- Lindl, T., and Bauer, B. (2003). *Zell- und Gewebekultur* (Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag).
- Linehan, W. M., Walther, M. M., Zbar, B. (2003). The genetic basis of cancer of the kidney. *J Urol* 170, 2163-2172.
- Linehan, W. M., Lerman, M. I., Zbar, B. (1995). Identification of the von Hippel-Lindau (VHL) gene. Its role in renal cancer. *JAMA* 273, 564-570.
- Llano, M., Lee, N., Navarro, F., Garcia, P., Albar, J. P., Geraghty, D. E., and Lopez-Botet, M. (1998). HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer. *Eur J Immunol* 28, 2854-2863.
- Loeffler, D. A., Juneau, P. L., and Masserant, S. (1992). Influence of tumour physico-chemical conditions on interleukin-2-stimulated lymphocyte proliferation. *Br J Cancer* 66, 619-622.
- Lopez, C. B., Rao, T. D., Feiner, H., Shapiro, R., Marks, J. R., Frey, A. B. (1998). Repression of interleukin-2 mRNA translation in primary human breast carcinoma tumor-infiltrating lymphocytes. *Cell Immunol* 190, 141-155.
- Lopez-Botet, M., Angulo, A., and Guma, M. (2004). Natural killer cell receptors for major histocompatibility complex class I and related molecules in cytomegalovirus infection. *Tissue Antigens* 63, 195-203.
- Luscher, U., Filgueira, L., Juretic, A., Zuber, M., Luscher, N. J., Heberer, M., and Spagnoli, G. C. (1994). The pattern of cytokine gene expression in freshly excised human metastatic melanoma suggests a state of reversible anergy of tumor-infiltrating lymphocytes. *Int J Cancer* 57, 612-619.
- Maccalli, C., Pisarra, P., Vegetti, C., Sensi, M., Parmiani, G., Anichini, A. (1999). Differential loss of T cell signaling molecules in metastatic melanoma patients' T lymphocyte subsets expressing distinct TCR variable regions. *J Immunol* 163, 6912-6923.
- MacDonald, C. (1990). Development of new cell lines for animal cell biotechnology. *Crit Rev Biotechnol* 10, 155-178
- Maeurer, M. J., Gollin, S. M., Storkus, W. J., Swaney, W., Karbach, J., Martin, D., Castelli, C., Salter, R., Knuth, A., and Lotze, M. T. (1996). Tumor escape from immune recognition: loss of HLA-A2 melanoma cell surface expression is associated with a complex rearrangement of the short arm of chromosome 6. *Clin Cancer Res* 2, 641-652.
- Maeurer, M. J., Martin, D. M., Castelli, C., Elder, E., Leder, G., Storkus, W. J., and Lotze, M. T. (1995). Host immune response in renal cell cancer: interleukin-4 (IL-4) and IL-10 mRNA are frequently detected in freshly collected tumor-infiltrating lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 41, 111-121.
- Maleno, I., Lopez-Nevot, M. A., Cabrera, T., Salinero, J., Garrido, F. (2002). Multiple mechanisms generate HLA class I altered phenotypes in laryngeal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Cancer Immunol Immunother* 51, 389-396.
- Maleno, I., Lopez Nevot, M. A., Seliger, B., and Garrido, F. (2004). Low frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21 in clear renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 109, 636-638.
- Malinowski, K., Kono, K., Takayama, T., Terashima, T., Tsukuda, K., Waltzer, W., and Rapaport, F. T. (1997). Inhibition of lymphocyte proliferative responses by renal cell carcinoma extract. *Transplant Proc* 29, 839-841.

- Mallet, V., Fournel, S., Schmitt, C., Campan, A., Lenfant, F., and Le Bouteiller, P. (1999). Primary cultured human thymic epithelial cells express both membrane-bound and soluble HLA-G translated products. *J Reprod Immunol* 43, 225-234.
- Malnati, M. S., Peruzzi, M., Parker, K. C., Biddison, W. E., Ciccone, E., Moretta, A., Long, E. O. (1995). Peptide specificity in the recognition of MHC class I by natural killer cell clones. *Science* 267, 1016-1018.
- Mandel, J. S., McLaughlin, J. K., Schlehofer, B., Mellempgaard, A., Helmert, U., Lindblad, P., McCredie, M., Adami, H. O. (1995). International renal-cell cancer study. IV. Occupation. *Int J Cancer* 61, 601-605.
- Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M. G., Piccinni, M. P., Maggi, E., Trinchieri, G., Romagnani, S. (1993). Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* 177, 1199-1204.
- Manfredi, J. J., Prives, C. (1994). The transforming activity of simian virus 40 large tumor antigen. *Biochim Biophys Acta* 1198, 65-83.
- Marchal-Bras-Goncalves, R., Rouas-Freiss, N., Connan, F., Choppin, J., Dausset, J., Carosella, E. D., Kirszenbaum, M., and Guillet, J. (2001). A soluble HLA-G protein that inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Transplant Proc* 33, 2355-2359.
- Marincola, F. M., Shamamian, P., Alexander, R. B., Gnarr, J. R., Turetskaya, R. L., Nedospasov, S. A., Simonis, T. B., Taubenberger, J. K., Yannelli, J., Mixon, A., et al. (1994). Loss of HLA haplotype and B locus down-regulation in melanoma cell lines. *J Immunol* 153, 1225-1237.
- Martinez, A., Fullwood, P., Kondo, K., Kishida, T., Yao, M., Maher, E. R., Latif, F. (2000). Role of chromosome 3p12-p21 tumour suppressor genes in clear cell renal cell carcinoma: analysis of VHL dependent and VHL independent pathways of tumorigenesis. *Mol Pathol* 53, 137-44.
- Massaia, M., Attisano, C., Beggiato, E., Bianchi, A., Pileri, A. (1994). Correlation between disease activity and T-cell CD3 zeta chain expression in a B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 88, 886-888.
- Matsuda, M., Salazar, F., Petersson, M., Masucci, G., Hansson, J., Pisa, P., Zhang, Q. J., Masucci, M. G., and Kiessling, R. (1994). Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. *J Exp Med* 180, 2371-2376.
- Matsuda, M., Petersson, M., Lenkei, R., Taupin, J. L., Magnusson, I., Mellstedt, H., Anderson, P., Kiessling, R. (1995). Alterations in the signal-transducing molecules of T cells and NK cells in colorectal tumor-infiltrating, gut mucosal and peripheral lymphocytes: correlation with the stage of the disease. *Int J Cancer* 61, 765-772.
- May, M. J., Ghosh, S. (1998). Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today* 19, 80-88.
- McLaughlin, J. K., Lindblad, P., Mellempgaard, A., McCredie, M., Mandel, J. S., Schlehofer, B., Pommer, W., Adami, H. O. (1995). International renal-cell cancer study. I. Tobacco use. *Int J Cancer* 60, 194-198.
- McMaster, M. T., Librach, C. L., Zhou, Y., Lim, K. H., Janatpour, M. J., DeMars, R., Kovats, S., Damsky, C., and Fisher, S. J. (1995). Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *J Immunol* 154, 3771-3778.
- Medema, J. P., de Jong, J., van Hall, T., Melief, C. J., and Offringa, R. (1999). Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein. *J Exp Med* 190, 1033-1038.
- Medema, J. P., de Jong, J., Peltenburg, L. T., Verdegaal, E. M., Gorter, A., Bres, S. A., Franken, K. L., Hahne, M., Albar, J. P., Melief, C. J., and Offringa, R. (2001). Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 11515-11520.

- Melder, R. J., Whiteside, T. L., Vujanovic, N. L., Hiserodt, J. C., Herberman, R. B. (1988). A new approach to generating antitumor effectors for adoptive immunotherapy using human adherent lymphokine-activated killer cells. *Cancer Res* 48, 3461-3469.
- Melero, I., Balboa, M. A., Alonso, J. L., Yague, E., Pivel, J. P., Sanchez-Madrid, F., Lopez-Botet, M. (1993). Signaling through the LFA-1 leucocyte integrin actively regulates intercellular adhesion and tumor necrosis factor-alpha production in natural killer cells. *Eur J Immunol* 23, 1859-1865.
- Mellemgaard, A., Lindblad, P., Schlehofer, B., Bergstrom, R., Mandel, J. S., McCredie, M., McLaughlin, J. K., Niwa, S., Odaka, N., Pommer, W., et al. (1995). International renal-cell cancer study. III. Role of weight, height, physical activity, and use of amphetamines. *Int J Cancer* 60, 350-354.
- Miescher, S., Whiteside, T. L., Carrel, S., von Fliedner, V. (1986). Functional properties of tumor-infiltrating and blood lymphocytes in patients with solid tumors: effects of tumor cells and their supernatants on proliferative responses of lymphocytes. *J Immunol* 136, 1899-1907.
- Miescher, S., Stoeck, M., Qiao, L., Barras, C., Barrelet, L., von Fliedner, V. (1988b). Proliferative and cytolytic potentials of purified human tumor-infiltrating T lymphocytes. Impaired response to mitogen-driven stimulation despite T-cell receptor expression. *Int J Cancer* 42, 659-666.
- Mitropoulos, D., Kooi, S., Rodriguez-Villanueva, J., and Platsoucas, C. D. (1994). Characterization of fresh (uncultured) tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) and TIL-derived T cell lines from patients with renal cell carcinoma. *Clin Exp Immunol* 97, 321-327.
- Mocci, S., Coffman, R. L. (1995). Induction of a Th2 population from a polarized Leishmania-specific Th1 population by in vitro culture with IL-4. *J Immunol* 154, 3779-3787.
- Momburg, F., Roelse, J., Howard, J. C., Butcher, G. W., Hammerling, G. J., and Neefjes, J. J. (1994). Selectivity of MHC-encoded peptide transporters from human, mouse and rat. *Nature* 367, 648-651.
- Momburg, F., and Tan, P. (2002). Tapasin-the keystone of the loading complex optimizing peptide binding by MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Mol Immunol* 39, 217-233.
- Monks, C. R., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N., Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82-86.
- Moor, G. E. (1997). Derivation of tumor derived cell lines (Melanoma cells): an overview. In *Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures*, A. Doyle and D. G. Newell, eds. (Wiley), 11C: 1. 1-11C:1.12.
- Moreau, P., Adrian-Cabestre, F., Menier, C., Guiard, V., Gourand, L., Dausset, J., Carosella, E. D., and Paul, P. (1999). IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol* 11, 803-811.
- Moreau, P., Faure, O., Lefebvre, S., Ibrahim, E. C., O'Brien, M., Gourand, L., Dausset, J., Carosella, E. D., and Paul, P. (2001). Glucocorticoid hormones upregulate levels of HLA-G transcripts in trophoblasts. *Transplant Proc* 33, 2277-2280.
- Moreau, P., Mouillot, G., Rousseau, P., Marcou, C., Dausset, J., and Carosella, E. D. (2003). HLA-G gene repression is reversed by demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1191-1196.
- Morel, S., Levy, F., Bulet-Schiltz, O., Brasseur, F., Probst-Kepper, M., Peitrequin, A. L., Monsarrat, B., Van Velthoven, R., Cerottini, J. C., Boon, T., Gairin, J. E., Van den Eynde, B. J. (2000). Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* 12, 107-117.
- Moretta, A., Parolini, S., Castriconi, R., Bottino, C., Vitale, M., Sivori, S., and Millo, R. (1997). Function and specificity of human natural killer cell receptors. *Eur J Immunogenet* 24, 455-468.

- Morford, L. A., Elliott, L. H., Carlson, S. L., Brooks, W. H., Roszman, T. L. (1997). T cell receptor-mediated signaling is defective in T cells obtained from patients with primary intracranial tumors. *J Immunol* 159, 4415-4425.
- Morford, L. A., Dix, A. R., Brooks, W. H., Roszman, T. L. (1999). Apoptotic elimination of peripheral T lymphocytes in patients with primary intracranial tumors. *J Neurosurg* 91, 935-946.
- Morita, T., Salmeron, M. A., Hayakawa, K., Swanson, D. A., von Eschenbach, A. C., Itoh, K. (1992) T cell functions of IL-2-activated tumor-infiltrating lymphocytes from renal cell carcinoma. *Reg Immunol* 4, 225-235.
- Morra, M. N., Das, S. (1993). Renal oncocytoma: a review of histogenesis, histopathology, diagnosis and treatment. *J Urol* 150, 295-302.
- Morrissey, C., Martinez, A., Zatyka, M., Agathangelou, A., Honorio, S., Astuti, D., Morgan, N. V., Moch, H., Richards, F. M., Kishida, T., Yao, M., Schraml, P., Latif, F., Maher, E. R. (2001). Epigenetic inactivation of the RASSF1A 3p21.3 tumor suppressor gene in both clear cell and papillary renal cell carcinoma. *Cancer Res* 61, 7277-7281.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- Motyka, B., Korbitt, G., Pinkoski, M. J., Heibein, J. A., Caputo, A., Hobman, M., Barry, M., Shostak, I., Sawchuk, T., Holmes, C. F., Gauldie, J., Bleackley, R. C. (2000). Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 103, 491-500.
- Motzer, R. J., Bander, N. H., and Nanus, D. M. (1996). Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 335, 865-875.
- Motzer, R. J., Murphy, B. A., Bacik, J., Schwartz, L. H., Nanus, D. M., Mariani, T., Loehrer, P., Wilding, G., Fairclough, D. L., Cella, D., Mazumdar, M. (2000). Phase III trial of interferon alfa-2a with or without 13-cis-retinoic acid for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 18, 2972-2980.
- Mulder, W. M., Bloemena, E., Stukart, M. J., Kummer, J. A., Wagstaff, J., Scheper, R. J. (1997). T cell receptor-zeta and granzyme B expression in mononuclear cell infiltrates in normal colon mucosa and colon carcinoma. *Gut* 40, 113-119.
- Munn, D. H., Shafizadeh, E., Attwood, J. T., Bondarev, I., Pashine, A., Mellor, A. L. (1999). Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med* 189, 1363-1372.
- Munz, C., Holmes, N., King, A., Loke, Y. W., Colonna, M., Schild, H., and Rammensee, H. G. (1997). Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G molecules inhibit NKAT3 expressing natural killer cells. *J Exp Med* 185, 385-391.
- Nakagomi, H., Petersson, M., Magnusson, I., Juhlin, C., Matsuda, M., Mellstedt, H., Taupin, J. L., Vivier, E., Anderson, P., Kiessling, R. (1993). Decreased expression of the signal-transducing zeta chains in tumor-infiltrating T-cells and NK cells of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Res* 53, 5610-5612.
- Nakagomi, H., Pisa, P., Pisa, E. K., Yamamoto, Y., Halapi, E., Backlin, K., Juhlin, C., and Kiessling, R. (1995). Lack of interleukin-2 (IL-2) expression and selective expression of IL-10 mRNA in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 63, 366-371.
- Namba, M., Mihara, K., Fushimi, K. (1996). Immortalization of human cells and its mechanisms. *Crit Rev Oncog* 7, 19-31.
- Navarro, F., Llano, M., Bellon, T., Colonna, M., Geraghty, D. E., and Lopez-Botet, M. (1999). The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur J Immunol* 29, 277-283.

- Neefjes, J. J., Momburg, F., Hammerling, G. J. (1993). Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science* 261, 769-71.
- Neefjes, J. J., Momburg, F., Hammerling, G. J. (1994). Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science* 264, 16.
- Neefjes, J., Gottfried, E., Roelse, J., Gromme, M., Obst, R., Hammerling, G. J., Momburg, F. (1995) Analysis of the fine specificity of rat, mouse and human TAP peptide transporters. *Eur J Immunol* 25, 1133-1136.
- Neitzel, H. (1986). A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. *Hum Genet* 73, 320-6.
- Nestle, F. O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G., and Schadendorf, D. (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4, 328-332.
- Neufeld, D. S., Ripley, S., Henderson, A., Ozer, H. L. (1987). immortalization of human fibroblasts transformed by origin-defective simian virus 40. *Mol Cell Biol* 7, 2794-2802.
- Neumann, E., Engelsberg, A., Decker, J., Storkel, S., Jaeger, E., Huber, C., and Seliger, B. (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.
- Newbold, R. F., Overell, R. W., Connell, J. R. (1982). Induction of immortality is an early event in malignant transformation of mammalian cells by carcinogens. *Nature* 299, 633-635.
- Newbold, R. F. (1985). Multistep malignant transformation of mammalian cells by carcinogens: induction of immortality as a key event. *Carcinog Compr Surv* 9, 17-28.
- Newbold, R. F., Cuthbert, A. P., Themis, M., Trott, D. A., Blair, A. L., Li, W. (1993). Cell immortalization as a key, rate-limiting event in malignant transformation: approaches toward a molecular genetic analysis. *Toxicol Lett* 67, 211-30.
- New nomenclature for MHC receptors. (2001). *Nat Immunol* 2, 661.
- Ni, H. T., Deeths, M. J., and Mescher, M. F. (2001). LFA-1-mediated costimulation of CD8+ T cell proliferation requires phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Immunol* 166, 6523-6529.
- Nishimura, T., and Ohta, A. (1999). A critical role for antigen-specific Th1 cells in acute liver injury in mice. *J Immunol* 162, 6503-6509.
- Noble, J. R., Rogan, E. M., Neumann, A. A., Maclean, K., Bryan, T. M., Reddel, R. R. (1996). Association of extended in vitro proliferative potential with loss of p16INK4 expression. *Oncogene* 13, 1259-68.
- Noel, P. J., Boise, L. H., Thompson, C. B. (1996). Regulation of T cell activation by CD28 and CTLA4. *Adv Exp Med Biol* 406, 209-217.
- North, R. J., Awwad, M. (1990). Elimination of cycling CD4+ suppressor T cells with an anti-mitotic drug releases non-cycling CD8+ T cells to cause regression of an advanced lymphoma. *Immunology* 71, 90-95.
- O'Callaghan, C. A., and Bell, J. I. (1998). Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. *Immunol Rev* 163, 129-138.
- Ochsenbein, A. F., Karrer, U., Klenerman, P., Althage, A., Ciurea, A., Shen, H., Miller, J. F., Whitton, J. L., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1999). A comparison of T cell memory against the same antigen induced by virus versus intracellular bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 9293-9298.

- O'Hare, M. J., Ormerod, M. G., Monaghan, P., Lane, E. B., Gusterson, B. A. (1991). Characterization in vitro of luminal and myoepithelial cells isolated from the human mammary gland by cell sorting. *Differentiation* 46, 209-221.
- Old, L. J., Chen, Y. T. (1998). New paths in human cancer serology. *J Exp Med* 187, 1163-1167.
- Oliver, R. T., Nouri, A. M., Crosby, D., Iles, R. L., Navarette, C., Martin, J., Bodmer, W., Festenstein, H. (1989). Biological significance of beta hCG, HLA and other membrane antigen expression on bladder tumours and their relationship to tumour infiltrating lymphocytes (TIL). *J Immunogenet* 16, 381-390.
- O'Mahony, A. M., O'Sullivan, G. C., O'Connell, J., Cotter, T. G., Collins, J. K. (1993). An immune suppressive factor derived from esophageal squamous carcinoma induces apoptosis in normal and transformed cells of lymphoid lineage. *J Immunol* 151, 4847-4856.
- Onno, M., Guillaudeux, T., Amiot, L., Renard, I., Drenou, B., Hirel, B., Girr, M., Semana, G., Le Bouteiller, P., and Fauchet, R. (1994). The HLA-G gene is expressed at a low mRNA level in different human cells and tissues. *Hum Immunol* 41, 79-86.
- Oosterwijk, E., Ruiter, D. J., Hoedemaeker, P. J., Pauwels, E. K., Jonas, U., Zwartendijk, J., Warnaar, S. O. (1986). Monoclonal antibody G 250 recognizes a determinant present in renal-cell carcinoma and absent from normal kidney. *Int J Cancer* 38, 489-494.
- Pannetier, C., Even, J., Kourilsky, P. (1995). T cell receptor repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunology Today* 16, 176-181.
- Pantel, K., Dickmanns, A., Zippelius, A., Klein, C., Shi, J., Hoechtlen-Vollmar, W., Schlimok, G., Weckermann, D., Oberneder, R., Fanning, E., et al. (1995). Establishment of micrometastatic carcinoma cell lines: a novel source of tumor cell vaccines. *J Natl Cancer Inst* 87, 1162-1168.
- Papa, S., Gregorini, A., Pascucci, E., Bartolucci, M., Rocchi, M. B., Valentini, M. (1994). Inhibition of NK binding to K562 cells induced by MAb saturation of adhesion molecules on target membrane. *Eur J Histochem* 38, 83-90.
- Pardoll, D. M. (2002). Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2, 227-238.
- Park, B., Lee, S., Kim, E., Chang, S., Jin, M., and Ahn, K. (2001). The truncated cytoplasmic tail of HLA-G serves a quality-control function in post-ER compartments. *Immunity* 15, 213-224.
- Paul, P., Rouas-Freiss, N., Khalil-Daher, I., Moreau, P., Riteau, B., Le Gal, F. A., Avril, M. F., Dausset, J., Guillet, J. G., and Carosella, E. D. (1998). HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4510-4515.
- Paul, P., Cabestre, F. A., Le Gal, F. A., Khalil-Daher, I., Le Danff, C., Schmid, M., Mercier, S., Avril, M. F., Dausset, J., Guillet, J. G., and Carosella, E. D. (1999). Heterogeneity of HLA-G gene transcription and protein expression in malignant melanoma biopsies. *Cancer Res* 59, 1954-1960.
- Paul, P., Cabestre, F. A., Ibrahim, E. C., Lefebvre, S., Khalil-Daher, I., Vazeux, G., Quiles, R. M., Bermond, F., Dausset, J., and Carosella, E. D. (2000a). Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. *Hum Immunol* 61, 1138-1149.
- Paul, P., Rouas-Freiss, N., Moreau, P., Cabestre, F. A., Menier, C., Khalil-Daher, I., Pangault, C., Onno, M., Fauchet, R., Martinez-Laso, J., Morales, P., Villena, A. A., Giacomini, P., Natali, P. G., Frumento, G., Ferrara, G. B., McMaster, M., Fisher, S., Schust, D., Ferrone, S., Dausset, J., Geraghty, D., Carosella, E. D. (2000b). HLA-G, -E, -F preworkshop: tools and protocols for analysis of non-classical class I genes transcription and protein expression. *Hum Immunol* 61, 1177-1195.

- Pawelec, G., Zeuthen, J., and Kiessling, R. (1997). Escape from host-antitumor immunity. *Crit Rev Oncog* 8, 111-141.
- Peltenburg, L. T., Schrier, P. I. (1994). Transcriptional suppression of HLA-B expression by c-Myc is mediated through the core promoter elements. *Immunogenetics* 40, 54-61.
- Pende, D., Biassoni, R., Cantoni, C., Verdiani, S., Falco, M., di Donato, C., Accame, L., Bottino, C., Moretta, A., Moretta, L. (1996). The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer. *J Exp Med* 184, 505-518.
- Pende, D., Sivori, S., Accame, L., Pareti, L., Falco, M., Geraghty, D., Le Bouteiller, P., Moretta, L., Moretta, A. (1997). HLA-G recognition by human natural killer cells. Involvement of CD94 both as inhibitory and as activating receptor complex. *Eur J Immunol* 27, 1875-1880.
- Pende, D., Accame, L., Pareti, L., Mazzocchi, A., Moretta, A., Parmiani, G., Moretta, L. (1998). The susceptibility to natural killer cell-mediated lysis of HLA class I-positive melanomas reflects the expression of insufficient amounts of different HLA class I alleles. *Eur J Immunol* 28, 2384-2394.
- Pende, D., Cantoni, C., Rivera, P., Vitale, M., Castriconi, R., Marcenaro, S., Nanni, M., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, A., and Moretta, L. (2001). Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *Eur J Immunol* 31, 1076-1086.
- Phillips, J. H., Gumperz, J. E., Parham, P., Lanier, L. L. (1995). Superantigen-dependent, cell-mediated cytotoxicity inhibited by MHC class I receptors on T lymphocytes. *Science* 268, 403-405.
- Phillips, J. H., Chang, C., Mattson, J., Gumperz, J. E., Parham, P., Lanier, L. L. (1996). CD94 and a novel associated protein (94AP) form a NK cell receptor involved in the recognition of HLA-A, HLA-B, and HLA-C allotypes. *Immunity* 5, 163-172.
- Polakova, K., and Russ, G. (2000). Expression of the non-classical HLA-G antigen in tumor cell lines is extremely restricted. *Neoplasma* 47, 342-348.
- Puppo, F., Scudelletti, M., Indiveri, F., Ferrone, S. (1995). Serum HLA class I antigens: markers and modulators of an immune response? *Immunol Today* 16, 124-127.
- Pietra, G., Romagnani, C., Falco, M., Vitale, M., Castriconi, R., Pende, D., Millo, E., Anfossi, S., Biassoni, R., Moretta, L., Mingari, M. C. (2001). The analysis of the natural killer-like activity of human cytolytic T lymphocytes revealed HLA-E as a novel target for TCR alpha/beta-mediated recognition. *Eur J Immunol* 31, 3687-3693.
- Probst-Kepper, M., Stroobant, V., Kridel, R., Gaugler, B., Landry, C., Bresseur, F., Cosyns, J. P., Weyand, B., Boon, T., Van Den Eynde, B. J. (2001). An alternative open reading frame of the human macrophage colony-stimulating factor gene is independently translated and codes for an antigenic peptide of 14 amino acids recognized by tumor-infiltrating CD8 T lymphocytes. *J Exp Med* 193, 1189-1198.
- Puisieux, I., Bain, C., Merrouche, Y., Malacher, P., Kourilsky, P., Even, J., and Favrot, M. (1996). Restriction of the T-cell repertoire in tumor-infiltrating lymphocytes from nine patients with renal-cell carcinoma. Relevance of the CDR3 length analysis for the identification of in situ clonal T-cell expansions. *Int J Cancer* 66, 201-208.
- Rabinowich, H., Suminami, Y., Reichert, T. E., Crowley-Nowick, P., Bell, M., Edwards, R., Whiteside, T. L. (1996b). Expression of cytokine genes or proteins and signaling molecules in lymphocytes associated with human ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 68, 276-284.
- Radoja, S., and Frey, A. B. (2000). Cancer-induced defective cytotoxic T lymphocyte effector function: another mechanism how antigenic tumors escape immune-mediated killing. *Mol Med* 6, 465-479.

- Rajagopalan, S., Long, E. O. (1997). The direct binding of a p58 killer cell inhibitory receptor to human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-Cw4 exhibits peptide selectivity. *J Exp Med* 185,1523-1528.
- Rajagopalan, S., Long, E. O. (2000). A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med* 191, 2027.
- Rajagopalan, S., Fu, J., Long, E. O. (2001). Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J Immunol* 167, 1877-1881.
- Rammensee, H. G., Falk, K., and Rötzschke, O. (1993). Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol* 11, 213-244.
- Real, L. M., Cabrera, T., Canton, J., Oliva, R., Ruiz-Cabello, F., and Garrido, F. (1999a). Looking for HLA-G expression in human tumours. *J Reprod Immunol* 43, 263-273.
- Real, L. M., Cabrera, T., Collado, A., Jimenez, P., Garcia, A., Ruiz-Cabello, F., and Garrido, F. (1999b). Expression of HLA G in human tumors is not a frequent event. *Int J Cancer* 81, 512-518.
- Rebmann, V., Regel, J., Stolke, D., and Grosse-Wilde, H. (2003). Secretion of sHLA-G molecules in malignancies. *Semin Cancer Biol* 13, 371-377.
- Reichert, T. E., Day, R., Wagner, E. M., Whiteside, T. L. (1998). Absent or low expression of the zeta chain in T cells at the tumor site correlates with poor survival in patients with oral carcinoma. *Cancer Res* 58, 5344-5347.
- Renner, C., Ohnesorge, S., Held, G., Bauer, S., Jung, W., Pfitzenmeier, J. P., and Pfreundschuh, M. (1996). T cells from patients with Hodgkin's disease have a defective T-cell receptor zeta chain expression that is reversible by T-cell stimulation with CD3 and CD28. *Blood* 88, 236-241.
- Restifo, N. P., Esquivel, F., Kawakami, Y., Yewdell, J. W., Mule, J. J., Rosenberg, S. A., and Bannink, J. R. (1993). Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J Exp Med* 177, 265-272.
- Restifo, N. P., Marincola, F. M., Kawakami, Y., Taubenberger, J., Yannelli, J. R., and Rosenberg, S. A. (1996). Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. *J Natl Cancer Inst* 88, 100-108.
- Restifo, N. P. (2000). Not so Fas: Re-evaluating the mechanisms of immune privilege and tumor escape. *Nat Med* 6, 493-495.
- Reuben, J. M., Hersh, E. M. (1984). Delayed hypersensitivity responses of cancer patients to recall antigens using a new "Multitest" applicator. *Ann Allergy* 53, 390-394.
- Rhyu, M. S. (1995). Telomeres, telomerase, and immortality. *J Natl Cancer Inst* 87, 884-894.
- Riteau, B., Menier, C., Khalil-Daher, I., Martinozzi, S., Pla, M., Dausset, J., Carosella, E. D., and Rouas-Freiss, N. (2001). HLA-G1 co-expression boosts the HLA class I-mediated NK lysis inhibition. *Int Immunol* 13, 193-201.
- Ritz, U., Drexler, I., Sutter, D., Abele, R., Huber, C., and Seliger, B. (2003). Impaired transporter associated with antigen processing (TAP) function attributable to a single amino acid alteration in the peptide TAP subunit TAP1. *J Immunol* 170, 941-946.
- Robertson, M. J., Ritz, J. (1990). Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76, 2421-2438.
- Rocha, B., Tanchot, C. (2004). Towards a cellular definition of CD8+ T-cell memory: the role of CD4+ T-cell help in CD8+ T-cell responses. *Curr Opin Immunol* 16, 259-263.

- Rock, K. L., and Goldberg, A. L. (1999). Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 17, 739-779.
- Ronsin, C., Chung-Scott, V., Poullion, I., Aknouche, N., Gaudin, C., and Triebel, F. (1999). A non-AUG-defined alternative open reading frame of the intestinal carboxyl esterase mRNA generates an epitope recognized by renal cell carcinoma-reactive tumor-infiltrating lymphocytes in situ. *J Immunol* 163, 483-490.
- Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Yang, J. C., Aebersold, P. M., Linehan, W. M., Seipp, C. A., White, D. E. (1989). Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Ann Surg* 210, 474-484.
- Rosenberg, S. A. (1996). The immunotherapy of solid cancers based on cloning the genes encoding tumor-rejection antigens. *Annu Rev Med* 47, 481-491.
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., White, D. E., Steinberg, S. M. (1998). Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. *Ann Surg* 228, 307-319.
- Rothstein, D. M., Yamada, A., Schlossman, S. F., Morimoto, C. (1991). Cyclic regulation of CD45 isoform expression in a long term human CD4+CD45RA+ T cell line. *J Immunol* 146, 1175-1183.
- Rötzschke, O., Falk, K., Deres, K., Schild, H., Norda, M., Metzger, J., Jung, G., und Rammensee, H. G. (1990). Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature* 348, 252-254.
- Rouas-Freiss, N., Marchal, R. E., Kirszenbaum, M., Dausset, J., und Carosella, E. D. (1997). The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5249-5254.
- Rouas-Freiss, N., Moreau, P., Menier, C., und Carosella, E. D. (2003). HLA-G in cancer: a way to turn off the immune system. *Semin Cancer Biol* 13, 325-336.
- Rubin, H. (2002). The disparity between human cell senescence in vitro and lifelong replication in vivo. *Nat Biotechnol* 20, 675-681.
- Ruffini, P. A., Rivoltini, L., Silvani, A., Boiardi, A., Parmiani, G. (1993). Factors, including transforming growth factor beta, released in the glioblastoma residual cavity, impair activity of adherent lymphokine-activated killer cells. *Cancer Immunol Immunother* 36, 409-416.
- Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., Lopez-Nevot, M. A., Garrido, F. (2002). Impaired surface antigen presentation in tumors: implications for T cell-based immunotherapy. *Semin Cancer Biol* 12, 15-24.
- Sad, S., Marcotte, R., Mosmann, T. R. (1995a). Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 2, 271-279.
- Sad, S., Mosmann, T. R. (1995b). Interleukin (IL) 4, in the absence of antigen stimulation, induces an anergy-like state in differentiated CD8+ TC1 cells: loss of IL-2 synthesis and autonomous proliferation but retention of cytotoxicity and synthesis of other cytokines. *J Exp Med* 182, 1505-1515.
- Sad, S., Li, L., Mosmann, T. R. (1997). Cytokine-deficient CD8+ Tc1 cells induced by IL-4: retained inflammation and perforin and Fas cytotoxicity but compromised long term killing of tumor cells. *J Immunol* 159, 606-613.
- Sadasivan, B., Lehner, P. J., Ortmann, B., Spies, T., and Cresswell, P. (1996). Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 5, 103-114.

- Sade, H., Sarin, A. (2003). IL-7 inhibits dexamethasone-induced apoptosis via Akt/PKB in mature, peripheral T cells. *Eur J Immunol* 33, 913-919.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Saito, S., Orikasa, S., Ohyama, C., Satoh, M., Fukushi, Y. (1991). Changes in glycolipids in human renal-cell carcinoma and their clinical significance. *Int J Cancer*. 49, 329-334.
- Sakakibara, N., Gasa, S., Kamio, K., Makita, A., Nonomura, K., Togashi, M., Koyanagi, T., Hatae, Y., Takeda, K. (1991). Distinctive glycolipid patterns in Wilms' tumor and renal cell carcinoma. *Cancer Lett* 57, 187-192.
- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708-712.
- Samaridis, J., Colonna, M. (1997). Cloning of novel immunoglobulin superfamily receptors expressed on human myeloid and lymphoid cells: structural evidence for new stimulatory and inhibitory pathways. *Eur J Immunol* 27, 660-665.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sampson, J. R., Patel, A., Mee, A. D. (1995). Multifocal renal cell carcinoma in sibs from a chromosome 9 linked (TSC1) tuberous sclerosis family. *J Med Genet* 32, 848-850.
- Sanger, F., Miklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467.
- Sato, M., Goto, S., Kaneko, R., Ito, M., Sato, S., and Takeuchi, S. (1998). Impaired production of Th1 cytokines and increased frequency of Th2 subsets in PBMC from advanced cancer patients. *Anticancer Res* 18, 3951-3955.
- Schendel, D. J., Gansbacher, B., Oberneder, R., Kriegmair, M., Hofstetter, A., Riethmuller, G., and Segurado, O. G. (1993). Tumor-specific lysis of human renal cell carcinomas by tumor-infiltrating lymphocytes. I. HLA-A2-restricted recognition of autologous and allogeneic tumor lines. *J Immunol* 151, 4209-4220.
- Schleypen, J. S., Von Geldern, M., Weiss, E. H., Kotzias, N., Rohrmann, K., Schendel, D. J., Falk, C. S., Pohla, H. (2003). Renal cell carcinoma-infiltrating natural killer cells express differential repertoires of activating and inhibitory receptors and are inhibited by specific HLA class I allotypes. *Int J Cancer* 106, 905-912.
- Schumacher, T. N., and Ploegh, H. L. (1994). Are MHC-bound peptides a nuisance for positive selection? *Immunity* 1, 721-723.
- Schmitz, G. G., Walter, T., Seibl, R., Kessler, C. (1991). Nonradioactive labeling of oligonucleotides *in vitro* with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal Biochem* 192, 222-231.
- Seed, B. (1983). Purification of genomic sequences from bacteriophage libraries by recombination and selection *in vivo*. *Nucleic Acids Res* 11, 2427-2445.
- Seliger, B., Hohne, A., Knuth, A., Bernhard, H., Ehring, B., Tampe, R., and Huber, C. (1996a). Reduced membrane major histocompatibility complex class I density and stability in a subset of human renal cell carcinomas with low TAP and LMP expression. *Clin Cancer Res* 2, 1427-1433.
- Seliger, B., Hohne, A., Knuth, A., Bernhard, H., Meyer, T., Tampe, R., Momburg, F., and Huber, C. (1996b). Analysis of the major histocompatibility complex class I antigen presentation machinery in

normal and malignant renal cells: evidence for deficiencies associated with transformation and progression. *Cancer Res* 56, 1756-1760.

Seliger, B., Hammers, S., Hohne, A., Zeidler, R., Knuth, A., Gerharz, C. D., and Huber, C. (1997). IFN-gamma-mediated coordinated transcriptional regulation of the human TAP-1 and LMP-2 genes in human renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 3, 573-578.

Seliger, B., Maeurer, M. J., and Ferrone, S. (2000). Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today* 21, 455-464.

Seliger, B., Abken, H., Ferrone, S. (2003a). HLA-G and MIC expression in tumors and their role in anti-tumor immunity. *Trends Immunol* 24, 82-87.

Seliger, B., Atkins, D., Bock, M., Ritz, U., Ferrone, S., Huber, C., and Storkel, S. (2003b). Characterization of human lymphocyte antigen class I antigen-processing machinery defects in renal cell carcinoma lesions with special emphasis on transporter-associated with antigen-processing down-regulation. *Clin Cancer Res* 9, 1721-1727.

Seliger, B., Menig, M., Lichtenfels, R., Atkins, D., Bukur, J., Halder, T. M., Kersten, M., Harder, A., Ackermann, A., Beck, J., Muehlenweg, B., Brenner, W., Melchior, S., Kellner, R., Lottspeich, F. (2003c). Identification of markers for the selection of patients undergoing renal cell carcinoma-specific immunotherapy. *Proteomics* 3, 979-990.

Seo, N., Hayakawa, S., and Tokura, Y. (2002). Mechanisms of immune privilege for tumor cells by regulatory cytokines produced by innate and acquired immune cells. *Semin Cancer Biol* 12, 291-300.

Sharma, S., Stolina, M., Lin, Y., Gardner, B., Miller, P. W., Kronenberg, M., and Dubinett, S. M. (1999). T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. *J Immunol* 163, 5020-5028.

Shay, J. W., Wright, W. E. (1989). Quantitation of the frequency of immortalization of normal human diploid fibroblasts by SV40 large T-antigen. *Exp Cell Res* 184, 109-118.

Shay, J. W., Pereira-Smith, O. M., Wright, W. E. (1991). A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res* 196, 33-39.

Shay, J. W. (1995). Aging and cancer: are telomeres and telomerase the connection? *Mol Med Today* 1, 378-384.

Shay, J. W., Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33, 787-791.

Shepherd, J. C., Schumacher, T. N., Ashton-Rickardt, P. G., Imaeda, S., Ploegh, H. L., Janeway, C. A. Jr, Tonegawa, S. (1993). TAP1-dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide selective. *Cell* 75, 613.

Shigekawa, K., Dower, W. J. (1988). Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *Biotechniques* 6, 742-51.

Shiroishi, M., Tsumoto, K., Amano, K., Shirakihara, Y., Colonna, M., Braud, V. M., Allan, D. S., Makadzange, A., Rowland-Jones, S., Willcox, B., Jones, E. Y., van der Merwe, P. A., Kumagai, I., Maenaka, K. (2003). Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 8856-8861.

Sica, D., Rayman, P., Stanley, J., Edinger, M., Tubbs, R. R., Klein, E., Bukowski, R., and Finke, J. H. (1993). Interleukin 7 enhances the proliferation and effector function of tumor-infiltrating lymphocytes from renal-cell carcinoma. *Int J Cancer* 53, 941-947.

Silhavy, T. J., Berman, M. L., and Enquist, L. W. (1984). *Experiments with Gene Fusions*. Cold Spring Harbour Laboratory.

- Singal, D. P., Ye, M., Ni, J., Snider, D. P. (1996). Markedly decreased expression of TAP1 and LMP2 genes in HLA class I-deficient human tumor cell lines. *Immunol Lett* 50, 149-154.
- Smith, J. R., Pereira-Smith, O. M. (1996). Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression. *Science* 273, 63-67.
- Smits, H. H., de Jong, E. C., Schuitemaker, J. H., Geijtenbeek, T. B., van Kooyk, Y., Kapsenberg, M. L., and Wierenga, E. A. (2002). Intercellular adhesion molecule-1/LFA-1 ligation favors human Th1 development. *J Immunol* 168, 1710-1716.
- Smits, H. H., van Rietschoten, J. G., Hilkens, C. M., Sayilir, R., Stiekema, F., Kapsenberg, M. L., and Wierenga, E. A. (2001). IL-12-induced reversal of human Th2 cells is accompanied by full restoration of IL-12 responsiveness and loss of GATA-3 expression. *Eur J Immunol* 31, 1055-1065.
- Sogn, J. A. (1998). Tumor immunology: the glass is half full. *Immunity* 9, 757-763.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-517.
- Spaggiari, G. M., Contini, P., Dondero, A., Carosio, R., Puppo, F., Indiveri, F., Zocchi, M. R., Poggi, A. (2002). Soluble HLA class I induces NK cell apoptosis upon the engagement of killer-activating HLA class I receptors through FasL-Fas interaction. *Blood* 100, 4098-4107.
- Spaggiari, G. M., Contini, P., Carosio, R., Arvigo, M., Ghio, M., Oddone, D., Dondero, A., Zocchi, M. R., Puppo, F., Indiveri, F., Poggi, A. (2002). Soluble HLA class I molecules induce natural killer cell apoptosis through the engagement of CD8: evidence for a negative regulation exerted by members of the inhibitory receptor superfamily. *Blood* 99, 1706-1714.
- Spaggiari, G. M., Contini, P., Negrini, S., Dondero, A., Carosio, R., Ghio, M., Puppo, F., Indiveri, F., Zocchi, M. R., Poggi, A. (2003). IFN-gamma production in human NK cells through the engagement of CD8 by soluble or surface HLA class I molecules. *Eur J Immunol* 33, 3049-3059.
- Spee, P., Neefjes, J. (1997). TAP-translocated peptides specifically bind proteins in the endoplasmic reticulum, including gp96, protein disulfide isomerase and calreticulin. *Eur J Immunol* 27, 2441-2449.
- Stamps, A. C., Gusterson, B. A., O'Hare, M. J. (1992). Are tumours immortal? *Eur J Cancer* 28A, 1495-1500.
- Steger, G. G., Gnant, M. F., Djavanmard, M. P., Mader, R. M., Jakesz, R., Pierce, W., deKernion, J. B., Figlin, R., and Beldegrun, A. (1997). The in vitro effects of interleukin-12 upon tumor-infiltrating lymphocytes derived from renal cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 123, 317-324.
- Sternberg, C. N., Vogelzang, N. J. (2003). Gemcitabine, paclitaxel, pemetrexed and other newer agents in urothelial and kidney cancers. *Crit Rev Oncol Hematol* 46 Suppl. S, 105-115.
- Stewart, S. A., Weinberg, R. A. (2002). Senescence: does it all happen at the ends? *Oncogene* 21, 627-630.
- Stewart, S. A., Ben-Porath, I., Carey, V. J., O'Connor, B. F., Hahn, W. C., Weinberg, R. A. (2003). Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence. *Nat Genet* 33, 492-496.
- Stockert, E., Jager, E., Chen, Y. T., Scanlan, M. J., Gout, I., Karbach, J., Arand, M., Knuth, A., Old, L. J. (1998). A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J Exp Med* 187, 1349-1354.
- Strauss, F., and Varshavsky, A., (1984). A Protein Binds to a Satellite DNA Repeat at Three Specific Sites That Would be Brought into Mutual Proximity by DNA Folding in the Nucleosome. *Cell* 37, 889-901.

- Sykulev, Y., Joo, M., Vturina, I., Tsomides, T. J., and Eisen, H. N. (1996). Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity* 4, 565-571.
- Szabo, S. J., Jacobson, N. G., Dighe, A. S., Gubler, U., Murphy, K. M. (1995). Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signaling. *Immunity* 2, 665-675.
- Szabo, S. J., Dighe, A. S., Gubler, U., Murphy, K. M. (1997). Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 185, 817-824.
- Tan, L. C., Gudgeon, N., Annels, N. E., Hansasuta, P., O'Callaghan, C. A., Rowland-Jones, S., McMichael, A. J., Rickinson, A. B., Callan, M. F. (1999). A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for EBV in healthy virus carriers. *J Immunol* 162, 1827-1835.
- Tanchot, C., Rocha, B. (2003). CD8 and B cell memory: same strategy, same signals. *Nat Immunol* 4, 431-432.
- Targoni, O. S., Lehmann, P. V. (1998). Endogenous myelin basic protein inactivates the high avidity T cell repertoire. *J Exp Med* 187, 20
- Tartour, E., Latour, S., Mathiot, C., Thiounn, N., Mosseri, V., Joyeux, I., D'Enghien, C. D., Lee, R., Debre, B., Fridman, W. H. (1995). Variable expression of CD3-zeta chain in tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) derived from renal-cell carcinoma: relationship with TIL phenotype and function. *Int J Cancer* 63, 205-212.
- Thiounn, N., Mathiot, C., Tartour, E., Joyeux, I., Peyret, C., Brandely, M., Deslignieres, S., Debre, B., and Fridman, W. H. (1994). Phenotypic and functional analysis of tumour-infiltrating lymphocytes from patients with renal cell carcinoma. *Eur Urol* 25, 151-157.
- Thoenes, W., Storkel, S., Rumpelt, H. J., Moll, R., Baum, H. P., Werner, S. (1988). Chromophobe cell renal carcinoma and its variants-a report on 32 cases. *J Pathol* 155, 277-287.
- Torres, M. J., Ruiz-Cabello, F., Skoudy, A., Berrozpe, G., Jimenez, P., Serrano, A., Real, F. X., Garrido, F. (1996). Loss of an HLA haplotype in pancreas cancer tissue and its corresponding tumor derived cell line. *Tissue Antigens* 47, 372-381.
- Traversari, C., van der Bruggen, P., Luescher, I. F., Lurquin, C., Chomez, P., Van Pel, A., De Plaen, E., Amar-Costesec, A., and Boon, T. (1992). A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J Exp Med* 176, 1453-1457.
- Tsuda, K., Toda, M., Kim, G., Saitoh, K., Yoshimura, S., Yoshida, T., Taki, W., Waga, S., Kuribayashi, K. (2000). Survival-promoting activity of IL-7 on IL-2-dependent cytotoxic T lymphocyte clones: resultant induction of G1 arrest. *J Immunol Methods* 236, 37-51.
- Tureci, O., Sahin, U., Pfreundschuh, M. (1997). Serological analysis of human tumor antigens: molecular definition and implications. *Mol Med Today* 3, 342-349.
- Ueno, N. T., Cheng, Y. C., Rondon, G., Tannir, N. M., Gajewski, J. L., Couriel, D. R., Hosing, C., de Lima, M. J., Anderlini, P., Khouri, I. F., Booser, D. J., Hortobagyi, G. N., Pagliaro, L. C., Jonasch, E., Giral, S. A., Champlin, R. E. (2003). Rapid induction of complete donor chimerism by the use of a reduced-intensity conditioning regimen composed of fludarabine and melphalan in allogeneic stem cell transplantation for metastatic solid tumors. *Blood* 102, 3829-3836.
- Ugolini, S., and Vivier, E. (2001). Multifaceted roles of MHC class I and MHC class I-like molecules in T cell activation. *Nat Immunol* 2, 198-200.
- Urosevic, M., Kurrer, M. O., Kamarashev, J., Mueller, B., Weder, W., Burg, G., Stahel, R. A., Dummer, R., and Trojan, A. (2001). Human leukocyte antigen g up-regulation in lung cancer associates with high-grade histology, human leukocyte antigen class I loss and interleukin-10 production. *Am J Pathol* 159, 817-824.

- Urosevic, M., Willers, J., Mueller, B., Kempf, W., Burg, G., and Dummer, R. (2002). HLA-G protein up-regulation in primary cutaneous lymphomas is associated with interleukin-10 expression in large cell T-cell lymphomas and indolent B-cell lymphomas. *Blood* 99, 609-617.
- Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., and Van den Eynde, B. J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 9, 1269-1274.
- Uzzo, R. G., Rayman, P., Kolenko, V., Clark, P. E., Bloom, T., Ward, A. M., Molto, L., Tannenbaum, C., Worford, L. J., Bukowski, R., *et al.* (1999). Mechanisms of apoptosis in T cells from patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 5, 1219-1229.
- Van de Wiel-van Kemenade, E., Te Velde, A. A., De Boer, A. J., Weening, R. S., Fischer, A., Borst, J., Melief, C. J., Figdor, C. G. (1992). Both LFA-1-positive and -deficient T cell clones require the CD2/LFA-3 interaction for specific cytolytic activation. *Eur J Immunol* 22, 1467-1475.
- van den Berg, E., van der Hout, A. H., Oosterhuis, J. W., Storkel, S., Dijkhuizen, T., Dam, A., Zweers, H. M., Mensink, H. J., Buys, C. H., de Jong, B. (1993). Cytogenetic analysis of epithelial renal-cell tumors: relationship with a new histopathological classification. *Int J Cancer* 55, 223-227.
- van den Berg, A., Buys, C. H. (1997). Involvement of multiple loci on chromosome 3 in renal cell cancer development. *Genes Chromosomes Cancer* 19, 59-76.
- Van Den Eynde, B. J., Gaugler, B., Probst-Kepper, M., Michaux, L., Devuyst, O., Lorge, F., Weynants, P., and Boon, T. (1999). A new antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human kidney tumor results from reverse strand transcription. *J Exp Med* 190, 1793-1800.
- Van den Hove, L. E., Van Gool, S. W., Van Poppel, H., Baert, L., Coorevits, L., Van Damme, B., and Ceuppens, J. L. (1997). Phenotype, cytokine production and cytolytic capacity of fresh (uncultured) tumour-infiltrating T lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Clin Exp Immunol* 109, 501-509.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-1647.
- Van Der Bruggen, P., Zhang, Y., Chaux, P., Stroobant, V., Panichelli, C., Schultz, E. S., Chapiro, J., Van Den Eynde, B. J., Basseur, F., and Boon, T. (2002). Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells. *Immunol Rev* 188, 51-64.
- van der Merwe, P. A. (2002). Formation and function of the immunological synapse. *Curr Opin Immunol* 14, 293-298.
- Van Elsas, A., Nijman, H. W., Van der Minne, C. E., Mourer, J. S., Kast, W. M., Melief, C. J., and Schrier, P. I. (1995). Induction and characterization of cytotoxic T-lymphocytes recognizing a mutated p21ras peptide presented by HLA-A*0201. *Int J Cancer* 61, 389-396.
- van Endert, P. M., Riganelli, D., Greco, G., Fleischhauer, K., Sidney, J., Sette, A., and Bach, J. F. (1995). The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing. *J Exp Med* 182, 1883-1895.
- van Leeuwen, J. E., Samelson, L. E. (1999). T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol* 11, 242-248.
- Van Seventer, G. A., Shimizu, Y., Horgan, K. J., and Shaw, S. (1990). The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *J Immunol* 144, 4579-4586.
- Van Seventer, G. A., Bonvini, E., Yamada, H., Conti, A., Stringfellow, S., June, C. H., and Shaw, S. (1992). Costimulation of T cell receptor/CD3-mediated activation of resting human CD4+ T cells by

- leukocyte function-associated antigen-1 ligand intercellular cell adhesion molecule-1 involves prolonged inositol phospholipid hydrolysis and sustained increase of intracellular Ca²⁺ levels. *J Immunol* 149, 3872-3880.
- Vandewalle, A., Bens, M., Duong Van Huyen, J. P. (1999). Immortalized kidney epithelial cells as tools for hormonally regulated ion transport studies. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 8, 581-587.
- Vely, F., Peyrat, M., Couedel, C., Morcet, J., Halary, F., Davodeau, F., Romagne, F., Scotet, E., Saulquin, X., Houssaint, E., Schleinitz, N., Moretta, A., Vivier, E., Bonneville, M. (2001). Regulation of inhibitory and activating killer-cell Ig-like receptor expression occurs in T cells after termination of TCR rearrangements. *J Immunol* 166, 2487-2494.
- Versteeg, R., Kruse-Wolters, K. M., Plomp, A. C., van Leeuwen, A., Stam, N. J., Ploegh, H. L., Ruiter, D. J., Schrier, P. I. (1989). Suppression of class I human histocompatibility leukocyte antigen by c-myc is locus specific. *J Exp Med* 170, 621-635.
- Vigano, P., Somigliana, E., Di Blasio, A. M., Cozzolino, S., Candiani, M., Vignali, M. (2001). Suppression of natural killer cell function and production of soluble ICAM-1: endometrial stroma versus melanoma. *Am J Reprod Immunol* 46, 342-348.
- Vissers, J. L., De Vries, I. J., Schreurs, M. W., Engelen, L. P., Oosterwijk, E., Figdor, C. G., and Adema, G. J. (1999). The renal cell carcinoma-associated antigen G250 encodes a human leukocyte antigen (HLA)-A2.1-restricted epitope recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 59, 5554-5559.
- Voest, E. E., Kenyon, B. M., O'Reilly, M. S., Truitt, G., D'Amato, R. J., Folkman, J. (1995). Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12. *J Natl Cancer Inst* 87, 581-596.
- Vojta, P. J., Barrett, J. C. (1995). Genetic analysis of cellular senescence. *Biochim Biophys Acta* 1242, 29-41.
- Wagner, S. N., Rebmann, V., Willers, C. P., Grosse-Wilde, H., and Goos, M. (2000). Expression analysis of classic and non-classic HLA molecules before interferon alfa-2b treatment of melanoma. *Lancet* 356, 220-221.
- Wagtmann, N., Biassoni, R., Cantoni, C., Verdiani, S., Malnati, M. S., Vitale, M., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A., Long, E. O. (1995). Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. *Immunity* 2, 439-449.
- Wagtmann, N., Rajagopalan, S., Winter, C. C., Peruzzi, M., Long, E. O. (1995). Killer cell inhibitory receptors specific for HLA-C and HLA-B identified by direct binding and by functional transfer. *Immunity* 3, 801-809.
- Wallace, D. M. (1987). Guide to Molecular Cloning Techniques. *Meth Enzymol* 152, 41-48.
- Wang, Q., Redovan, C., Tubbs, R., Olencki, T., Klein, E., Kudoh, S., Finke, J., and Bukowski, R. M. (1995). Selective cytokine gene expression in renal cell carcinoma tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes. *Int J Cancer* 61, 780-785.
- Wang, Z., Margulies, L., Hicklin, D. J., Ferrone, S. (1996). Molecular and functional phenotypes of melanoma cells with abnormalities in HLA class I antigen expression. *Tissue Antigens* 47, 382-390.
- Weinberg, R. A. (1998). Telomeres. Bumps on the road to immortality. *Nature* 396, 23-24.
- Weirich, G., Glenn, G., Junker, K., Merino, M., Storkel, S., Lubensky, I., Choyke, P., Pack, S., Amin, M., Walther, M. M., Linehan, W. M., Zbar, B. (1998). Familial renal oncocytoma: clinicopathological study of 5 families. *J Urol* 160, 335-340.
- Weiss, A., Littman, D. R. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76, 263-274.

- Whiteside, T. L. (1994). Tumor-infiltrating lymphocytes in human solid tumors. *Immunol Ser* 61, 137-148.
- Whiteside, T. L. (1999). Signaling defects in T lymphocytes of patients with malignancy. *Cancer Immunol Immunother* 48, 346-352.
- Wiendl, H., Mitsdoerffer, M., Hofmeister, V., Wischhusen, J., Bornemann, A., Meyermann, R., Weiss, E. H., Melms, A., and Weller, M. (2002). A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J Immunol* 168, 4772-4780.
- Wilson, A. (1997). Preparation of ovarian carcinoma cell lines. *Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures*, A. Doyle & D. G. Newell, eds. (Wiley), 15C: 1.1-15C: 1.20
- Wilson, S. E., Weng, J., Blair, S., He, Y. G., Lloyd, S. (1995). Expression of E6/E7 or SV40 large T antigen-coding oncogenes in human corneal endothelial cells indicates regulated high-proliferative capacity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36, 32-40.
- Wimmenauer, S., Keller, H., Ruckauer, K. D., Rahner, S., Wolff-Vorbeck, G., Kirste, G., von Kleist, S., Farthman, E. H. (1997). Expression of CD44, ICAM-1 and N-CAM in colorectal cancer. Correlation with the tumor stage and the phenotypical characteristics of tumor-infiltrating lymphocytes. *Anticancer Res* 17, 2395-2400.
- Wittekind, C., Meyer, H. J., and Bootz, F. (2002). *TNM-Klassifikation maligner Tumoren* (Berlin (u.a.), Springer).
- Wojtowicz-Praga, S. (1997). Reversal of tumor-induced immunosuppression: a new approach to cancer therapy. *J Immunother* 20, 165-177.
- Wölfel, T., Van Pel, A., Brichard, V., Schneider, J., Seliger, B., Meyer zum Buschenfelde, K. H., and Boon, T. (1994). Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 24, 759-764.
- Wolk, A., Gridley, G., Niwa, S., Lindblad, P., McCredie, M., Mellempgaard, A., Mandel, J. S., Wahrendorf, J., McLaughlin, J. K., Adami, H. O. (1996). International renal cell cancer study. VII. Role of diet. *Int J Cancer* 65, 67-73.
- Woods, C., LeFeuvre, C., Stewart, N., Bacchetti, S. (1994). Induction of genomic instability in SV40 transformed human cells: sufficiency of the N-terminal 147 amino acids of large T antigen and role of pRB and p53. *Oncogene* 9, 2943-2950.
- Wright, W. E., Pereira-Smith, O. M., Shay, J. W. (1989). Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol* 9, 3088-3092.
- Wright, W. E., Shay, J. W. (1992). The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp Gerontol* 27, 383-389.
- Wright, W. E., Shay, J. W. (1995). Time, telomeres and tumours: is cellular senescence more than an anticancer mechanism? *Trends Cell Biol* 5, 293-297.
- Wright, W. E., Brasiskyte, D., Piatyszek, M. A., Shay, J. W. (1996). Experimental elongation of telomeres extends the lifespan of immortal x normal cell hybrids. *EMBO J* 15, 1734-1741.
- Wu, R., Wu, T., and Ray, A. (1987). In *Guide to Molecular Cloning Techniques*. S. L. Berger and A. R. Kimmel, eds. (Academic Press). *Meth Enzymol* 152, 343-349.
- Yewdell, J. W., Norbury, C. C., and Bennink, J. R. (1999). Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: implications for generating CD8+ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines. *Adv Immunol* 73, 1-77.

- Yewdell, J. W., Reits, E., Neefjes, J. (2003). Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 3, 952-961.
- Yoshino, I., Yano, T., Murata, M., Ishida, T., Sugimachi, K., Kimura, G., Nomoto, K. (1992). Tumor-reactive T-cells accumulate in lung cancer tissues but fail to respond due to tumor cell-derived factor. *Cancer Res* 52, 775-781.
- Yssel, H., Fasler, S., de Vries, J. E., de Waal Malefyt, R. (1994). IL-12 transiently induces IFN-gamma transcription and protein synthesis in human CD4+ allergen-specific Th2 T cell clones. *Int Immunol* 6, 1091-1096.
- Yu, M. C., Mack, T. M., Hanisch, R., Cicioni, C., Henderson, B. E. (1986). Cigarette smoking, obesity, diuretic use, and coffee consumption as risk factors for renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 77, 351-356.
- Yue, F. Y., Dummer, R., Geertsen, R., Hofbauer, G., Laine, E., Manolio, S., Burg, G. (1997). Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int J Cancer* 71, 630-637.
- Zavazava, N., Krönke, M. (1996). Soluble HLA class I molecules induce apoptosis in alloreactive cytotoxic T lymphocytes. *Nat Med* 2, 1267.
- Zavazava, N. (1998). Soluble HLA class I molecules: biological significance and clinical implications. *Mol Med Today* 4, 116-121.
- Zbar, B., Tory, K., Merino, M., Schmidt, L., Glenn, G., Choyke, P., Walther, M. M., Lerman, M., Linehan, W. M. (1994). Hereditary papillary renal cell carcinoma. *J Urol* 151, 561-566.
- Zea, A. H., Curti, B. D., Longo, D. L., Alvord, W. G., Strobl, S. L., Mizoguchi, H., Creekmore, S. P., O'Shea, J. J., Powers, G. C., Urba, W. J., et al. (1995). Alterations in T cell receptor and signal transduction molecules in melanoma patients. *Clin Cancer Res* 1, 1327-1335.
- Zinkernagel, R. M. (2002). On cross-priming of MHC class I-specific CTL: rule or exception? *Eur J Immunol* 32, 2385-2392.

Ac	Acetat
amp	Ampicillin
ampR	Ampicillinresistenz
AMV	Aviäres Myoblasto Virus
AP	Alkalische Phosphatase
APM	Antigenprozessierungsmaschinerie
APS	Ammoniumpersulfat
APZ	antigenpräsentierende Zelle
<i>Aqua bidest.</i>	redestilliertes Wasser
AS	Aminosäure(n)
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
Bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin/Rinderserumalbumin
CD	„cluster of differentiation“
cDNS	kopierte (copy) DNS
cfu	„colony forming units“
CMV	Cytomegalievirus
cpm	Impulse pro Minute
CTLA-4	„cytotoxic T-lymphocyte antigen-4“
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTH	„delayed type hypersensitivity“
dNTP	Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DZ	dendritische Zelle
EBV	Epstein Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FKS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	„forward scatter“ Vorwärtsstreulicht
GM-CSF	Granulozyten-Monocyten „colony stimulation factor“
gp	Glykoprotein
GVHD	„graft versus host disease“
Gy	Gray
HLA	„human leucocyte antigen“
HPV	Humanes Papillom-Virus
HSP	Hitzeschockprotein
ICAM	„intercellular adhesion molecule“
ICOS	„inducible costimulator“
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G

IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
Ires	„internal ribosome entry site“
IU	Internationale Einheit der Enzymaktivität
kB	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LE	Leiden, Niederlande
LFA	Leukozytenfunktionsantigen
LMP2, -7	„low molecular weight proteins“-2, -7
mA	Milliampère
μ F	Mikrofarad
mAk	monoklonaler Antikörper
MFI	mittlere logarithmische Fluoreszenzintensität
min	Minute
MHC	„major histocompatibility complex“, Haupthistokompatibilitätskomplex
μ l	Mikroliter
μ M	mikromolar
μ mol	Mikromol
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmol	Millimol
MOPS	3-[N-Morpholin]-propansulfonsäure-N´-[2-ethansulfonsäure]
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MZ	Mainz
NBT	4-Nitro Blau-Tetrazoliumchlorid
NEA	nicht-essentielle Aminosäuren
neoR	Neomycinresistenz
ng	Nanogramm
NIH	National Institute of Health, USA
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
nm	Nanometer
NP 40	Nonidet P40
OD	Optische Dichte
p(A)-	Polyadenylierungssequenz
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS-Puffer	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“/Polymerase-Ketten-Reaktion
PD-1	„receptor for programmed cell death 1“
PE	Phycoerythrin
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol 3-Phosphat
PKC	Proteinkinase C

PLC	Phospholipase C
pmol	picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Oligonukleotid	Startermolekül der DNS-Synthese/Hybridisierungssonde
P/S	Penizillin/Streptomycin
PTEN	„phosphatase and tensin homologue“
RC	„renal cell carcinoma“
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
SCC	seitwärts Streulicht
sec	Sekunde
SDS	„sodium dodecyl sulfate“/Natriumdodecylsulfat
SOP	„standard operating procedure“
SV40	Simian Virus 40
TAE-	Tris-Acetat-EDTA-
TAP	Transporter assoziiert mit Antigenprozessierung
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TB-Medium	„terrific broth“-Medium
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit 0,1% Tween 20
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	„transforming growth factor“
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TZR	T-Zell-Rezeptor
ü/N	über Nacht
Ub	Ubiquitin
Unit	spezifische Einheit der Enzymaktivität
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
VEGF	„vascular endothelial growth factor“
Wt	Wildtyp
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranoside
Y	Tyrosin
ZAP	CD3- ζ -assoziiertes Protein
ZTL	zytotoxische T-Zelle

10. Anhang

10.1 TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinoms

Größe des Primärtumors

T	Primärtumor
Tx	Primärtumor kann nicht bestimmt werden
T0	Kein Hinweis auf einen Primärtumor
T1a	Tumor auf die Niere begrenzt und kleiner als 4 cm
T1b	Tumor auf die Niere begrenzt, größer als 4 cm und kleiner als 7 cm
T2	Tumor auf die Niere begrenzt und größer als 7 cm
T3a	Tumorinfiltration in die Nebenniere und/oder das perirenale Fettgewebe
T3b	Tumorinfiltration in die Vena cava oder eine Hilusvene unterhalb des Zwerchfells
T3c	Tumor infiltriert in die Vena cava bis oberhalb des Zwerchfells
T4	Tumor infiltriert durch die Gerota-Faszie

Lymphknotenbefall

N	Regionäre Lymphknoten
Nx	Lymphknotenstatus unbekannt
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in einem regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten

Fernmetastasen

M	Fernmetastase
Mx	unbekannter Status von möglichen Fernmetastasen
M0	keine Fernmetastasen zum Zeitpunkt der OP
M1	Fernmetastasen vorhanden

Grading

Gx	Differenzierungsgrad unbekannt
G0	Nierenadenom
G1	gut differenziertes Nierenzellkarzinom
G2	mäßig differenziertes Nierenzellkarzinom
G3	schlecht differenziertes Nierenzellkarzinom
G4	undifferenziertes/anaplastisches Nierenzellkarzinom

Functional Role of Human Leukocyte Antigen-G Up-Regulation in Renal Cell Carcinoma¹

Jürgen Bukur, Vera Rebmann, Hans Grosse-Wilde, Hans Luboldt, Herbert Ruebben, Ingo Drexler, Gerd Sutter, Christoph Huber, and Barbara Seliger²

Third Department of Internal Medicine, Johannes Gutenberg University, 55101 Mainz [J. B., C. H., B. S.]; Institute of Immunology, University Hospital of Essen, 43147 Essen [V. R., H. G.-W.]; Department of Urology, University Hospital of Essen, 43147 Essen [H. L., H. R.]; Technical University, Institute of Virology, 81675 Munich [I. D.]; and Gesellschaft für Strahlenschutz-forschung Research Center, Institute of Molecular Virology, 81675 Munich [G. S.], Germany

ABSTRACT

The nonclassical HLA-G molecule exhibits a limited tissue distribution and exerts multiple immune regulatory functions. Recent studies indicate that HLA-G expression plays a key role in the induction of immune tolerance and may represent a novel immune escape mechanism of tumor cells. Despite a high frequency of tumor-infiltrating T lymphocytes in renal cell carcinoma (RCC) lesions, outgrowth of tumor cells occurs that might be attributable to abrogation-efficient antitumor responses. To delineate the potential role of HLA-G in RCC immunology, the HLA-G expression pattern and its functional consequences on immune responses were analyzed in cell lines and lesions derived from primary RCC lesions. A heterogeneous constitutive and IFN- γ -inducible HLA-G mRNA and protein expression was found in 12.5% of RCC cell lines but not in autologous normal kidney cells. Western blot analysis of 37 primary RCC lesions revealed HLA-G protein expression in 27% of RCC lesions. Functional studies performed with alloreactive natural and lymphokine-activated killer cells as well as antigen-specific CD8⁺ T-cell populations demonstrated that HLA-G expression inhibits lysis of RCC cells by these different immune effector cells, whereas HLA-G⁻ normal kidney cells were recognized. Furthermore, the HLA-G-mediated counteraction of immune response could be restored by antibody blocking experiments. Thus, aberrant HLA-G expression is found at a relatively high frequency in RCC and might participate in evasion of these tumor cells from immunosurveillance.

INTRODUCTION

HLA class I abnormalities, which are often attributable to defects in the MHC class I antigen processing pathway, have a decisive influence on the metastatic capacity of tumors and the host immunosurveillance, thereby resulting in resistance of tumor cells to CTL-mediated lysis and susceptibility to NK³ cell-mediated killing (1). Up-regulation of the nonclassical HLA class I molecule HLA-G can also modulate immune responses by protecting HLA class I-deficient targets from NK cell-mediated lysis. In contrast to the classical HLA class I antigens, HLA-G is characterized by a limited polymorphism and a tissue-restricted, selective expression, mainly at the materno-fetal interface and the thymus. A major feature of HLA-G is the alternative splicing of its primary transcript creating at least seven different isoforms, four membrane-bound (HLA-G1 to HLA-G4), and three soluble proteins (sHLA-G: HLA-G5, HLA-G6, and HLA-G7; Refs. 2, 3).

Data regarding HLA-G expression in tumors are highly conflicting.

Although an up-regulation of HLA-G expression has been reported in different solid tumors, controversial information exists about its clinical and functional relevance (4–6). The frequency of HLA-G expression significantly varied between the different tumor types analyzed but also between the same tumor entity depending on the study (4–9). HLA-G mRNA and/or protein expression was demonstrated in T- and B-cell lymphomas, in lung carcinoma, sarcoma, bladder cancer, glioblastoma, breast carcinoma, colorectal cancer, melanoma, as well as RCC (4, 10–13), but the number of tumors analyzed is still limited.

Experimental evidence of HLA-G-mediated suppression of T-cell and NK cell responses was obtained from *in vitro* studies (4, 14). HLA-G expression on tumor cells in association with their ability to interact with the immunoglobulin-like KIRs of NK and T cells suggest that HLA-G molecules protect tumor cells from its host immune attack. To additionally evaluate the frequency and biological relevance of HLA-G expression in tumors, both the constitutive and/or IFN- γ -regulated expression was monitored in cell lines and tissue samples derived from RCC lesions and autologous normal kidney epithelium. In addition, the role of HLA-G expression in the control of immune responses directed against RCC was investigated. Our data propose that HLA-G expression in RCC cells negatively interferes with the host immune response by inhibiting CTL and LAK and NK cell function.

MATERIALS AND METHODS

Cell Lines and IFN- γ Treatment. The cell line MZ2733RC and the autologous normal kidney cell line MZ2733NN were recently established from a patient with metastatic RCC (J. B. and B. S., personal communication). The other RCC cell lines used in this study have been described elsewhere and were kindly provided by Peter I. Schrier (University of Leiden, Leiden, the Netherlands) and Alexander Knuth (Nordwest Krankenhaus, Frankfurt, Germany; Ref. 15). The HLA-G⁺ human choriocarcinoma cell line JEG3, the HLA-A2⁻, HLA-G⁻ normal kidney cell line MZ2789NN (J. B. and B. S., personal communication), and the HLA class I⁻, LAK cell-sensitive erythroleukemic cell line K562, served as controls in functional assays. The HLA-A2-restricted tyr-specific CTL and the HLA-A2⁺, tyr-expressing NA8 melanoma cells have been described elsewhere (16). All cell lines were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS and 2 mM glutamine, penicillin, and streptomycin. IFN- γ treatment was performed for 48 h using 20 ng/ml recombinant human IFN- γ (Thomae, Biberach, Germany) as described recently (15).

Tumor Specimen and Patients' Characteristics. Tissue specimens from tumor and autologous adjacent normal kidney tissue were obtained from 37 patients who had undergone radical nephrectomy. All tumor specimens were classified as clear cell adenocarcinoma. Stage of disease, tumor invasion, and lymph node involvement according to the tumor-node-metastasis classification system, as well as patients' age and sex are summarized in Table 1.

mAbs and Flow Cytometry. The following mAbs were used: the mAb w6/32 recognizing a monomorphic epitope of HLA class I in association with β_2 -microglobulin (17); the anti-HLA-A2 mAbs mA2.1 and BB7.2 (16); the anti-HLA-G-specific mAbs MEM-G/9 (IgG1) and MEM-G/1 (IgG1) both purchased from Exbio (Prag, Czech Republic; Refs. 18, 19); and the isotypic murine control antibodies IgG1, IgG2a, and the FITC-conjugated goat-anti-mouse immunoglobulin as secondary antibody, all purchased from Beckman

Received 9/3/02; accepted 5/13/03.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This publication is part of the Ph.D. thesis of J. B. and partially supported by Sonderforschungsbereich 432, project A5 and the Stiftung Innovation Rheinland-Pfalz.

² To whom requests for reprints should be addressed, at Johannes Gutenberg-University, Third Department of Internal Medicine, Langenbeckstr. 1, 55101 Mainz, Germany. Phone: 06131-17-6760; Fax: 06131-17-5635; E-mail: B.Seliger@3-med.klinik.uni-mainz.de.

³ The abbreviations used are: NK, natural killer; HC, heavy chain; KIR, killer-inhibitory receptor; LAK, lymphokine-activated killer; mAb, monoclonal antibody; MVA, modified vaccinia virus Ankara; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; RCC, renal cell carcinoma; sHLA, soluble HLA; tyr, tyrosinase.

Table 1 Characteristics of patients and RCC lesions

ID no.	Age (yr)	Sex	Tumor staging			HLA-G expression		
			T	N	M	Grading	Normal	Tumor
1	70	M	2	0	0	I	-	-
2	62	M	2	0	0	I	-	+
3	51	M	1	0	0	n.a.	n.a.	-
4	44	M	2	0	0	II	n.a.	-
5	71	M	2	0	0	I	-	-
6	59	F	3	0	0	III	-	-
7	43	F	2	0	0	II	-	-
8	66	F	3	0	1	II	-	-
9	40	M	3	0	x	II	n.a.	+
10	73	F	2	0	0	I	-	+
11	71	M	3	0	0	I-II	-	-
12	58	M	4	2	x	III	n.a.	-
13	58	M	4	2	x	III	-	+
14	40	M	3	0	0	I-II	-	+
15	59	M	2	0	0	III	-	-
16	74	M	3b	0	0	II	n.a.	-
17	54	M	2	0	0	III	n.a.	-
18	71	F	1	0	0	III	n.a.	-
19	73	M	2	0	0	III	n.a.	+
20	64	F	2	0	0	III	n.a.	+
21	40	M	2	0	0I	n.a.	n.a.	-
22	77	F	3	0	0	III	-	-
23	62	F	1	0	0	n.a.	-	-
24	67	F	3a	0	0	II	n.a.	+
25	67	M	2	0	0	n.a.	n.a.	-
26	73	M	2	0	0	III	-	-
27	72	F	2	0	0	III	-	+
28	64	M	2	0	0	II	-	-
29	68	M	1	0	0	I	-	-
30	46	F	1	0	0	I	-	-
31	49	M	2	0	0	n.a.	n.a.	+
32	56	F	3	0	0	III	-	-
33	55	M	2	0	0	II	-	-
34	56	M	2	0	0	I	-	-
35	53	M	2	0	0	I	-	-
36	69	M	2	0	0	II	-	-
37	52	M	2	X	0	I	-	-

^a Thirty-seven randomly selected lesions of RCC patients were analyzed for HLA-G protein expression by immunoprecipitation, SDS-PAGE, and Western blotting using the HLA-G-specific mAbs MEM/G9 and MEM/G1 as immunoprecipitation or MEM/G1 as detection antibodies after Western blotting. n.a., not available; -, no HLA-G expression detectable; +, HLA-G expression detectable.

Coulter (Krefeld, Germany). The alkaline phosphatase-labeled goat antimouse IgG antibody was obtained from Dianova (Hamburg, Germany).

For flow cytometry, cells were incubated with the respective primary mAbs or isotype-matched control antibody for 30 min on ice followed by an additional 30-min incubation with the secondary antibody. After washing in PBS/1% heat-inactivated FCS, cells were analyzed on a flow cytometer (Coulter Epics XL MCL; Beckman Coulter).

Reverse Transcriptase-PCR Analysis and Southern Blotting. HLA-G-specific amplifications were performed as described by Real *et al.* (6) with minor modifications using the HLA-G-specific primer pairs that coamplify the HLA-G isoforms HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3, HLA-G4, HLA-G5, and HLA-G6: G.257 (sense: 5'-GGAAGAGGAGACACGGAACA-3') and G.1225 (antisense: 5'-TGAGACAGAGACGGAGACAT-3') and the β -actin-specific primers (sense: 5'-GAAGCATTGCGGTGGACGAT-3'; antisense: 5'-TCCTGTGGCATCCACGAAACT-3'). Amplification products were size fractionated on 1% ethidium bromide containing agarose gels. Gels were blotted onto nitrocellulose membranes (Roche Diagnostics), which were hybridized with a biotin-labeled exon 5-specific HLA-G oligonucleotide and additionally processed as described recently (6).

Immunoprecipitation, SDS-PAGE, and Western Blotting. Ten μ g of mAb MEM-G/9 were conjugated to a 1-ml suspension of 1×10^8 immunomagnetic beads (Dynabeads M280; Dynal, Hamburg, Germany) by an overnight incubation at 4°C. After intensive washings, the MEM-G/9-precoated immunobeads were filled up to 1 ml and stored until usage. SDS-PAGE and Western blotting were performed as described previously (20). The precipitation of HLA-G and sHLA-G molecules was performed either with 1-ml cell lysate of 5×10^6 cells or 1-ml cell lysate obtained from 60- μ g tissue sample (21) or 6 ml of spent medium from the respective cell lines incubated overnight with 250 μ l of immunomagnetic beads precoated with the mAb MEM-G/9.

Upon elution, antigens were subjected to SDS-PAGE and subsequently analyzed by Western blotting using mAb MEM-G/1 for the detection of HLA-G and sHLA-G molecules, which were visualized by a chemiluminescent detection kit (Perbio Science, Bonn, Germany).

Generation of LAK Cells and NK Cells. LAK cells were generated from freshly isolated or thawed PBMCs obtained from buffy coats of HLA-A1- and HLA-A2-matched healthy donors. PBMCs were separated by Ficoll gradient (Pharmacia, Uppsala, Sweden), washed, resuspended in complete RPMI supplemented with 10% human AB serum, and 2 ml (1×10^6 cells/ml) were plated into 24-well tissue plates in presence of 6000 units/ml recombinant human interleukin-2 (Proleukin; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) and incubated for 3 days at 37°C, 5% CO₂.

NK cells were isolated from 3×10^7 PBMCs resuspended in 240 μ l of PBS supplemented with 0.5% BSA and 2 mM EDTA by negative selection with hapten-conjugated antibodies directed against CD3, CD14, CD19, CD36, and anti-IgE using an antihapten antibody coupled to microbeads as a secondary antibody according to the manufacturers protocol (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). NK cells were cultured overnight in RPMI 1640 supplemented with 15% FCS, 2 mM glutamine, 1 mM sodium-pyruvate, and $1 \times$ nonessential amino acids (Invitrogen, Krefeld, Germany) in the presence of 500 units/ml recombinant human interleukin-2 before NK cells were used for cytotoxicity experiments. The purity of isolated subpopulations used in the experiments was >90% as determined by flow cytometry.

Cytotoxicity Assays. Cytotoxicity assays were performed using 5×10^5 – 1×10^6 target cells labeled with 50–100 μ Ci ⁵¹sodium chromate for 1 h at 37°C, 5% CO₂. For blocking experiments, RCC and normal kidney epithelium cells were preincubated with the anti-HLA class I-specific mAb w6/32 or the corresponding anti-immunoglobulin isotype control. A total of 1×10^3 of ⁵¹Cr-labeled cells was incubated with the respective effectors at different E:T ratios for 4–6 h at 37°C. Specific lysis was calculated as [cpm (effector cells) – cpm (spontaneous)]/cpm (Triton X-100) – cpm (spontaneous)] \times 100%. The cytolytic activity of HLA-A2-restricted tyr-specific T cells was assessed on MVA-tyr-infected targets using the standard chromium release assay as described recently (22).

Statistics. All data are representative experiments performed at least twice. Differences between two groups were analyzed for significance by Wilcoxon's test for paired samples ($P < 0.05$).

RESULTS

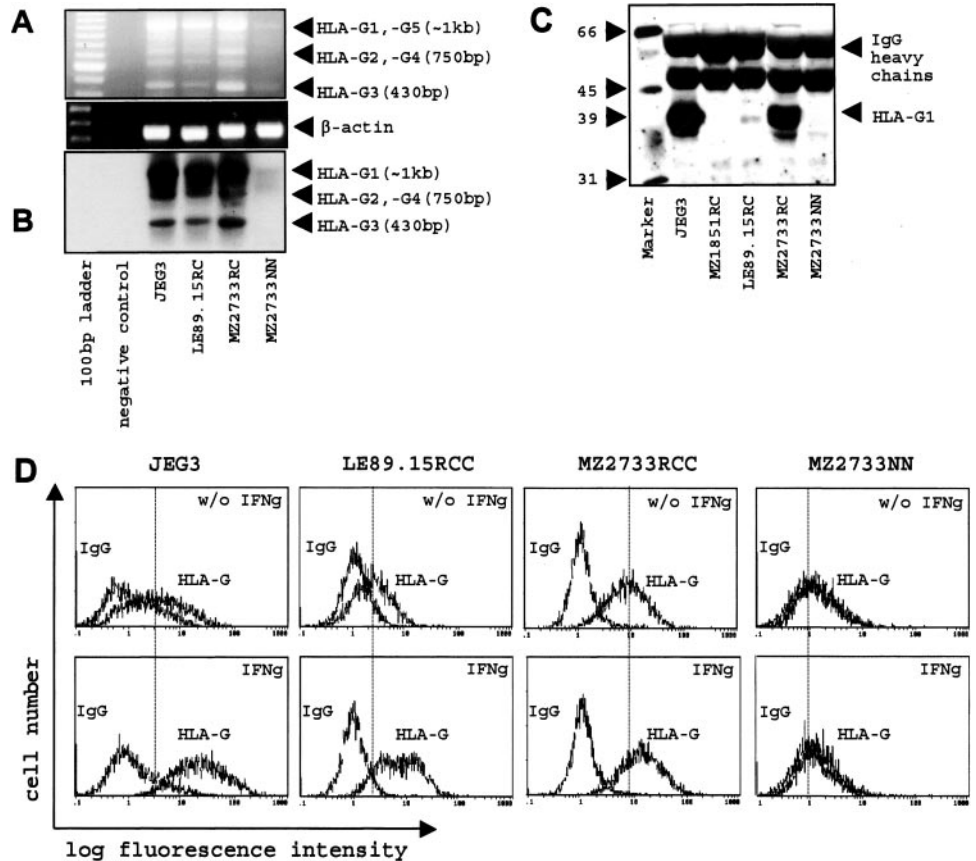
Expression of Multiple HLA-G mRNA Transcripts in RCC Cell

Lines. To address the biological significance of HLA-G expression in human RCC, HLA-G expression was studied in 24 RCC cell lines and 8 autologous normal kidney cells by reverse transcriptase-PCR analysis using pan-HLA-G-specific primers (6). The HLA-G⁺ choriocarcinoma cell line JEG3 served as control. In total, 12.5% of RCC cell lines demonstrated HLA-G-specific transcripts, whereas normal kidney cells lack HLA-G expression. As representatively shown in Fig. 1A, alternative splicing patterns of HLA-G were detected in the RCC cell lines MZ2733RC and LE89.15RC and JEG3 control cells but not in autologous kidney cells. However, the transcription level of the different HLA-G isoforms varied between the HLA-G⁺ RCC cell lines. The constitutive HLA-G transcription was additionally confirmed by Southern blot analysis using an exon 5-specific probe (Fig. 1B).

Constitutive and IFN- γ -inducible HLA-G Expression in RCC Cell Lines but not in Normal Kidney Cells.

To verify the translation of HLA-G transcripts into HLA-G protein, flow cytometric analyses were performed using the HLA-G-specific mAb MEM-G/9, as well as the anti-HLA class I mAb w6/32. All HLA-G mRNA-expressing RCC cell lines demonstrated a significant HLA-G surface expression. As representatively shown for the RCC cell lines LE89.15RC and MZ2733RC, the constitutive HLA-G surface expression was at least comparable with that of HLA-G⁺ JEG3 control cells, whereas the corresponding normal kidney cells MZ2733NN failed to express HLA-G protein (Fig. 1D). IFN- γ treatment caused on up-

Fig. 1. Detection of HLA-G-specific mRNA isoforms and proteins in different RCC cell lines. A-C, 100 ng of DNase I-digested total cellular RNA from different RCC cell lines and corresponding normal kidney cells were used for analysis of HLA-G and β -actin expression. HLA-G transcripts were detected in the positive control JEG3 as well as the RCC cell lines LE89.15RC and MZ2733RC but not detected in the normal kidney cells MZ2733NN. A, one percent TAE-agarose gels of size-separated HLA-G amplicons detecting HLA-G1 (980 bp), HLA-G2, HLA-G4 (750 bp), and HLA-G3 (430 bp) and β -actin amplicons. B, Southern blot confirming the specificity of HLA-G amplicons. C, detection of HLA-G1 molecules in RCC cell lines using the mAb MEM-G/9. A HLA-G1-specific protein pattern with a typical molecular size of M_r 39,000 was obtained from TX114 detergent lysate of the HLA-G-positive cell line JEG3 and RCC cell line LE89.15RC and MZ2733RC, but not by the autologous kidney cells MZ2733NN and the RCC cell line MZ1851RC. D, constitutive and IFN- γ -mediated HLA-G1 expression in RCC cell lines. The untreated and IFN- γ -treated RCC cell lines LE89.15RC and MZ2733RC, the normal kidney cell line MZ2733NN as well as the choriocarcinoma cell line JEG3 were subjected to flow cytometry as described in "Materials and Methods" using the anti-HLA-G1-specific mAb MEM-G/9 and the murine isotypic control antibody. Constitutive and IFN- γ -mediated HLA-G expression was detected in the cell lines JEG3, LE89.15RC, and MZ2733RC, but not in the normal kidney cells MZ2733NN.



regulation of HLA-G surface expression in HLA-G⁺ cell lines but not in HLA-G⁻ normal kidney cells. It is noteworthy that all RCC cell lines and normal kidney cells expressed high levels of the classical HLA class I antigens, which were additionally enhanced by IFN- γ stimulation (data not shown).

Detection of Membrane-anchored and Soluble HLA-G Molecules in RCC. To confirm the flow cytometric data, membrane-bound and soluble HLA-Gs were immunoprecipitated from cell lysate or culture supernatant of HLA-G⁺ RCC and HLA-G⁻ normal kidney cells using the mAb MEM-G/9 as capture and mAb MEM-G/1 as detection reagent. HLA-G⁺ JEG3 and HLA-G⁻ MZ1851RC cells served as positive and negative controls, respectively. Using the mAb MEM-G/9, HLA-G1 molecules with a molecular size of M_r 39,000 were immunoprecipitated from the HLA-G⁺ JEG3, MZ2733RC, and LE89.15RC cell lines, but not from MZ1851RC and the normal kidney cell line MZ2733NN (Fig. 1D). In addition, sHLA-G1 molecules with the typical molecular weight of M_r 35,000 were detected in the supernatants of the RCC cell lines MZ2733RC and LE89.15RC (data not shown).

HLA-G Protein Expression in RCC Lesions *in Vivo*. Western blot analysis was performed to determine HLA-G protein expression in a series of primary RCC lesions and autologous normal kidney tissues. Ten of 37 RCC samples expressed high levels of HLA-G protein, suggesting that HLA-G expression frequently occurs in RCC, whereas normal kidney cells lack HLA-G expression (Fig. 2). No correlation was found between HLA-G expression and clinical parameters such as tumor staging, grading, and age of the patients.

Effect of HLA-G Expression on Immune Response. To elucidate the functional relevance of constitutive HLA-G expression in RCC cells, different immune effector cells were used for cytotoxicity assays. For the determination of the CTL-mediated cytotoxicity, unin-

ected and MVA-tyr-infected HLA-A2⁺, HLA-G⁺ RCC cell line MZ2733RC and its autologous HLA-G⁻ normal kidney counterpart MZ2733NN were used as targets for HLA-A2-restricted, tyr-specific CTL. The HLA-A2⁺, HLA-G⁻ melanoma cell line NA8 and the HLA-A2⁻, HLA-G⁻ normal kidney cell line MZ2789NN served as controls. NA8 and HLA-A2⁺, MVA-tyr-infected MZ2733NN cells were efficiently recognized by the HLA-A2-restricted tyr-specific CTL, whereas all tyr⁻ cell lines as well as the HLA-A2⁻, MVA-tyr⁺ normal kidney cells MZ2789NN were not recognized. The relevance of constitutive HLA-G molecules for protection of RCC from CTL-specific lysis was demonstrated because the CTL-mediated lysis of MVA-tyr⁺ HLA-G⁺ MZ2733RC cells was significantly down-regulated when compared with the MVA-tyr-infected autologous

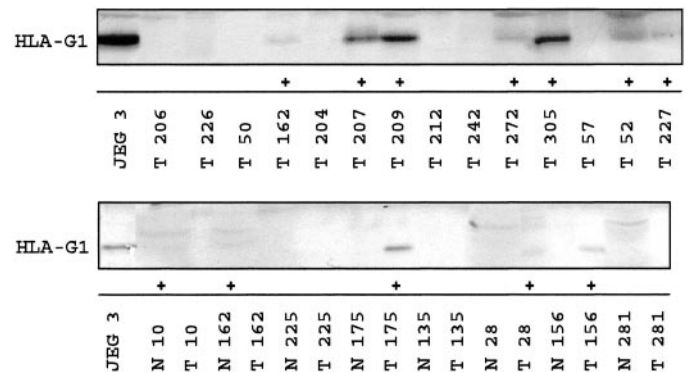


Fig. 2. Analysis of HLA-G1 protein expression in RCC lesions. Proteins from RCC lesions and corresponding normal kidney tissues were assessed by Western blot analysis as described in "Materials and Methods." The cell line JEG3 served as positive control. T and N indicate tumor lesion and autologous normal kidney specimen, respectively.

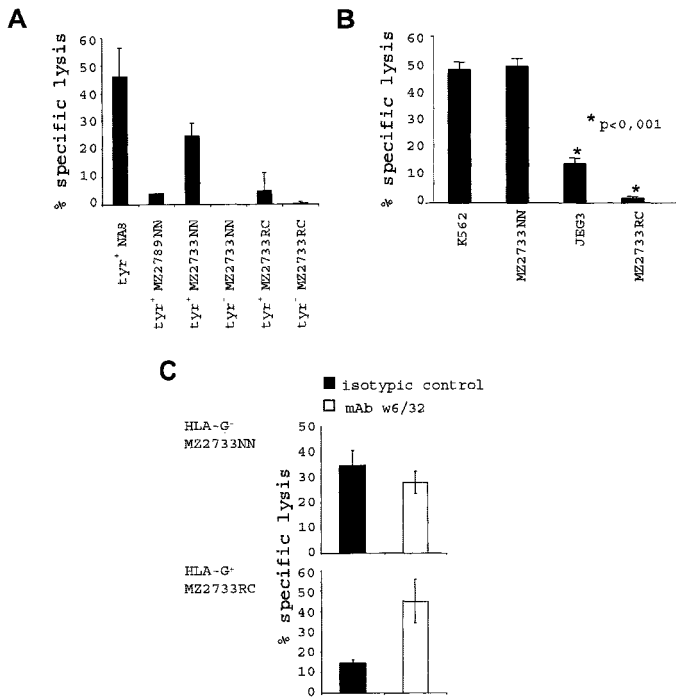


Fig. 3. Impaired CTL- and LAK-mediated cytotoxicity of HLA-G-expressing tumor cells. **A**, tyr-directed lysis of different cell lines after infection with recombinant modified MVA-tyr. Uninfected and MVA-tyr-infected cells were incubated with HLA-A2-restricted tyr-specific CTL at different E:T ratios (30:1, 10:1, 3:1, and 1:1). Three independent experiments were performed and the results are expressed as percentage of specific lysis \pm SD. Representative data using an E:T ratio of 30:1 are shown. The HLA-A2⁺, tyr⁺ NA8 melanoma cells served as positive, the MVA-tyr-infected HLA-A2⁻ MZ2789NN cells as negative control, respectively. Both NA8 cells (46 \pm SD10%) and the HLA-A2⁺ tyr⁺ MZ2733NN (24 \pm SD5%) but not the uninfected MZ2733NN (0%) and MZ2733RC (0%) cells were recognized by the HLA-A2-restricted, tyr-specific CTL. CTL-mediated lysis of HLA-A2⁺, tyr⁺ MZ2733RC (5 \pm SD7%) cells was strongly down-regulated. **B**, differential LAK cell-mediated recognition of normal kidney cells and RCC cells. The generation of LAK cells and the cytotoxicity assays were performed as described in "Materials and Methods." LAK cells from 10 HLA-A1, HLA-A2-matched healthy donors recognized the target cells at the indicated E:T ratio (30:1) in a chromium release assay. The K562 and MZ2733NN were LAK cell-sensitive, whereas the lysis of JEG3 as well as MZ2733RC cells was significantly reduced (Wilcoxon's test was performed; $P < 0.001$). The results are expressed as mean percentage lysis using 10 independent LAK cell populations. **C**, restoration of cytotoxicity by antibody blockade. Targets cells were preincubated with saturating amounts of w6/32 (□) or isotope control antibodies (■) for 30 min before LAK cells were added as effectors at an E:T ratio of 35:1, and the results are expressed as percentages of specific lysis \pm SD obtained in 6-h ⁵¹Cr release assays. Three independent experiments were performed, and the lysis of HLA-G⁻ MZ2733NN normal kidney cells (35 \pm SD6%) was reduced in presence of w6/32 (28 \pm SD4%), whereas the lysis of HLA-G⁺ MZ2733RC tumor cells (15 \pm SD2%) was 3-fold enhanced (45 \pm SD11%).

HLA-G⁻ kidney cells (Fig. 3A). The impaired susceptibility of MVA-tyr⁺ MZ2733RC cells was not attributable to reduced HLA-A2 surface antigen expression because both MZ2733NN and MZ2733RC cells expressed similar HLA-A2 surface levels (data not shown). In this context, it is noteworthy that all RCC cells and normal kidney cells express the same levels of HLA-E (data not shown). Thus, HLA-G expression appears to participate in the functional inhibitory effect on CTL-mediated lysis of the HLA-G⁺ RCC cell lines.

To investigate whether the HLA-G expression on RCC also affects LAK cell function, LAK cells generated from PBMCs of 10 healthy donors were used as effectors in cytotoxicity assays. JEG3 and K562 cells served as controls, respectively. All LAK cells efficiently recognize the HLA-G⁻ normal kidney cells MZ2733NN and K562 cells with lysis rates ranging between 40 and 55%. In contrast, the lysis of HLA-G⁺ JEG3 and MZ2733RC cells was significantly reduced ($P < 0.001$) with values ranging between 12 and 2%, respectively (Fig. 3B). Blocking experiments with the pan anti-HLA class I mAb w6/32, which reacts with HLA-G and the negative immune regulatory

molecule HLA-E, were performed to restore LAK activity. As shown in Fig. 3C, saturating amounts of mAb w6/32 enhanced LAK-specific killing of HLA-G⁺ RCC cells, but had no effect on the autologous kidney cells.

To additionally elucidate the effector populations inhibited by HLA-G expression of RCC cells, LAK and NK cells generated from the same healthy volunteers were used for cytotoxicity assays. As expected, HLA-G⁺ MZ2733RC cells were resistant to both LAK and NK cell-mediated lysis, whereas the HLA-G⁻ MZ2733NN and K562 control cells were not protected from lysis (data not shown). However, there exist quantitative differences between the level of protection using LAK and NK cells.

DISCUSSION

The aim of our study was to elucidate the biochemical and functional properties of HLA-G expression on RCC cells and its role as an immune escape mechanism of this tumor entity. Using reverse transcriptase-PCR analysis, the alternative splicing variants of HLA-G were detected in 12.5% of RCC cell lines analyzed but not in normal kidney cells. The corresponding membrane-bound HLA-G1 isoform could also be detected at the protein level (Figs. 1C and 2). The correlation between alternative transcript levels and protein expression in RCC cell lines argues against a posttranscriptional control of HLA-G expression in RCC, which has been demonstrated in other tumor lesions. In addition, HLA-G protein expression was detected in 27% of RCC lesions. Although the literature about HLA-G expression on tumors is conflicting (4), our data confirm and extend a previous report that provided the first evidence of HLA-G expression in RCC (10). However, the frequency of HLA-G expression between RCC cell lines and tumor lesions differed. The incidence of HLA-G expression is probably higher *in vivo* than in *in vitro* RCC cell cultures as it has been previously reported also for melanoma (8).

The hypothesis of HLA-G expression as a possible tumor immune escape mechanism was strengthened by recent data demonstrating that HLA-G surface expression in melanoma and glioblastoma cells exerts significant immune inhibitory function on different immune effector cells (4, 13, 23). Our data suggest for the first time that HLA-G-expressing RCC cell lines were less sensitive to CTL, LAK, and NK cell-mediated cytotoxicity than HLA-G⁻ normal kidney cells. However, evidence linking inhibition of cytotoxicity with HLA-G expression is still correlative. It can be speculated that the inhibition of LAK activity might result from interactions between HLA-G and the KIRs present on activated effector cells. These results are in line with experiments of Stanley *et al.* (24), demonstrating resistance of RCC to NK cell lysis via the CD94 receptor. It is generally accepted that the level of HLA class I surface antigens on tumors is inversely associated with their resistance to NK and/or LAK cell-mediated lysis. However, the differential recognition of the MZ2733 system by allogeneic, innate effector cells appears to be independent of the HLA class I expression level because both MZ2733RC and MZ2733NN cells express same amounts of HLA class I surface molecules, suggesting an immunoregulatory role of HLA-G coexpressed in presence of HLA class I antigens. An indirect up-regulation of other inhibitory molecules such as HLA-E can be excluded. This is based on the fact that HLA-E expression was found on RCC and normal kidney cells (data not shown). If HLA-E negatively interferes with the immune response an inhibitory effect would have been noticed in HLA-G⁻ cells (2, 4).

Because KIRs are also present on T lymphocytes, HLA-G molecules may also affect T-cell function, thereby enlarging their capacity to block both NK and T-cell responses (14). Indeed, a decreased CTL-mediated recognition of HLA-G⁺ MZ2733RC cells in comparison to its autologous HLA-G⁻ normal kidney cells was observed

using tyr as a surrogate antigen. Thus far, limited information exists about the role of sHLA-G in immune response, sHLA-G has recently been demonstrated to prevent T-cell- and NK cell-mediated cytotoxicity (25). However, one might speculate that the CTL and NK cell-based immune responses might be additionally impaired by sHLA-G released from RCC cells. *In vivo* HLA-G1 protein expression was demonstrated in ~27% of RCC specimens, which additionally corroborate the functional data obtained *in vitro* in RCC cell lines. HLA-G expression has been demonstrated in tumors of distinctive histology, but its overall relevance as an alternative principle of immune escape is still controversially discussed (4). This is further complicated by the limited availability of HLA-G-specific mAb, which could be routinely used for immunohistochemical staining of paraffin-embedded tissue sections (18, 19). In this context, it is noteworthy that the commercially available antibody BFL1 lack HLA-G-specific reactivity as demonstrated by the HLA-G workshop in 2000 (19).

Thus, HLA-G expression on RCC cells *in vitro* and *in vivo* can lead to impaired immune recognition by CTL, NK, and LAK cells and therefore might play a role in their escape from immunosurveillance. Future experiments aim to break the HLA-G-dependent tolerance of HLA-G⁺ RCC. This, together with the understanding of the underlying molecular mechanism of up-regulated HLA-G expression, may open new possibilities for the treatment of patients with RCC and have to be considered in the design of new innovative RCC-specific immunotherapies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Peter J. van den Elsen (Leiden, the Netherlands) and Dr. Rudolf Lichtenfels (Mainz, Germany) for helpful discussions, and Inge Schmidt for helping in the preparation of the manuscript.

REFERENCES

- Seliger, B., Maeurer, M. J., and Ferrone, S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol. Today*, *21*: 455–464, 2000.
- Carosella, E. D., Paul, P., Moreau, P., and Rouas-Freiss, N. HLA-G and HLA-E: fundamental and pathophysiological aspects. *Immunol. Today*, *21*: 532–534, 2000.
- Ishitani, A., and Geraghty, D. E. Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *89*: 3947–3951, 1992.
- Seliger, B., Abken, H., and Ferrone, S. HLA-G and MIC expression in tumors and their role in anti-tumor immunity. *Trends Immunol.*, *24*: 82–87, 2003.
- Davies, B., Hiby, S., Gardner, L., Loke, Y. W., and King, A. HLA-G expression by tumors. *Am. J. Reprod. Immunol.*, *45*: 103–107, 2001.
- Real, L. M., Cabrera, T., Collado, A., Jimenez, P., Garcia, A., Ruiz-Cabello, F., and Garrido, F. Expression of HLA G in human tumors is not a frequent event. *Int. J. Cancer*, *81*: 512–518, 1999.
- Paul, P., Cabestre, F. A., Le Gal, F. A., Khalil-Daher, I., Le Danff, C., Schmid, M., Mercier, S., Avril, M. F., Dausset, J., Guillet, J. G., and Carosella, E. D. Heterogeneity of HLA-G gene transcription and protein expression in malignant melanoma biopsies. *Cancer Res.*, *59*: 1954–1960, 1999.
- Paul, P., Rouas-Freiss, N., Khalil-Daher, I., Moreau, P., Riteau, B., Le Gal, F. A., Avril, M. F., Dausset, J., Guillet, J. G., and Carosella, E. D. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *95*: 4510–4515, 1998.
- Willers, J., Urošević, M., Laine, E., Geertsen, R., Kundig, T., Burg, G., and Dummer, R. Decreased intraindividual HLA class I expression is due to reduced transcription in advanced melanoma and does not correlate with HLA-G expression. *J. Invest. Dermatol.*, *117*: 1498–1504, 2001.
- Ibrahim, E. C., Guerra, N., Lacombe, M. J., Angevin, E., Chouaib, S., Carosella, E. D., Caignard, A., and Paul, P. Tumor-specific up-regulation of the nonclassical class I HLA-G antigen expression in renal carcinoma. *Cancer Res.*, *61*: 6838–6845, 2001.
- Lefebvre, S., Antoine, M., Uzan, S., McMaster, M., Dausset, J., Carosella, E. D., and Paul, P. Specific activation of the non-classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer. *J. Pathol.*, *196*: 266–274, 2002.
- Urošević, M., Kurrer, M. O., Kamarashev, J., Mueller, B., Weder, W., Burg, G., Stahel, R. A., Dummer, R., and Trojan, A. Human leukocyte antigen G up-regulation in lung cancer associates with high-grade histology, human leukocyte antigen class I loss and interleukin-10 production. *Am. J. Pathol.*, *159*: 817–824, 2001.
- Wiendl, H., Mitsdoerffer, M., Hofmeister, V., Wischhusen, J., Bornemann, A., Meyermann, R., Weiss, E. H., Melms, A., and Weller, M. A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J. Immunol.*, *168*: 4772–4780, 2002.
- Le Gal, F. A., Riteau, B., Sedlik, C., Khalil-Daher, I., Menier, C., Dausset, J., Guillet, J. G., Carosella, E. D., and Rouas-Freiss, N. HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int. Immunol.*, *11*: 1351–1356, 1999.
- Seliger, B., Hammers, S., Hohne, A., Zeidler, R., Knuth, A., Gerharz, C. D., and Huber, C. IFN- γ -mediated coordinated transcriptional regulation of the human *TAP-1* and *MLP-2* genes in human renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, *3*: 573–578, 1997.
- Wolfel, T., Van Pel, A., Brichard, V., Schneider, J., Seliger, B., Meyer zum Buschenfelde, K. H., and Boon, T. Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytotoxic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, *24*: 759–764, 1994.
- Brodsky, F. M., Parham, P., Barnstable, C. J., Crumpton, M. J., and Bodmer, W. F. Monoclonal antibodies for analysis of the HLA system. *Immunol. Rev.*, *47*: 3–61, 1979.
- Fournel, S., Huc, X., Aguerre-Girr, M., Solier, C., Legros, M., Praud-Brethou, C., Moussa, M., Chaouat, G., Berrebi, A., Bensussan, A., Lenfant, F., and Le Bouteiller, P. Comparative reactivity of different HLA-G monoclonal antibodies to soluble HLA-G molecules. *Tissue Antigens*, *55*: 510–518, 2000.
- Paul, P., Rouas-Freiss, N., Moreau, P., Cabestre, F. A., Menier, C., Khalil-Daher, I., Pangault, C., Onno, M., Fauchet, R., Martinez-Laso, J., Morales, P., Villena, A., A., Giacomini, P., Natali, P. G., Frumento, G., Ferrara, G. B., McMaster, M., Fisher, S., Schust, D., Ferrone, S., Dausset, J., Geraghty, D., and Carosella, E. D. HLA-G, -E, -F Preworkshop: tools and protocols for analysis of non-classical class I genes transcription and protein expression. *Hum. Immunol.*, *61*: 1177–1195, 2000.
- Kubens, B. S., Passler, M., and Grosse-Wilde, H. Segregation study of the soluble 39-kD HLA class I heavy chain. *Hum. Immunol.*, *40*: 247–252, 1994.
- Luboldt, H. J., Kubens, B. S., Rubben, H., and Grosse-Wilde, H. Selective loss of human leukocyte antigen class I allele expression in advanced renal cell carcinoma. *Cancer Res.*, *56*: 826–830, 1996.
- Drexler, I., Antunes, E., Schmitz, M., Wolfel, T., Huber, C., Erfle, V., Rieber, P., Theobald, M., and Sutter, G. Modified vaccinia virus Ankara for delivery of human tyrosinase as melanoma-associated antigen: induction of tyrosinase- and melanoma-specific human leukocyte antigen A*0201-restricted cytotoxic T cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.*, *59*: 4955–4963, 1999.
- Wagner, S. N., Reibmann, V., Willers, C. P., Grosse-Wilde, H., and Goos, M. Expression analysis of classic and non-classic HLA molecules before interferon α -2b treatment of melanoma. *Lancet*, *356*: 220–221, 2000.
- Stanley, A. J., Gough, M. J., Banks, R. E., Selby, P. J., and Patel, P. M. Renal carcinoma cell lines inhibit natural killer activity via the CD94 receptor molecule. *Cancer Immunol. Immunother.*, *50*: 260–268, 2001.
- Spaggiari, G. M., Contini, P., Carosio, R., Arvigo, M., Ghio, M., Oddone, D., Dondero, A., Zocchi, M. R., Puppo, F., Indiveri, F., and Poggi, A. Soluble HLA class I molecules induce natural killer cell apoptosis through the engagement of CD8: evidence for a negative regulation exerted by members of the inhibitory receptor superfamily. *Blood*, *99*: 1706–1714, 2002.