

**Identifizierung und Charakterisierung von Zielantigenen
alloreaktiver zytotoxischer T-Zellen
mittels cDNA-Bank-Expressionsklonierung
in akuten myeloischen Leukämien**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Sabine Domning

Mainz, 2012

Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Dekan:

1.Berichterstatter:

2.Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zusammenfassung

Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantationen (HSZTs) werden insbesondere zur Behandlung von Patienten mit Hochrisiko-Leukämien durchgeführt. Dabei bewirken T-Zellreaktionen gegen Minorhistokompatibilitätsantigene (mHAgs) sowohl den therapeutisch erwünschten *graft-versus-leukemia* (GvL)-Effekt als auch die schädigende *graft-versus-host* (GvH)-Erkrankung. Für die Identifizierung neuer mHAgs mittels des T-Zell-basierten cDNA-Expressionsscreenings waren leukämieaktive T-Zellpopulationen durch Stimulation naiver CD8⁺-T-Lymphozyten gesunder HLA-Klasse I-identischer *Buffly Coat*-Spender mit Leukämiezellen von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) generiert worden (Albrecht *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 60:235, 2011). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit diesen im AML-Modell des Patienten MZ529 das mHAg CYBA-72Y identifiziert. Es resultiert aus einem bekannten Einzelnukleotidpolymorphismus (rs4673: *CYBA-242T/C*) des Gens *CYBA* (kodierend für Cytochrom b₂₄₅ α-Polypeptid; syn.: p22phox), der zu einem Austausch von Tyrosin (Y) zu Histidin (H) an Aminosäureposition 72 führt. Das mHAg wurde von T-Lymphozyten sowohl in Assoziation mit HLA-B*15:01 als auch mit HLA-B*15:07 erkannt. Eine allogene T-Zellantwort gegen CYBA-72Y wurde in einem weiteren AML-Modell (MZ987) beobachtet, die ebenso wie in dem AML-Modell MZ529 polyklonal war. Insgesamt konnte bei drei von fünf getesteten HLA-B*15:01-positiven *Buffly Coat*-Spendern, die homozygot für CYBA-72H (H/H) waren, eine CYBA-72Y-spezifische T-Zellantwort generiert werden. Das von den T-Lymphozyten übereinstimmend in niedrigster Konzentration erkannte Peptid umfasste die Aminosäuren 69 - 77, wobei das homologe Peptid aus CYBA-72H auch in hohen Konzentrationen keine Reaktivität auslöste. Eine reziproke Immunogenität des mHAgs ist bislang nicht belegt. T-Lymphozyten gegen CYBA-72Y erkannten Leukämiezellen bei acht von zwölf HLA-B*15:01-positiven Patienten (FAB-Subtypen: M1, M2, M4, M5). Da das Gen *CYBA* für eine Komponente des mikrobiziden Oxidasesystems von phagozytierenden Zellen kodiert, ist es überwiegend in Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert. Von Leukozytensubtypen, aufgereinigt aus HLA-B*15:01-positiven *Buffly Coat*-Spendern mit *CYBA-242T*-Allel, wurden Monozyten und daraus abgeleitete dendritische Zellen durch CYBA-72Y-reaktive T-Lymphozyten sehr stark, untransformierte B-Zellen in weit geringerem Maße und Granulozyten sowie T-Lymphozyten nicht erkannt. Das für CYBA-72Y kodierende Allel *CYBA-242T* wurde bei 56% aller getesteten gesunden Spender und Malignompatienten (n=481) nachgewiesen. Unter Berücksichtigung der Häufigkeit des präsentierenden HLA-Allels ist davon auszugehen, dass etwa 4,5% der Kaukasier das mHAg CYBA-72Y zusammen mit HLA-B*15:01 tragen. Nach bisherigen Beobachtungen führt ein immunogener *CYBA-72Y-Mismatch* bei allogenen HSZTs nicht notwendigerweise zu einer schweren GvH-Erkrankung. Das hier beschriebene mHAg CYBA-72Y erscheint potenziell geeignet, im Rahmen einer allogenen HSZT die präferenzielle Elimination der Empfänger-Hämatopoese unter Einschluss von myeloischen Leukämiezellen zu bewirken. Jedoch sind weiterführende Untersuchungen erforderlich, um die therapeutische Relevanz des Antigens zu belegen.

Summary

In particular patients with high-risk leukemias (AMLs) are treated with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). As a result, donor-derived T-cell responses against minor histocompatibility antigens (mHAgs) can cause the desirable graft-versus-leukemia (GvL) effect, but also the graft-versus-host disease (GvHD) associated with significant morbidity. For the identification of new mHAgs via cDNA expression screening leukemia-reactive T-cell populations had been generated by stimulating naïve CD8⁺ T lymphocytes from healthy HLA class I-matched buffy coat donors with leukemia cells from patients with acute myeloid leukemia (AML) (Albrecht *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 60:235, 2011). Using such allogeneic leukemia-reactive T cells CYBA-72Y was identified within this thesis as a new mHAgs expressed on AML cells of patient MZ529. This mHAgs depends on a known single nucleotide polymorphism (rs4673: *CYBA-242T/C*) of the gene *CYBA* (encoding cytochrome b₂₄₅ α-polypeptide; syn.: p22phox) resulting in a tyrosine(Y)-to-histidine(H) exchange on amino acid position 72. CYBA-72Y was recognized by T lymphocytes in association with HLA-B*15:01 as well as HLA-B*15:07. An independent allogeneic T-cell response against CYBA-72Y was observed in the model system of AML patient MZ987. In both models these responses were polyclonal. In total, CYBA-72Y-reactive T lymphocytes were generated in three of five HLA-B*15:01 positive buffy coat donors, all of whom were homozygous for CYBA-72H (H/H). These T lymphocytes consistently recognized a nonameric peptide comprising amino acids 69 - 77 in lowest concentration. The homologous peptide derived from CYBA-72H did not induce reactivity even at very high concentrations. So far, no reciprocal immunogenicity has been found. CYBA-72Y-reactive T lymphocytes recognized leukemic blasts from eight out of twelve HLA-B*15:01 positive AML patients (FAB subtypes were M1, M2, M4, M5). *CYBA* encodes a component of the microbicidal oxidase system of phagocytic cells. Therefore, *CYBA* expression is preferentially confined to cells of hematopoietic origin. Among leukocyte subtypes derived from HLA-B*15:01 positive buffy coat donors carrying a *CYBA-242T* allele CYBA-72Y-specific T lymphocytes strongly recognized monocytes and monocyte-derived dendritic cells, weakly recognized untransformed B cells, but reacted neither with granulocytes nor with T cells. Genotyping revealed that 56% of tested healthy donors and patients with malignant diseases (n=481) carried at least one *CYBA-242T* allele. Taking into account the frequency of the presenting HLA allele, approximately 4,5% of Caucasians carry CYBA-72Y together with HLA-B*15:01. According to observations made so far, immunogenic CYBA-72Y mismatches do not necessarily induce severe GvHD after allogeneic HSCT. The mHAgs CYBA-72Y has the potential to induce after allogeneic HSCT a preferential elimination of recipient hematopoietic cells including myeloid leukemia cells. But further investigations are required to prove the antigen's therapeutic relevance.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Summary	ii
Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Maligne Erkrankungen.....	1
1.1.1 Bedeutung und Entwicklung von Malignomen.....	1
1.1.2 Klassifizierung und Bedeutung leukämischer Erkrankungen	2
1.1.3 Akute myeloische Leukämie (AML).....	3
1.1.3.1 Bedeutung und Entstehung	3
1.1.3.2 Klassifizierung und Prognostik.....	4
1.1.3.3 Therapiemöglichkeiten.....	5
1.2 Grundlagen der Antigenerkennung durch T-Lymphozyten	7
1.2.1 Antigenprozessierung und -präsentation über Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHCs).....	7
1.2.2 Antigen-spezifische Aktivierung von T-Lymphozyten über T-Zellrezeptoren (TZR).....	9
1.2.3 Eigenschaften von T-Lymphozyten mit unterschiedlichen Funktionen	10
1.3 Interaktionen des Immunsystems mit malignen Zellen	11
1.3.1 <i>Immunosurveillance</i> und <i>Immunescape</i>	11
1.3.2 Zielantigene von T-Lymphozyten.....	12
1.3.2.1 Leukämie-assoziierte Antigene (LAAs).....	12
1.3.2.2 Minorhistokompatibilitätsantigene (mHAGs)	13
1.4 Methoden zur Identifizierung von Antigenen	14
1.4.1 T-Zell-basierte cDNA-Expressionsklonierung.....	15
1.4.2 Genetische <i>linkage</i> -Analyse	16
1.4.3 Biochemisch-biophysikalische Analyse	16
1.4.4 Reverse Immunologie.....	17
1.5 Aufgabenstellung	19
2 Materialien & Methoden	20
2.1 Materialien	20
2.1.1 Laborgeräte.....	20
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	23
2.1.4 Zusätze	24
2.1.5 Lösungen, Puffer und Medien.....	25
2.1.6 Enzyme und ihre Reaktionszusätze	27
2.1.7 Antikörper.....	28

2.1.8 Molekulargewichtsmarker und Ladepuffer.....	29
2.1.9 Primer	29
2.1.10 Synthetische Peptide.....	31
2.1.11 Plasmide	31
2.1.12 Molekularbiologische Kits	32
2.1.13 <i>Escherichia coli</i> -Bakterienstämme	32
2.1.14 Eukaryotische Zellen	33
2.1.14.1 Zellmaterial von gesunden Spendern und Patienten	33
2.1.14.2 Eukaryotische Zelllinien	33
2.1.15 Software.....	34
2.2 Methoden.....	34
2.2.1 Zellbiologische Methoden	34
2.2.1.1 Kultur- und Arbeitsbedingungen.....	34
2.2.1.2 Kultivierung von Adhäsions- und Suspensionszellen.....	34
2.2.1.3 Isolation von Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation und magnetischer Separation	35
2.2.1.4 Generierung von FastDCs	35
2.2.1.5 Stimulation von allogenen miniMLLCs	36
2.2.1.6 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen	36
2.2.1.7 <i>In vitro</i> -Peptidstimulation	36
2.2.1.8 IFN- γ -ELISpot-Assay	37
2.2.1.9 ⁵¹ Chrom-Freisetzungs-Assay	37
2.2.1.10 Durchflusszytometrie (FACS).....	38
2.2.1.11 Peptid- <i>Shift</i> -Assay	38
2.2.1.12 Kultivierung von Antikörper-produzierenden Hybridomzellen und Antikörperaufreinigung	38
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	39
2.2.2.1 Photometrische Konzentrationsbestimmungen	39
2.2.2.2 Isolation genomischer DNA	39
2.2.2.3 Isolation von RNA.....	39
2.2.2.4 cDNA-Synthese.....	40
2.2.2.5 Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCRs)	40
2.2.2.6 Restriktionsverdau	41
2.2.2.7 Aufreinigung von Reaktionsprodukten.....	41
2.2.2.8 Gelelektrophorese von DNA und RNA	41
2.2.2.9 DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	42
2.2.2.10 Ligation von <i>Inserts</i> mit dem Expressionsplasmid pcDNA3.1/V5-His TOPO	42
2.2.2.11 Transformation und Kryokonservierung von <i>E. coli</i> TOP10.....	42
2.2.2.12 Isolation von Plasmiden (Miniprep, Maxiprep)	43
2.2.2.13 Sequenzierung	43
2.2.2.14 Phenol-Chloroform-Extraktion.....	43
2.2.2.15 Generierung von polyadenylierter IVT-RNA	44

2.2.2.16 Konstruktion einer cDNA-Bank aus EBV-transformierten B-Zellen des AML-Patienten MZ529	44
2.2.2.17 Klonierung und Transfer von T-Zellrezeptorketten.....	47
3 Ergebnisse	49
3.1 Restimulation und HLA-Restriktion der miniMLLC 2E8 des Modells MZ529-AML/ <i>Buffy Coat</i> 730	49
3.2 Konstruktion der cDNA-Bank des AML-Patienten MZ529 aus EBV-B-Zellen	51
3.3 Expressionscreening der cDNA-Bank aus EBV-B-Zellen des AML-Patienten MZ529 mit der miniMLLC 2E8	52
3.4 Epitopidentifizierung durch Fragmentierung des <i>CYBA</i> -kodierenden Klon #428.67.4 der cDNA-Bank von AML-Patient MZ529.....	54
3.5 Erkennung des Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) <i>CYBA-242T/C</i> (rs4673) durch die miniMLLC 2E8	56
3.6 Erkennung synthetischer <i>CYBA</i> -Peptide durch die miniMLLC 2E8.....	57
3.7 Identifizierung des Antigens der miniMLLCs 4D3, 7G9 und 7H1 aus dem Modell MZ529-AML/ <i>Buffy Coat</i> 730	58
3.8 Identifizierung des Antigens der miniMLLCs 2B8 und 2D10 aus dem Modell MZ987-AML/ <i>Buffy Coat</i> 940	62
3.9 Präsentation von <i>CYBA-72Y</i> über verschiedene HLA-B15-Allele	64
3.10 Untersuchung der Frequenzverteilung der <i>CYBA-242</i> -Genotypen.....	65
3.11 Erkennung von nicht-malignen Zellen der Hämatopoese durch <i>CYBA-72Y</i> -spezifische T-Lymphozyten	69
3.12 Erkennung HLA-B*15:01-positiver Malignome durch <i>CYBA-72Y</i> -spezifische T-Lymphozyten.....	71
3.13 Identifizierung <i>CYBA-72Y</i> -reaktiver T-Lymphozyten in HLA-B*15:01-positiven Patienten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation und in HLA-B*15:01-positiven <i>Buffy Coat</i> -Spendern.....	73
3.14 Untersuchung einer HLA-A2-abhängigen Präsentation des <i>CYBA</i> -Antigens.....	74
3.15 Charakterisierung der T-Zellrezeptoren von den <i>CYBA-72Y</i> -spezifischen miniMLLCs 2E8, 4D3, 7G9 und 7H1 (<i>Buffy Coat</i> 730) sowie 2B8 und 2D10 (<i>Buffy Coat</i> 940).....	77
4 Diskussion.....	82
4.1 Wissensstand zu dem Cytochrom b ₂₄₅ α-Polypeptid (<i>CYBA</i> , p22phox).....	82
4.2 Der Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) <i>CYBA-242T/C</i> (rs4673) generiert das mHAg <i>CYBA-72Y</i>	83
4.2.1 Wissensstand zu dem SNP <i>CYBA-242T/C</i> (rs4673)	83
4.2.2 Häufigkeitsverteilung der Allele <i>CYBA-242T</i> und <i>CYBA-242C</i>	84
4.3 HLA-Assoziation des mHAg <i>CYBA-72Y</i>	85
4.4 Charakterisierung <i>CYBA-72Y</i> -spezifischer miniMLLCs	87
4.4.1 Klonalität <i>CYBA-72Y</i> -reaktiver miniMLLCs.....	87
4.4.2 Peptidspezifität der miniMLLCs gegen <i>CYBA-72Y</i>	88
4.5 Charakterisierung der T-Zellrezeptoren <i>CYBA-72Y</i> -spezifischer miniMLLCs.....	89
4.5.1 Polyklonalität der <i>CYBA-72Y</i> -spezifischen T-Zellantwort bei den <i>Buffy Coat</i> -Spendern 730 und 940	89

4.5.2 <i>In vitro</i> -Transfer CYBA-72Y-spezifischer T-Zellrezeptorketten.....	91
4.6 Potenzielle Bedeutung des mHAg CYBA-72Y für die Auslösung einer GvHD sowie von GvL- und GvT-Effekten.....	93
4.6.1 Häufigkeit des immunogenen CYBA-72Y- <i>Mismatch</i> bei allogenen Stammzelltransplantationen	93
4.6.2 CYBA-72Y-spezifische Erkennung von nicht-malignen Zellen der Hämatopoese	93
4.6.3 <i>Graft-versus-host disease</i> (GvHD) bei CYBA-72- <i>Mismatch</i> -transplantierten HLA-B*15:01-positiven Leukämiepatienten.....	95
4.6.4 CYBA-72Y-vermittelte Erkennung HLA-B*15:01-positiver Leukämiezellen	97
4.6.5 CYBA-72Y-vermittelte Erkennung HLA-B*15:01-positiver solider Malignome	97
4.7 Weiterführende Untersuchungen zur <i>In vivo</i> -Relevanz des immunogenen CYBA-72Y- <i>Mismatch</i>	99
4.7.1 Tiermodelle	99
4.7.2 Korrelation des immunogenen CYBA-72Y- <i>Mismatch</i> mit klinischen Beobachtungen	100
5 Anhang	103
5.1 Schema zur Konstruktion der cDNA-Bank des AML-Patienten MZ529 aus EBV-transformierten B-Zellen	103
5.2 Sequenzvergleich des Klons #428.67.4 aus der cDNA-Bank von AML-Patient MZ529 mit CYBA	104
5.3 Fragmente des MZ529-cDNA-Bank-Klons #428.67.4.....	106
5.4 Sequenzvergleich von dem MZ529-cDNA-Bank-Klon #428.67.4 mit der CYBA-kodierenden cDNA von der miniMLLC 2E8 aus <i>Buffy Coat</i> 730 und EBV-transformierten B-Zellen des AML-Patienten MZ529.....	107
5.5 Sequenzvergleich von HLA-B15-Allelen und HLA-A*02:01.....	109
5.6 Bestimmung von CYBA-242-Genotypen durch Sequenzierung und Schmelzkurvenanalyse..	111
5.7 Verteilung von CYBA-242-Genotypen und -Allelfrequenzen bei Patienten mit unterschiedlichen malignen Erkrankungen	112
5.8 Vorhersagen zur Bindung der identifizierten CYBA-Peptide an unterschiedliche HLA-Moleküle mittels Peptid-HLA-Bindungsalgorithmen.....	113
5.9 Vorhersagen zur Bindung von unterschiedlichen CYBA-Peptiden mit der polymorphen 72.Aminosäure an HLA-Moleküle mittels Peptid-HLA-Bindungsalgorithmen.....	115
Literaturverzeichnis	117
Eidesstattliche Erklärung	134
Danksagung	135
Lebenslauf.....	136

Abbildungsverzeichnis

1 Einleitung	1
Abb.1.1: Charakterisierung prognostischer AML-Gruppen	5
Abb.1.2: Präsentation von exogenen und endogenen Antigenen	8
Abb.1.3: Abhängigkeit der Ausbildung des GvL-Effekts und der GvHD von dem Expressionsmuster von Minorhistokompatibilitätsantigenen	14
3 Ergebnisse	49
Abb.3.1: Erkennung von AML-Zellen und EBV-transformierten B-Zellen des Patienten MZ529 durch die miniMLLC 2E8 nach Kultivierung mit unterschiedlichen Stimulatorzellen	49
Abb.3.2: HLA-spezifische Blockade der Erkennung von MZ529-EBV-B-Zellen durch die miniMLLC 2E8	50
Abb.3.3: Erkennung HLA-transfizierter COS-7- und 293T-Zellen durch die miniMLLC 2E8	50
Abb.3.4: Restriktionsverdau von rekombinanten Plasmiden aus 15 Bakterienkolonien der cDNA-Bank des AML-Patienten MZ529	51
Abb.3.5: Expressionsscreening der cDNA-Bank aus EBV-B-Zellen des AML-Patienten MZ529 mit der miniMLLC 2E8	53
Abb.3.6: Eingrenzung der peptidkodierenden Region von cDNA-Bank-Klon #428.67.4	55
Abb.3.7: Eingrenzung der peptidkodierenden Region von cDNA-Bank-Klon #428.67.4 durch Fragmentierung von Exon 4	56
Abb.3.8: Erkennung von CYBA-72Y durch die miniMLLC 2E8	57
Abb.3.9: Erkennung der CYBA-Peptide durch die miniMLLC 2E8	58
Abb.3.10: HLA-Restriktion der miniMLLCs 2E8, 4D3, 7G9 und 7H1 aus <i>Buffy Coat</i> 730	59
Abb.3.11: Erkennung von CYBA-72Y durch die miniMLLCs 2E8, 4D3, 7G9 und 7H1 aus <i>Buffy Coat</i> 730	60
Abb.3.12: Erkennung titrierter CYBA-Peptide durch die miniMLLCs 2E8, 4D3, 7G9 und 7H1 aus <i>Buffy Coat</i> 730	61
Abb.3.13: HLA-Restriktion der miniMLLCs 2B8 und 2D10 aus <i>Buffy Coat</i> 940	62
Abb.3.14: Wechselseitige Kreuzreaktivität der miniMLLCs aus den Modellen MZ987-AML/ <i>Buffy Coat</i> 940 und MZ529-AML/ <i>Buffy Coat</i> 730	63
Abb.3.15: Erkennung von CYBA-72Y durch die miniMLLCs 2B8 und 2D10 aus <i>Buffy Coat</i> 940	63
Abb.3.16: Erkennung titrierter CYBA-Peptide durch die miniMLLCs 2B8 und 2D10 aus <i>Buffy Coat</i> 940	64
Abb.3.17: Präsentation von CYBA-72Y über verschiedene HLA-B15-Allele	65
Abb.3.18: CYBA-242-Typisierung der AML-Patienten MZ529 und MZ987 sowie der <i>Buffy Coat</i> -Spender 730 und 940	66
Abb.3.19: Bestimmung von CYBA-242-Genotypen mittels <i>RsaI</i> -Restriktionsverdau von PCR-Produkten	67
Abb.3.20: CYBA-242-Genotypverteilung	68
Abb.3.21: Erkennung von nicht-malignen Zellen der Hämatopoese HLA-B*15:01-positiver <i>Buffy Coat</i> -Spender durch die CYBA-72Y-spezifische miniMLLC 2E8	69

Abb.3.22: Erkennung von Monozyten und dendritischen Zellen HLA-B*15:01-positiver <i>Buffy Coat</i> -Spender durch die CYBA-72Y-spezifische miniMLLC 2E8.....	70
Abb.3.23: CYBA-72Y-spezifische Reaktivität der Minikultur #83 des <i>Buffy Coat</i> -Spenders BC153 nach <i>In vitro</i> -Peptidstimulation.....	74
Abb.3.24: Peptid- <i>Shift</i> -Assay mit HLA-A*02:01-positiven T2-Zellen und den Peptiden CYBA-72Y / H ₆₉₋₇₇ und CYBA-72Y / H ₆₈₋₇₇	75
Abb.3.25: Durchflusszytometrische Bestimmung der Klonalität CYBA-72Y-spezifischer miniMLLCs aus <i>Buffy Coat</i> 730 (2E8, 4D3, 7G9, 7H1) und <i>Buffy Coat</i> 940 (2B8, 2D10) mit Hilfe der V-Region ihrer TZR- β -Ketten.....	78
Abb.3.26: Transfer von T-Zellrezeptorketten der miniMLLC 2D10 aus <i>Buffy Coat</i> 940	80
5 Anhang	103
Abb.5.1: Schema zur Konstruktion der cDNA-Bank des AML-Patienten MZ529.....	104
Abb.5.2: Nukleotidsequenzen von dem cDNA-Bank-Klon #428.67.4 und CYBA im Vergleich.....	105
Abb.5.3: Schema der Fragmente des cDNA-Bank-Klons CYBA Exon 1-6 (bp1-588) #428.67.4 ..	106
Abb.5.4: Fragmente des 4.Exons von dem cDNA-Bank-Klon CYBA Exon 1-6 (bp1-588) #428.67.4	107
Abb.5.5: Vergleich der Aminosäuresequenz von klonierten CYBA-Transkripten des <i>Buffy Coat</i> -Spenders 730 mit der des MZ529-cDNA-Bank-Klons #428.67.4.....	108
Abb.5.6: Vergleich der Aminosäuresequenz von klonierten CYBA-Transkripten des AML-Patienten MZ529 mit der des MZ529-cDNA-Bank-Klons #428.67.4.....	109
Abb.5.7: Nukleotidsequenzen von HLA-B*15:01, -B*15:03, - B*15:04, -B*15:07 und -B*15:17 sowie HLA-A*02:01.....	111
Abb.5.8: CYBA-242-Genotypisierung von 293T- und COS-7-Zellen.....	112
Abb.5.9: Schmelzkurvenanalyse von CYBA-242 in genomischen DNA-Proben.....	112

Tabellenverzeichnis

1 Einleitung	1
Tabelle 1.1: FAB-Klassifizierung von AMLs	4
Tabelle 1.2: Übersicht über einige mittels cDNA-Expressionsklonierung identifizierter Minorhistokompatibilitätsantigene (mHAgs)	15
Tabelle 1.3: Übersicht über einige mittels genetischer <i>linkage</i> -Analyse identifizierter Minorhistokompatibilitätsantigene (mHAgs)	16
Tabelle 1.4: Übersicht über einige mittels biochemisch-biophysikalischer Analyse identifizierter Minorhistokompatibilitätsantigene (mHAgs)	17
Tabelle 1.5: Übersicht über einige mittels reverser Immunologie identifizierter Minorhistokompatibilitätsantigene (mHAgs)	18
3 Ergebnisse	49
Tabelle 3.1: Verteilung der <i>CYBA-242</i> -Genotypen und -Allelfrequenzen bei Gesunden und Malignompatienten.....	68
Tabelle 3.2: <i>CYBA-242</i> -Genotypisierung und Erkennung HLA-B*15:01-positiver Malignome durch die <i>CYBA-72Y</i> -spezifische miniMLLC 2E8.....	72
Tabelle 3.3: <i>CYBA-72Y</i> - bzw. <i>CYBA-72H</i> -Stimulations-Assays mit HLA-A2-positiven <i>Buffy Coats</i> 76	
Tabelle 3.4: β -Ketten der T-Zellrezeptoren der miniMLLCs 2E8, 4D3, 7G9 und 7H1 aus <i>Buffy Coat</i> 730 sowie der miniMLLCs 2B8 und 2D10 aus <i>Buffy Coat</i> 940	79
Tabelle 3.5: α -Ketten der T-Zellrezeptoren der miniMLLCs 2E8, 4D3, 7G9 und 7H1 aus <i>Buffy Coat</i> 730 sowie der miniMLLCs 2B8 und 2D10 aus <i>Buffy Coat</i> 940	79
5 Anhang	103
Tabelle 5.1: Verteilung der <i>CYBA-242</i> -Genotypen und -Allelfrequenzen bei Patienten mit unterschiedlichen malignen Erkrankungen	113
Tabelle 5.2: Peptid-HLA-Bindungswahrscheinlichkeiten für <i>CYBA-72Y</i> / H ₆₉₋₇₇ und <i>CYBA-72Y</i> / H ₆₈₋₇₇ an unterschiedliche HLA-Moleküle laut www.syfpeithi.de , www-bimas.cit.nih.gov bzw. www.cbs.dtu.dk	114
Tabelle 5.3: Peptid-HLA-Bindungswahrscheinlichkeiten für <i>CYBA</i> -Nonamere um Aminosäure 72 an unterschiedliche HLA-Moleküle laut www.syfpeithi.de , www-bimas.cit.nih.gov bzw. www.cbs.dtu.dk	115
Tabelle 5.4: Peptid-HLA-Bindungswahrscheinlichkeiten für <i>CYBA</i> -Decamere um Aminosäure 72 an unterschiedliche HLA-Moleküle laut www.syfpeithi.de , www-bimas.cit.nih.gov bzw. www.cbs.dtu.dk	116

Abkürzungsverzeichnis

Nachfolgend sind in dieser Arbeit häufig verwendete Abkürzungen und ihre Bedeutung aufgelistet. Gängige Abkürzungen sowie Maß- und Mengeneinheiten wurden nicht angegeben.

Abkürzung	Bedeutung
A.dest.	destilliertes Wasser (lateinisch: <i>aqua destillatum</i>)
ad	addieren
AEC	3-Amino-9-ethyl-carbazole
al.	andere (lateinisch: <i>alii</i>)
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APC	antigenpräsentierende Zelle (englisch: <i>antigen presenting cell</i>)
APL	akute Promyelozyten-Leukämie
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BC	(englisch) <i>buffy coat</i>
C	Cytosin
CD	(englisch) <i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (englisch: <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CDR	(englisch) <i>complementarity determining region</i>
CDS	Protein-kodierende Sequenz (englisch: <i>coding sequence</i>)
CLIP	(englisch) <i>class II invariant chain-associated peptide</i>
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
CMV	Zytomegalie-Virus (englisch: <i>cytomegalovirus</i>)
COS	(englisch) <i>CV-1 origin SV40</i>
CYBA	Cytochrom b ₂₄₅ α-Polypeptid
DC	dendritische Zelle (englisch: <i>dendritic cell</i>)
del	Deletion
DEPC	Diethyl-Pyrocbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ELISpot	(englisch) <i>enzyme-linked immunosorbent spot</i>
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAB	(englisch) <i>French-American-British</i>
FACS	(englisch) <i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum (englisch: <i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GM-CSF	(englisch) <i>granulocyte-monocyte colony-stimulating factor</i>
GvH	Transplantat-gegen-Wirt (englisch: <i>graft-versus-host</i>)
GvHD	Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (englisch: <i>graft-versus-host-disease</i>)
GvL	Transplantat-gegen-Leukämie (englisch: <i>graft-versus-leukemia</i>)
GvT	Transplantat-gegen-Tumor (englisch: <i>graft-versus-tumor</i>)
H	Histidin

HLA	humanes Leukozytenantigen (englisch: <i>human leukocyte antigen</i>)
HS	Humanserum
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
HVR	hypervariable Region
iDC	unreife dendritische Zelle (englisch: <i>immature dendritic cell</i>)
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
inv	Inversion
IVT	<i>In vitro</i> -Transkription
k.A.	keine Angabe
KE	Kultureinheit
LAA	leukämieassoziiertes Antigen
LCL	lymphoblastische Zelllinie (englisch: <i>lymphoblastoid cell line</i>)
M	Marker
mDC	reife dendritische Zelle (englisch: <i>mature dendritic cell</i>)
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
mHA γ	Minorhistokompatibilitätsantigen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (englisch: <i>major histocompatibility complex</i>)
MLLC	gemischte Lymphozyten-Leukämie-Kultur (englisch: <i>mixed lymphocyte leukemia culture</i>)
MPN	Myeloproliferative Neoplasie
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (englisch: <i>messenger ribonucleic acid</i>)
mut	Mutation
n	Anzahl (englisch: <i>number</i>)
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NCBI	(englisch) <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NOD/SCID	(englisch) <i>non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency</i>
NOX	NADPH-Oxidase
N-WASP	Neurales Wiskott-Aldrich Syndrom-Protein
PBMC	periphere mononukleäre Blutzelle (englisch: <i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
PBS	(englisch) <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (englisch: <i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure (englisch: <i>ribonucleic acid</i>)
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
ROS	reaktive Sauerstoffradikale (englisch: <i>reactive oxygen species</i>)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rs	(englisch) <i>reference single nucleotide polymorphism</i>
SB	starker Bindungspartner (englisch: <i>strong binder</i>)
siRNA	(englisch) <i>small interfering ribonucleic acid</i>
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (englisch: <i>single nucleotide polymorphism</i>)
syn.	synonym
SZT	Stammzelltransplantation
T	Thymin
t	Translokation
Tab.	Tabelle
TAP	(englisch) <i>transporter associated with antigen processing</i>
TE	Testeinheit
TGF	(englisch) <i>transforming growth factor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor

tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TZR	T-Zellrezeptor
V	Valin
WB	schwacher Bindungspartner (englisch: <i>weak binder</i>)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (englisch: <i>World Health Organization</i>)
Y	Tyrosin

1 Einleitung

Um eine Heilung leukämischer Erkrankungen zu erreichen, werden allogene hämatopoetische Stammzelltransplantationen durchgeführt (Bleakley & Riddell, 2011; Feng *et al.*, 2008). Die übertragenen Spenderlymphozyten können aufgrund der Erkennung von Antigenen auf den Patientenzellen sowohl den Transplantat-gegen-Leukämie (*graft-versus-leukemia*)-Effekt als auch die schädigende Transplantat-gegen-Wirt (*graft-versus-host*)-Erkrankung auslösen (Bleakley & Riddell, 2004; Falkenburg *et al.*, 2002). Die Kenntnis eines repräsentativen Spektrums von T-Zell-erkannten Antigenen und ihrer Charakteristika bilden die Grundlage für die Verbesserung der Stammzelltransplantation und Immuntherapie von Malignompatienten.

1.1 Maligne Erkrankungen

1.1.1 Bedeutung und Entwicklung von Malignomen

Maligne Erkrankungen sind eine der Haupttodesursachen. Aufgrund maligner Erkrankungen werden für das Jahr 2012 annähernd 1,3 Millionen Todesfälle innerhalb der Europäischen Union erwartet (Malvezzi *et al.*, 2012). Weltweit starben 2008 7,6 Millionen Menschen an Malignomen. Das entsprach etwa 13% aller Todesfälle (www.who.int). Von den über 100 Malignomarten unterschiedlichen Ursprungs sind am weitesten verbreitet Lungen-, Brust-, Magen-, Leber- und Kolorektalkarzinome sowie zunehmend Prostatakarzinome, Melanome und Non-Hodgkin-Lymphome (www.who.int; Byrne *et al.*, 1993). Dabei steigt das Erkrankungsrisiko mit zunehmendem Alter (Hanahan & Weinberg, 2000).

Die Umwandlung von normalen Zellen in maligne Zellen wird durch karzinogeninduzierte (z.B. ionisierende oder ultraviolette Strahlung, mutagene Substanzen, Infektionen) und spontane Fehlfunktionen von Tumorsuppressorgenen sowie Aktivierung von Onkogenen ausgelöst. Die Tumorgenese ist ein mehrstufiger Prozess, der durch die Ansammlung von Genmutationen vorangetrieben wird. Relevante Mutationen bringen den Zellen einen Wachstumsvorteil, in dem sie ihnen ermöglichen (1) sich selbst mit Wachstumssignalen zu versorgen, (2) die Unterdrückung ihres Wachstums zu verhindern, (3) ihren Zelltod zu vermeiden, (4) sich unbegrenzt zu replizieren aufgrund des Erhalts der Telomere, (5) die Angiogenese zu fördern sowie (6) sich durch Gewebeinvasion und Metastasierung mit Hilfe von Proteasen und der Verhinderung von Zell-Zell- bzw. Zell-extrazelluläre Matrix-Kontakten zu verbreiten (Hanahan & Weinberg, 2000). Daneben werden außerdem die Reprogrammierung des zellulären Energiestoffwechsels (z.B. zur anaeroben Glykolyse) und die Fähigkeit zur Immunevasion (z.B. verringerte Antigenpräsentation, Freisetzung immunsuppressiver Zytokine) als grundlegend für die Tumorgenese angesehen (Cavallo *et al.*, 2011; Hanahan & Weinberg, 2011). Die zur Mikroumgebung von Malignomen gehörenden Fibroblasten, Endothel- und Immunzellen können zusätzlich deren Entwicklung fördern (Hanahan & Weinberg, 2011 & 2000).

Bei der Behandlung von Malignomen werden konventionell chirurgische Eingriffe, Radio- und Chemotherapien durchgeführt. In moderneren Ansätzen wird die Signalübertragung und die Angiogenese der Malignome beeinflusst sowie immuntherapeutisch eingegriffen (Dayyani *et al.*, 2011; Higgins & Baselga, 2011; Dutreix *et al.*, 2010; Omay & Vogelbaum, 2009).

1.1.2 Klassifizierung und Bedeutung leukämischer Erkrankungen

Zu den Malignomen des hämatopoetischen Systems gehören die Leukämien. Deren Bezeichnung geht zurück auf Rudolf Virchow, der damit 1847 eine anomale hohe Anzahl von weißen Blutzellen, den Leukozyten, benannte. Leukämien sind bei Kindern die am häufigsten auftretenden malignen Erkrankungen (Kampen *et al.*, 2012). Schätzungen gehen davon aus, dass in der Europäischen Union von 100.000 Männer 4,25 und von 100.000 Frauen 2,56 aufgrund leukämischer Erkrankungen im Jahr 2012 sterben werden (Malvezzi *et al.*, 2012).

Von der WHO wurde eine Klassifizierung von hämatopoetischen Neoplasien anhand von morphologischen, immunphänotypischen, genetischen und klinischen Merkmalen eingeführt (Vardiman 2010; Yin *et al.*, 2010; Vardiman *et al.*, 2009). Demnach gehören zu den lymphatischen Neoplasien Erkrankungen, die durch die Veränderung von normalen B-, T- und NK-Zellen in verschiedenen Differenzierungsstadien entstehen. Myeloische Neoplasien werden in die folgenden fünf Gruppen unterteilt: (1) Myeloproliferative Neoplasien (MPNs), (2) myeloische und lymphatische Neoplasien mit Eosinophilie und Anomalien von *PDGFRA*, *PDGFRB* oder *FGFR1*, (3) Myelodysplastische / Myeloproliferative Neoplasien (MDS / MPNs), (4) Myelodysplastisches Syndrom (MDS) und (5) akute myeloische Leukämien (AMLs).

Die häufigste maligne hämatologische Erkrankung sind chronische lymphatische Leukämien (CLLs), die einen Verlauf von Monaten bis Jahren aufweisen. Sie gehören zu den lymphatischen Neoplasien und entstehen durch Transformation von reifen Lymphozyten. Etwa 30% aller Leukämien sind B-CLLs (Herdrich & Weinberger, 2010; Jacobs, 1998).

Chronische myeloische Leukämien (CMLs) umfassen etwa 15% der Leukämiefälle. Sie betreffen aufgrund der Transformation einer pluripotenten Stammzelle verschiedene hämatopoetische Zellreihen (Kalidas *et al.*, 2001; Russell, 1997). Die chronische Phase der CML kann wegen zusätzlicher Mutationen nach drei bis fünf Jahren in eine akute Blastenkrise übergehen, die als AML angesehen wird und durch einen schnellen Anstieg der Anzahl unreifer myeloischer Zellen gekennzeichnet ist. Bei über 90% der CML-Patienten ist in den leukämischen Blasten eine Translokation zwischen Chromosom 9 und 22 [t(9;22)(q34;q11)] nachweisbar, die zur Bildung des Fusionsprodukts BCR-ABL führt. Ist dieses Philadelphia-Chromosom vorhanden erfolgt die Einordnung der CML in die MPNs (Jaiswal *et al.*, 2003; Kalidas *et al.*, 2001). Bei dessen Abwesenheit werden sie als atypische CML den MDS / MPNs zugeordnet (Vardiman, 2010).

Akute Leukämien sind die häufigsten malignen Erkrankungen bei Kindern. Bei ihnen treten mehr akute lymphatische Leukämien (ALLs) als akute myeloische Leukämien auf (Shah & Agarwal, 2008; Basso *et al.*, 2007). Bei einer ALL werden durch die klonale Expansion einer transformierten lymphatischen Vorläuferzelle die Hämatopoese und normale Zellen verdrängt. Genetische Veränderungen wie t(12;21)/*ETV6-RUNX1* oder in den T-Zellrezeptorloci sind bei 80% der ALL-Patienten zu finden (Vardiman *et al.*, 2009; Basso *et al.*, 2007). Von den Kindern, die an einer ALL erkrankt sind, sind 75 - 80% heilbar (Shah & Agarwal, 2008).

Akute myeloische Leukämien umfassen etwa 70% der neu diagnostizierten akuten Leukämien. Sie betreffen vorrangig Erwachsene und haben meist ihren Ursprung in der malignen Transformation einer myeloischen Vorläuferzelle (Laubach & Rao, 2008; Giles *et al.*, 2002; Lichtman & Segel, 2005; Jacobs, 1998).

Für die Behandlung von Leukämien werden Chemo- und Bestrahlungstherapien sowie Stammzelltransplantationen und spezifische Immuntherapien (z.B. Tyrosinkinase-Inhibitoren) eingesetzt (Kater *et al.*, 2007; Chanan-Khan & Porter, 2006; Kelly & Gilliland, 2002; Jacobs, 1998).

1.1.3 Akute myeloische Leukämie (AML)

1.1.3.1 Bedeutung und Entstehung

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine seltene maligne Erkrankung. Aber da 80% der Erwachsenen mit einer aggressiven Leukämie eine AML haben, ist sie die am häufigsten auftretende akute Leukämie (Laubach & Rao, 2008). Jährlich werden weltweit etwa 300.000 neue AML-Fälle diagnostiziert, wobei das durchschnittliche Diagnosealter bei 68 Jahren liegt (Rowe, 2009; Laubach & Rao, 2008; Stone *et al.*, 2004). Allein in den USA kommen jährlich etwa 13.000 neue AML-Fälle und 9.000 AML-bedingte Todesfälle hinzu (Lin & Smith, 2011; Laubach & Rao, 2008; Stone *et al.*, 2004; Parisi *et al.*, 2002). Die AML-Inzidenz steigt mit dem Alter an. AMLs treten in den USA pro Jahr bei 1,8 von 100.000 Menschen unter 65 Jahren und bei 17,6 von 100.000 Menschen über 65 Jahren auf (Laubach & Rao, 2008; Stone *et al.*, 2004). Etwa 35% der neu diagnostizierten AML-Patienten sind über 75 Jahre alt (Laubach & Rao, 2008). Bei den Leukämieerkrankungen von Kindern liegt der AML-Anteil bei 13 - 36% (Giles *et al.*, 2002).

AMLs umfassen eine genetisch heterogene Gruppe von malignen Erkrankungen. Sie gehen jeweils von der klonalen Expansion einer transformierten Zelle im Knochenmark aus. Diese kann eine myeloisch-spezifische Vorläuferzelle oder eine multipotente Stammzelle sein, weshalb neben der granulomonozytischen auch die erythroide und megakaryozytische Zelllinie betroffen sein können (Lichtman & Segel, 2005; Jacobs, 1998; Pinto *et al.*, 1998; Russell, 1997). Für die Transformation von normalen zu leukämischen Zellen sind nach dem *two-hit model* Mutationen notwendig und ausreichend, die zum einen Transkriptionsfaktoren der hämatopoetischen Differenzierung (z.B. CBF, RAR α , HOX-Mitglieder, CEBPA, NPM1) beeinträchtigen und zum anderen proliferationsfördernde Tyrosinkinasen (z.B. FLT3, c-KIT, N-RAS, K-RAS) aktivieren bzw. antiapoptotisch wirken (Betz & Hess, 2010; Scholl *et al.*, 2009; Kelly & Gilliland, 2002; Jordan, 2002). Bei über 55% der AML-Patienten besitzen die Leukämiezellen einen anomalen Karyotyp mit Translokationen, Inversionen, Deletionen oder Monosomien. Komplexe Karyotypen, die bei über 15% der Fälle auftreten, weisen mehr als drei solcher Anomalien auf (Betz & Hess, 2010; Grimwade & Hills, 2009; Scholl *et al.*, 2009; Döhner & Döhner, 2008).

Die durch die Expansion der transformierten unreifen Blutzellen verursachte Verdrängung des Knochenmarks ist mit der Suppression der normalen Hämatopoese und damit einhergehend mit der Abnahme der Anzahl normaler Blutzellen verbunden. Kombiniert mit Interaktionen zwischen normalen und malignen Zellen löst dies bei AML-Patienten Anämie, Neutropenie und Thrombozytopenie aus. Diese führen zu Symptomen wie Müdigkeit, Kurzatmigkeit, Blutungen und erhöhte Infektionsanfälligkeit (Parisi *et al.*, 2002; Schiffer, 2001). Zudem können die leukämischen Blasten in das lymphatische System, die Milz und andere Organe einwandern (Parisi *et al.*, 2002). Unbehandelt nimmt die AML einen tödlichen Verlauf, wobei die durchschnittliche Lebenserwartung weniger als drei Monate beträgt (Parisi *et al.*, 2002; Cripe, 1997).

1.1.3.2 Klassifizierung und Prognostik

Für die Diagnose und Klassifizierung von AML-Subtypen werden das periphere Blut und das Knochenmark von Patienten morphologisch, zytogenetisch und molekularbiologisch untersucht. Dies ist sowohl für die Prognose als auch die Therapie entscheidend (Vardiman *et al.*, 2009; Parisi *et al.*, 2002).

Nach der veralteten, aber weiterhin angewendeten *French-American-British* (FAB)-Klassifikation kann die AML anhand der Zellmorphologie und zytogenetischer Aberrationen in acht Subtypen (M0 - M7) unterteilt werden (**Tab.1.1**). Äußerst seltene Subtypen (z.B. Mastzell-, akute basophile oder eosinophile Leukämie) werden darin nicht erfasst (Parisi *et al.*, 2002).

AML-Subtyp	Bezeichnung	charakteristische zytogenetische Aberration	geschätzter Anteil an AML-Fällen [%]
M0	akute myeloische Leukämie mit minimaler Differenzierung	/	5
M1	akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung	t(9;22)	15
M2	akute myeloische Leukämie mit Ausreifung	t(8;21)	25
M3	akute Promyelozyten-Leukämie (APL)	t(15;17)	10
M4	akute myelomonozytäre Leukämie	/	25
M4eo	akute myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie	inv(16)	<5
M5a	akute Monoblasten-Leukämie	/	5
M5b	akute Monozyten-Leukämie	/	5
M6	akute Erythroleukämie	/	5
M7	akute Megakaryoblasten-Leukämie	/	10

Tabelle 1.1: FAB-Klassifizierung von AMLs (inv: Inversion; t: Translokation)
(Herdrich & Weinberger, 2010; Orazi, 2007; Vardiman *et al.*, 2002)

Von der WHO ist ein System zur Klassifizierung von hämatopoetischen Neoplasien eingeführt worden, bei dem neben zytomorphologischen Aspekten verstärkt zytochemische, genetische, immunphänotypische und klinische Merkmale berücksichtigt werden (Vardiman *et al.*, 2009 & 2002; Haferlach *et al.*, 2005). Nach diesem System liegt eine AML vor, wenn der Anteil leukämischer Myeloblasten im Blut oder Knochenmark bei über 20% liegt oder eine zytogenetische Aberration wie t(8;21), inv(16) / t(16;16) oder t(15;17) nachweisbar ist. Für die Prognose und die Therapiewahl haben sich zusätzlich das Patientenalter bei der Diagnose, der Karyotyp der leukämischen Zellen, die Anzahl der Leukozyten, knochenmarkschädliche Vorerkrankungen und deren Behandlung sowie Veränderungen bestimmter Gene erwiesen, zu denen beispielsweise *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA* und *EVI-1* gehören (**Abb.1.1**) (Ofran & Rowe, 2011; Grimwade & Hills, 2009; Löwenberg, 2008; Giles *et al.*, 2002; Parisi *et al.*, 2002). Letztere sind insbesondere für die Einteilung von AMLs mit normalem Karyotyp, der bei etwa 50% der AML-Patienten vorliegt, von Bedeutung (Lin & Smith, 2011; Scholl *et al.*, 2009).

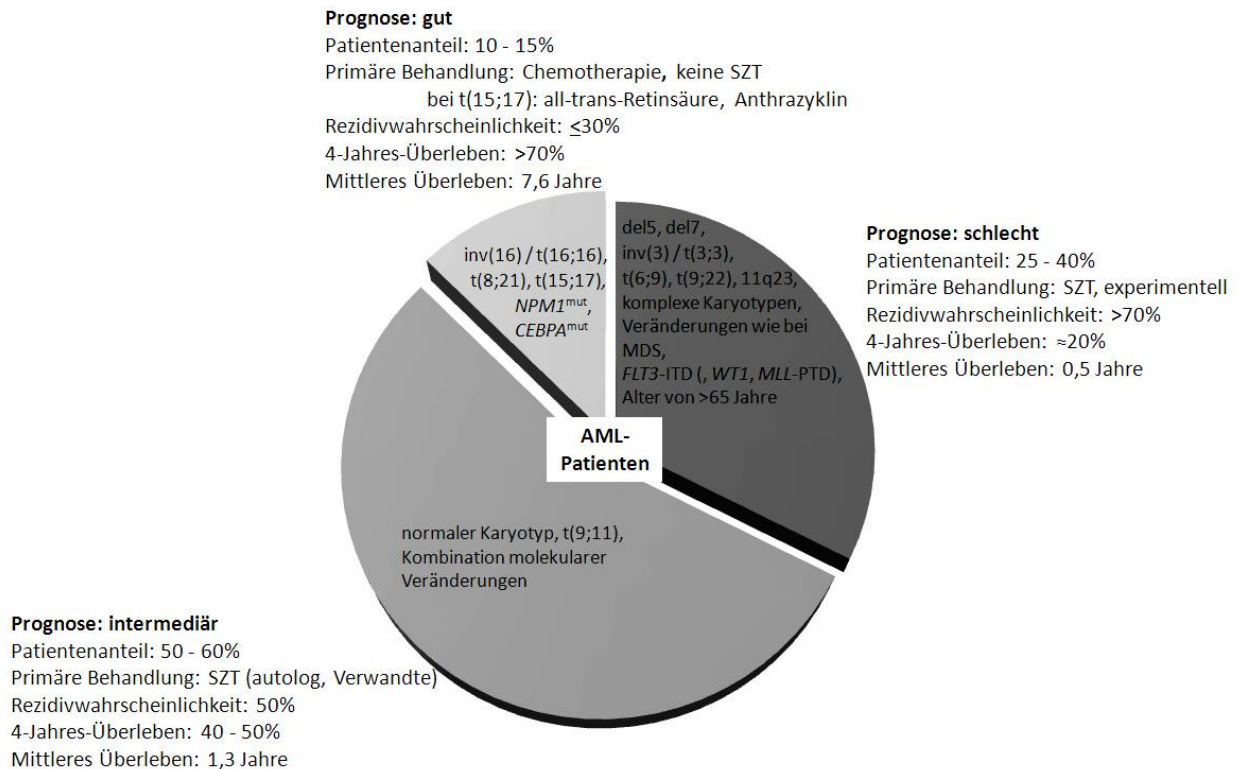


Abb.1.1: Charakterisierung prognostischer AML-Gruppen

AML-Patienten werden aufgrund genetischer Veränderungen ihrer Leukämiezellen in unterschiedliche Prognosegruppen unterteilt und dementsprechend bevorzugt therapiert (del: Deletion; inv: Inversion; mut: Mutation; SZT: Stammzelltransplantation; t: Translokation) (Lin & Smith, 2011; Betz & Hess, 2010; Grimwade & Hills, 2009; Ferrara *et al.*, 2008; Stone, 2007; Stone *et al.*, 2004; Löwenberg, 2004).

1.1.3.3 Therapiemöglichkeiten

Bei der Behandlung von AMLs wird zunächst als so genannte Induktionstherapie versucht durch eine Chemotherapie (z.B. Cytarabin, Anthrazykline) eine komplette Remission zu erreichen, d.h. die Anzahl leukämischer Zellen soll auf ein zytologisch nicht nachweisbares Niveau gesenkt werden (Ofrañ & Rowe, 2011; Löwenberg, 2008 & 2004; Tallman *et al.*, 2005; Stone *et al.*, 2004; Parisi *et al.*, 2002). Da die zytotoxischen Medikamente u.a. normale hämatopoetische Zellen angreifen, wird die Chemotherapie von einer ernsten Myelosuppression begleitet. Bei 70 - 80% der AML-Patienten unter 60 Jahren kann durch diese Behandlung eine Remission erreicht werden (Stone, 2007; Löwenberg, 2008 & 2004; Giles *et al.*, 2002; Parisi *et al.*, 2002). Bei den älteren Patienten sterben 20% bereits in der Induktionsphase aufgrund von Komplikationen, 40 - 50% erreichen eine komplette Remission (Rowe, 2009; Laubach & Rao, 2008; Stone, 2007). Der Induktion schließt sich die Konsolidierungstherapie (Postremissionstherapie) an, bei der insbesondere mit höheren Cytarabindosierungen die verbliebenen Leukämiezellen (engl. *minimal residual disease*) beseitigt werden soll (Löwenberg, 2004; Cripe, 1997). Bei 60 - 70% der Patienten mit guter Prognose, zu denen beispielsweise solche mit t(8;21) und inv(16) in den Leukämiezellen gehören, kann dies durch eine alleinige Chemotherapie bewirkt werden (Stone *et al.*, 2004).

Bei Patienten mit einem hohen Rezidivrisiko bzw. bei einem Rückfall wird versucht, eine allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) durchzuführen (Rowe, 2009; Stone,

2007; Visani *et al.*, 2006; Giles *et al.*, 2002; Burnett, 2001; Cripe, 1997). Für eine allogene HSZT muss zunächst durch Chemotherapie oder Ganzkörperbestrahlung das patienteneigene Knochenmark zerstört werden. Dadurch wird verhindert, dass es in einer Wirt-gegen-Transplantat-Reaktion zu einer Abstoßung der transplantierten Spenderzellen durch Patientenlymphozyten kommt. Die Hämatopoese wird durch die anschließende allogene HSZT wiederhergestellt. Die übertragenen Spenderlymphozyten vermitteln den eigentlichen therapeutischen Transplantat-gegen-Leukämie (engl. *graft-versus-leukemia*, GvL)-Effekt, durch den verbliebene Leukämiezellen beseitigt werden (Bleakley & Riddell, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Barrett, 2008; Schiffer, 2001). Etwa 25% der Patienten haben ein Geschwister, das als Spender für eine allogene HSZT geeignet ist (Rowe, 2009). Ist dies nicht der Fall, können für 30 - 70% der Patienten Fremdspender gefunden werden, deren MHC-Allele mit denen des entsprechenden Patienten komplett übereinstimmen (Nowak, 2008). Zwar birgt eine allogene HSZT das Potenzial zur Heilung und verringert das Rezidivrisiko, aber gleichzeitig ist durch die behandlungsbedingte Toxizität, GvHD und gesteigerte Infektionsneigung die Morbidität und Mortalität erhöht (Bleakley & Riddell, 2011; Li *et al.*, 2009; Visani *et al.*, 2006; Löwenberg, 2004; Stone *et al.*, 2004). Die durch Spenderlymphozyten verursachte Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (engl. *graft-versus-host-disease*, GvHD) tritt bei 40% der transplantierten Patienten auf. Sie stellt einen potenziell lebensbedrohlichen Immunangriff dar, der vor allem gegen die Haut, den Darm sowie die Leber der transplantierten Patienten gerichtet ist (Zhang *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009; Blazer & Murphy, 2005; Bleakley & Riddell, 2004). Wegen dieser Komplikationen werden allogene HSZTs vorzugsweise bei Patienten mit schlechter Prognose seitens der Leukämie vorgenommen (Löwenberg, 2008; Visani *et al.*, 2006; Parisi *et al.*, 2002).

Durch die verfügbaren AML-Behandlungen kann die Lebenserwartung der Patienten gesteigert werden. Aber nur 20 - 30% der jungen AML-Patienten leben länger als zehn Jahre (Rowe, 2009; Stone, 2007; Visani *et al.*, 2006). Von den über 60-jährigen und den Patienten mit schlechter Prognose erreichen nur 50 - 60% eine komplette Remission. Von diesen wiederum überleben nur 10% längerfristig und bleiben krankheitsfrei (Guinn *et al.*, 2007; Giles *et al.*, 2002; Schiffer, 2001).

Um nach einer allogenen HSZT eine Rezidivierung zu verhindern und die Remissionsphase zu verlängern, werden chemotherapeutische Behandlungen, Spender-Lymphozyten-Infusionen und gezielte Therapieansätze angewendet (Guinn *et al.*, 2007). Für gezielte Therapieansätze werden auf die veränderten Eigenschaften der Leukämiezellen gerichtete Behandlungsmethoden getestet, die u.a. Tyrosinkinase-, Angiogenese-, Histon-Deacetylase- und DNA-Methyltransferase-Inhibitoren sowie spezifische monoklonale Antikörper und *in vitro* stimulierte Lymphozyten umfassen (Fathi *et al.*, 2010; Cesco-Gaspere *et al.*, 2009; Morgan & Reuter, 2006; Tallman *et al.*, 2005; Parisi *et al.*, 2002; Schiffer, 2001). Bei APL-Patienten, die nach der FAB-Klassifikation den AML-Subtyp M3 bilden, kann durch die Kombination von Chemotherapie und gezielter Therapie in über 90% der Fälle eine komplette Remission und in fast 80% eine Heilung erreicht werden (Kamimura *et al.*, 2011; Sanz & Lo-Coco, 2011; Gorin, 1998). Dieser Erfolg beruht auf der Gabe der hypomethylierend-wirkenden all-trans-Retinsäure, die die

durch das APL-spezifische PML-RAR α -Fusionsprodukt induzierte Differenzierungsblockade der Leukämiezellen aufhebt (Schoofs & Müller-Tidow, 2011; Stone, 2007).

Da das Immunsystem von Leukämiepatienten unfähig ist ausreichende Immunantworten gegen leukämieassoziierte Antigene (LAAs) aufzubauen und nach konventioneller Chemo- und Bestrahlungstherapie die Erkrankungen oft rezidivieren oder voranschreiten, spielen adoptiv transferierte Effektoren des Immunsystems allogener Spender (z.B. Spender-Lymphozyten-Infusionen, monoklonale Antikörper) eine entscheidende Rolle in der Therapie und sind oftmals die einzige Heilungschance (Cesco-Gaspere *et al.*, 2009; Kater *et al.*, 2007). Genveränderungen in malignen Zellen können ebenso wie polymorphe Gene zur Bildung von Antigenen führen, die von allogenen Immunzellen erkannt werden. Ihre Charakterisierung ermöglicht eine Verbesserung der allogenen Stammzelltransplantation sowie gezielte Therapien, bei denen einzelne Risikogruppen mit individuellen Kombinationen verschiedener Therapieansätze behandelt werden können (Petrie *et al.*, 2009; Grant, 2008; Basso *et al.*, 2007; Burnett & Knapper, 2007; Giles, 2002).

1.2 Grundlagen der Antigenerkennung durch T-Lymphozyten

1.2.1 Antigenprozessierung und -präsentation über Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHCs)

T-Zell-vermittelte Immunantworten beruhen auf der Erkennung von Antigenen durch T-Lymphozyten. Diese Peptidfragmente werden im Zellinneren aus Proteinen prozessiert und an Zelloberflächen von membranständigen Glykoproteinen, den Haupthistokompatibilitätsmolekülen (engl. *major histocompatibility complexes*, MHCs), präsentiert (Janeway *et al.*, 2002).

Antigene, die von zytoplasmatischen Proteinen stammen, werden meist in Form von acht bis zehn Aminosäure langen Peptiden von allen kernhaltigen Zellen über MHC-Klasse I-Moleküle präsentiert. MHC-Klasse I-Moleküle setzen sich aus einer membranständigen α -Kette, von deren drei extrazellulären Domänen zwei einen peptidbindenden Spalt bilden, und dem nicht kovalent assoziierten β_2 -Mikroglobulin zusammen (Chemali *et al.*, 2011; Janeway *et al.*, 2002). Zytosolische Proteine werden im Verlauf der Antigenprozessierung aufgrund ihrer Ubiquitinierung von einem multikatalytischen Proteasekomplex, der als Proteasom bezeichnet wird, zu Peptiden abgebaut und von TAP-Heterodimeren (engl. *transporter associated with antigen processing*, TAP) ATP-abhängig in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert (Sijts & Kloetzel, 2011). In der Membran des ER sind MHC-Klasse I-Moleküle verankert, wo sie nach ihrer Synthese im Zytosol mit Hilfe von Chaperonen wie Calnexin, Calreticulin und Erp57 partiell gefaltet und zusammengebaut worden sind. Das TAP-assoziierte Tapasin vermittelt im ER die Bindung von den aufgenommenen und durch Peptidasen verkürzten Peptiden an die MHC-Moleküle. Nach der Ablösung der Chaperone und der endgültigen Faltung zu stabilen Antigen-MHC-Komplexen werden diese für die Antigenpräsentation über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert (**Abb.1.2**) (Neefjes *et al.*, 2011; Saunders & van Endert, 2011; Vigneron & Van den Eynde, 2011). Insbesondere dendritische Zellen (engl. *dendritic cells*, DCs) sind in der Lage über

die so genannte Kreuzpräsentation auch exogene Antigene über MHC-Klasse I-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche zu präsentieren (Chemali *et al.*, 2011; Saunders & van Endert, 2011).

Die meisten aus dem Extrazellulärraum durch Endo- oder Phagozytose aufgenommenen Proteine werden von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (engl. *antigen presenting cells*, APCs) wie Makrophagen, dendritischen und B-Zellen in Endosomen proteolytisch abgebaut und der Antigenpräsentation über MHC-Klasse II-Moleküle zugeleitet. Dafür werden die MHC-Klasse II-Moleküle nach ihrer Synthese im Zytosol über das ER zu den Endosomen gebracht. Die entstandenen Peptid-MHC-Klasse II-Komplexe werden für die Antigenpräsentation weiter zur Zelloberfläche transportiert (**Abb.1.2**) (Neefjes *et al.*, 2011; Burster *et al.*, 2010; Loss & Sant, 1993). MHC-Klasse II-Moleküle bestehen aus einer α - und einer β -Kette, die beide die Zellmembran durchspannen, zwei Domänen besitzen und gemeinsam einen an den Enden offenen Spalt für die Bindung von mindestens 13 Aminosäure langen Peptiden bilden (Chemali *et al.*, 2011; Janeway *et al.*, 2002).

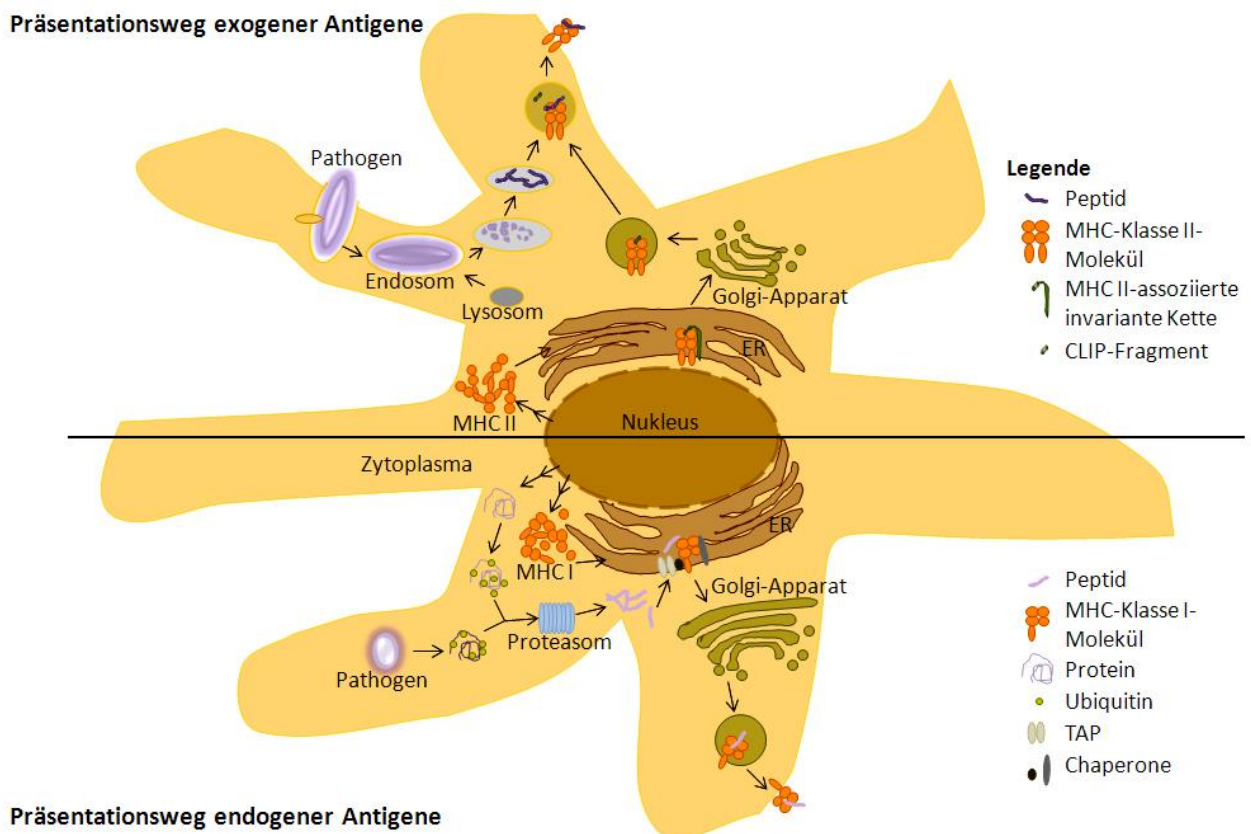


Abb.1.2: Präsentation von exogenen und endogenen Antigenen

Jede kernhaltige Zelle präsentiert über MHC-Klasse I-Moleküle Antigene, die von intrazellulären Pathogenen oder zelleigenen Proteinen stammen (Präsentationsweg endogener Antigene). Dadurch können zytotoxische $CD8^+$ -T-Lymphozyten aktiviert werden. Professionelle antigenpräsentierende Zellen sind zusätzlich in der Lage, Antigene, die durch den Abbau von extrazellulären Proteinen gewonnen worden sind, auf ihrer Oberfläche über MHC-Klasse II-Moleküle zu präsentieren (Präsentationsweg exogener Antigene). Dies ermöglicht die Aktivierung von $CD4^+$ -T-Lymphozyten (CLIP: *class II invariant chain-associated peptide*; ER: Endoplasmatisches Retikulum; MHC: *major histocompatibility complex*; TAP: *transporter associated with antigen processing*) (nach Pezzutto *et al.*, 2007; Schuurhuis *et al.*, 2006; Janeway *et al.*, 2002).

Die humanen MHC-Klasse I- und MHC-Klasse II-Loci sind polygenisch. Sie kodieren auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 21 HLA-Gene (engl. *human leukocyte antigen*, HLA) (Li & Raghavan, 2010; Agrawal & Kishore, 2000; Robinson *et al.*, 2000). Die HLA-Moleküle zeichnen sich durch hochpolymorphe Regionen in ihren aminoterminalen Domänen aus. Diese ermöglichen einerseits eine hochaffine Bindung vonprozessierten Peptiden. Andererseits werden dafür nur zwei oder drei ähnliche Aminosäuren an Ankerpositionen der Peptide gebraucht, weshalb an einzelne HLA-Moleküle unterschiedliche Peptide binden können (Neefjes *et al.*, 2011; Janeway *et al.*, 2002).

1.2.2 Antigen-spezifische Aktivierung von T-Lymphozyten über T-Zellrezeptoren (TZRs)

Über MHC-Moleküle präsentierte Peptide werden von T-Lymphozyten mit Hilfe antigenspezifischer T-Zellrezeptoren (TZRs) erkannt. Die dadurch aktivierten Lymphozyten beteiligen sich mit unterschiedlichen Mechanismen an einer effektiven Immunantwort (Pezzutto *et al.*, 2007; Janeway *et al.*, 2002).

Jeder T-Lymphozyt ist mit einem einzigartigen T-Zellrezeptor ausgestattet, der sich aus der individuellen Rekombination von V- und J-Gensegmenten seiner α -Kette sowie von den V-, D- und J-Gensegmenten der β -Kette während der Lymphozytenreifung im Thymus ergibt (Naito *et al.*, 2011; Hernandez *et al.*, 2010). Dadurch entstehen etwa 10^{12} unterschiedliche antigenspezifische TZRs (Birkholz *et al.*, 2009; Brochet *et al.*, 2008). Während ihrer Differenzierung im Thymus werden die T-Zellvorläufer aufgrund ihrer Spezifität und Affinität selektioniert. Dabei werden Lymphozyten, deren Rezeptoren keine mittelstarke Bindung zu MHC-Molekülen ausbilden oder Autoantigene erkennen können, durch Apoptose beseitigt (Naito *et al.*, 2011; Sijts & Kloetzel, 2011; Hernandez *et al.*, 2010; Pezzutto *et al.*, 2007; Glik & Douvdevani, 2006). In der Peripherie befinden sich schließlich T-Lymphozyten, die zusammen ein Repertoire von ungefähr $2,5 \times 10^8$ unterschiedlichen TZRs aufweisen (Morris & Allen, 2012). Die V(D)J-Region mit den drei für die Peptid-MHC-Erkennung verantwortlichen hypervariablen Bereichen (engl. *complementarity determining regions* 1 - 3, CDR1 - 3) befindet sich jeweils in dem aminoterminalen variablen Bereich der α - und β -Kette. Die konstante Region der TZR-Ketten dient der Verankerung in der Zellmembran, der Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den beiden Ketten und der Interaktion mit rezeptorassoziierten Signalkomplexen. Etwa 90% der T-Zellen besitzen $\alpha:\beta$ -T-Zellrezeptoren, die restlichen 10% immunglobulinähnliche $\gamma:\delta$ -TZRs. Die zytotoxischen $\gamma:\delta$ -T-Zellen erkennen MHC-unabhängig Moleküle, die nicht pathogenspezifisch sind (Pezzutto *et al.*, 2007; Janeway *et al.*, 2002).

Bei der Antigenerkennung durch naive T-Lymphozyten bindet zunächst der TZR an den Antigen-MHC-Komplex von professionellen APCs. In der entstehenden immunologischen Synapse aggregieren Rezeptorkomplexe und Interaktionen zwischen Adhäsions- sowie kostimulatorischen Molekülen auf den APCs (z.B. B7.1, B7.2, ICAM-1) und den T-Lymphozyten (z.B. CD28, Integrin LFA-1) werden zur Signalstabilisierung ausgebildet (Glik & Douvdevani, 2006; Janeway *et al.*, 2002). Das führt zur Phosphorylierung der akzessorischen TZR-Ketten des CD3-Komplexes, zur Bindung der Korezeptoren CD4 bzw. CD8 an die MHC-Moleküle und zur Aktivierung weiterer Signalmoleküle (z.B. Tyrosinkinasen, Phospholipase C- γ , G-Proteine). Dadurch werden der

Stoffwechsel und die Zytokinproduktion (z.B. IL-2) sowie die Genexpression der Lymphozyten verstärkt (Morris & Allen, 2012; Zhang & Bevan, 2011; Powell & Delgoffe, 2010; Santana & Rosenstein, 2003). Die aktivierten Lymphozyten werden zur Proliferation angeregt, damit ausreichend viele Zellen für die Immunreaktion zur Verfügung stehen. Die Nachkommen eines Lymphozyten sind klonal, d.h. sie besitzen denselben antigenspezifischen TZR, und differenzieren unter dem Einfluss spezifischer Zytokine zu Effektorzellen (Harrington *et al.*, 2006; Weaver *et al.*, 2006). Die vier bis fünf Tage andauernde klonale Expansion und Differenzierung der T-Lymphozyten führt zu einem verzögerten Einsetzen der adaptiven Immunantwort. Aufgrund ihrer veränderten Ausstattung an Adhäsionsmolekülen können die Effektorlymphozyten zu Infektionsorten wandern oder verbleiben zur B-Zellaktivierung in den lymphatischen Organen. Effektorlymphozyten können mit Hilfe ihres TZR auch Antigen-MHC-Komplexe auf nicht-professionellen APCs erkennen (Janeway *et al.*, 2002).

1.2.3 Eigenschaften von T-Lymphozyten mit unterschiedlichen Funktionen

Naïve T-Lymphozyten erkennen in den peripheren Lymphorganen Antigene, die von professionellen APCs über MHC-Moleküle präsentiert werden. Sie zirkulieren nach der Selektion im Thymus zwischen Blut, lymphatischem Gewebe (z.B. Lymphknoten, Milz) und Lymphe. Diese Lymphozyten zeichnen sich durch eine niedrige Expression von Effektormolekülen und Komponenten von Todeskaskaden sowie eine starke Proliferationsfähigkeit aus (Klebanoff *et al.*, 2006; Seder & Ahmed, 2003; Swain, 2003). Erst bei anhaltender TZR-Stimulation durch große Antigenmengen und in Anwesenheit von kostimulatorischen und Zytokinsignalen proliferieren naïve T-Lymphozyten (Chappell & Jacob, 2003; Swain, 2003). Sowohl naïve CD8⁺- als auch CD4⁺-T-Lymphozyten differenzieren abhängig von dem Zytokinmilieu und weiteren Signalen zu Typ 1- (Tc1, Th1) oder Typ 2-Effektorzellen (Tc2, Th2), die als charakteristisches Zytokin entweder IFN- γ oder IL-4 produzieren (Naito *et al.*, 2011; Chappell & Jacob, 2003; Santana & Rosenstein, 2003; Seder & Ahmed, 2003).

Für die Aktivierung der CD8⁺- und CD4⁺-Effektorlymphozyten sind eine optimale Antigenmenge, Kostimulation und ein entsprechendes Zytokinmilieu notwendig. Dadurch werden ihre Effektormechanismen angeregt, aber auch ihre Anfälligkeit für einen spontanen oder Aktivierungs-induzierten Zelltod (engl. *activation-induced cell death*, AICD) erhöht (Green *et al.*, 2003; Swain, 2003). Die durch die Expression des Korezeptors CD8 charakterisierten zytotoxischen T-Lymphozyten erkennen über MHC-Klasse I präsentierte Peptide von zytoplasmatischen Proteinen. Sie beseitigen APCs, welche meist maligne oder infizierte Zellen sind, durch Exozytose von lytischen Perforin- und Granzym-haltigen Granula sowie Fas-FasLiganden-Interaktionen (Chappell & Jacob, 2003). Ihre freigesetzten Zytokine (z.B. IFN- γ) aktivieren weitere Immunzellen (z.B. Makrophagen) und deren Effektormechanismen (z.B. *respiratory burst*) (Glik & Douvdevani, 2006; Ellis & Beaman, 2004). Mit dem CD4-Korezeptor ausgestattete T-Lymphozyten erkennen über MHC-Klasse II-präsentierte Antigene. Sie regulieren vor allem durch die Freisetzung von Zytokinen (z.B. GM-CSF, TNF- α , IL-4, IL-10) angeborene und adaptive Immunantworten (z.B. Makrophagen-, B-Zellaktivierung) (Weaver *et al.*, 2006; Chappell & Jacob, 2003; Swain, 2003). IL-17 produzierende Th17-CD4⁺-Lymphozyten sind an der

Pathogenbekämpfung und Autoimmunreaktionen beteiligt (Harrington *et al.*, 2006; Weaver *et al.*, 2006). Regulatorische CD4⁺-T-Lymphozyten verhindern durch die Sekretion der supprimierenden Zytokine IL-10 und TGF- β sowie durch Zell-Zellkontakte überschießende Immunreaktionen und Autoimmunantworten (Pezzutto *et al.*, 2007; Glik & Douvdevani, 2006; Weaver *et al.*, 2006).

Nach der Lymphozytenexpansion und Effektorphase werden zum Ende einer adaptiven Immunantwort die meisten antigenspezifischen Lymphozyten durch Apoptose beseitigt. Aber etwa 10% der T-Lymphozyten bleiben als langlebige Gedächtniszellen erhalten, sodass bei einem erneuten Kontakt mit bereits kleinen Antigenmengen eine schnellere und wirksamere Immunreaktion eingeleitet werden kann (Glik & Douvdevani, 2006; Klebanoff *et al.*, 2006; Chappell & Jacob, 2003; Swain, 2003).

1.3 Interaktionen des Immunsystems mit malignen Zellen

1.3.1 *Immunosurveillance* und *Immunescape*

Die Immunüberwachung (engl. *immunosurveillance*) führt dazu, dass verschiedene Komponenten des Immunsystems (z.B. T-, NK-Zellen, Antikörper) maligne transformierte Zellen erkennen und zerstören (Barrett & Savani, 2009). Bei der direkten Bekämpfung von Malignomen spielt das angeborene Immunsystem (z.B. Komplementfaktoren) eine untergeordnete Rolle (Janeway *et al.*, 2002; van Spriël *et al.*, 2001). Zur effektiven Beseitigung von Malignomen müssen Immunreaktionen ausgelöst werden, die zwischen normalen und malignen Zellen unterscheiden können und sämtliche Malignomzellen vernichten. Daran sind insbesondere zytotoxische T-Lymphozyten beteiligt, die aufgrund der Erkennung malignomspezifischer Antigene maligne Zellen durch die Freisetzung von Perforin und Granzymen bzw. Auslösung der Fas-FasLigandenvermittelten Apoptose zerstören (Pandolfi *et al.*, 2011). Aufgrund ihrer Transformation präsentieren Malignomzellen über MHC-Moleküle spezifische Peptide, die von mutierten, überexprimierten oder *de novo* exprimierten Antigenen stammen (Guinn *et al.*, 2007; Kolb *et al.*, 2003; Janeway *et al.*, 2002). Obwohl Leukämien zu den schwach immunogenen Malignomen gehören, wurden in Leukämiepatienten autologe T-Lymphozyten, die gegen leukämieassoziierte Antigene (LAAs) wie BCR-ABL und WT-1 gerichtet waren, in erhöhter Anzahl gefunden (Pandolfi *et al.*, 2011; Riva *et al.*, 2010; Barrett & Savani, 2009; Rusakiewicz *et al.*, 2009).

Maligne Zellen versuchen sich, den Immunantworten durch so genannte *Immunescape*-Mechanismen zu entziehen (Du & Wang, 2011; Janeway *et al.*, 2002). Diese klonale Selektion von evasiven Leukämiezellen kann zur Rezidivierung von Leukämien nach allogenen HSZTs führen (Vago *et al.*, 2009; Dermime *et al.*, 1997). Zu den *Escape*-Mechanismen gehört der Verlust von MHC-, Adhäsions- oder kostimulatorischen Molekülen (z.B. CD80, CD86), der zur Verringerung der Immunogenität von malignen Zellen wie leukämischen Blasten führt (Stölzel *et al.*, 2012; Vago *et al.*, 2009; Kater *et al.*, 2007; Pawelec, 2004; Kolb *et al.*, 2003; Agrawal & Kishore, 2000). Außerdem können Malignomzellen durch die Freisetzung von entsprechenden Zytokinen (z.B. TGF- β , IL-10) ein immunsuppressives Milieu erschaffen und supprimierende Immunzellen wie regulatorische T-Lymphozyten rekrutieren (Cavallo *et al.*, 2011; Kolb, 2008; Prendergast, 2008;

Kater *et al.*, 2007; Chanan-Khan & Porter, 2006). Aufgrund der Deregulation apoptotischer Signalwege (z.B. Fas-FasLiganden-Interaktion) entziehen sich maligne Zellen ebenfalls ihrer Zerstörung und erwerben einen Überlebensvorteil (Greiner *et al.*, 2008; Pawelec, 2004). Eine Besonderheit der Leukämien ist, dass die eigentlich der Immunabwehr dienenden Zellen selbst maligne transformiert sind. Die für Leukämien charakteristische Verdrängung der normalen Hämatopoese und Expansion von undifferenzierten Immunzellen resultiert in der Generierung einer krankheitsbedingten Immunschwäche (Cavallo *et al.*, 2011).

Bei der Behandlung von malignen Erkrankungen sollten demnach nicht nur vorhandene Immunreaktionen verstärkt und ergänzt werden, sondern auch Immunevasionsmechanismen von malignen Zellen berücksichtigt werden (Pandolfi *et al.*, 2011; Huber *et al.*, 2008; Pawelec, 2004).

1.3.2 Zielantigene von T-Lymphozyten

1.3.2.1 Leukämieassoziierte Antigene (LAAs)

Leukämiezellen können leukämieassoziierte Antigene (LAAs) exprimieren, die potenziell von körpereigenen und Spenderlymphozyten erkannt werden können. Diese Antigene stammen von mutierten Genen (z.B. *FLT3-ITD*) oder entstehen aufgrund von chromosomalen Translokationen wie beispielsweise das Fusionsprodukt BCR-ABL durch die Translokation t(9;22) (Rusakiewicz *et al.*, 2009; Guinn *et al.*, 2007). Aber auch Proteine, die von Leukämiezellen *de novo* oder überexprimiert werden, wie beispielsweise WT-1, RHAMM, PRAME, Proteinase 3, BCL-2, Survivin und hTERT können leukämiespezifische zytotoxische T-Zellantworten induzieren (Greiner *et al.*, 2008 & 2004; Guinn *et al.*, 2007; Bleakley & Riddell, 2004). Die Expression von *cancer-germline*-Antigenen (z.B. HAGE, BAGE, NY-ESO-1, PASD1), die normalerweise auf Zellen der Keimbahn begrenzt ist, wurde ebenfalls in einigen hämatologischen Malignomen (z.B. T-Zellleukämie bzw. -lymphom bei Erwachsenen) belegt (Nishikawa *et al.*, 2012; Meklat *et al.*, 2009; Greiner *et al.*, 2008; Guinn *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2004 & 2003). Da einige LAAs auch von normalen Zellen exprimiert werden, können gegen sie gerichtete T-Lymphozyten ebenso für diese zytotoxisch sind (Bleakley & Riddell, 2004).

Die Immunüberwachung durch das patienteneigene Immunsystem führt bei Leukämiepatienten u.a. zur Durchsetzung von Leukämiezellen mit niedriger Expression von immunogenen LAAs. Dies ist ein Grund dafür, dass LAAs schließlich keine effektiven antileukämischen Antworten mehr auslösen können, weder bei autologen noch bei durch Transplantation übertragenen allogenen Immunzellen (Vincent *et al.*, 2011). Da LAAs aber grundsätzlich in der Lage sind sowohl zytotoxische T-Zell- als auch Antikörperantworten zu induzieren, sind sie wichtige Zielstrukturen für Therapieansätze (z.B. Vakzinierung), die vor allem zur Verlängerung der kompletten Remission und nach Chemotherapie zur Beseitigung verbliebener Malignomzellen dienen (Schmitt *et al.*, 2009a; Greiner *et al.*, 2008; Guinn *et al.*, 2007; Perreault & Brochu, 2002).

1.3.2.2 Minorhistokompatibilitätsantigene (mHAgs)

Die Erhöhung der Rezidivrate nach Depletion von T-Lymphozyten in allogenen Transplantaten und die erfolgreiche Beseitigung leukämischer Zellen nach Spender-Lymphozyten-Infusionen hat bewiesen, dass bei Leukämiepatienten nach einer allogenen Stammzelltransplantation die Spender-T-Lymphozyten für antileukämische Immunreaktionen entscheidend sind (Bleakley & Riddell, 2011 & 2004; Falkenburg *et al.*, 2002). Spenderlymphozyten erkennen insbesondere Minorhistokompatibilitätsantigene (mHAgs). Diese unterscheiden sich zwischen verschiedenen Individuen aufgrund von natürlichen Polymorphismen, die meist einzelne Nukleotide (engl. *single nucleotide polymorphisms*, SNPs) in proteinkodierenden Genabschnitten betreffen und zu einem Austausch von Aminosäuren führen (Bleakley & Riddell, 2011 & 2004; Feng *et al.*, 2008; Akatsuka *et al.*, 2007; Falkenburg *et al.*, 2002). Dadurch können Epitope entstehen, die von Spender-T-Lymphozyten als fremd wahrgenommen werden, wie es bei den mHAgs HA-1, HB-1 und TRIM22-442C der Fall ist (Bleakley & Riddell, 2011; Wölfel *et al.*, 2008; Dolstra *et al.*, 1999). Da SNPs auch die Bindung von Peptiden an HLA-Moleküle beeinflussen, also an der Agretopbildung beteiligt sind, können solche mHAgs (z.B. HA-1, HA-2, CTSH) ebenfalls von allogenen T-Zellen erkannt werden (Bleakley & Riddell, 2011; Torikai *et al.*, 2006; Mommaas *et al.*, 2002; Pierce *et al.*, 2001). Das mHAgs HA-8 wird aufgrund des Einflusses eines SNP auf den Peptidtransport als allogenes wahrgenommen (Brickner *et al.*, 2001). Ebenso können SNPs aufgrund der Veränderung von Spleiß- und Proteasomschnittstellen (z.B. ACC-6, HA-3, SP110) sowie Proteinsequenzen (z.B. ECGF-1, PANE1, LRH-1, UGT2B17) zur Bildung immunogener Neopeptide führen (Kawase *et al.*, 2007; Birckner *et al.*, 2006; Slager *et al.*, 2006; Warren *et al.*, 2006; de Rijke *et al.*, 2005; Murata *et al.*, 2003; Spierings *et al.*, 2003).

Diese immunologischen Unterschiede zwischen Patienten und ihren Spendern lösen trotz des immunsuppressiven Milieus, das in transplantierten Patienten vorliegt, über hochavide CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten starke Immunantworten aus (Bleakley & Riddell, 2011; Akatsuka *et al.*, 2007). Dabei können Spenderlymphozyten aufgrund der Erkennung von mHAgs sowohl den erwünschten GvL-Effekt als auch die schädigende GvHD vermitteln (Feng *et al.*, 2008; Bleakley & Riddell, 2004). Die Ausprägung beider Effekte hängt insbesondere von dem Expressionsmuster und der Expressionsstärke der mHAgs ab (Bleakley & Riddell, 2004; Falkenburg *et al.*, 2002; Dolstra *et al.*, 1999). Werden mHAgs von hämatopoetischen Zellen exprimiert, können sie einen GvL-Effekt auslösen (**Abb.1.3**). Zytotoxische CD8⁺-Lymphozyten, die für Hämatopoese-spezifische mHAgs wie HA-1 und HA-2 restringiert sind, können primäre Blasten von akuten Leukämien lysieren, das Wachstum leukämischer Kolonien inhibieren und das Anwachsen von Leukämien in NOD/SCID (engl. *non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency*)-Mäusen verhindern (Bleakley & Riddell, 2011 & 2004; Bonnet *et al.*, 1999; Falkenburg *et al.*, 1991). Eine ubiquitäre Expression eines mHAgs kann zusätzlich zur GvHD führen (**Abb.1.3**) (Bleakley & Riddell, 2011 & 2004; Kessels *et al.*, 2002). Eine GvHD kann sich als akute GvHD innerhalb von 100 Tagen oder auch als chronische GvHD noch Jahre nach einer allogenen Stammzelltransplantation ausbilden (Schroeder & DiPersio, 2011). Bei nichtverwandten Spendern sind der GvL-Effekt und die GvHD stärker ausgeprägt. Das ist durch die höhere Wahrscheinlichkeit für unterschiedliche mHAgs begründet (Bleakley & Riddell, 2011 & 2004; Martin, 1991).

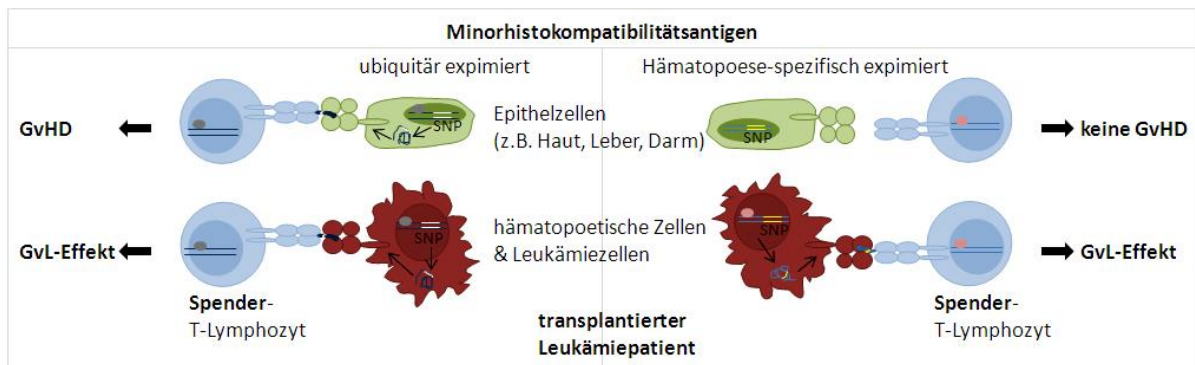


Abb.1.3: Abhängigkeit der Ausbildung des GvL-Effekts und der GvHD von dem Expressionsmuster von Minorhistokompatibilitätsantigenen

Wird ein Minorhistokompatibilitätsantigen ubiquitär exprimiert, dann können T-Lymphozyten von Transplantatspendern neben leukämischen und hämatopoetischen Zellen auch Zellen anderer Gewebe erkennen. Dadurch wird neben dem gewünschten Transplantat-gegen-Leukämie (GvL)-Effekt auch die Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (GvHD) ausgelöst. Wenn ein Minorhistokompatibilitätsantigen nur von leukämischen und hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, wird durch die Spenderlymphozyten ein GvL-Effekt ohne GvHD bewirkt (SNP: Einzelnukleotidpolymorphismus) (nach Akatsuka *et al.*, 2007; Bleakley & Riddell, 2004; Falkenburg *et al.*, 2002).

Annähernd 30 mHAGs sind bisher beim Menschen bekannt (Feng *et al.*, 2008; Akatsuka *et al.*, 2007; Bleakley & Riddell, 2004). Dazu gehören Y-chromosomal-kodierte Proteine, die von unterschiedlichen Zelltypen exprimiert werden können und bei Transplantationen zwischen verschiedenen Geschlechtern zum Tragen kommen (z.B. HY B7, HY A2, HY A1, HY B60). Neben ubiquitär exprimierten mHAGs (z.B. HA-3, HA-8, UGT2B17) wurden mindestens 14 mHAGs identifiziert, die nur von hämatopoetischen Zellen exprimiert werden (z.B. HA-2, HB-1) (**Tab.1.2 - 1.5**) (Bleakley & Riddell, 2011 & 2004; Falkenburg *et al.*, 2002; Dolstra *et al.*, 1999). Für die erfolgreiche Trennung des GvL-Effekts von der GvHD sind Antigene, die nur von hämatopoetischen und somit auch von leukämischen Zellen exprimiert werden, von besonderem Interesse (Akatsuka *et al.*, 2007; Falkenburg *et al.*, 2002).

Die niedrige Genotypfrequenz der bekannten mHAGs und oft begrenzte Verbreitung der sie präsentierenden MHC-Moleküle macht es notwendig, die Suche nach weiteren mHAGs voranzutreiben (Bleakley & Riddell, 2011). Durch das Wissen über eine Vielzahl von mHAGs kann bei Stammzelltransplantationen von Malignompatienten die Spenderauswahl und damit der klinische Ausgang sowie die Therapie durch Vakzinierungen und TZR-Transfers optimiert werden.

1.4 Methoden zur Identifizierung von Antigenen

Für die Identifizierung von behandlungsrelevanten Antigenen bei Malignompatienten wurden verschiedene Methoden angewendet (Bleakley & Riddell, 2011; Feng *et al.*, 2008). Bisher wurden vor allem durch cDNA-Expressionsklonierung und biochemisch-biophysikalische Analysen mHAGs gefunden (**Tab.1.2, Tab.1.4**) (Bleakley & Riddell, 2004). Wegen der Möglichkeit mit geringerem Aufwand eine große Anzahl von Antigenkandidaten zu untersuchen und der

gestiegenen Verfügbarkeit an Sequenzdaten, nimmt die Bedeutung revers immunologischer Methoden zu (Bleakley & Riddell, 2011).

1.4.1 T-Zell-basierte cDNA-Expressionsklonierung

Bei der T-Zell-basierten cDNA-Expressionsklonierung werden immunogene Antigene mit Hilfe malignomspezifischer T-Lymphozyten identifiziert. Dazu werden ausgehend von der RNA antigenpositiver Zellen cDNAs synthetisiert und in Expressionsvektoren einkloniert. Diese cDNA-Banken werden zunächst in Pools von 50 - 100 cDNAs pro Testeinheit präpariert und gemeinsam mit den patientenspezifischen HLA-Molekülen in Empfängerzellen (z.B. COS-7, 293T) transfiziert. Die Transfektanten werden auf Erkennung durch antigenspezifische T-Lymphozyten getestet. Induziert ein cDNA-Pool eine Zytokinfreisetzung (z.B. IFN- γ) bei den T-Zellen, wird der Pool subkloniert und auf Erkennung durch die T-Lymphozyten gescreent. Nach Klonierung von cDNA-Pools und Testung auf Erkennung wird mittels Datenbankvergleich das von positiven cDNA-Klonen kodierte Antigen identifiziert. Die immunogene Peptidregion eines solchen cDNA-Bank-Klons kann durch seine Fragmentierung eingegrenzt werden. Dabei werden cDNA-Fragmente, die in PCRs mit spezifischen Primern generiert werden, mit dem präsentierenden HLA-Allel kotransfiziert und auf Erkennung durch die T-Lymphozyten untersucht. Die sich ergebenden Peptidkandidaten werden in Form von synthetischen Peptiden auf ihre Fähigkeit Effektorfunktionen der antigenspezifischen T-Lymphozyten zu induzieren überprüft (Tab.1.2) (de Rijke *et al.*, 2008; De Plaen *et al.*, 1997).

mHAg (Gen)	immunogenes Peptid (AS-Austausch)	mHAg-Frequenz	HLA-Allel	HLA-Frequenz	bevorzugte Expression	Referenz
ACC-6 (HMSD)	MEIFIEVFSHF (Spleißvariante)	35%	-B*44:03, -B*44:02	20% [#] [^]	DCs, aktivierte B- und T-Zellen, maligne myeloische Zellen	Kawase <i>et al.</i> , 2007
CTSH ^K (CTSH)	ATLPLL <u>C</u> AR (R \leftrightarrow G)	k.A.	-A*31:01	38 [#] - 46% [^] (HLA-A3)	hämatopoetische Zellen (ubiquitär)	Torikai <i>et al.</i> , 2006
CTSH ^K (CTSH)	WATLPLL <u>C</u> AR (R \leftrightarrow G)	k.A.	-A*33:03	38 [#] - 46% [^] (HLA-A3)	hämatopoetische Zellen (ubiquitär)	Torikai <i>et al.</i> , 2006
HB-1 (HMHB1)	EEKRGS <u>L</u> H <u>V</u> W (H \leftrightarrow Y)	6%	-B44	23% [#]	B-ALL-, Epstein-Barr-Virus-infizierte B-Zellen	Dolstra <i>et al.</i> , 1999
HB-1 (HMHB1)	EEKRGS <u>L</u> Y <u>V</u> W (Y \leftrightarrow H)	24%	-B44	23% [#]	B-ALL-, Epstein-Barr-Virus-infizierte B-Zellen	Dolstra <i>et al.</i> , 1999
LB-ECGF-1H (ECGF-1)	RPHAI <u>R</u> R <u>P</u> LAL (H \leftrightarrow R)	11%	-B*07:02	11% (HLA-B7)	hämatopoetische Zellen, solide Tumore	Slager <i>et al.</i> , 2006
SP110 (SP110)	SLP <u>R</u> G <u>T</u> STPK (R \leftrightarrow G)	54%	-A*03:01	6 - 31% [#]	hämatopoetische Zellen	Warren <i>et al.</i> , 2006
TRIM22-442C (TRIM22)	MAVPP <u>C</u> C <u>I</u> GV (C \leftrightarrow R)	1,3%	-A*02:01	43%	hämatopoetische Zellen	Wölfel <i>et al.</i> , 2008
UGT2B17 (UGT2B17)	<u>A</u> ELLNIP <u>F</u> LY (Deletion)	11%	-A*29:02, -B*44:03	5%, 20% [^]	ubiquitär (Leber, Darm, APCs)	Murata <i>et al.</i> , 2003

Tabelle 1.2: Übersicht über einige mittels cDNA-Expressionsklonierung identifizierter Minorhistokompatibilitätsantigene (mHAgS)

In der immunogenen Peptidregion der identifizierten mHAgS wurde die für die Erkennung entscheidende Aminosäure unterstrichen sowie die HLA-Restriktion und bevorzugte Expression der mHAgS angegeben ([^]: Japaner; [#]: Kaukasier; AS: Aminosäure; k.A.: keine Angabe) (ergänzt mit Bleakley & Riddell, 2011 & 2004; Gonzalez-Galarza *et al.*, 2011; Akatsuka *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2008; Spierings & Goulmy, 2005).

1.4.2 Genetische *linkage*-Analyse

In genetischen *linkage*-Analysen wird versucht durch Korrelation bekannter Genmarker mit der Zellerkennung durch antigenspezifische T-Lymphozyten antigenkodierende Regionen zu definieren. Dafür stehen von Mitgliedern mehrerer Familien immortalisierte B-Zelllinien zur Verfügung. Deren Genome wurden bezüglich tausender bekannter Genmarker charakterisiert. Nach Transfektion mit entsprechenden HLA-Molekülen werden die B-Zelllinien auf Erkennung durch antigenspezifische zytotoxische T-Lymphozyten untersucht. Aus dem Erkennungsmuster der Zelllinien und deren polymorphen Genmarkern kann die chromosomale Region, in der ein Antigen kodiert wird, eingegrenzt werden (**Tab.1.3**). Innerhalb einer solchen Region liegen meist mehrere Gene vor, von denen beispielsweise aufgrund von SNP-Analysen und dem Expressionsmuster viele als Antigenkandidaten ausgeschlossen werden können (Bleakley *et al.*, 2010; de Rijke *et al.*, 2008 & 2005; Spaapen *et al.*, 2008). Gelingt dies nicht, werden alternative Methoden zur Antigenidentifizierung herangezogen wie das cDNA-Bankscreening (Torikai *et al.*, 2006). Peptidkandidaten, die einen interessanten SNP enthalten, werden aufgrund von Vorhersageprogrammen synthetisiert und auf Erkennung durch die antigenspezifischen T-Lymphozyten untersucht (Bleakley *et al.*, 2010).

mHAg (Gen)	immunogenes Peptid (AS-Austausch)	mHAg-Frequenz	HLA-Allel	HLA-Frequenz	bevorzugte Expression	Referenz
BAP28 (HEATR1)	ISKERA <u>E</u> AL (E↔G)	50%	-B*08:01	22,5%# (HLA-B8)	hämatopoetische Zellen, leukämische Stammzellen, AML	Bleakley <i>et al.</i> , 2010
CD19 ^L (CD19)	PEIWEGEPPCLP PRD (L↔V)	53%#	-DQA1*05/B1*02	15,3%	B-Lymphozyten	Spaapen <i>et al.</i> , 2008
LRH-1 (P2X5)	TPNQRQNV <u>C</u> (<i>frameshift</i> -Mutation)	46%	-B*07:02	11% (HLA-B7)	lymphoide Zellen, CD34 ⁺ -Vorläuferzellen, myeloische Leukämien	de Rijke <i>et al.</i> , 2005

Tabelle 1.3: Übersicht über einige mittels genetischer *linkage*-Analyse identifizierter Minorhistokompatibilitätsantigene (mHAgs)

In der immunogenen Peptidregion der identifizierten mHAgs wurde die für die Erkennung entscheidende Aminosäure unterstrichen sowie die HLA-Restriktion und bevorzugte Expression der mHAgs angegeben (#: Kaukasier; AS: Aminosäure) (ergänzt mit Bleakley & Riddell, 2011; Akatsuka *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2008; Spierings & Goulmy, 2005).

1.4.3 Biochemisch-biophysikalische Analyse

Unter Verwendung biochemischer und biophysikalischer Methoden werden zur Antigenidentifizierung natürlich prozessierte Peptide analysiert, die von antigenspezifischen T-Lymphozyten erkannt werden. Der biochemische Ansatz umfasst die Ablösung von den an MHC-Molekülen gebundenen Peptiden der Patientenzellen und deren Fraktionierung mit Hilfe von *high-performance liquid chromatography* (HPLC). Die Peptidfraktionen werden anschließend auf Zielzellen mit übereinstimmenden HLA-Molekülen geladen und auf Erkennung durch zytotoxische T-Lymphozyten getestet. Positive Fraktionen werden weiter fraktioniert und ebenfalls auf Erkennung untersucht. Wird schließlich ein einzelnes Peptid erkannt, kann es biophysikalisch mittels Massenspektrometrie charakterisiert werden. Die daraufhin synthetisierten

Peptidkandidaten werden massenspektrometrisch mit dem durch HPLC isolierten Peptid verglichen und auf ihre Immunogenität getestet. Datenbankvergleiche führen zu dem antigenkodierenden Gen (**Tab.1.4**) (Brickner *et al.*, 2006 & 2001; Kawahara *et al.*, 2006; Spierings *et al.*, 2003; den Haan *et al.*, 1995).

mHAg (Gen)	immunogenes Peptid (AS-Austausch)	mHAg-Frequenz	HLA-Allel	HLA-Frequenz	bevorzugte Expression	Referenz
HA-2 (MYO1G)	YIGEVLVS <u>V</u> (V↔M)	4%	-A*02:01	43%	hämatopoetische Zellen	den Haan <i>et al.</i> , 1995
HA-3 (Lbc/ AKAP13)	V <u>I</u> EPGTAQY (T↔M)	88%	-A*01:01	8 - 25% [#]	ubiquitär	Spierings <i>et al.</i> , 2003
HA-8 (KIAA0020)	RTLDKVLE <u>V</u> (R↔P)	65%	-A*02:01	49% [#]	ubiquitär	Brickner <i>et al.</i> , 2001
PANE1k (CENPM)	R <u>V</u> WDLPGVLK (R↔Stoppcodon)	51 [^] - 75% [#]	-A*03:01	6 - 31% [#]	B-Lymphozyten, B-CLL	Brickner <i>et al.</i> , 2006

Tabelle 1.4: Übersicht über einige mittels biochemisch-biophysikalischer Analyse identifizierter Minorhistokompatibilitätsantigene (mHAg)

In der immunogenen Peptidregion der identifizierten mHAg wurde die für die Erkennung entscheidende Aminosäure unterstrichen sowie die HLA-Restriktion und bevorzugte Expression der mHAg angegeben ([^]: Japaner; [#]: Kaukasier; AS: Aminosäure) (ergänzt mit Bleakley & Riddell, 2011 & 2004; Gonzalez-Galarza *et al.*, 2011; Akatsuka *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2008; Spierings & Goulmy, 2005; Pierce *et al.*, 2001).

1.4.4 Reverse Immunologie

In der reversen Immunologie werden maligne Zellen auf Ebene des Genoms oder Transkriptoms auf signifikante Unterschiede zu normalen Zellen untersucht. Sowohl *microarray*-Analysen von Genexpressionsprofilen als auch SNP-Arrays und *next generation sequencing* werden dafür eingesetzt. Die Analyse von Genexpressionsprofilen, die auf der Quantifizierung von tausenden Genen pro Probe beruhen, kann nicht nur zur Identifizierung potenzieller Antigene (z.B. RAGE-1), sondern auch in der Diagnostik und Prognostik von etablierten und neuen AML-Subtypen sowie zur Beobachtung des Therapieverlaufs eingesetzt werden (Hombrink *et al.*, 2011; Marcucci *et al.*, 2011; Bacher *et al.*, 2010; Metzeler *et al.*, 2008; Guinn *et al.*, 2007; Bullinger & Valk, 2005). Die Sequenzierung der Genome von AML-Zellen zeigte, dass diese spezifische Mutationen in verschiedenen Genen wie z.B. *FLT3*, *NPM1* und *IDH1* aufweisen (Mardis *et al.*, 2009; Ley *et al.*, 2008).

Um potenziell immunogene Peptide von Antigenkandidaten zu identifizieren, werden Vorhersagealgorithmen für Epitope, HLA-Bindungswahrscheinlichkeiten und Proteasomschnittstellen eingesetzt (**Tab.1.5**) (DeLuca *et al.*, 2009; Hambach & Goulmy, 2005; Schuler *et al.*, 2005; Bleakley & Riddell, 2004). Die daraufhin synthetisierten Peptide (z.B. PR-1) werden zur Überprüfung ihrer Immunogenität u.a. zur Stimulation von T-Lymphozyten verwendet (Kausche *et al.*, 2006; Molldrem *et al.*, 1996). Zudem muss die natürliche Prozessierung und Präsentation der Antigene experimentell belegt werden. Dafür kann die Reaktivität von T-Lymphozyten, die durch Stimulation mit den Peptidkandidaten generiert worden sind, gegenüber Zellen mit natürlicher Antigenprozessierung wie Malignomzellen getestet werden (Bae *et al.*, 2011; Coleman *et al.*, 2011; Overes *et al.*, 2009). Zwar wurden revers immunologische Vorgehensweisen

mit bereits bekannten mHAgS (z.B. HA-1, HA-8) validiert, jedoch sind die Vorhersagealgorithmen noch nicht ausgereift (Hombrink *et al.*, 2011; Schuler *et al.*, 2005). Experimentelle Untersuchungen bleiben trotz der Weiterentwicklung der Algorithmen auch weiterhin unabdingbar. Das zeigt beispielsweise die Generierung von T-Lymphozyten durch Peptidstimulation, die entgegen der üblichen Ankermotive das mHAg HA-1 präsentiert über HLA-A*02:06 erkannt (Akatsuka *et al.*, 2007). Selbst nachdem durch bioinformatische Analysen Korrelationen zwischen dem klinischen Verlauf von transplantierten Leukämiepatienten und SNPs, die sich zwischen Spendern und Patienten unterscheiden, festgestellt wurden, bleibt die Relevanz der mHAgS durch die Existenz antigenspezifischer T-Lymphozyten experimentell zu beweisen (Armistead *et al.*, 2011).

mHAg	immunogenes Peptid (AS-Austausch)	mHAg-Frequenz	HLA-Allel	HLA-Frequenz	bevorzugte Expression	Referenz
HER2_P	k.A. (P↔A ₁₁₇₀)	k.A.	-A*02:01	43%	k.A., AML	Wenandy <i>et al.</i> , 2009
MAP4K1 _{IMA}	<u>I</u> MAIELAEL (M↔A)	k.A.	-A2	>43%	k.A.	Hombrink <i>et al.</i> , 2011

Tabelle 1.5: Übersicht über einige mittels reverser Immunologie identifizierter Minorhistokompatibilitätsantigene (mHAgS)

In der immunogenen Peptidregion der identifizierten mHAgS wurde die für die Erkennung entscheidende Aminosäure unterstrichen sowie die HLA-Restriktion und bevorzugte Expression der mHAgS angegeben (AS: Aminosäure; k.A.: keine Angabe).

1.5 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels cDNA-Expressionsklonierung Zielantigene alloreaktiver T-Lymphozyten zu identifizieren und zu charakterisieren, die Zellen akuter myeloischer Leukämien (AML) erkannten. Hierfür wurden AML-reaktive T-Zellen von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. W.Herrs (Universitätsmedizin Mainz) im Rahmen eines DFG-geförderten Verbundprojekts bereitgestellt. Dafür waren CD8⁺-Lymphozyten der HLA-Klasse I-übereinstimmenden *Buffy Coat*-Spender 730 und 940 mit AML-Zellen der Patienten MZ529- bzw. MZ987-AML stimuliert und sogenannte miniMLLCs (engl. *mixed lymphocyte leukemia cultures*, MLLCs) generiert worden (Albrecht *et al.*, 2011). Aus dem Modellsystem MZ529-AML/*Buffy Coat* 730 waren die miniMLLCs 2E8, 4D3, 7G9 und 7H1 und aus dem Modellsystem MZ987-AML/*Buffy Coat* 940 die miniMLLCs 2B8 und 2D10 verfügbar.

Vor dem Einsatz des Verfahrens der cDNA-Expressionsklonierung waren die HLA-Klasse I-Allele der Patienten MZ529- bzw. MZ987-AML in einen Expressionsvektor zu klonieren und cDNA-Banken aus den Patientenzellen zu konstruieren. Für die Identifizierung und Charakterisierung der Antigene o.g. T-Zellpopulationen waren die folgenden Arbeitsschritte vorgesehen:

- T-Zell-basiertes cDNA-Expressionscreening der cDNA-Banken,
- Klonierung antigenkodierender cDNAs,
- Eingrenzung der peptidkodierenden Regionen auf antigenkodierenden cDNAs,
- Identifizierung immunogener Peptide,
- Expressionsanalysen in malignen und benignen Zellen,
- bei Minorhistokompatibilitätsantigenen Erfassung der Allelhäufigkeiten,
- Nachweis von antigenspezifischen T-Lymphozyten in weiteren gesunden Spendern und Patienten nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation,
- Klonierung von T-Zellrezeptoren aus o.g. miniMLLCs.

Die Kenntnis einer möglichst großen Anzahl von Antigenen, die von T-Lymphozyten allogener HLA-passender Spender auf Leukämiezellen erkannt werden, würde bei der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) helfen, den gewünschten Transplantat-gegen-Leukämie (engl. *graft-versus-leukemia*, GvL)-Effekt zu verstärken und die schädigende Transplantat-gegen-Wirt (engl. *graft-versus-host*, GvH)-Erkrankung abzuschwächen. Außerdem können solche Antigene für den adoptiven Transfer von T-Zellen definierter Spezifität und für die Impfung von Patienten nach allogener HSZT zur Formierung eines protektiven immunologischen Gedächtnisses eingesetzt werden.

2 Materialien & Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborgeräte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die nachfolgenden Laborgeräte genutzt.

Gerät	Hersteller	Firmensitz
Autoklav VX-150	KSG Sterilisatoren GmbH Systec	Eichenau, Deutschland Wettenberg, Deutschland
Bakterienbrutschrank	Heraeus	Hanau, Deutschland
BD FACS Canto™II	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Brucheis-Automat	Ziegler	Isernhagen, Deutschland
¹³⁷ Cäsiumquelle Gamma cell 2000	Moolsgard Medical	Riso, Dänemark
Chemikalienwaage	Sartorius	Göttingen, Deutschland
CO ₂ -Inkubator BBD6220	Thermo Scientific Heraeus	Hanau, Deutschland
Digital Graphic Printer UP-D890	Biometra, Sony	Göttingen, Deutschland
Dispenser RepeatOne®	Starlab Eppendorf	Ahrensburg, Deutschland Hamburg, Deutschland
Elektroporationsgeräte GenePulser II, X cell™	BioRad GmbH	München, Deutschland
Eli-Punch, A-EL-VIS	Sanquin	Amsterdam, Niederlande
ELISpot-Analyse-System Axio Imager.M1 mit AxioCam MRC	Zeiss	Jena, Deutschland
Feinwaage Precisa 40SM-200A	Precisa Gravimetrics AG	Dietikon, Schweiz
Geigerzähler Monitor LB1210D	BERTHOLD technologies	Bad Wildbad, Deutschland
Geldokumentationsanlage BioDocAnalyse	Biometra	Göttingen, Deutschland
Gelelektrophoresekammern	PEQLAB	Erlangen, Deutschland
GenePower Supply GPS200/400	Pharmacia	Uppsala, Schweden
Hybridpumpe Econo-Pump	BioRad GmbH	München, Deutschland
Kolbenhubpipetten	Gilson Eppendorf	Middleton, USA Hamburg, Deutschland
Kühl- und Gefrierschränke	Bosch Liebherr	Stuttgart, Deutschland Deutschland
LightCycler® 480	Roche Applied Science	Mannheim, Deutschland
Magnete MiniMACS, µMACS	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte IKAMAG®REC-G	Janke & Kunkel GmbH u. Co.KG IKA-Labortechnik	Staufen, Deutschland
Magnetständer MACS Multi Stand	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25 Eclipse TS100	Zeiss Nikon	Jena, Deutschland Alzenau, Deutschland
Mikrowelle MWS2819	Bauknecht Hausgeräte GmbH	Stuttgart, Deutschland
Multikanalpipetten mLINE ErgoOne	BIOHIT Starlab	Helsinki, Finnland Ahrensburg, Deutschland
Packard Cobra gamma counter	Perkin Elmer LAS GmbH	Rodgau, Deutschland
pH-Meter Toledo Five easy	Mettler-Toledo GmbH	Giessen, Deutschland
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand GmbH + Co.KG	Wertheim, Deutschland

Schüttelinkubator certomat® S II & H	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Schwenker IKA-VIBRAX-VXR	Janke & Kunkel GmbH u. Co.KG IKA-Labortechnik	Staufen, Deutschland
Spectrophotometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotec	Freiburg, Deutschland
Sterile Werkbank antair BSK Hera safe	Heraeus	Hanau, Deutschland
Stickstoffbänke MVE1400 Series Chronos & Biosafe® KRYOMATC	Cryo-Tech Messer Griesheim	Bad Soden, Deutschland
Stickstoffvorratstank XL-180	Taylor-Wharton	Husum, Deutschland
Thermocycler T _{gradient} , T1, T3	Biometra	Göttingen, Deutschland
Thermomixer comfort, 5436	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Tiefkühler Hera freeze, Hera freeze basic	Thermo Scientific Heraeus	Hanau, Deutschland
Trockenschrank OV5	Biometra	Göttingen, Deutschland
Vakuumpumpe ME2C	Vacuubrand GmbH + Co.KG	Wertheim, Deutschland
Vortexer Lab dancer REAX control, REAX 2000	VWR International GmbH Heidolph Instruments GmbH & CO.KG	Darmstadt, Deutschland Schwabach, Deutschland
VF2	Janke & Kunkel GmbH u. Co.KG IKA-Labortechnik	Staufen, Deutschland
Wasserbad	GFL	Burgwedel, Deutschland
Wasserdeionisierungsanlage	Elga LabWater	Celle, Deutschland
Wasserstrahlpumpe	Brand GmbH + Co.KG	Wertheim, Deutschland
Zentrifugen Multifuge Rotina 420	Hettich	Buckinghamshire, Großbritannien
Tischzentrifuge 3S-R, Biofuge fresco Centrifuge 5424, 5415R	Costar, corning Heraeus Eppendorf	Amsterdam, Niederlande Hanau, Deutschland Hamburg, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die nachfolgenden Materialien wurden für die experimentellen Arbeiten eingesetzt.

Glas- / Plastikware	Hersteller	Firmensitz
Affinitätssäulen (HiTrap, 1 ml)	Amersham Biosciences	Freiburg, Deutschland
Autoklavier-Indikatorband	neoLab	Heidelberg, Deutschland
Bechergläser, Glas (0,5 l, 1,0 l, 2,0 l)	Jenaer Glas Schott AG	Zwiesel, Deutschland Mainz, Deutschland
Bechergläser, Kunststoff	Vitlab	Großostheim, Deutschland
CELLLine™1000 System Bioreaktor	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Cellstar Tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Duran-Glasflaschen (0,5 l, 1,0 l, 2,0 l, 5,0 l)	Schott AG Fisherbrand, Fisher Scientific GmbH	Mainz, Deutschland Schwerte, Deutschland
Einfrierröhrchen Cryo Tube™Vials Cryo-Röhrchen Cellstar®	Nunc™ Greiner bio-one	Roskilde, Dänemark Frickenhausen, Deutschland
Einmalküvetten	ratiolab® GmbH	Dreieich-Buchschlag, Deutschland
Einmalspritzen (1 ml, 10 ml, 20 ml, 50 ml)	BD Biosciences B.Braun Melsungen AG	Heidelberg, Deutschland Melsungen, Deutschland
Einwegskalpelle	Feather Safety Razor Co.	Osaka, Japan
Elektroporationsküvetten (0,1 cm, 0,4 cm)	Bio-Rad GmbH VWR International GmbH	München, Deutschland Darmstadt, Deutschland

ELISpotplatten MultiScreen [®] HTS IP Filter Plates	Millipore GmbH	Schwalbach, Deutschland
Entsorgungsbeutel	Carl Roth GmbH + Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Erlenmeyerkolben (0,5 l, 1,0 l, 2,0 l)	Jenaer Glas Schott AG	Zwiesel, Deutschland Mainz, Deutschland
Falcon [®] Rundbodenröhrchen (5 ml)	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Filtereinheiten (0,2 µm, 0,45 µm)	Whatman GmbH	Dassel, Deutschland
Handschuhe sempercare [®]	Semperit Technische Produkte GmbH	Wien, Österreich
Impfösen	Nunc [™]	Roskilde, Dänemark
Kanülen Sterican [®]	B.Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Klarsichtfolien TAPE Multiscreen [®]	Millipore GmbH	Schwalbach, Deutschland
Light Cycler [®] 480 Multiwell Plates 96	Roche Applied Science	Mannheim, Deutschland
MACS [®] Seperation Columns (MS, LS)	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Mr.Frosty [™] Cryo Einfriercontainer	Nalgene [®] Labware	Roskilde, Dänemark
Nylon-Zellsiebe (70 µm) BD Falcon [™]	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Parafilm [®]	Pechiney Plastic Packaging	Menasha, USA
Petrischalen (Ø35 mm, 60 mm, 100 mm)	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen MBP [®] 1000 TipOne (0,5 - 10 µl, 200 µl) TipOne (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Molecular BioProducts Inc. Starlab Starlab	San Diego, USA Ahrensburg, Deutschland Ahrensburg, Deutschland
Por [®] Dialysis Membrane	Spectra	Tilburg, Niederlande
Pre-Seperation Filter	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
PS-Röhrchen (0,6 ml)	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Quartzküvetten	Pharmacia Biotec	Freiburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf Greiner bio-one	Hamburg, Deutschland Frickenhausen, Deutschland
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml) Cellstar [®]	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Stericup [®] Sterilfilter (0,22 µm, 0,45 µm)	Millipore GmbH	Schwalbach, Deutschland
Thermopapier für schwarz / weiß Drucker K56HM-CR	Mitsubishi electric	Ratingen, Deutschland
TipOne [®] Repeat 5 ml Dispenser-Spitzen Combitips Plus	Starlab Eppendorf	Ahrensburg, Deutschland Hamburg, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²) Cellstar [®]	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten (mit 6, 24, 48, 96 Kultureinheiten)	Greiner bio-one Costar, corning Nunc [™]	Frickenhausen, Deutschland Amsterdam, Niederlande Roskilde, Dänemark
Zell-Zählkammern, Fuchs-Rosenthal	Marienfeld	Lauda-Königshofen, Deutschland

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Diese Chemikalien und Reagenzien wurden eingesetzt, um die Experimente durchzuführen.

Chemikalie / Reagenz	Hersteller	Firmensitz
3-Amino-9-ethyl-carbazole (AEC)	Sigma Aldrich Co.	Steinheim, Deutschland
AIM-V [®] Medium (Serum-frei 1x) mit L-Glutamin, 50 µg/ml Streptomycinsulfat, 10 µg/ml Gentamycinsulfat Gibco [®]	invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Albumin, bovin	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Ammoniumacetat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ammoniumchlorid	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Aqua	B.Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Aqua ad. iniectabilia	B.Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
β ₂ -Mikroglobulin, human	Sigma Aldrich Co.	Steinheim, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
BD Bacto [™] Agar	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
BD Bacto [™] Tryptone	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
BD Bacto [™] Yeast Extract	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
BD Cell [™] MAb Basal Medium	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
BD FACSClean	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
BD FACSTribe [™]	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
BD FACSRinse	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Bromphenolblau	Merck	Darmstadt, Deutschland
Capping Analog, M7G(5')ppp(5')G RNA	invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Chloroform (Trichlormethan)	Carl Roth GmbH + Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
⁵¹ Chrom-Radionuklid (Na ₂ ⁵¹ CrO ₄)	Perkin Elmer LAS GmbH	Rodgau, Deutschland
D PBS (Dulbeccos Phosphate Buffered Saline 1x) Gibco [®]	invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Dextran 500	Carl Roth GmbH + Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Diethyl-Pyrocbonat (DEPC)	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT), 0,1 M	invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure, 100%	Carl Roth GmbH + Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, absolut	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Fetal Bovine Serum (fötales Kälberserum, FCS)	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
Formaldehydlösung, min.37%	Merck Schuchardt OHG	Hohenbrunn, Deutschland
Formamid	Merck Schuchardt OHG	Hohenbrunn, Deutschland
Gel Red, 10.000x	Biotium Inc., VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Sigma Aldrich Co.	Steinheim, Deutschland
Histopaque [®] 1077	Sigma Aldrich Co.	Steinheim, Deutschland
Histopaque [®] 1119	Sigma Aldrich Co.	Steinheim, Deutschland
Humanserum (HS)	Transfusionszentrale Universitätsmedizin Mainz	Mainz, Deutschland
Isoamylalkohol	Merck	Darmstadt, Deutschland

Kaliumhydrogencarbonat	Riedel-de Haën	Seelze, Deutschland
L-Glutamin Gibco [®] , 200 mM	invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Lipofectamin [™] 2000 Reagent	invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Lipopolysaccharid von <i>E.coli</i> O111:B4	Sigma Aldrich Co.	Steinheim, Deutschland
LSM1077 Lymphocyte (Ficoll [™] Separation Medium)	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
Magnesiumchlorid	Merck	Darmstadt, Deutschland
(N-Morpholino)-Propansulfonsäure	Carl Roth GmbH + Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
N,N-Dimethylformamid	Carl Roth GmbH + Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Merck Schuchardt OHG	Hohenbrunn, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Opti-Mem [®] I (reduced serum Medium) mit L-Glutamin, HEPES Gibco [®]	invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
PBS Dulbecco (instamed)	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Pellet Paint [®] Ko-Präzipitant	Novagen	Bad Soden, Deutschland
Phytohämagglutinin (PHA-E)	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Propan-2-ol	Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Protein Assay	BioRad GmbH	München, Deutschland
Protein Standard	BioRad GmbH	München, Deutschland
Puffer EB (elution buffer)	Qiagen	Hilden, Deutschland
Puffer N3 (neutralization buffer)	Qiagen	Hilden, Deutschland
Puffer P1 (resuspension buffer)	Qiagen	Hilden, Deutschland
Puffer P2 (lysis buffer)	Qiagen	Hilden, Deutschland
Puffer PE (wash buffer)	Qiagen	Hilden, Deutschland
Recovery Medium	invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Roti [®] -Phenol/Chloroform (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol, 25:24:1)	Carl Roth GmbH + Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640 (1x) mit L-Glutamin Gibco [®]	invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
S.O.C.Medium	invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Star Pure Agarose	Starlab	Ahrensburg, Deutschland
SYBR [®] Gold	invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
TBE Puffer, 10x	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg, Deutschland
Transmessenger-Reagenz	Qiagen	Hilden, Deutschland
Trypanblau	Merck Schuchardt OHG	Hohenbrunn, Deutschland
Trypsin-EDTA, 1x 0,05% Gibco [®]	invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Tween [®] 20	Sigma Aldrich Co.	Steinheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid, 30%	Merck Schuchardt OHG	Hohenbrunn, Deutschland

2.1.4 Zusätze

Den Medien wurden entsprechend ihrem Verwendungszweck folgende Antibiotika bzw. Zytokine zugesetzt.

	Hersteller	Firmensitz
Antibiotikum		
Ampicillin	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
G418	Biochrom AG	Berlin, Deutschland

Kanamycin	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Pen Strep (Penicillin Streptomycin) Gibco®	invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Zytokin / Prostaglandin		
<i>Granulocyte-Monocyte Colony-Stimulating Factor</i> (GM-CSF), Leukine® sargramostim	genzyme	Neu-Isenburg, Deutschland
Interferon-gamma (IFN-γ)	Miltenyi Biotec GmbH R & D Systems	Bergisch Gladbach, Deutschland Wiesbaden, Deutschland
Interleukin-1β (IL-1β)	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Interleukin-2 (IL-2), Proleukin®S	Novartis, Sandoz Pharmaceuticals GmbH	Holzkirchen, Deutschland
Interleukin-4 (IL-4)	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Interleukin-6 (IL-6)	Promocell GmbH	Heidelberg, Deutschland
Interleukin-7 (IL-7)	R & D Systems	Wiesbaden, Deutschland
Interleukin-12 (IL-12)	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Interleukin-15 (IL-15)	R & D Systems	Wiesbaden, Deutschland
Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)	Sigma Aldrich Co.	Steinheim, Deutschland
Tumornekrosefaktor-α (TNF-α)	Promocell GmbH	Heidelberg, Deutschland

2.1.5 Lösungen, Puffer und Medien

Für die Versuche wurden die nachfolgenden Medien und Puffer angesetzt.

	Menge	Substanz
Lösung / Puffer		
Acetatpuffer für ELISpot-Assays	46 ml 110 ml 469 ml	Essigsäure, 0,2 N Natriumacetat, 0,2 N H ₂ O
AEC-Komplex für ELISpot-Assays	1 Tablette 2,5 ml 47,5 ml	3-Amino-9-ethyl-carbazole (AEC) N,N-Dimethylformamid Acetatpuffer filtriert (0,2 μm)
Avidin-Peroxidase-Komplex für ELISpot-Assays	1 Tropfen 1 Tropfen 0,1 ml 10,0 ml	Vectastain-Reagenz A Vectastain-Reagenz B Tween®20, 10% D PBS
DEPC-H ₂ O	2,0 ml 2,0 l	DEPC H ₂ O ad 20 min rühren, autoklavieren
EDTA, 0,5 M	18,6 g 100,0 ml	EDTA H ₂ O ad
Erythrozytenlyse-Puffer	82,90 g 10,00 g 0,372 g 1,00 l	NH ₄ Cl KHCO ₃ EDTA H ₂ O ad
Essigsäure, 0,2 N	11,3 g 1,0 l	Essigsäure, 96% H ₂ O ad

FACS-Fixans	1,35 ml 50,00 ml	Formaldehydlösung, min.37% D PBS ad
FACS-Puffer	0,1% 500,0 ml	Albumin, bovin D PBS filtriert (0,22 µm)
Formaldehydgel, denaturierend, 0,8%	0,56 g 56,00 ml 7,00 ml 7,00 ml 2,00 µl	Agarose H ₂ O ad MOPS, 10x Formaldehydlösung, min.37% GelRed
MACS-Puffer	0,5% 2,0 ml 500,0 ml	Albumin, bovin EDTA, 0,5 M D PBS filtriert (0,22 µm)
MOPS, 10x	41,86 g 16,70 ml 10,00 ml 1,00 l	(N-Morpholino)-Propansulfonsäure Natriumacetat, 3 M (pH 7) EDTA, 0,5 M (pH 8) DEPC-H ₂ O ad
MOPS, 1x	100 ml 900 ml	MOPS, 10x DEPC-H ₂ O
Natriumacetat, 0,2 N	16,4 g 1,0 l	Natriumacetat H ₂ O ad
Natriumacetat, 3 M	24,6 g 100,0 ml	Natriumacetat H ₂ O ad
PBS, 1x	95,5 g 10,0 l	PBS Dulbecco H ₂ O ad
RNA-Ladepuffer	100 µl 70 µl 50 µl 20 µl 271 µl	Formamid (deionisiert) Formaldehydlösung, min.37% MOPS, 10x Bromphenolblau, 2,5% DEPC-H ₂ O
TBE-Puffer, 0,5x	0,1 l 2,0 l	TBE-Puffer, 10x H ₂ O ad
Trypanblau (Gebrauchslösung)	37,5 ml 12,5 ml	Stocklösung (A) Stocklösung (B) filtriert (0,22 µm)
Trypanblau-Stocklösung (A), 0,2%	1 g 500 ml	Trypanblau H ₂ O ad
Trypanblau-Stocklösung (B), 4,5% NaCl	22,5 g 500,0 ml	NaCl H ₂ O ad
Medium		
DC-Medium	500 ml 2%	RPMI 1640 mit L-Glutamin HS, hitzeinaktiviert (45 min bei 56 °C)
Einfriermedium für Bakterien	50 ml 60%	LB-Medium Glycerol
Einfriermedium für eukaryotische Zellen	50 ml 10%	FCS / HS, hitzeinaktiviert (45 min bei 56 °C) DMSO
LB-Agar	1 l 15 g	LB-Medium Bacto™ Agar autoklaviert (30 min bei 121 °C)
LB-Medium	10 g 5 g	Bacto™ Tryptone Bacto™ Yeast Extract

	10 g 1 l	NaCl H ₂ O ad autoklaviert (30 min bei 121 °C)
Transfektionsmedium	500 ml 10%	RPMI 1640 mit L-Glutamin FCS, hitzeinaktiviert (45 min bei 56 °C)
T-Zellmedium	1000 ml 10%	AIM-V mit L-Glutamin HS, hitzeinaktiviert (45 min bei 56 °C)
Zellnährmedium	500 ml 10% 50 U/ml 50 µg/ml	RPMI 1640 mit L-Glutamin FCS, hitzeinaktiviert (45 min bei 56 °C) Penicillin Streptomycin

2.1.6 Enzyme und ihre Reaktionszusätze

Für die enzymatisch vermittelten Nuklease-Reaktionen und PCRs wurden die nachfolgenden Enzyme mit den entsprechenden Zusätzen eingesetzt.

	Hersteller	Firmensitz
Nuklease / Puffer		
DNase I, 100 mg	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, Deutschland
RNase A, 100 mg/ml	Qiagen	Hilden, Deutschland
<i>Bbv</i> CI, 2.000 U/ml	NewEngland BioLabs® Inc	Frankfurt am Main, Deutschland
<i>Bsr</i> GI, 10.000 U/ml	NewEngland BioLabs® Inc	Frankfurt am Main, Deutschland
<i>Rsa</i> I, 10.000 U/ml	NewEngland BioLabs® Inc	Frankfurt am Main, Deutschland
<i>Xba</i> I, 12 U/µl	Promega	Mannheim, Deutschland
Reaktionspuffer, 10x	NewEngland BioLabs® Inc Promega	Frankfurt am Main, Deutschland Mannheim, Deutschland
PCR-Reagenz		
Advantage®2 Polymerase Mix, 50x	Clontech	Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
Advantage®2 PCR-Puffer, 10x	Clontech	Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
dNTP Mix (je 10 mM), 50x	Clontech	Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
EasyA® High-Fidelity PCR Cloning Enzyme	Stratagene, Agilent Technologies	Kassel, Deutschland
EasyA™ Reaction Buffer, 10x	Stratagene, Agilent Technologies	Kassel, Deutschland
dNTP Mix, 10 mM	invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Perfect Taq Plus Master Mix Kit	5Prime GmbH	Hamburg, Deutschland
Ready Mix™ red taq™	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Taq DNA Polymerase, 5 U/µl	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Key Puffer mit 15 mM MgCl ₂ , 10x	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
dNTP Mix, 25 mM	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland

2.1.7 Antikörper

Antikörper wurden in der Durchflusszytometrie gekoppelt mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluoreszeinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) bzw. Allophycocyanin und in ELISpot-Assays zum Nachweis von IFN- γ eingesetzt. Magnetische *Micro Beads*, an denen spezifische Antikörper gebunden waren, wurden zur Isolation von entsprechenden Zell-Subpopulationen verwendet.

Antikörper für	Hersteller	Firmensitz
Durchflusszytometrie		
CD3 – FITC / PE	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
CD4 – FITC / PE / Allophycocyanin	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
CD8 – FITC / PE	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
CD14 – FITC / PE	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
CD15 – PE	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD16 – FITC / PE	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
CD19 – FITC	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
CD20 – PE	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
CD33 – PE	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
CD66b – FITC	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
CD80 – FITC	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
CD83 – PE	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
CD86 – FITC	BD Pharmingen™ BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
HLA-ABC – FITC	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
HLA-B13, B62, B15	OneLambda Inc.	Meerbusch, Deutschland
IgG1 – FITC + PE (Maus), Isotypkontrolle	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
IgG1 (Maus), Isotypkontrolle	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
V β 2 – PE	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
V β 11 – PE	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
V β 13.2 – PE	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
V β 14 – PE	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
V β 17 – PE	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
Goat (Fab') ₂ Fragment-anti-Maus IgG1 – FITC	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
IFN-γ-ELISpot-Assay		
Anti-human Interferon- γ mAb 7-B6-1-Biotin, 1 mg/ml	MABTECH AB	Nacka, Schweden
Anti-human IFN- γ mAb 1-D1K, 1 mg/ml	MABTECH AB	Nacka, Schweden
Magnetische Zellseparation (MACS® Miltenyi Biotec)		
CD4- <i>Micro Beads</i>	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD8- <i>Micro Beads</i>	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD14- <i>Micro Beads</i>	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD19- <i>Micro Beads</i>	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
CD20- <i>Micro Beads</i>	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach,

		Deutschland
CD66abce- <i>Micro Beads</i>	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland

HLA-spezifische monoklonale Antikörper, die mit Hilfe von Hybridomzellen produziert worden sind, fanden in der Durchflusszytometrie und in IFN- γ -ELISpot-Assays Anwendung.

Antikörper	Spezifität	Referenz
B1.23.2	anti-HLA-B, -C, -Aw19	Rebaï & Malissen, 1983
GAP.A3	anti-HLA-A3	Berger <i>et al.</i> , 1982
HB55	anti-HLA-Klasse II (HLA-DR)	Wu <i>et al.</i> , 1990
PA2.1	anti-HLA-A2	Ways & Parham, 1983
SFR8-B6	anti-HLA-Bw6, -C-Subgruppen	Radka <i>et al.</i> , 1982
W6/32	anti-HLA-Klasse I	Barnstable <i>et al.</i> , 1978

2.1.8 Molekulargewichtsmarker und Ladepuffer

Als Größenstandards in DNA- bzw. RNA-Gelen wurden in dieser Arbeit folgende Marker verwendet.

Größenstandard / Ladepuffer	Hersteller	Firmensitz
1 kb DNA ladder, 500 $\mu\text{g/ml}$	NewEngland BioLabs® Inc	Frankfurt am Main, Deutschland
Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder, 6,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Fermentas	St.Leon-Rot, Deutschland
DNA loading dye, 6x	Fermentas	St.Leon-Rot, Deutschland
RiboRuler™ High Range RNA Ladder	Fermentas	St.Leon-Rot, Deutschland
RNA loading dye, 2x	Fermentas	St.Leon-Rot, Deutschland

2.1.9 Primer

Sämtliche Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Um sie zur Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte zu verwenden, wurden die lyophilisierten Primer mit destilliertem H₂O zunächst auf eine Stockkonzentration von 100 pmol/ μl eingestellt. In den PCR-Ansätzen wurden schließlich 1 - 2 μl von 20 pmol/ μl -Lösungen eingesetzt.

Zielsequenz	Bezeichnung	Primersequenz (5' => 3')
HLA-A-, -B-, -C- Allele	2S.se	AGG GGC CGG AGT ATT GGG AC
	2N.as	GTC CCA ATA CTC CGG CCC CT
	3S.se	CGG CAA GGA TTA CAT CGC CCT G
	3N.as	CAG GGC GAT GTA ATC CTT GCC G
	4S.se	GCG GAG ATC ACA CTG ACC TGG C
	4N.as	GCC AGG TCA GTG TGA TCT CCG C
	HLA3.pA.se	CCG CGT CGA CTT GG GAG GGA GCA CAG GTC AGC GTG GGA AG
	HLA3.pB.se	GGG CGT CGA CTG GGG AGG AAA CAC AGG TCA GCA TGG GAA
	HLA3.pC.se	GGG CGT CGA CCT GCA TCT CAG TCC CAC ACA GGC
	HLA5.p2.as	GGG CGA ATT CGG ACT CAG AAT CTC CCC AGA CGC CGA G
	HLA-B15.p25.se	GTC CTC CTG CTG CTC TCG GGA GCC
	HLA-B15.p31.se	CTG CTG CTC TCG GGA GCC
HLA.B15.p427.as	CGT AGG CGG ACT GGT CA	

CYBA	CYBA.p-34.se	CGC CTA GCA GTG TCC CAG CCG
	CYBA.p-15ATG.se	CGG GTT CGT GTC GCC ATG GGG
	CYBAex1.p57.rev	TCA CAG GCC GGA CGC CAG CGC CT
	CYBAex2.p126.rev	TCA GGA GTA GGC ACC AAA GTA CC
	CYBAex3.p168.se	GGG GAA GAG GAA GAA GGG C
	CYBAex4.p192.se	TGT GGC GGG CGT GTT TGT
	CYBAex3.p202.rev	TCA GCG CTC CAT GGT GGA GCC CT
	CYBAex4.p210.rev	CTA CTG TCC CCA GCG CTC CAT GGT GGA
	CYBAex4.p213.rev	CTA CTT CTG TCC CCA GCG CTC CAT GGT
	CYBAex4.p216.rev	CTA GTA CTT CTG TCC CCA GCG CTC CAT
	CYBAex4.p219.rev	CTA CAT GTA CTT CTG TCC CCA GCG CTC
	CYBAex4.p222.rev	CTA GGT CAT GTA CTT CTG TCC CCA GCG
	CYBAex4.p225.rev	CTA GGC GGT CAT GTA CTT CTG TCC CCA
	CYBAex4.p228.rev	CTA CAC GGC GGT CAT GTA CTT CTG TCC
	CYBAex4.p231.rev	CTA CAC CAC GGC GGT CAT GTA CTT CTG
	CYBAex4.p234.rev	CTA CTT CAC CAC GGC GGT CAT GTA CTT
	CYBAex4.p237.rev	CTA CAG CTT CAC CAC GGC GGT CAT
	CYBAex5.p240.rev	CTA GAA CAG CTT CAC CAC GG
	CYBAex5.p243.rev	CTA CCC GAA CAG CTT CAC CAC
	CYBAex5.p246.vre	CTA GGG CCC GAA CAG CTT CAC CAC
	CYBAex5.p249.rev	CTA AAA GGG CCC GAA CAG CTT CAC CAC
	CYBAex5.p252.rev	CTA GGT AAA GGG CCC GAA CAG CTT CAC
	CYBAex5.p255.rev	CTA CCT GGT AAA GGG CCC GAA CAG CTT
	CYBAex5.p258.rev	CTA ATT CCT GGT AAA GGG C
	CYBAex5.p261.rev	CTA GTA ATT CCT GGT AAA GGG
	CYBAex5.p264.rev	CTA ATA GTA ATT CCT GGT AAA GGG
	CYBAex5.p267.rev	CTA AAC ATA GTA ATT CCT GGT AAA GGG
	CYBAex5.p270.rev	CTA CCG AAC ATA GTA ATT CCT GGT AAA
	CYBAex4.p283.as	GAT GCA GGA CGG CCC GAA C
	CYBAex4.p286.rev	TCA GAG ATG CAG GAC GGC CCG AA
	CYBAex5.p310.rev	TCA CAG TAG GTA GAT GCC GCT CG
	CYBA.p488.rev	CTG CTT GAT GGT GCC TCC GAT CTG CG
	CYBA.p698.rev	CTC ACG CGC TCC CGG CTT CG
	CYBAint3.p4081.se	GGT GCC TGC CCG GTG TGT
T-Zellrezeptor- ketten	capswitch oligo	AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC GGG
	T7-capswitch	TTA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GGA AGC AGT GGT AAC AAC GCA GAG T
	5'Primer	AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CG
	64T	CGA TAA AAG CTC CGG GGA TAA CAG ATT TTG C
	TRAV10*01.se	ATG AAA AAG CAT CTG ACG ACC
	TRAV13-1*02.se	ATG ACA TCC ATT CGA GCT G
	TRAV21*02.se	ATG GAG ACC CTC TTG GGC CTG C
	TRAV29/DV5*01.se	ATG GCC ATG CTC CTG GGG GC
	TRBV6-2.se	ATG AGC CTC GGG CTC CTG TGC
	TRBV19.se	ATG AGC AAC CAG GTG C
	TRBV20-1.se	ATG CTG CTG CTT CTG CTG CTT C
	TRBV25-1.se	ATG ACT ATC AGG CTC CTC TGC
	TRBV27.se	ATG GGC CCC CAG CTC CTT GGC
	C α 3'UTR	CTG TCT TAC AAT CTT GCA GAT C
	C β 1 3'UTR	CAC TTC CAG GGC TGC CTT C

	Cβ2 3'UTR	TGA CCT GGG ATG GTT TTG GAG CTA
	Cα sequencing	TTT AGA GTC TCT CAG CTG GTA CAC GG
	Cβ sequencing	TTC CCA TTC ACC CAC CAG CTC AG
β-Aktin	huBAct.p4.se	GCC GAG ACC GCG TCC GCC
	huBAct.p1236.rev	TAA CGC AAC TAA GTC ATA GTC CGC CTA
pcDNA3.1/V5-His-TOPO	T7.se	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
	BgH.as	TAG AAG GCA CAG TCC AGG

2.1.10 Synthetische Peptide

Die verwendeten Peptide wurden von der JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin, Deutschland) mit einer Reinheit von >90% synthetisiert und in DMSO auf eine Stockkonzentration von 40 mg/ml eingestellt. Anschließend wurden sie mit PBS weiter verdünnt.

Protein	Peptidsequenz (H=>OH)	Peptidposition im Protein	Peptid-bezeichnung	HLA-Restriktion	Referenz
p22phox (CYBA)	WGQKYMTAVV	68 - 77	CYBA-72Y ₆₈₋₇₇	-B*15:01	/
	WGQKHMTAVV	68 - 77	CYBA-72H ₆₈₋₇₇	-B*15:01	/
	GQKYMTAVV	69 - 77	CYBA-72Y ₆₉₋₇₇	-B*15:01	/
	GQKHMTAVV	69 - 77	CYBA-72H ₆₉₋₇₇	-B*15:01	/
pp65	NLVPMVATV	495 - 503	/	-A*02:01	Solache <i>et al.</i> , 1999
Tyrosinase	MLLAVLYCL	1 - 9	/	-A*02:01	Wölfel <i>et al.</i> , 1994
	YMDGTMSQV	369 - 377	/	-A*02:01	Skipper <i>et al.</i> , 1996
Neurales Wiskott-Aldrich Syndrom-Protein, mutiert (N-WASP ^{mut})	YPPPPPALL	343 - 351	/	-B*51:01	unveröffentlichte Daten
Sirtuin 2	KIFSEVTPK	175 - 183	/	-A*03:01	Lennerz <i>et al.</i> , 2005

2.1.11 Plasmide

Spezifische DNA-Sequenzen wurden in den Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His TOPO einkloniert. Dieser ermöglicht eine Ampicillin-abhängige Selektion von Bakterien, die rekombinante Plasmide tragen, und eine hohe Plasmidamplifikation.

Zur Herstellung der cDNA-Bank wurde das Gateway[®]-System verwendet. Dabei wurde als Übergangsvektor pDONR[™] 222 eingesetzt, der ein Kanamycin-Resistenzgen und ein von den beiden Rekombinationsstellen attP1 und attP2 flankiertes ccdB-Resistenzgen enthält.

Als Gateway[®]-kompatibler Expressionsvektor der cDNA-Bank wurde pcDNA3.1/RfA/Dest, eine modifizierte Form des pcDNA3.1-Vektors benutzt. Dieser enthält die Rekombinationskassette RfA, in der ccdB- und Chloramphenicolresistenzgene von den beiden Rekombinationsstellen attR1 und attR2 flankiert werden.

Vektor	Kit	Hersteller	Firmensitz
pcDNA3.1/V5-His TOPO	pcDNA3.1/V5-His TOPO TA Cloning Kit [®]	invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
pDONR [™] 222	Clone Miner [™] cDNA Library Construction Kit	invitrogen	Karlsruhe, Deutschland

pcDNA3.1/RfA/Dest	Gateway® Vector Conversion System	invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
-------------------	-----------------------------------	------------	------------------------

2.1.12 Molekularbiologische Kits

Für molekularbiologische Arbeiten wurden die nachfolgenden Kits verwendet.

Kit	Hersteller	Firmensitz
5x Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, StarSEQ GmbH	Mainz, Deutschland
5x Sequenzierungspuffer	Applied Biosystems, StarSEQ GmbH	Mainz, Deutschland
BD Clontech™ RNA/cDNA Quality Assay	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Clone Miner™ cDNA Library Construction Kit	invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Gateway® LR Clonase™ II Plus Enzyme Mix	invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Gateway® Vector Conversion System	invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Hi Trap™ Protein GHP	GE Healthcare Bio-Sciences AB	München, Deutschland
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, Deutschland
HiSpeed® Plasmid Maxi Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
LightCycler® 480 High Resolution Melting Kit	Roche Applied Science	Mannheim, Deutschland
Mab Trap™ Kit	GE Healthcare Bio-Sciences AB	München, Deutschland
mMESSAGE mMACHINE® T7 Ultra	Ambion Inc., Applied Biosystems	Darmstadt, Deutschland
pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO® TA Expression Kit	invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
QIAprep® 96 Turbo Miniprep Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
QIAquick® Gel extraction Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
QIAshredder™	Qiagen	Hilden, Deutschland
RiboMAX™ Large Scale RNA Production System T7	Promega	Mannheim, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Qiagen	Hilden, Deutschland
RNeasy® Mini Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
SuperScript® II Reverse Transcriptase	invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
SuperScript® III First Strand Synthesis System	invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Vectastain® Elite ABC-Kit	Vector Laboratories	Burlingame, USA

2.1.13 *Escherichia coli*-Bakterienstämme

Rekombinante Plasmid-DNA wurde in *E.coli*-Bakterien des chemisch kompetenten Stamms One Shot® TOP10 (invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) transformiert. Dieser zeichnet sich durch eine hohe Transformationseffizienz und Plasmidamplifikation aus.

Zu ihrer Amplifikation wurden die beiden Vektoren des Gateway®-Systems in den *E.coli*-Stamm One Shot® ccdB Survival™ 2 T1 Phage Resistent (invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) transformiert, der ebenfalls eine Transformationseffizienz von über 1×10^9 cfu/μg *supercoiled* DNA aufweist.

Der elektrokompetente *E.coli*-Stamm ElectroMAX™DH10B™T1 Phage Resistent (invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), der eine Transformationseffizienz von über 1×10^{10} cfu/μg DNA besitzt, wurde für die Transformation der cDNA-Bank verwendet.

<i>E.coli</i>-Stamm	Genotyp, relevante Eigenschaften
One Shot® Top 10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galJ</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i> λ ⁻
One Shot® ccdB Survival™2 T1 Phage Resistent	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>ara</i> Δ139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galJ</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i> <i>fhuA::IS2</i>
ElectroMAX™DH10B™T1 Phage Resistent	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galJ</i> <i>galK</i> λ ⁻ <i>rpsL</i> <i>nupG</i> <i>tonA</i>

2.1.14 Eukaryotische Zellen

2.1.14.1 Zellmaterial von gesunden Spendern und Patienten

Von der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz wurden aufgearbeitete *Buffy Coats* (BCs) gesunder Spender bereitgestellt. Von Leukämiepatienten, die in der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz behandelt wurden, stammte peripheres Blut bzw. Leukapheresen.

2.1.14.2 Eukaryotische Zelllinien

Sowohl aus dem Blut von gesunden Spendern als auch AML-Patienten waren mit dem Epstein-Barr-Virus transfizierte lymphoblastische Zelllinien (EBV-LCL) nach etablierten Protokollen generiert (Chen *et al.*, 2009; Palacios, 1981) und in Form von Suspensionszellen kultiviert worden. Tumore unterschiedlichen Ursprungs (z.B. Melanome, Kolon-, Pankreaskarzinome) standen in Form von adhärenen Zelllinien, Leukämien dagegen als Suspensionszellen zur Verfügung.

Für die transiente Expression von Genen wurden die eukaryotischen Zelllinien COS-7 und 293T verwendet. Die adhärenente COS-7-Zelllinie (engl. *CV-1 origin SV40*, COS) stammt von gesunden Nierenzellen eines adulten Männchens der Meerkatzenart *Cercopithecus aethiops* (Grüne Meerkatze) ab, die mit einem defekten SV40-Virus transfiziert worden sind (Gluzman *et al.*, 1981). Die semi-adhärenente 293T-Zelllinie ist durch Transfektion mit dem Adenovirus-Typ5 aus humanen embryonalen Nierenzellen generiert worden. Aufgrund des SV40-T-Antigens ist sie wie die COS-7-Linie zur Replikation von Plasmiden mit SV40-Replikationsursprung befähigt (DuBridghe *et al.*, 1987; Graham *et al.*, 1977).

L721.221-Zellen sind EBV-transfizierte B-Lymphozyten, deren HLA-Klasse I-Gene durch strahlungsinduzierte Mutagenese inaktiviert worden sind (Shimizu & DeMars, 1989). Stabile Transfektanten, u.a. für das HLA-B*15:01-Molekül, sind durch Elektroporation generiert worden.

Die Suspensionszelllinie T2, ein Hybrid aus der humanen B-lymphoblastischen Zelllinie LCL721.174 und der T-Zell-Leukämie-Zelllinie (T-LCL) CEM, zeichnet sich durch eine geringe Oberflächenpräsenz seiner HLA-Moleküle aus (Salter & Cresswell, 1986).

2.1.15 Software

Für die Erfassung und Auswertung von Daten wurden folgende Computerprogramme verwendet.

Programm	Hersteller	Firmensitz
BD FACS Diva Software	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
BioDocAnalyze	Biometra	Göttingen, Deutschland
FlowJo Vers.7.2.5	Tree Star, Inc.	Ashland, USA
KS Elispot Version 4.9	Zeiss	Jena, Deutschland
LightCycler [®] 480 SW1.5	Roche Applied Science	Mannheim, Deutschland
MegAlign	DNA Star	Madison, USA
SeqMan	DNA Star	Madison, USA

Die nachfolgenden öffentlich zugänglichen Online-Datenbanken wurden für Recherchen eingesetzt.

Online-Datenbank	Referenz
www.allelefreqencies.net	Gonzalez-Galarza <i>et al.</i> , 2011
www.cbs.dtu.dk	Larsen <i>et al.</i> , 2010
www.ebi.ac.uk/imgt/hla/allele.html	Robinson <i>et al.</i> , 2011 & 2000
www.genecards.org	Safran <i>et al.</i> , 2010
www.imgt.org	Brochet <i>et al.</i> , 2008
www.ncbi.nlm.nih.gov	/
www.proteinatlas.org	Uhlen <i>et al.</i> , 2010 & 2005
www.syfpeithi.de	Rammensee <i>et al.</i> , 1999
www.who.int	/
www-bimas.cit.nih.gov	Parker <i>et al.</i> , 1994

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultur- und Arbeitsbedingungen

Die Kultivierung sämtlicher Zellen erfolgte in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37 °C und einem Kohlendioxidgehalt von 5%. Alle zellbiologischen Arbeiten fanden unter sterilen Bedingungen statt.

Für die Zellzählungen in Fuchs-Rosenthal-Zählkammern wurde Trypanblau verwendet, um die toten Zellen für die nachfolgenden Anwendungen außer Acht zu lassen.

2.2.1.2 Kultivierung von Adhäsions- und Suspensionszellen

Suspensionszellen wie T2, L721.221 und EBV-B-transformierte Zelllinien wurden zweimal wöchentlich auf $0,3 \times 10^6$ Zellen pro ml RPMI-Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin-Streptomycin eingestellt. Kryokonservierte Leukämiezellen sind aufgetaut und über Nacht mit $1 - 2 \times 10^6$ Zellen pro ml AIM-V-Medium mit 10% HS inkubiert worden, bevor sie für einen Test oder zur Restimulation von T-Lymphozyten eingesetzt wurden.

Adhäsionszellen wie 293T, COS-7 und Tumorzelllinien wurden in RPMI mit 10% FCS und 1% Penicillin-Streptomycin zweimal wöchentlich kultiviert. Zum Ablösen der Zellen von den Kulturflaschen sind sie für 5 min mit Trypsin-EDTA inkubiert worden, welches anschließend durch Zentrifugation (1.500 rpm, 5 min) ausgewaschen wurde. Die Zellen wurden so eingestellt, dass sie nach vier Tagen eine Dichte von 70 - 80% erreichten und in IFN- γ -ELISpot-Assays eingesetzt werden konnten.

2.2.1.3 Isolation von Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation und magnetischer Separation

Aus *Buffy Coats* und Heparin-Blut wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation die peripheren mononukleären Zellen (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) isoliert. Dafür wurde das Blut zunächst mit PBS 1:1 verdünnt, auf das Lymphozyten-Trennmedium geschichtet und bei 2.500 rpm für 15 min ohne Bremse zentrifugiert. Die in der Interphase angesammelten PBMCs wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Falls notwendig wurde das Zellpellet mit einem Lysepuffer inkubiert, um die Erythrozyten zu entfernen. Die abgezählten PBMCs wurden entsprechend dem nachfolgenden Verwendungszweck weiterbehandelt oder zunächst in Aliquots kryokonserviert.

Aus den PBMCs gesunder Spender wurden mit Hilfe von magnetischen *Micro Beads*, deren Oberflächen mit anti-CD-Antikörpern versehen waren, unterschiedliche Subpopulationen (T-Lymphozyten: CD4⁺, CD8⁺; Monozyten: CD14⁺; B-Lymphozyten: CD19⁺, CD20⁺) isoliert. Dafür wurden die PBMCs zunächst mit dem MACS-Puffer gewaschen und abgezählt, so dass jeweils 10×10^6 Zellen mit 20 μ l anti-CD-*Beads* in 80 μ l MACS-Puffer bei 4 °C für 15 min inkubiert werden konnten. Nach einem Waschgang im MACS-Puffer wurden die an die magnetischen *Beads* gekoppelten Zellen (positive Fraktion) über eine Magnetsäule von den ungebundenen Zellen (negative Fraktion) getrennt. Entsprechend ihrer weiteren Verwendung wurden beide Zellfraktionen gezählt und in Kultur genommen oder kryokonserviert.

Neutrophile Granulozyten wurden aus dem Vollblut isoliert, in dem sie mit biotinylierten anti-CD66abce-Antikörpern markiert und anschließend durch Streptavidin-konjugierte Magnetbeads über eine Magnetsäule isoliert wurden. Alternativ wurden Granulozyten über einen doppelten Dichtegradienten angereichert. Dafür wurde das Histopaque[®]1119-Medium mit dem Histopaque[®]1077-Medium und dieses anschließend mit dem verdünnten Vollblut überschichtet. Nach einem Zentrifugationsschritt (700 g, 30 min, ohne Bremse) wurden die zwischen den beiden Histopaquegradienten liegenden Granulozyten abgenommen, gewaschen und gezählt.

Die Reinheit der isolierten Zellpopulationen wurde anhand charakteristischer Oberflächenmoleküle durchflusszytometrisch überprüft.

2.2.1.4 Generierung von FastDCs

Aus PBMCs wurden Monozyten isoliert, in dem 10×10^6 PBMCs in RPMI mit 2% Humanserum für 90 min bei 37 °C in Platten mit 6 Kultureinheiten (KE) kultiviert worden sind. Nicht-adhärierte Zellen wurden anschließend durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Die adhärenzten Monozyten wurden zunächst mit 1.000 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4 für 24

Stunden bei 37 °C inkubiert, um unreife dendritische Zellen (engl. *immature dendritic cells*, iDCs) zu generieren. Für die Ausdifferenzierung zu reifen DCs (engl. *mature dendritic cells*, mDCs) folgte eine 24-stündige Inkubation bei 37 °C mit 10 ng/ml IL-1 β , 10 ng/ml TNF α , 1.000 U/ml IL-6 und 1 μ g/ml PGE₂ (Dauer *et al.*, 2003).

2.2.1.5 Stimulation von allogenen miniMLLCs

Innerhalb der von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten Klinischen Forschergruppe 183 waren allogene gemischte Lymphozyten-Leukämie-Kulturen (engl. *mixed lymphocyte leukemia cultures*, MLLCs) zur Verfügung gestellt worden. Diese sind in 96 KE-Platten durch wiederholte Stimulation von naiven CD8⁺-Lymphozyten gesunder HLA-Klasse I-passender *Buffy Coat*-Spender mit bestrahlten AML-Blasten von Patienten generiert (sog. miniMLLCs) und nach Expansion als Aliquots kryokonserviert worden. In dem Modell MZ529-AML/*Buffy Coat* 730 entstanden auf diese Weise die miniMLLCs 2E8, 4D3, 7G9 und 7H1 und in dem Modell MZ987-AML/*Buffy Coat* 940 2B8 und 2D10 (Albrecht *et al.*, 2011).

Für ihre Restimulation wurden die miniMLLCs wöchentlich im Verhältnis 1:1 mit bestrahlten AML- (35 Gy) bzw. EBV-transformierten B-Zellen (100 Gy) des entsprechenden Patienten in 24 KE-Platten rekultiviert. Dem AIM-V-Medium wurde dabei 10% HS, 250 U/ml IL-2, 5 ng/ml IL-7 und 5 ng/ml IL-15 zugesetzt. Fünf bzw. sechs Tage nach Stimulation wurden die miniMLLCs in Assays verwendet.

2.2.1.6 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

Zur Lagerung wurden Humanzellen in HS mit 10% DMSO und Zelllinien in FCS mit 10% DMSO portionsweise aufgenommen und in Einfrierboxen mit einer Geschwindigkeit von -1 °C/min auf -80 °C abgekühlt. Dem schloss sich die Aufbewahrung in Stickstoff an.

2.2.1.7 In vitro-Peptidstimulation

Für *In vitro*-Peptidstimulationen wurden PBMCs oder CD8-selektionierte Zellen eingesetzt. Sowohl PBMCs als auch CD8⁻-Zellen wurden für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 20 mg Peptid inkubiert und anschließend ungebundenes Peptid durch zweimaliges Waschen entfernt. Die PBMCs wurden mit 1,5x10⁵ Zellen pro KE in 96 KE-Rundbodenplatten ausgesät. Bei den CD8-selektionierten Zellen wurden die mit 35 Gy bestrahlten CD8⁻-Zellen mit 1x10⁴ Zellen pro KE zur Stimulation von 1,5x10⁵ autologer CD8⁺-Lymphozyten pro KE verwendet. Bei beiden Ansatzvarianten wurden die Zellen in AIM-V-Medium mit 10% HS unter Zugabe von 20 U/ml IL-2, 10 U/ml IL-4, 10 ng/ml IL-7 und 25 ng/ml IL-21 kultiviert.

Wöchentlich wurden zur Restimulation neue PBMCs bzw. CD8⁻-Zellen mit Peptid beladen, bestrahlt und gemeinsam mit den Zytokinen den Ansätzen zugegeben. Nach 2 Wochen wurde kein IL-21 mehr zugesetzt.

2.2.1.8 IFN- γ -ELISpot-Assay

IFN- γ -ELISpot-Assays (engl. *enzyme-linked immunosorbent spot*, ELISpot) basieren auf der Freisetzung des Zytokins Interferon- γ (IFN- γ) durch T-Lymphozyten bei Antigenkontakt und dessen Nachweis durch Bindung an Enzym-gekoppelte IFN- γ -spezifische Antikörper.

Für IFN- γ -ELISpot-Assays wurden Millipore-Filterplatten mit 35%-igen Ethanol aktiviert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen, um sie dann mit 10 $\mu\text{g/ml}$ anti-human-IFN- γ -Erstantikörper (mAb 1-D1K) über Nacht bei 4 °C zu inkubieren. Dadurch konnte der konstante Fc-Teil des Antikörpers an die Plattenmembran binden, während sein gegen IFN- γ gerichtetes Fab-Fragment unbesetzt blieb. Nach dreimaligem Abwaschen ungebundener Antikörpermoleküle mit PBS wurden die Zielzellen 293T bzw. COS-7 mit 2×10^4 Zellen pro Testeinheit (TE) in RPMI mit 10% FCS ausgesät. Anschließend wurden sie durch Lipofectamin[®]2000 transient mit Plasmiden, die HLA- (100 ng/TE) bzw. Antigen-cDNA (300 ng/TE) kodierte, transfiziert. Der Inkubation über Nacht bei 37 °C folgte das Hinzufügen der T-Lymphozyten mit 1 - 2×10^4 Zellen/TE in AIM-V-Medium mit 10% HS. Malignom- und EBV- transformierte B-Zellen wurden mit 5×10^4 Zellen pro TE am gleichen Tag ausgesät. Des Weiteren wurden gegebenenfalls Peptide bzw. Antikörper, die in den verwendeten Konzentrationen eine Blockade der Antigenerkennung durch T-Lymphozyten mit entsprechender HLA-Restriktion bewirkten, hinzugefügt. Die Entwicklung der ELISpot-Platten fand nach Inkubation über Nacht bei 37 °C statt. Dabei wurden diese zunächst sechsmal mit PBS mit 0,05% Tween[®]20 gewaschen, um anschließend für 1 Stunde bei 37 °C mit 2 $\mu\text{g/ml}$ des anti-human-IFN- γ -Detektionsantikörpers (mAb7-B6-1) inkubiert zu werden. Dieser Zweitantikörper ist gegen ein weiteres Epitop von IFN- γ gerichtet und biotinyliert. Nach erneuter Waschung mit PBS und 0,05% Tween[®]20 erfolgte eine einstündige Inkubation im Dunkeln mit einem Konjugat aus Avidin und biotinylierter Peroxidase. Durch Waschung in PBS mit und anschließend ohne Tween[®]20 wurden die ungebundenen Peroxidase-Komplexe entfernt. Mit Hilfe des AEC-Substrats wurde schließlich das bei Antigenerkennung von den T-Lymphozyten sezernierte und an den ELISpot-Antikörpern gebundene IFN- γ als rötliche *Spots* nachgewiesen.

Zur Auswertung der *Spot*-Anzahl wurden Computer-gestützte Videobildanalysen durchgeführt. Dabei wurden die *Spots* jeder Testeinheit automatisch über ein Auflichtmikroskop in fünffacher Vergrößerung von einer Kamera erfasst und mit der KS ElispotSoftware Version 4.9 gemessen.

2.2.1.9 ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Assay

In einem ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Assay wurde die zytotoxische Kapazität von CD8⁺-Lymphozyten gegenüber Zielzellen getestet, die mit deren Antigen in Form von Peptiden beladen worden sind bzw. es natürlich präsentierten. Dafür wurden 5×10^5 Zielzellen in 50 μl FCS aufgenommen und mit 100 μCi Na₂⁵¹CrO₄ für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der radioaktiven Markierung der Zellen wurde das nicht-aufgenommene Na₂⁵¹CrO₄ durch viermaliges Waschen mit PBS bzw. AIM-V mit 10% HS entfernt. Anschließend erfolgte die Einstellung auf 2×10^3 Zellen pro 100 μl AIM-V mit 10% HS und die Ausplattierung in eine 96 TE-Spitzbodenplatte. Die entsprechenden Peptide wurden als 1:10-Verdünnungsreihe (10^5 - 10^{-1} ng/ml) hinzugefügt.

Aufgrund von Vortests wurde eine zehnmal höhere Anzahl an CD8⁺-Lymphozyten (miniMLLC 2E8) als an Zielzellen eingesetzt, um eine optimale Lyseaktivität zu gewährleisten. Für die Ermittlung der Spontanfreisetzung des ⁵¹Chrom-Nuklids wurden die Zielzellen stattdessen mit PBS bzw. für die maximale Freisetzung mit einer 1%-igen Tween[®]20-PBS-Lösung für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nachdem die Zellen abzentrifugiert worden sind, wurde zur Messung der freigesetzten Radioaktivität der Überstand abgenommen. Zur Berechnung der spezifischen Lyse wurde folgende Formel verwendet: $(\text{Messwert} - \text{Spontanfreisetzung}) / (\text{maximale Freisetzung} - \text{Spontanfreisetzung}) \times 100 = \text{spezifische Lyse [\%]}$.

Parallel zu dem ⁵¹Chrom-Freisetzungs-Assay wurde ein IFN- γ -ELISpot-Assay mit denselben Zellen und Ansätzen, aber angepassten Zellzahlen, durchgeführt.

2.2.1.10 Durchflusszytometrie (FACS)

Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, an denen fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt sind, können in der Durchflusszytometrie (engl. *fluorescence activated cell sorting*, FACS) zellcharakteristische Oberflächen- und intrazelluläre Moleküle nachgewiesen werden.

Zur Markierung ihrer Oberflächenmoleküle wurden Zellen für 20 min mit Fluorochrom-gekoppelten oder unmarkierten Antikörpern, die spezifisch gegen bestimmte Zielmoleküle gerichtet waren, bei 4 °C inkubiert und anschließend mit FACS-Puffer gewaschen. Proben, die mit unmarkierten Antikörpern inkubiert worden sind, wurden danach mit FITC-markierten *Goat-anti-Mouse*-Antikörpern bei 4 °C inkubiert und gewaschen. Abschließend wurden die Zellen mit FACS-Fixans fixiert und im BD FACS Canto[™]II vermessen.

2.2.1.11 Peptid-Shift-Assay

T2-Zellen exprimieren zwar HLA-Moleküle wie HLA-A*02:01 und -B*51:01, aber aufgrund ihrer TAP-Defizienz sind sie zu keiner effektiven HLA-abhängigen Präsentation von endogenen Peptiden auf ihrer Zelloberfläche befähigt. Die Bindung exogener Peptide an die HLA-Moleküle stabilisiert deren Oberflächenpräsenz, was durchflusszytometrisch mit HLA-spezifischen Antikörpern nachweisbar ist.

Für den Peptid-Shift-Assay wurden kultivierte T2-Zellen nach zweimaliger Waschung mit 1×10^6 Zellen in 880 μ l AIM-V-Medium in 48 KE-Platten ausgesät. Ihnen wurden 50 μ l von 2 mg/ml-Peptidlösungen gemeinsam mit 10 μ g β_2 -Mikroglobulin hinzugefügt. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen mit FACS-Antikörpern, die spezifisch für HLA-Klasse I-, HLA-B/C- bzw. HLA-A2-Moleküle waren, markiert und nach Fixierung im BD FACS Canto[™]II gemessen.

2.2.1.12 Kultivierung von Antikörper-produzierenden Hybridomzellen und Antikörperaufreinigung

Hybridomzellen wurden zunächst mit 2×10^5 Zellen/ml in RPMI mit 10% FCS und 1% Penicillin-Streptomycin kultiviert, um ein exponentielles Wachstum zu erreichen. Dann wurde stufenweise das Standardmedium mit dem MAb-Medium, das 20% FCS und 1% L-Glutamin enthielt, ersetzt. Nach mehreren Passagen wurden 30×10^6 Zellen in 15 ml von diesem Medium in

die Zellkammer der CELLline-Bioreaktorflaschen überführt. Deren Nährstoffkammer wurde mit MAb-Medium inkl. 1% L-Glutamin gefüllt. Nach 7 bis 14 Tagen Inkubation bei 37 °C wurden die Hybridomzellen zusammen mit dem freigesetzten Antikörper aus der Zellkammer entfernt und abzentrifugiert. Der Antikörper-haltige Überstand von mehreren solchen Passagen wurde gesammelt. Parallel weiterkultivierte Hybridomzellen wurden zur erneuten Befüllung der Zellkammer in der Bioreaktorflasche verwendet.

Für die Antikörperaufreinigung wurden die gesammelten Fraktionen zunächst auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt und filtriert. Dann wurden die Antikörperfraktionen über eine Affinitätssäule (Hi Trap™ Protein GHP-Säule) geführt, die zuvor mit einem Bindungspuffer des Mab Trap™ Kits äquilibriert worden ist. Nach der Elution der gebundenen Antikörper wurde die Antikörperlösung in Dialyseschläuche gefüllt und über Nacht bei 4 °C in PBS inkubiert. Abschließend wurden die Antikörper steriltrifert und für die Lagerung bei -20 °C aliquotiert. Für die Konzentrationsbestimmung ist sowohl von den aufgereinigten Antikörpern als auch von einem Proteinstandard eine 1:2-Verdünnungsreihe hergestellt worden, die anschließend 1:5 mit der BioRad Protein-Assay-Lösung verdünnt und photometrisch vermessen wurden. Die aufgereinigten Antikörper, die gegen spezifische HLA-Moleküle gerichtet sind, wurden außerdem in IFN- γ -ELISpot-Assays in unterschiedlichen Konzentrationen auf ihre Fähigkeit die Antigenerkennung durch T-Lymphozyten mit entsprechender HLA-Restriktion zu blockieren geprüft.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Photometrische Konzentrationsbestimmungen

Für die photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, wobei eine Absorptionseinheit bei DNA 50 μ g und bei RNA 40 μ g entsprach. Die Konzentration von Proteinen wurde entsprechend bei deren Absorptionsmaximum von 280 nm ermittelt. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm diente als Maß für die Reinheit der Proben.

2.2.2.2 Isolation genomischer DNA

Unter Verwendung des QIAamp®DNA Mini Kits wurde aus eukaryotischen Zellen die genomische DNA extrahiert. Dafür wurden die Zellen durch den Puffer AL bei 56 °C in Anwesenheit der Proteinase K lysiert und anschließend das Lysat zusammen mit 100%-igen Ethanol über eine Säule abzentrifugiert. Dabei band die DNA an die Kieselgelmembran der Säule. Dem folgten Zentrifugationen mit den beiden Waschpuffern AW1 und AW2, um Verunreinigungen zu beseitigen. Abschließend wurde die Konzentration der in A.dest. eluierten DNA photometrisch bestimmt. Die Lagerung der genomischen DNA erfolgte bei -20 °C.

2.2.2.3 Isolation von RNA

Für die Isolierung der gesamten RNA von eukaryotischen Zellen wurde das RNeasy® Mini Kit verwendet. Mit PBS gewaschene Zellen wurden durch den mit β -Mercaptoethanol versetzten

RLT-Puffer lysiert und direkt auf Eis gestellt oder bei -80 °C gelagert. Durch die Zentrifugation über QIAshredder™-Säulen wurden die Lysate zunächst homogenisiert. Unter Zusatz von Ethanol erfolgte dann die Bindung der RNA an die Quarzmembran von Zentrifugationssäulen. Die anschließenden Zentrifugationen mit dem Puffer RW1 und dem Ethanol-haltigen RPE-Puffer dienten der Reinigung. Eluiert wurde die RNA in RNase-freiem Wasser. Nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

2.2.2.4 cDNA-Synthese

Für die reverse Transkription mit dem SuperScript®III First Strand Synthesis System wurden maximal 5 µg RNA zunächst mit 50 µM Oligo dTs und 10 mM dNTPs für 5 min bei 65 °C inkubiert. Nach der Anlagerung dieser unspezifischen Primer erfolgte die Synthese der komplementären DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA) innerhalb von 50 min bei 50 °C unter Verwendung von 200 U SuperScript®III Reverse Transkriptase, 25 mM MgCl₂, 0,1 M DTT, 10x Reaktionspuffer sowie 40 U von dem RNase-Inhibitor RNase Out. Im Anschluss wurden durch 5-minütige Inkubation bei 85 °C die Enzyme deaktiviert. Abschließend wurde die RNase H hinzugefügt und bei 37 °C für 20 min inkubiert, um die RNA-Matrizen abzubauen. Die gesamten Reaktionen wurden mit A.dest. 1:5 verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.2.2.5 Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCRs)

Polymerase-Ketten-Reaktionen (engl. *polymerase chain reactions*, PCRs) ermöglichen unter Einsatz von Sequenz-spezifischen Primern die Amplifikation von definierten DNA-Abschnitten.

Für eine PCR sind neben den Primern und der Ausgangsmatrize eine Polymerase mit entsprechendem Puffer und dNTPs notwendig. Letztere lagen miteinander kombiniert (Perfect Taq Plus Master Mix Kit, Ready Mix™ red taq™) oder einzeln (EasyA-, Advantage®2-, VWR-Taq-Polymerase-Kit) vor. Wegen ihrer hohen Genauigkeit wurde für die Synthese und Klonierung von Amplikons die EasyA-Polymerase eingesetzt. Die Perfect Taq Plus Master Mix, Ready Mix™ red taq™ und VWR-Taq-Polymerase-Kits wurden zum Nachweis definierter Amplikons verwendet.

Die PCRs erfolgten in einem Volumen von 20 oder 50 µl unter Einsatz von 10 bzw. 20 pmol jedes Primers. Die PCR-Programme umfassten zur Auftrennung der DNA-Doppelstränge eine initiale Inkubation bei 95 °C, die bei DNA-Matrizen 5 min und bei transformierten Bakterienkulturen 10 min andauerte. Danach fand die Amplifikation durch die meist 35-fache Wiederholung der nachfolgenden Schritte statt: (1) Einzelstranggenerierung bei 95 °C für 30 sec, (2) Anlagerung der Primer bei Primer-abhängiger Temperatur und Zeit, (3) Elongation der Primer bei 72 °C für eine von der Amplikonlänge abhängigen Zeit, wobei 1 Minute pro 1 kb als Grundlage festgesetzt wurde. Um alle Elongationen vollständig abzuschließen, folgte eine finale 8-minütige Inkubation bei 72 °C. Abhängig von der Zielsetzung wurden die PCR-Produkte anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt oder aufgereinigt.

Für die CYBA-Genotypisierungen wurde das High Resolution Melting Kit im LightCycler®480 eingesetzt, der *real-time* PCRs ermöglicht. Das Kit enthält einen fluoreszierenden

Farbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert und so ein Verfolgen der Menge sowie des Zustands der DNA ermöglicht. Dafür wurde im 96 TE-Format der 2x Mastermix des Kits mit den Primern CYBAint3.p4081.se und CYBAex4.p283.rev, $MgCl_2$ und genomischer DNA verschiedener Spenderproben verwendet. Nach 10 sec bei 95 °C folgte die Amplifikation innerhalb von 45 Zyklen [(1) 10 sec bei 95 °C, (2) 15 sec bei 65 °C, (3) 12 sec bei 72 °C], wobei nach jedem Elongationsschritt eine Fluoreszenzmessung stattfand. Dem schloss sich die Erzeugung einer Schmelzkurve an. Dabei folgte der vollständigen Auftrennung der DNA-Doppelstränge bei 95 °C für 1 min die Zusammenlagerung der Einzelstränge bei 40 °C für 1 min. Ausgehend von 1 sec bei 65 °C fand dann zur Auftrennung der DNA-Doppelstränge ein langsamer Temperaturanstieg mit einer Geschwindigkeit von 0,02 °C/sec auf 95 °C statt, der begleitet war von einer kontinuierlichen Fluoreszenzmessung.

2.2.2.6 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen spezifische DNA-Sequenzen, die oft palindromisch sind. Sie lagern sich an die doppelsträngige DNA an und durchtrennen diese mit einem charakteristischen Überhang von Basen oder mit glatten Enden.

Sowohl zur Überprüfung von DNA-Sequenzen als auch zur Linearisierung von Plasmiden wurden Restriktionsreaktionen angesetzt. Dafür wurden von jedem Restriktionsenzym 10 U pro μg DNA eingesetzt. Gemeinsam mit einem entsprechenden Puffer wurde die DNA mit den Endonukleasen für mindestens 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.7 Aufreinigung von Reaktionsprodukten

Für die weitere Verwendung von Produkten enzymatischer Reaktionen wurden die Reaktionsansätze von PCRs und Restriktionsverdauen mit Hilfe des High Pure PCR Product Purification Kits aufgereinigt. Dafür wurden die Reaktionsansätze gemeinsam mit dem Bindungspuffer auf Zentrifugationssäulen mit Glasfibernembran aufgetragen. Die gebundenen DNA-Stücke wurden anschließend zweimal mit dem Waschpuffer abzentrifugiert, um Verunreinigungen zu beseitigen. Nach ihrer Elution in A.dest. konnten die aufgereinigten Reaktionsprodukte weiterverwendet werden.

2.2.2.8 Gelelektrophorese von DNA und RNA

In der Gelelektrophorese findet eine Auftrennung von geladenen Molekülen anhand ihrer Größe statt, da sie durch ein elektrisches Feld zur Durchquerung eines Gelnetzes gezwungen werden.

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Stücken wurden Agarosegele verwendet. Diese bestanden aus Agarose und 0,5x TBE-Puffer, versetzt mit dem Nukleinsäurefarbstoff GelRed. Entsprechend der Größe der erwarteten DNA-Stücke waren die Gele unterschiedlich konzentriert. Als Laufpuffer diente der 0,5x TBE-Puffer.

RNA-Proben wurden in denaturierenden Formaldehydgelen unter Einsatz des 1x MOPS-Puffers als Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Sowohl die RNA-Proben als auch der RNA-Marker wurden vor Auftragung auf ein Gel mit einem RNA-Ladepuffer versetzt und für 8 min bei 72 °C inkubiert.

2.2.2.9 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Aus Agarosegelen wurden mit Hilfe des QIAquick® Gel extraction Kits DNA-Stücke der jeweils gesuchten Größe isoliert. Dabei wurde die ausgeschnittene DNA-Bande entsprechend ihres Gewichts mit dem salzreichen Puffer QG versetzt und zum Schmelzen der Agarose für 10 min bei 50 °C inkubiert. Nach Hinzufügen von Isopropanol erfolgte die Zentrifugation über eine Säule mit Quarzmembran. Um Kontaminationen zu beseitigen, wurde die daran gebundene DNA mit zwei Puffern gewaschen. Die anschließende Eluierung erfolgte mit A.dest oder dem salzarmen EB-Puffer.

2.2.2.10 Ligation von Inserts mit dem Expressionsplasmid pcDNA3.1/V5-His TOPO

Aufgrund seines CMV-Promotors ist der Vektor pcDNA3.1/V5-His TOPO in der Lage eine starke und konstitutive Expression von integrierten DNA-Sequenzen in eukaryotischen Zellen zu ermöglichen.

Wird eine PCR mit einer Taq-Polymerase durchgeführt, dann wird den Reaktionsprodukten an das 3'-Ende ein überschüssiges Deoxyadenosin angefügt. Dieses ermöglicht mit hoher Effizienz die Ligation mit dem linearisierten pcDNA3.1/V5-His TOPO-Vektor, der mit dem komplementären Überhang aus Deoxythymidin ausgestattet worden ist. Dafür wurden aufgereinigte Reaktionsprodukte mit dem Vektor in Anwesenheit einer Salzlösung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.2.11 Transformation und Kryokonservierung von *E.coli* TOP10

Um Plasmide zu vervielfältigen, wurden sie in den chemisch kompetenten *E.coli*-Stamm TOP10 übertragen. Für die Transformation von *E.coli* TOP10 wurden Plasmide gemeinsam mit den Bakterien für 30 min auf Eis inkubiert. Durch den nachfolgenden 30-sekündigen Hitzeschock bei 42° C und der Inkubation auf Eis für 5 min erfolgte die Aufnahme der Plasmide. Für 1 Stunde wurden die Transformanten dann im S.O.C.Nährmedium bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden sie auf Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit Hilfe einer Orientierungs-PCR konnten dann von den gewachsenen Bakterienkolonien die ausgewählt werden, deren Plasmid ein richtig orientiertes *Insert* enthielt. Von diesen wurden Flüssigkulturen in LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin angesetzt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterien wurden schließlich als Glycerolstocks, d.h. in LB-Medium mit 15% Glycerol, bei -80 °C gelagert oder ihre Plasmide isoliert.

2.2.2.12 Isolation von Plasmiden (Miniprep, Maxiprep)

Rekombinante Plasmide wurden aus 5 ml-Bakterienkulturen mit Hilfe des QIAprep[®]Spin Miniprep Kits und aus 200 ml-Kulturen mit Hilfe des HiSpeed[®]Plasmid Maxi Kits isoliert und bei -20 °C gelagert.

Für einen Miniprep wurden die Bakterien zunächst abzentrifugiert, um das Pellet anschließend in den Resuspensionspuffer P1 mit der RNase A aufzunehmen. Nach einer 5-minütigen Inkubation mit dem Lysepuffer P2 wurden durch den Neutralisierungspuffer N3 die freigesetzten Proteine ausgefällt. Das Zellysate wurde abzentrifugiert, so dass mit dem Überstand die DNA auf eine Zentrifugationssäule übertragen werden konnte. In Anwesenheit der salzreichen Puffer band die DNA an die Kieselgelmembran der Säule. Dem zweimaligen Waschen durch Zentrifugation mit einem Ethanol-haltigen Puffer folgten die Elution der DNA mit dem salzarmen EB-Puffer und die photometrische Konzentrationsbestimmung.

Für einen Maxiprep wurden die Bakterien ebenfalls abzentrifugiert, das Pellet in den Resuspensionspuffer P1 aufgenommen, mit dem Puffer P2 lysiert und der Puffer N3 zur Neutralisierung zugesetzt. Die ausgefallenen Proteine wurden durch Filtration entfernt. Das aufgereinigte Bakterienlysate wurde anschließend in eine Filtersäule, die zuvor durch den Puffer QBT äquilibriert worden ist, übertragen und mit dem Puffer QC gewaschen. Die in den Elutionspuffer QF aufgenommene DNA wurde mit Isopropanol gefällt und anschließend auf eine weitere Filtermembran aufgetragen, an die die DNA band. Einem Waschgang mit 70%-igem Ethanol folgte die Elution mit dem EB-Puffer und die Konzentrationsbestimmung der DNA.

2.2.2.13 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden von der Firma StarSEQ[®] (Mainz, Deutschland) mit ABI 3730 Kapillarsequenzern von Applied Biosystems[™] durchgeführt. Während für Sequenzierungen von Plasmiden diese mit 10 pmol von einem entsprechenden Primer eingeschickt worden sind, wurden die Sequenzierungsreaktionen für PCR-Produkte selbst angesetzt. Dafür wurden 170 - 350 ng der PCR-Produkte mit 5 pmol von einem entsprechenden Primer, dem 5x Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit und dem dazugehörigen 5x Sequenzierungspuffer für 3 min bei 96 °C inkubiert und in 30 Zyklen mit 10 sec bei 96 °C und 4 min bei 55 °C amplifiziert.

2.2.2.14 Phenol-Chloroform-Extraktion

Während der Phenol-Chloroform-Extraktion wurde der RNA im Verhältnis 1:1 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:1:24) zugesetzt und abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit Chloroform-Isoamylalkohol (1:24) abzentrifugiert, um das verbliebene Phenol zu entfernen. Die nun entstandene obere Phase wurde mit 300 mM Natriumacetat und dann mit einem Überschuss an 100%-igem Ethanol versetzt. Die Fällungsreaktion fand innerhalb von 20 min bei -80 °C oder über Nacht bei -20 °C statt. Nach einstündiger Zentrifugation bei 4 °C wurde das Pellet zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Nachdem der Ethanol komplett verdunstet war, wurde das RNA-Pellet in DEPC-Wasser aufgenommen und die RNA-Konzentration photometrisch gemessen.

2.2.2.15 Generierung von polyadenylierter IVT-RNA

Mit den beiden Kits RiboMAX™ LargeScale RNA Production System T7 und mMessage mMachine® T7 Ultra Kit wurde polyadenylierte RNA durch *In vitro*-Transkription (IVT) synthetisiert unter Verwendung von rekombinanten Plasmiden, die mit einem T7-RNA-Polymerase-Promotor ausgestattet waren.

Für die IVT mit dem System T7-Kit wurden 2,5 µg eines linearisierten Plasmids eingesetzt und mit den vier rNTPs ATP, CTP, UTP und GTP, der T7-RNA-Polymerase und dem entsprechenden T7-Puffer sowie zur Erhöhung der RNA-Stabilität und Translationseffizienz einem Capping Analog für 3 Stunden bei 37 °C und abschließend für 10 min bei 70 °C inkubiert. Dem folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion zur Aufreinigung der IVT-RNA. Für die Polyadenylierung der aufgereinigten IVT-RNA musste der Bedarf an ATPs für einen 300 bp langen Überhang und an Poly(A)-Polymerase zunächst berechnet werden. Dann erfolgte eine einstündige Inkubation der IVT-RNA mit den ATPs und der Polymerase in einem entsprechenden Puffer bei 37 °C. Nach der Aufreinigung der polyadenylierten IVT-RNA durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion wurde photometrisch die Konzentration bestimmt.

Um polyadenylierte RNA mit dem T7 Ultra Kit zu synthetisieren, wurde jeweils 1 µg eines linearisierten Plasmids eingesetzt und gemeinsam mit den NTPs, dem Cap-Analog ARCA, einem T7-Enzymmix und dem entsprechenden Puffer für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde zum Abbau der DNA-Matrize die TURBO DNase für 15 min bei 37 °C hinzugegeben. Für die Polyadenylierung der IVT-RNA wurde direkt die Polymerase E-PAP mit ihrem Puffer sowie ATPs und MnCl₂ hinzugefügt und der gesamte Ansatz für 45 min bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurde die polyadenylierte IVT-RNA durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt und die Konzentration photometrisch gemessen.

Die Qualität der IVT-RNAs wurde gelelektrophoretisch in denaturierenden Formaldehydgelen überprüft. Ihre Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.2.16 Konstruktion einer cDNA-Bank aus EBV-transformierten B-Zellen des AML-Patienten MZ529

Zur Konstruktion der cDNA-Bank des AML-Patienten MZ529 (s. **Anhang 5.1**) wurde aus 200×10^6 MZ529-EBV-B-Zellen die gesamte RNA mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits isoliert, wofür mehrere Zentrifugationssäulen eingesetzt wurden. Von dem in RNase-freiem Wasser gepoolten Eluat wurde photometrisch die Konzentration bestimmt und mit einem denaturierenden Formaldehydgel die Integrität der RNA überprüft.

Für die Isolation der polyadenylierten mRNAs von den tRNAs und rRNAs, die über 95% der zellulären RNAs ausmachen, wurde das Oligotex® mRNA Mini Kit verwendet. Dabei wurde die extrahierte Gesamt-RNA zunächst mit der Oligotex-Suspension und dem salzreichen Puffer OBB für 3 min bei 70 °C inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNAs zu zerstören. Während der anschließenden 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur konnten die polyA-Enden der mRNAs mit den dC₁₀T₃₀-Oligonukleotiden auf der Oberfläche der Oligotex-Polystyrol-Latexpartikel hybridisieren. Nachdem die Oligotex-Partikel mit den gebundenen mRNAs herunterzentrifugiert

und der Überstand abgenommen worden ist, wurden sie zweimal mit dem Puffer OW2 gewaschen. Die darauf folgende Inkubation in dem 70 °C heißen Puffer OEB führte zur Lösung der mRNAs von den Partikeln, die schließlich durch Zentrifugation entfernt wurden.

Um die Qualität der gewonnenen polyadenylierten mRNAs zu kontrollieren, wurde der BD Clontech™ RNA/cDNA Quality Assay eingesetzt. Ausgehend von den polyadenylierten mRNAs wurden dabei mit Oligo(dT)-Primern und der PowerScript Reversen Transkriptase in Anwesenheit des entsprechenden 5x Puffers, dNTPs und DTT einzelsträngige cDNAs bei 42 °C innerhalb von 75 min synthetisiert. Diese dienten als Matrize für eine PCR, bei der von einem *housekeeping* Gen ein Fragment am 5'- und eines am 3'-Ende amplifiziert werden sollten. Dafür wurde die Advantage®2 Polymerase mit dem Primer-Mix für das 5'- und das 3'-Fragment sowie dNTPs und dem Advantage®2 PCR-Puffer eingesetzt. Nach einer initialen Inkubation bei 94 °C für 4 min folgten 25 Amplifikationszyklen [(1) 30 sec bei 95 °C, (2 & 3) 2 min bei 68 °C]. Dann wurden 5 µl aus dem PCR-Ansatz entfernt. Dem schlossen sich neun weitere solche Zyklen an, wobei nach jedem dritten Zyklus ein 5 µl-Aliquot entnommen wurde. Diese vier Aliquots wurden auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Da die Banden der beiden PCR-Produkte, die 835 bp bzw. 671 bp lang waren, nach 28 Zyklen ähnlich stark ausgeprägt waren, wurde die Qualität der isolierten RNA als exzellent eingestuft. Daraufhin wurden die polyadenylierten mRNAs mit Natriumacetat und Ethanol gefällt. Nach Inkubation bei -20 °C über Nacht und Abzentrifugation für 1 Stunde bei 4 °C wurde das mRNA-Pellet zweimal mit 70%-igen Ethanol gewaschen und in Wasser eluiert.

Für die Konstruktion der cDNA-Bank wurde das Clone Miner™ cDNA Library Construction Kit eingesetzt. Dieses basiert auf dem ortsspezifischen Rekombinationssystem des Bakteriophagen Lambda, bestehend aus DNA-Rekombinationssequenzen, den *att*-Stellen, und Rekombinationen-vermittelnden Enzymen. Daher wurden zunächst 5 µg der polyadenylierten mRNAs mit dem Oligo(dT)-Primer 5' Biotin-GGCGGCCGC**CACA**CTTTGTACAAGAAAGTTGG**GT**(T)₁₉ 3', der mit der *attB*2-Sequenz (in Sequenz fett geschrieben) versehen und biotinyliert war, und dNTPs für 5 min bei 65 °C und anschließend für 2 min bei 45 °C inkubiert. Daraufhin wurde der 5x Reaktionspuffer und DTT hinzugegeben und für weitere 2 min bei 45 °C inkubiert. Schließlich wurde die SuperScript®II Reverse Transkriptase hinzugefügt, um innerhalb von 60 min bei 45 °C die Erststrangsynthese umzusetzen. Diese cDNA-Stränge dienten als Matrizen für die Synthese der zweiten komplementären DNA-Stränge durch die *E.coli* DNA-Polymerase I. Neben dem entsprechenden Puffer und dNTPs befanden sich in dem Reaktionsansatz die *E.coli* RNase H und DNA-Ligase. Nach 2 Stunden bei 16 °C wurden mit Hilfe der T4 DNA-Polymerase glatte cDNA-Enden generiert. Die Zugabe von EDTA beendete diese Reaktion. Danach wurden die cDNAs durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt, mit Ammoniumacetat, Glykogen und 100%-igen Ethanol gefällt und mit 70%-igen Ethanol gewaschen. An das glatte 5'-Ende der doppelsträngigen cDNAs wurde abschließend durch die T4 DNA-Ligase in Anwesenheit des Adapterpuffers und von DTT innerhalb von 24 Stunden bei 16 °C der doppelsträngige *attB*1-Adapter

5' TCGTCGGGG**CACA**CTTTGTACAAAAAGTTGG 3'
3' CCCCTGTTGAAACATGTTTTTCAACCp 5' (*attB*1-Sequenz fett geschrieben)

angefügt. Nach der Inaktivierung der Ligase durch eine 10-minütige Inkubation bei 70 °C wurden die mit *attB*-Enden versehenen cDNAs über eine Sephacryl®S-500 HR-Säule ihrer Größe nach

aufgetrennt, wobei große Moleküle die Matrix schneller passierten. Dafür wurden die cDNAs mit TEN-Puffer versetzt, auf die Säule geladen und das Eluat aufgefangen (Fraktion #1). Die Säule wurde erneut mit 100 µl TEN-Puffer beladen, der wieder gesammelt wurde (Fraktion #2). Die nächsten 100 µl TEN-Puffer, die auf die Säule geladen wurden, wurden tropfenweise aufgefangen (Fraktion #3 - 20). Die Konzentration der Fraktionen wurde in einem DNA-*Spotting*-Assay geschätzt, bei dem auf eine Agaroseplatte 1 µl von jeder Fraktion sowie unterschiedliche Mengen von *supercoiled* pEXP7tet-DNA (50 ng/µl) aufgetragen und anschließend die Platte mit einer 1:10.000-Lösung von SYBR[®]Gold nachgefärbt wurde. Die aus dem Vergleich der Fraktionen mit der Standard-DNA geschätzte Konzentration der Fraktionen diente zusammen mit den Fraktionsvolumen zur Berechnung der jeweiligen cDNA-Menge. Alle Fraktionen wurden mit Ammoniumacetat, Glykogen und 100%-igen Ethanol ausgefällt und bei -20 °C gelagert, wodurch eine spätere Erweiterung der cDNA-Bank möglich war. Mit den Fraktionen, die die größten cDNAs enthielten, wurde weitergearbeitet. Die komplette Fraktion #3 und die Hälfte von Fraktion #4 wurden gepoolt, so dass etwa 150 ng Ausgangsmaterial für die cDNA-Bank eingesetzt werden konnte. Nach der Ethanolpräzipitation wurde die Konzentration der in TE-Puffer aufgenommenen cDNAs erneut in einem DNA-*Spotting*-Assay geschätzt. Dadurch konnten für den nachfolgenden BP-Rekombinationsschritt etwa 100 ng von den *attB*-flankierten cDNAs und 250 ng von dem Übergangsvektor pDONRTM222, dessen *attP*-Sequenzen das wachstumshemmende *ccdB*-Gen flankierten, eingesetzt werden. Vermittelt wurde die Reaktion durch den BP ClonaseTM-Enzym-Mix innerhalb von 20 Stunden bei 25 °C. Die nachfolgende Inkubation mit der Proteinase K bei 37 °C für 15 min und anschließend bei 75 °C für 10 min inaktivierte die Clonase. Dem folgten die Konzentrierung der DNA mit Glykogen und Ammoniumacetat sowie anschließend eine Ethanolfällung. Schließlich wurde die Übergangs-cDNA-Bank in sechs Aliquots der elektrokompenten ElectroMAXTMDH10BTM-Bakterien durch Elektroporation (2 kV, 200 Ω, 25 µF) transferiert. Nachdem die Transformanten innerhalb 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln in S.O.C. Medium angewachsen waren, wurden sie gepoolt und ein Aliquot als 1:10-Verdünnungsreihe auf Kanamycin-haltige Agarplatten ausgestrichen. Aus der Anzahl der über Nacht bei 37 °C gewachsenen Kolonien wurde die Anzahl der transformierten Bakterien im restlichen Medium berechnet. Sie betrug insgesamt etwa 78×10^6 cfu. Außerdem wurde von 20 Kolonien ein Miniprep durchgeführt, um zur Charakterisierung der Übergangs-cDNA-Bank die extrahierten Plasmide mit der Restriktionsendonuklease *BsrGI* zu verdauen und gelelektrophoretisch aufzutrennen. Die restlichen Transformanten wuchsen derweil bei 37 °C unter Schütteln in 50 ml Kanamycin-haltigen LB-Medium auf eine optische Dichte (OD_{600}) von 1. Dann wurden von den Bakterien zum einen Glycerolstocks angelegt und zum anderen mit dem QIAprep[®]Spin Miniprep Kit ihre Plasmide isoliert, deren Konzentration photometrisch gemessen wurde. In einer PEG-Präzipitation wurden die Plasmide gemeinsam mit 30%-igem PEG/MgCl₂ abzentrifugiert und in TE-Puffer aufgenommen.

Als Expressionsvektor für die cDNA-Bank wurde pcDNA3.1/RfA/Dest gewählt, in dem das *ccdB*-Gen von *attR*-Sequenzen flankiert wird. Um die Rekombinationseffizienz zu erhöhen, wurde der Vektor mit der Restriktionsendonuklease *BbvCI* linearisiert. Für die LR-Rekombination wurden 62,5 ng der Übergangs-cDNA-Bank in pDONRTM222 und 225 ng des linearisierten Zielvektors

eingesetzt. Vermittelt wurde diese Reaktion durch den Gateway[®]LR Clonase[™]II Plus Enzyme Mix über Nacht bei 25 °C. Durch Inkubation mit der Proteinase K für 15 min bei 37 °C und anschließend für 10 min bei 75 °C wurde die Rekombinationsreaktion beendet. Die nachfolgende PEG-Präzipitation setzte sich aus der Fällung mit NaCl und PEG/MgCl₂ bei 4 °C für 20 min, dem Abzentrifugieren und Waschen mit 70%-igen Ethanol sowie dem Eluieren in TE-Puffer zusammen. Die Expressions-cDNA-Bank wurde ebenfalls in die elektrokompetenten ElectroMAX[™]DH10B[™]-Bakterien durch Elektroporation (2 kV, 200 Ω, 25 µF) transferiert. Nach dem Anwachsen der Transformanten innerhalb 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln in Recovery Medium wurde ein Aliquot von ihnen als 1:10-Verdünnungsreihe auf Ampicillin-haltige Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit Hilfe der Anzahl der auf den Agarplatten gewachsenen Kolonien wurde die Anzahl der Transformanten in dem restlichen Medium berechnet. Die Gesamtanzahl betrug etwa $46,7 \times 10^6$ cfu. Aus 15 Kolonien wurden zur Auswertung der cDNA-Bank-Qualität die Plasmide mit Hilfe des QIAprep[®]Spin Miniprep Kits isoliert, mit der Endonuklease *BsrGI* verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Schließlich wurde die Expressions-cDNA-Bank des AML-Patienten MZ529 in Form von Glycerolstocks sowie nach Isolierung und Präzipitation in Form von rekombinanten Plasmiden gelagert.

Für das T-Zell-basierte Expressionsscreening der cDNA-Bank unter Verwendung von IFN-γ-ELISpot-Assays wurden jeweils $2,5 \times 10^4$ Bakterien der cDNA-Bank auf Ampicillin-haltige Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden für sechs 96 TE-Platten ungefähr 100 Kolonien pro TE gepickt und in 5 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Von diesen Bakterienkulturen wurden Glycerolstocks angelegt und mit dem QIAprep[®]96 Turbo Miniprep Kit die Plasmide isoliert. Pro Platte wurde von fünf Pools der cDNA-kodierenden Plasmide photometrisch die Konzentration gemessen, so dass vorverdünnte Platten mit 300 ng cDNA-kodierenden Plasmiden in 5 µl EB-Puffer pro TE für das Screening vorbereitet werden konnten.

Sobald bei dem cDNA-Expressionsscreening ein Kandidatenpool gefunden wurde, wurde für seine Subklonierung der entsprechende Bakterienstock angetaut und auf Ampicillin-haltige Agarplatten ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden Pools von 8 Kolonien pro TE für 96 TE-Platten gepickt und über Nacht bei 37 °C in 1 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium geschüttelt. Von diesen wurden Glycerolstocks angelegt und mit dem QIAprep[®]96 Turbo Miniprep Kit die Plasmide isoliert, deren Konzentration anschließend photometrisch bestimmt wurde. Für das Screening in IFN-γ-ELISpot-Assays wurden die 8x Pools in 96 TE-Platten auf 300 ng cDNA-kodierender Plasmide in 5 µl EB-Puffer pro TE eingestellt.

Genauso wurde verfahren, so bald ein Kandidat bei dem Screening der 8x Pools aufgefallen war. Allerdings wurden einzelne Kolonien gepickt und folglich lagen für das Screening die cDNA-kodierenden Plasmide in den Testeinheiten einzeln vor.

2.2.2.17 Klonierung und Transfer von T-Zellrezeptorketten

Für die Klonierung der T-Zellrezeptoren (TZRs) wurde mit dem RNeasy[®]Mini Kit die RNA aus antigenspezifischen T-Lymphozyten isoliert. Anschließend erfolgte innerhalb von 60 min mit Hilfe der SuperScript[®]II Reverse Transcriptase die cDNA-Synthese bei 42 °C. Neben den dNTPs,

DTT und einem entsprechenden Puffer waren in dem Reaktionsansatz 64T- und capswitch oligo-Primer enthalten. Die generierten cDNAs dienen als Matrizen für eine PCR mit der Advantage[®]2-Polymerase und den Primern 64T und T7 capswitch. Dabei folgten einer einminütigen Inkubation bei 95 °C 20 Amplifikationszyklen [(1) 5 sec bei 95 °C, (2) 5 sec bei 65 °C, (3) 6 min bei 68 °C]. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde anschließend für TZR-Ketten-spezifische PCRs mit der Advantage[®]2-Polymerase verwendet. Für die α -Ketten-PCR wurden der 5'- und der C α 3'UTR-Primer eingesetzt. Nach 5 min bei 95 °C umfasste das PCR-Programm 30 Zyklen zur Amplifikation [(1) 30 sec bei 95 °C, (2) 45 sec bei 62 °C, (3) 90 sec bei 72 °C]. Die β -Ketten wurden mit den Primern 5' und C β 1 3'UTR sowie C β 2 3'UTR amplifiziert. Diese PCRs durchliefen ebenfalls eine initiale Inkubation bei 95 °C für 5 min und 30 Amplifikationszyklen [(1) 30 sec bei 95 °C, (2) 45 sec bei 63 °C, (3) 90 sec bei 72 °C]. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurde jeweils das entsprechende PCR-Produkt, das eine Länge zwischen 0,8 und 1,2 kb besaß, aus dem Agarosegel extrahiert und sequenziert (Birkholz *et al.*, 2009). Aufgrund der Auswertung der Sequenzen konnten mit kettenspezifischen Primern die jeweiligen TZR-Ketten direkt amplifiziert und in den Expressionsplasmid pcDNA3.1/V5-His TOPO inkloniert werden. Der Linearisierung der rekombinanten Plasmide mit der Restriktionsendonuklease *Xba*I folgte die Generierung von polyadenylierten IVT-RNAs der TZR-Ketten.

Für den Transfer der T-Zellrezeptoren wurden zunächst aus *Buffy Coats* mittels Dichtegradientenzentrifugation die PBMCs isoliert und in Portionen von 30×10^6 Zellen in AIM-V-Medium mit 50 ng/ml Okt-3 und 250 U/ml IL-2 für 3 Tage bei 37 °C inkubiert. Nach der anschließenden Isolation der CD8⁺-Zellen mit Hilfe von *Micro Beads* wurden diese bis zum Transfer der TZR-Ketten in AIM-V-Medium mit 10% HS, 250 U/ml IL-2 und 20 U/ml IL-7 für 2 bis 15 Tage kultiviert. Die CD8⁺-Lymphozyten wurden nach Elektroporation (*square wave*, 500 V, 5 ms) mit der polyadenylierten IVT-RNA der TZR-Ketten über Nacht in AIM-V mit 10% HS, IL-2 und IL-7 kultiviert. Die Expression der TZR- β -Ketten wurde durchflusszytometrisch kontrolliert. Die Funktionalität der transferierten T-Zellrezeptoren wurde in 10-stündigen IFN- γ -ELISpot-Assays in Anwesenheit von 100 U/ml IL-2 überprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Restimulation und HLA-Restriktion der miniMLLC 2E8 des Modells MZ529-AML/Buffy Coat 730

Zu dem Patienten MZ529, der eine akute myeloische Leukämie (AML) vom FAB-Subtyp M1 aufwies, ist ein *Buffy Coat* (BC)-Spender mit demselben HLA-Klasse I-Genotyp (HLA-A*03:01, -A*11:01, -B*15:01, -B*35:01, -C*03:04, -C*04:01) gesucht worden. In dem Modell MZ529-AML/*Buffy Coat* 730 wurden daraufhin in gemischten Lymphozyten-Leukämie-Kulturen (engl. *mixed lymphocyte leukemia cultures*, MLLCs) naive CD8⁺-T-Lymphozyten des *Buffy Coat*-Spenders 730 mit AML-Blasten des Patienten MZ529 restimuliert (s. **Materialien & Methoden 2.2.1.5**). Zur Untersuchung ihrer Antigen-spezifität wurde u.a. die auf diese Weise generierte miniMLLC 2E8 bereitgestellt (Albrecht *et al.*, 2011).

Um die leukämie-reaktiven T-Lymphozyten zu expandieren, wurde die miniMLLC 2E8 wiederholt mit AML-Zellen des Patienten MZ529 restimuliert. Allerdings war die Anzahl der Leukämiezellen begrenzt. Da die miniMLLC 2E8 neben den Leukämiezellen des Patienten MZ529 auch dessen mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV)-transformierten B-Zellen erkannte, wurde der Einsatz von den immortalisierten und damit in unbegrenzter Menge verfügbaren MZ529-EBV-B-Zellen zur Restimulation der miniMLLC untersucht. Sowohl nach Stimulation mit AML-Blasten als auch mit EBV-B-Zellen des Patienten erkannte die miniMLLC 2E8 MZ529-EBV-B- und -AML-Zellen (**Abb.3.1**) und wies das gleiche Erkennungsmuster bei der Blockade mit HLA-spezifischen Antikörpern (**Abb.3.2**) sowie bei transient mit HLA-Molekülen transfizierten COS-7-Zellen auf (**Abb.3.3**). Daher erfolgte die Stimulation der miniMLLC 2E8 für die nachfolgenden Versuche grundsätzlich mit MZ529-EBV-B-Zellen. Die für das Expressionsscreening mit der miniMLLC 2E8 benötigte cDNA-Bank des AML-Patienten MZ529 wurde von dessen EBV-transformierten B-Lymphozyten konstruiert.

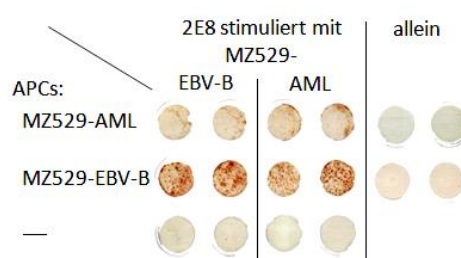


Abb.3.1: Erkennung von AML-Zellen und EBV-transformierten B-Zellen des Patienten MZ529 durch die miniMLLC 2E8 nach Kultivierung mit unterschiedlichen Stimulatorzellen

Fünf Tage nach Restimulation mit MZ529-AML- bzw. -EBV-B-Zellen wurde die Reaktivität der miniMLLC 2E8 (1×10^4 Zellen / TE) gegenüber MZ529-AML- und MZ529-EBV-B-Zellen (je 5×10^4 Zellen / TE) getestet. Abgebildet sind die Filter des 20Std-IFN- γ -ELISPOT-Assays (s. **Materialien & Methoden 2.2.1.8**).

Um die HLA-Restriktion der miniMLLC 2E8 zu bestimmen, wurde die Erkennung von MZ529-EBV-B-Zellen in Anwesenheit von HLA-spezifischen Antikörpern untersucht. Die Blockade der Erkennung durch HLA-B/C- sowie HLA-Bw6-spezifische Antikörper ergab die Identifizierung der beiden HLA-B-Allele als potenzielle Restriktionselemente (**Abb.3.2**).

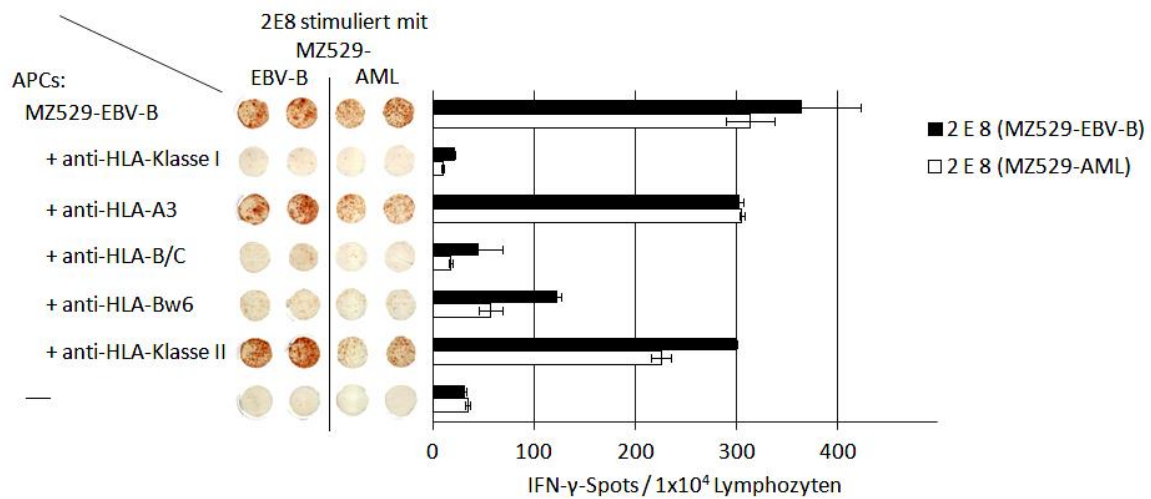


Abb.3.2: HLA-spezifische Blockade der Erkennung von MZ529-EBV-B-Zellen durch die miniMLLC 2E8

Die miniMLLC 2E8 wurde mit MZ529-EBV-B- (■) bzw. -AML-Zellen (□) stimuliert und anschließend in einer Konzentration von 1×10^4 Zellen pro TE auf ihre Reaktivität gegenüber MZ529-EBV-B-Zellen (5×10^4 Zellen / TE) in Gegenwart von HLA-spezifischen Antikörpern in einem IFN- γ -ELISpot-Assay untersucht. Die Antikörper wurden in einer Verdünnung eingesetzt, die die Erkennung durch Kontroll-T-Lymphozyten mit entsprechender HLA-Restriktion vollständig blockierten. Gezeigt sind die Filter der Doppelwerte (links) sowie die sich aus ihrer Vermessung mittels Computer-gestützter Videobildanalyse ergebenden Mittelwerte mit der dazugehörigen Standardabweichung (rechts).

Für das Expressionsscreening von cDNA-Banken werden diese gemeinsam mit HLA-Moleküle-kodierenden Plasmiden in DNA-Empfängerzellen wie 293T- und COS-7-Zellen transient transfiziert. Im Vorfeld wurde die Hintergrundreaktivität der für das Screening verwendeten miniMLLC 2E8 gegenüber den beiden Empfängerzelllinien untersucht. Nach Transfektion der COS-7- und 293T-Zellen mit den einzelnen HLA-Molekülen des Modells MZ529-AML/*Buffy Coat* 730 zeigte sich eine starke Erkennung von COS-7-Zellen, die mit HLA-B*15:01 transfiziert wurden. Weder die Transfektion von 293T-Zellen mit HLA-B*15:01 noch die der beiden Zelllinien mit den anderen HLA-Molekülen induzierte eine Reaktivität bei der miniMLLC 2E8 (**Abb.3.3**).

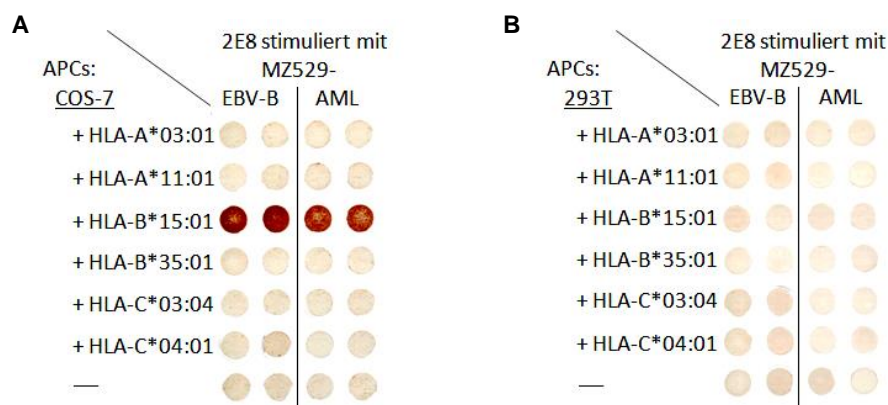


Abb.3.3: Erkennung HLA-transfizierter COS-7- und 293T-Zellen durch die miniMLLC 2E8

Als potenzielle DNA-Empfängerzellen für das cDNA-Expressionsscreening mit der miniMLLC 2E8 wurden COS-7- (A) und 293T-Zellen (B) (je 2×10^4 Zellen / TE) mit den HLA-Allelen des Modells MZ529-AML/*Buffy Coat* 730 transfiziert und auf Erkennung durch die miniMLLC 2E8 (2×10^4 Zellen / TE) in einem IFN- γ -ELISpot-Assay in Doppelwerten getestet. Die miniMLLC ist mit MZ529-EBV-B- bzw. -AML-Zellen stimuliert worden.

Die miniMLLC 2E8 des Modells MZ529-AML/*Buffy Coat* 730 behält ihre Spezifität und Reaktivität auch nach Stimulation mit EBV-transformierten B-Lymphozyten des Patienten MZ529. Blockadeexperimente mit Antikörpern gegen HLA-Moleküle und HLA-Transfektionsexperimente mit COS-7-Zellen legen nahe, dass HLA-B*15:01 das restringierende HLA-Molekül für die miniMLLC 2E8 darstellt. Für das cDNA-Expressionsscreening wurden 293T-Zellen als Empfängerzellen identifiziert.

3.2 Konstruktion der cDNA-Bank des AML-Patienten MZ529 aus EBV-B-Zellen

Eine cDNA-Bank wurde aus den EBV-transformierten B-Lymphozyten des AML-Patienten MZ529 konstruiert (**s. Materialien & Methoden 2.2.2.16; s. Anhang 5.1**). Dafür wurde zunächst die gesamte RNA aus 2×10^8 Zellen isoliert und anschließend die polyadenylierten mRNAs angereichert. Nach deren Umwandlung in doppelsträngige cDNAs erfolgte über eine Säule ihre Größenaufreinigung. Die Fraktionen mit den größten cDNAs (>500 bp) wurden für die Herstellung der Bank weiterverwendet. Flankierende *attB*-Rekombinationssequenzen ermöglichten die ortsspezifische Einklonierung dieser cDNAs in die *attP*-Stellen des Übergangsvektors pDONR™ 222. Die daraufhin von *attL*-Sequenzen flankierten *Inserts* können mit unterschiedlichen Zielvektoren, die *attR*-Sequenzen enthalten, rekombiniert werden. Für die Konstruktion der cDNA-Bank des AML-Patienten MZ529 wurde pcDNA3.1/RfA/Dest als Zielvektor verwendet.

Um die Qualität der cDNA-Bank des AML-Patienten MZ529 zu überprüfen, wurden aus 15 Bakterienkolonien die rekombinanten Plasmide isoliert und mit der Endonuklease *BsrGI* verdaut. Dadurch konnte neben einer hohen Insertionsfrequenz auch die erfolgreiche Insertion unterschiedlicher cDNAs, die sich durch Gesamtgrößen von über 500 bp auszeichneten, belegt werden (**Abb.3.4**).

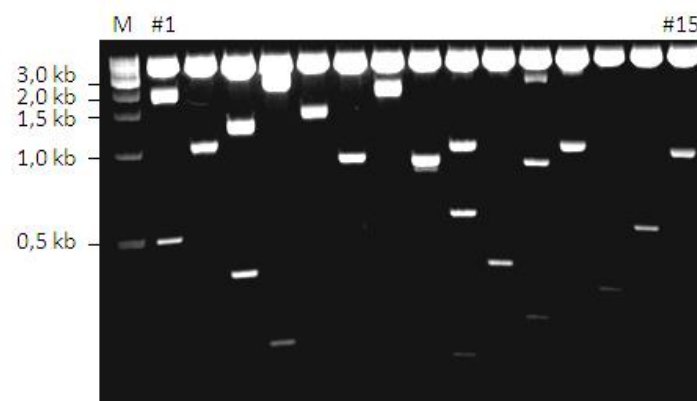


Abb.3.4: Restriktionsverdau von rekombinanten Plasmiden aus 15 Bakterienkolonien der cDNA-Bank des AML-Patienten MZ529

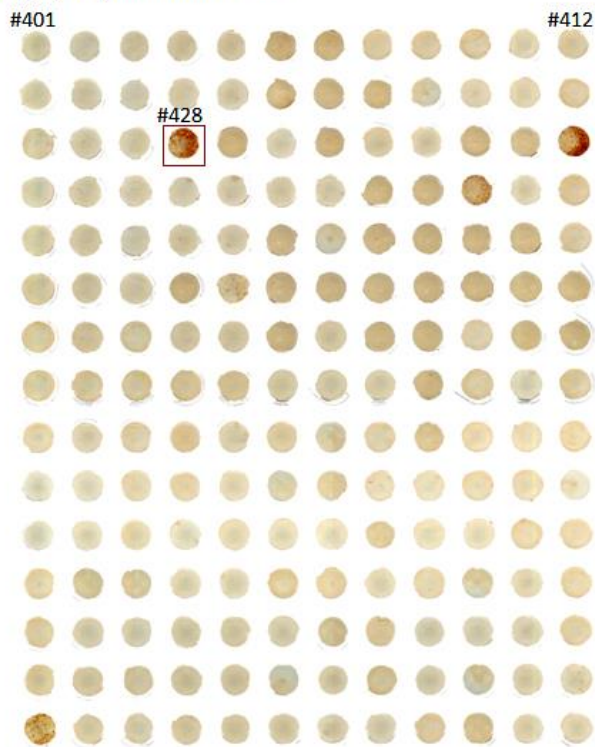
In einem 1%-igen Agarosegel wurden die rekombinanten Plasmide aus 15 Bakterienkolonien der cDNA-Bank des AML-Patienten MZ529 nach einem Restriktionsverdau mit *BsrGI* elektrophoretisch aufgetrennt (M: 1 kb-Marker).

Die cDNA-Bank des AML-Patienten MZ529 wurde zunächst in 600 Pools aus 100 cDNA-kodierenden Plasmiden unterteilt. Diese wurden durch Plasmidextraktion aus jeweils geschätzten 100 Bakterienkolonien gewonnen.

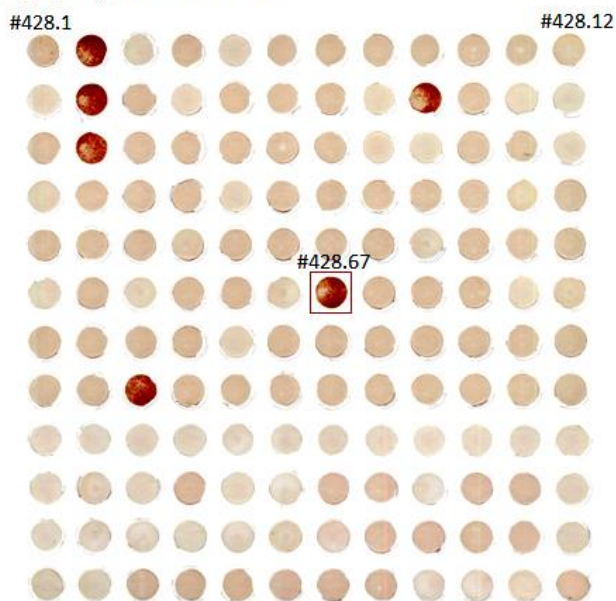
3.3 Expressionsscreening der cDNA-Bank aus EBV-B-Zellen des AML-Patienten MZ529 mit der miniMLLC 2E8

Im T-Zell-basierten Expressionsscreening der cDNA-Bank von AML-Patient MZ529 wurden zunächst Pools mit 100 rekombinanten Plasmiden (100x Pool) pro Testeinheit zusammen mit HLA-B*15:01-kodierenden Plasmiden in 293T-Zellen kotransfiziert und auf Erkennung durch die miniMLLC 2E8 untersucht. Die Testung von 180 solcher cDNA-Bank-Pools resultierte in der Identifizierung von sechs Pools, die nach Transfektion eine deutliche Reaktivität bei der miniMLLC induzierten (**Abb.3.5A**). Der positive 100x Pool #428 wurde für die anschließende Subklonierung der cDNA-Bank ausgewählt. Aus diesem Pool wurden 144 Pools mit je acht cDNA-Klonen generiert und getestet. Von den 8x Pools erwiesen sich sieben als deutlich positiv (**Abb.3.5B**). Einer dieser 8x Pools, Pool #428.67, wurde für die cDNA-Klonierung verwendet. Von den 84 untersuchten cDNA-Klonen des 8x Pools #428.67 wurden neun durch die miniMLLC 2E8 erkannt (**Abb.3.5C**).

A APCs: 293T + HLA-B*15:01 + MZ529-cDNA-Bank (100 cDNAs / TE)
T-Lymphozyten: miniMLLC 2E8



B APCs: 293T + HLA-B*15:01 + MZ529-cDNA-Bank #428 (8 cDNAs / TE)
T-Lymphozyten: miniMLLC 2E8



C APCs: 293T + HLA-B*15:01 + MZ529-cDNA-Bank #428.67 (Einzel-cDNA / TE)
T-Lymphozyten: miniMLLC 2E8

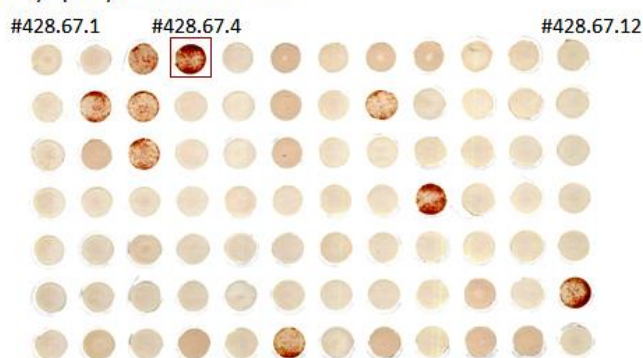


Abb.3.5:

Expressionscreening der cDNA-Bank aus EBV-B-Zellen des AML-Patienten MZ529 mit der miniMLLC 2E8

293T-Zellen (2×10^4 Zellen / TE) wurden mit HLA-B*15:01 und 180 100x Pools der cDNA-Bank aus EBV-B-Zellen des AML-Patienten MZ529 kotransfiziert und auf Erkennung durch die miniMLLC 2E8 ($1,5 \times 10^4$ Zellen / TE) im IFN- γ -ELISPOT-Assay untersucht (**A**). Nach Subklonierung des 100x Pools #428 in Pools mit jeweils acht cDNA-Klonen wurden diese ebenfalls mit HLA-B*15:01 in 293T-Zellen kotransfiziert und mit der miniMLLC 2E8 gescreent (**B**). Ausgehend von dem 8x Pool #428.67 wurden anschließend einzelne cDNA-Klone präpariert und nach Kotransfektion mit HLA-B*15:01 in 293T-Zellen auf Erkennung durch die miniMLLC getestet (**C**). Rot umrandet sind die Pools, die für die anschließenden Versuche weiterverwendet wurden.

Für weiterführende Experimente wurde der positive cDNA-Klon #428.67.4 ausgewählt. Die Sequenzierung seines *Inserts* ergab, dass er die komplette leichte α -Polypeptidkette von Cytochrom b_{-245} (Genbezeichnung: *CYBA*; Proteinbezeichnung: p22phox) kodierte (NCBI-Bezeichnungen: NM_000101.3, NP_000092.2) (**s. Anhang 5.2**). Da das Transkript von *CYBA* aus sechs Exons besteht bzw. 588 bp lang ist, wurde der cDNA-Klon #428.67.4 in den nachfolgenden Versuchen auch als *CYBA* Exon 1-6 (bp1-588) #428.67.4 bezeichnet. *CYBA* kodiert eine membrangebundene Untereinheit der weitverbreiteten NADPH-Oxidase-Komplexe (NOXs) 1 bis 4 (San José *et al.*, 2008; Krause, 2004).

Nur nach Kotransfektion mit HLA-B*15:01-kodierenden Plasmiden konnte der *CYBA*-kodierende Plasmid #428.67.4 eine Erkennung durch die miniMLLC 2E8 induzieren (**Abb.3.6A**).

In einem cDNA-Expressionsscreening wurde die leichte α -Polypeptidkette von Cytochrom b_{-245} (*CYBA*, p22phox) als Antigen der leukämiereaktiven miniMLLC 2E8 identifiziert.

3.4 Epitopidentifizierung durch Fragmentierung des *CYBA*-kodierenden Klons #428.67.4 der cDNA-Bank von AML-Patient MZ529

Mit Hilfe des HLA-Bindungsvorhersagealgorithmus auf www.syfpeithi.de (Rammensee *et al.*, 1999) konnte kein herausragendes, über HLA-B*15:01 präsentierte Peptid in *CYBA* gefunden werden. Da *CYBA* außerdem mehrere Einzelnukleotidpolymorphismen (engl. *single nucleotide polymorphisms*, SNPs) enthält (www.genecards.org, Safran *et al.*, 2010), wurde zur Eingrenzung der peptidkodierenden Region das *Insert* des cDNA-Klons #428.67.4 ausgehend vom 3'-Ende fragmentiert.

Mit Hilfe spezifischer Primer, die komplementär zu den Exongrenzen von *CYBA* waren und ein Stoppcodon enthielten, wurden um jeweils ein Exon verkürzte Fragmente von *CYBA* amplifiziert und in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His TOPO kloniert (**s. Anhang 5.3**). Nur rekombinante Plasmide mit den beiden längsten Fragmenten, *CYBA* Exon 1-4 (bp1-286) und Exon 1-6 (bp1-558), induzierten nach Kotransfektion mit HLA-B*15:01 eine Erkennung durch die miniMLLC 2E8. Die drei kürzeren Fragmente wurden nicht erkannt (**Abb.3.6**).

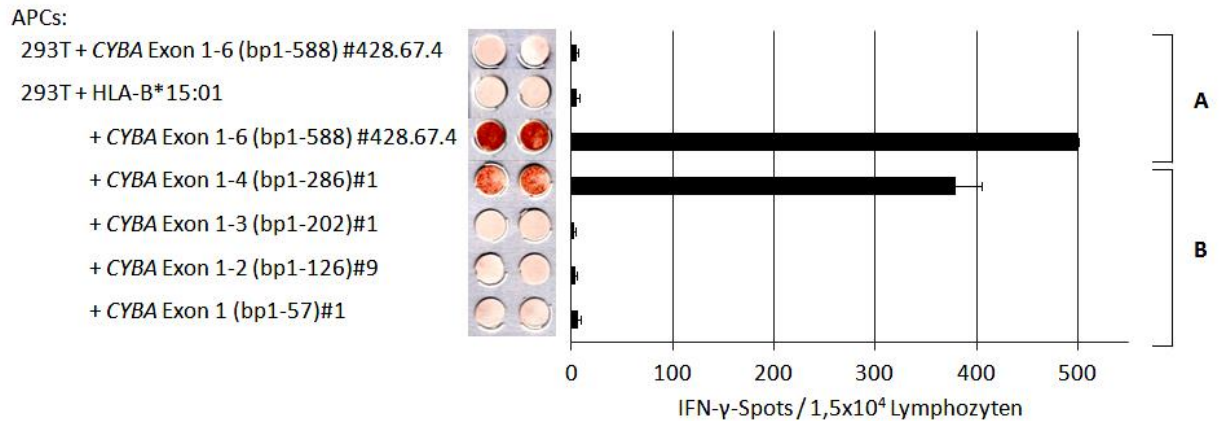


Abb.3.6: Eingrenzung der peptidkodierenden Region von cDNA-Bank-Klon #428.67.4

In einem IFN- γ -ELISpot-Assay wurden 293T-Zellen (2×10^4 Zellen / TE) mit dem cDNA-Bank-Klon #428.67.4, der CYBA Exon 1-6 (bp1-588) kodierte, allein oder gemeinsam mit HLA-B*15:01 transfiziert und auf Erkennung durch die miniMLLC 2E8 ($1,5 \times 10^4$ Zellen / TE) untersucht (A).

Ausgehend von dem identifizierten Klon #428.67.4 der MZ529-cDNA-Bank wurden 3'-Fragmente des *Inserts* generiert, die sich in ihrer Länge um jeweils ein Exon unterschieden. Diese Fragmente wurden zusammen mit HLA-B*15:01 in 293T-Zellen (2×10^4 Zellen / TE) kotransfiziert, um sie in einem IFN- γ -ELISpot-Assay auf Erkennung durch die miniMLLC 2E8 ($1,5 \times 10^4$ Zellen / TE) zu testen (B).

Graphisch dargestellt ist der Mittelwert aus Doppelbestimmungen mit der dazugehörigen Standardabweichung. Neben der Fragmentlänge in Basenpaar (bp) sind die Klonnummern der einzelnen Plasmidpräparationen (#) angegeben.

Aufgrund der Abhängigkeit der Antigenerkennung von dem Vorhandensein des vierten Exons von CYBA (Abb.3.6), wurde dieses Exon im CYBA-kodierenden Klon #428.67.4 ausgehend vom 3'-Ende mit Hilfe spezifischer Primer Codon für Codon fragmentiert (s. Anhang 5.3). Die Testung dieser Fragmente ergab die Identifizierung von CYBA Exon 1-4 (bp1-231) als kürzestes von der miniMLLC 2E8 erkanntes CYBA-Fragment (Abb.3.7). Dieses Fragment kodierte das CYBA-Protein p22phox bis zur 77.Aminosäure (AS), einem Valin (V). Unter Berücksichtigung dieses Carboxyterminus und einer Peptidlänge von neun bis zehn Aminosäuren, wie sie für Epitope von CD8⁺-T-Lymphozyten typisch ist, ergaben sich als Peptidkandidaten das Nonamer GQKYMTAVV und das Decamer WGQKYMTAVV.

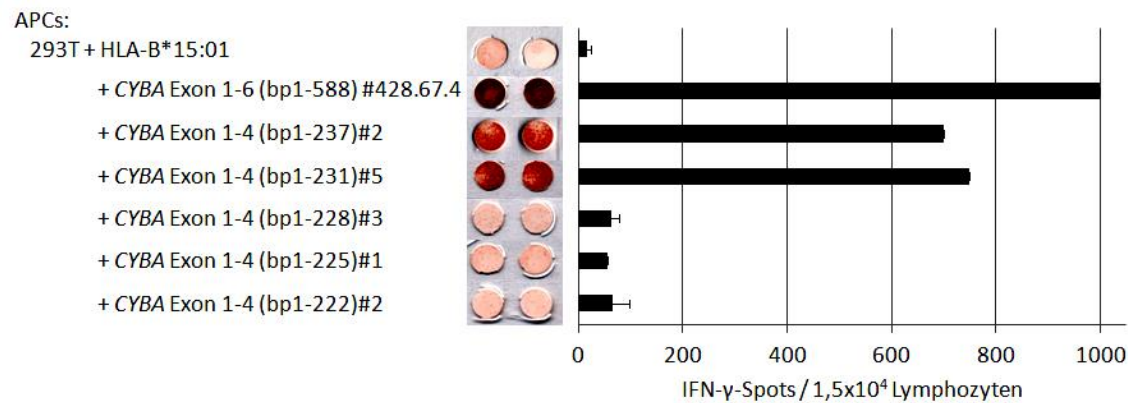


Abb.3.7: Eingrenzung der peptidkodierenden Region von cDNA-Bank-Klon #428.67.4 durch Fragmentierung von Exon 4

Fragmente des *Inserts* von cDNA-Bank-Klon #428.67.4, die sich in ihrer Länge jeweils um ein Codon unterschieden, wurden gemeinsam mit HLA-B*15:01 in 293T-Zellen (2×10^4 Zellen / TE) kotransfiziert und auf Erkennung durch die miniMLLC 2E8 ($1,5 \times 10^4$ Zellen / TE) in IFN- γ -ELISpot-Assays untersucht. In der Graphik sind die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen mit der dazugehörigen Standardabweichung zu sehen. In den Fragmentbezeichnungen finden sich die Fragmentlängen (bp) sowie die Klonbezeichnungen (#) wieder.

Durch die schrittweise Fragmentierung des *Inserts* von dem identifizierten MZ529-cDNA-Bank-Klon #428.67.4 wurden als Peptidkandidaten des CYBA-Proteins das Nonamer GQKYMTAVV und das Decamer WGQKYMTAVV gefunden.

3.5 Erkennung des Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) CYBA-242T/C (rs4673) durch die miniMLLC 2E8

Das kürzeste erkannte CYBA-Fragment, das p22phox bis zur 77.Aminosäure kodierte, enthielt innerhalb des Abschnitts der identifizierten Peptidkandidaten den bekannten Polymorphismus rs4673 (engl. *reference SNP*, rs). Dieser SNP bezeichnet einen Cytosin (C)-Thymin (T)-Austausch, der in der Literatur meist dem 242.Nukleotid von CYBA zugeschrieben wird, aber vom Startcodon ausgehend das 214.Nukleotid betrifft (Bedard *et al.*, 2009). Von dem CYBA-242T-Allel wird als 72.Aminosäure von p22phox Tyrosin (CYBA-72Y) kodiert, von dem CYBA-242C-Allel stattdessen Histidin (CYBA-72H).

Die Sequenzierung der CYBA-Transkripte aus EBV-transformierten B- und AML-Zellen des Patienten MZ529 sowie aus der miniMLLC 2E8 des *Buffy Coat*-Spenders 730 zeigte, dass der Patient heterozygot für CYBA-242 war und der *Buffy Coat*-Spender homozygot für das CYBA-242C-Allel (**Abb.3.18**). Sowohl aus den EBV-transformierten B-Zellen des Patienten MZ529 als auch der miniMLLC 2E8 des *Buffy Coat*-Spenders 730 wurden die CYBA-Transkripte kloniert und auf Erkennung durch die miniMLLC 2E8 getestet. Nur klonierte Transkripte mit dem CYBA-242T-Allel, die für CYBA-72Y kodierten, induzierten eine Reaktivität bei der miniMLLC (**Abb.3.8**).

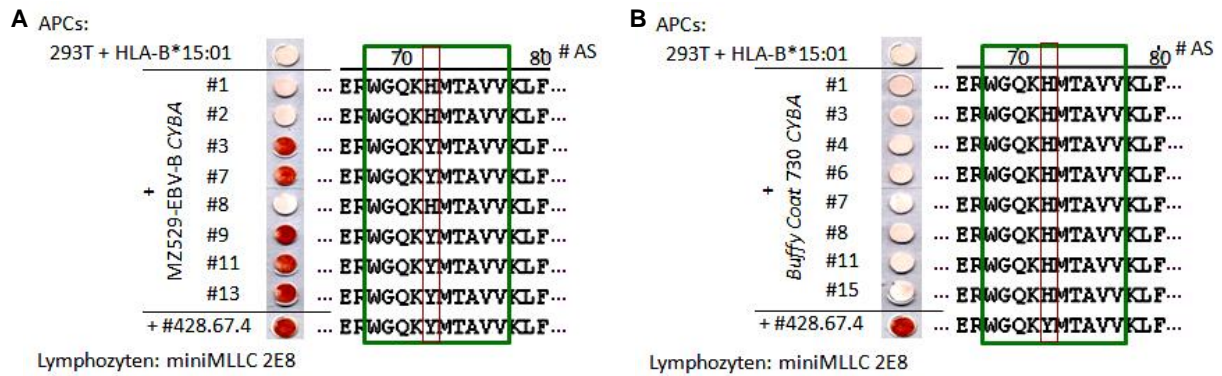


Abb.3.8: Erkennung von CYBA-72Y durch die miniMLLC 2E8

Die CYBA-Transkripte aus EBV-transformierten B-Zellen des AML-Patienten MZ529 (A) sowie aus der miniMLLC 2E8 des Buffy Coat-Spenders 730 (B) wurden in einen Expressionsvektor kloniert (#: Klonnummer) und sequenziert (s. Anhang 5.4). Diese Plasmide wurden gemeinsam mit HLA-B*15:01 in 293T-Zellen (2×10^4 Zellen / TE) transfiziert und in IFN- γ -ELISpot-Assays auf Erkennung durch die miniMLLC 2E8 ($1,5 \times 10^4$ Zellen / TE) getestet. In den Aminosäuresequenzen von den Inserts der untersuchten Plasmide ist die potenzielle Peptidregion grün und der darin enthaltene Polymorphismus rs4673 rot hervorgehoben (AS: Aminosäure).

Das von der miniMLLC 2E8 erkannte Antigen von CYBA enthält den Polymorphismus rs4673 (CYBA-242T/C). Nur das von dem CYBA-242T-Allel kodierte CYBA-72Y-Antigen induzierte eine Erkennung durch die miniMLLC.

3.6 Erkennung synthetischer CYBA-Peptide durch die miniMLLC 2E8

Als Peptidkandidaten wurden sowohl die Nonamere GQKYMTAVV (CYBA-72Y₆₉₋₇₇) und GQKHMTAVV (CYBA-72H₆₉₋₇₇) als auch die Decamere WGQKYMTAVV (CYBA-72Y₆₈₋₇₇) und WGQKHMTAVV (CYBA-72H₆₈₋₇₇) untersucht. Nur die beiden Peptide, die Tyrosin enthielten, CYBA-72Y₆₉₋₇₇ und CYBA-72Y₆₈₋₇₇, induzierten eine Erkennung durch die miniMLLC 2E8 im Lysetest sowie IFN- γ -ELISpot-Assay (Abb.3.9). Sowohl das Decamer als auch das Nonamer mit Histidin an fünfter bzw. vierter Position (CYBA-72H₆₈₋₇₇, CYBA-72H₆₉₋₇₇) war dazu nicht in der Lage. Die Titration der Peptide zeigte, dass das Nonamer CYBA-72Y₆₉₋₇₇ in beiden Testverfahren eine stärkere Reaktivität induzierte als das Decamer CYBA-72Y₆₈₋₇₇. Die halbmaximale Lyse durch die miniMLLC 2E8 wurde bei einer Nonamerkonzentration von etwa 700 ng/ml erreicht. Die Decamerkonzentration, die diesen Effekt bewirkte, lag bei 2000 ng/ml (Abb.3.9A). Der gleiche Unterschied zeigte sich im parallel durchgeführten IFN- γ -ELISpot-Assay, wofür mit HLA-B*15:01 transfizierte L721.221- und 293T-Zellen zur Peptidpräsentation verwendet wurden. Die Erkennung der peptidbeladenen 293T-Zellen konnte bis zu einer Nonamerkonzentration von 1 ng/ml und einer Decamerkonzentration von 10 ng/ml nachgewiesen werden. Die Erkennungsgrenze der 293T-Zellen lag damit bei einer zehnfach niedrigeren Peptidkonzentration als die der peptidbeladenen L721.221-Zellen (Abb.3.9B).

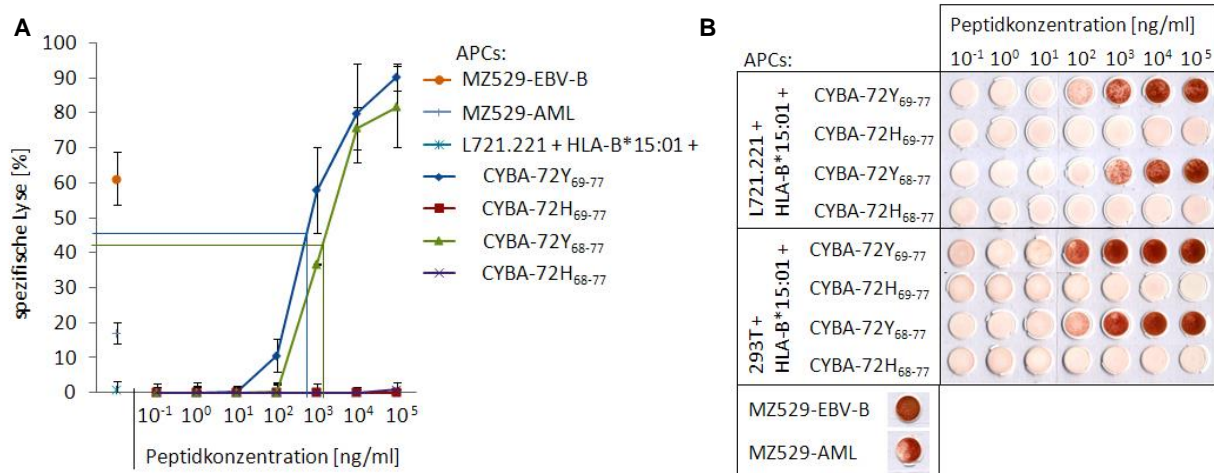


Abb.3.9: Erkennung der CYBA-Peptide durch die miniMLLC 2E8

Mit HLA-B*15:01 transient bzw. stabil transfizierte 293T- und L721.221-Zellen wurden mit den CYBA-Nonameren (CYBA-72Y / H₆₉₋₇₇) und -Decameren (CYBA-72Y / H₆₈₋₇₇) in den angegebenen Konzentrationen beladen.

In einem ⁵¹Chrom-Freisetzung-Assay (s. **Materialien & Methoden 2.2.1.9**) wurden die antigenpräsentierenden Zellen, peptidbeladene L721.221-Zellen sowie MZ529-EBV-B- und -AML-Zellen (je 2x10³ Zellen / TE), mit Na₂⁵¹CrO₄ markiert und mit der miniMLLC 2E8 (2x10⁴ Zellen / TE) kokubiert, um anschließend die von den lysierten Zellen freigesetzten ⁵¹Chrom-Nuklide zu messen. Für jeden Messwert der Doppelbestimmungen wurde die relative Lysekapazität berechnet und deren Mittelwert mit der dazugehörigen Standardabweichung dargestellt. Markiert sind die Peptidkonzentrationen, bei denen jeweils die halbmaximale Lyse erreicht wurde (**A**).

Im IFN-γ-ELISpot-Assay wurden die peptidbeladenen 293T- und L721.221-Zellen (je 2x10⁴ Zellen / TE) sowie MZ529-EBV-B- und -AML-Zellen (je 5x10⁴ Zellen / TE) auf Erkennung durch die miniMLLC 2E8 (1,5x10⁴ Zellen / TE) getestet (**B**).

Die CYBA-Peptide GQKYMTAVV (CYBA-72Y₆₉₋₇₇) und WGQKYMTAVV (CYBA-72Y₆₈₋₇₇) vermittelten im Gegensatz zu den Peptiden GQKHMTAVV (CYBA-72H₆₉₋₇₇) und WGQKHMTAVV (CYBA-72H₆₈₋₇₇) in ⁵¹Chrom-Freisetzung- und IFN-γ-ELISpot-Assays eine Erkennung durch die miniMLLC 2E8. Dabei wurde das Nonamer CYBA-72Y₆₉₋₇₇ in der niedrigsten Konzentration erkannt.

3.7 Identifizierung des Antigens der miniMLLCs 4D3, 7G9 und 7H1 aus dem Modell MZ529-AML/Buffy Coat 730

Durch Stimulation der CD8⁺-Lymphozyten des *Buffy Coat*-Spenders 730 mit AML-Zellen des Patienten MZ529 wurden über die miniMLLC 2E8 hinaus drei weitere miniMLLCs generiert, 4D3, 7G9 und 7H1 (s. **Materialien & Methoden 2.2.1.5**) (Albrecht *et al.*, 2011).

Die Erkennung von MZ529-EBV-B-Zellen durch diese miniMLLCs wurde mit HLA-spezifischen Antikörpern blockiert, um die HLA-Restriktion zu bestimmen. Das führte bei allen miniMLLCs des Modells zur zunehmenden Eingrenzung auf die beiden HLA-B-Allele als Restriktionselemente (**Abb.3.10A**). Die Transfektion von COS-7-Zellen mit den einzelnen HLA-

Molekülen des Modells ergab, dass die drei miniMLLCs genauso wie 2E8 ihr Antigen über HLA-B*15:01 erkannten (**Abb.3.10B**). Bei diesen Tests wies die miniMLLC 4D3 im Vergleich zu den anderen miniMLLCs durchgehend eine geringe Reaktivität auf (**Abb.3.10**).

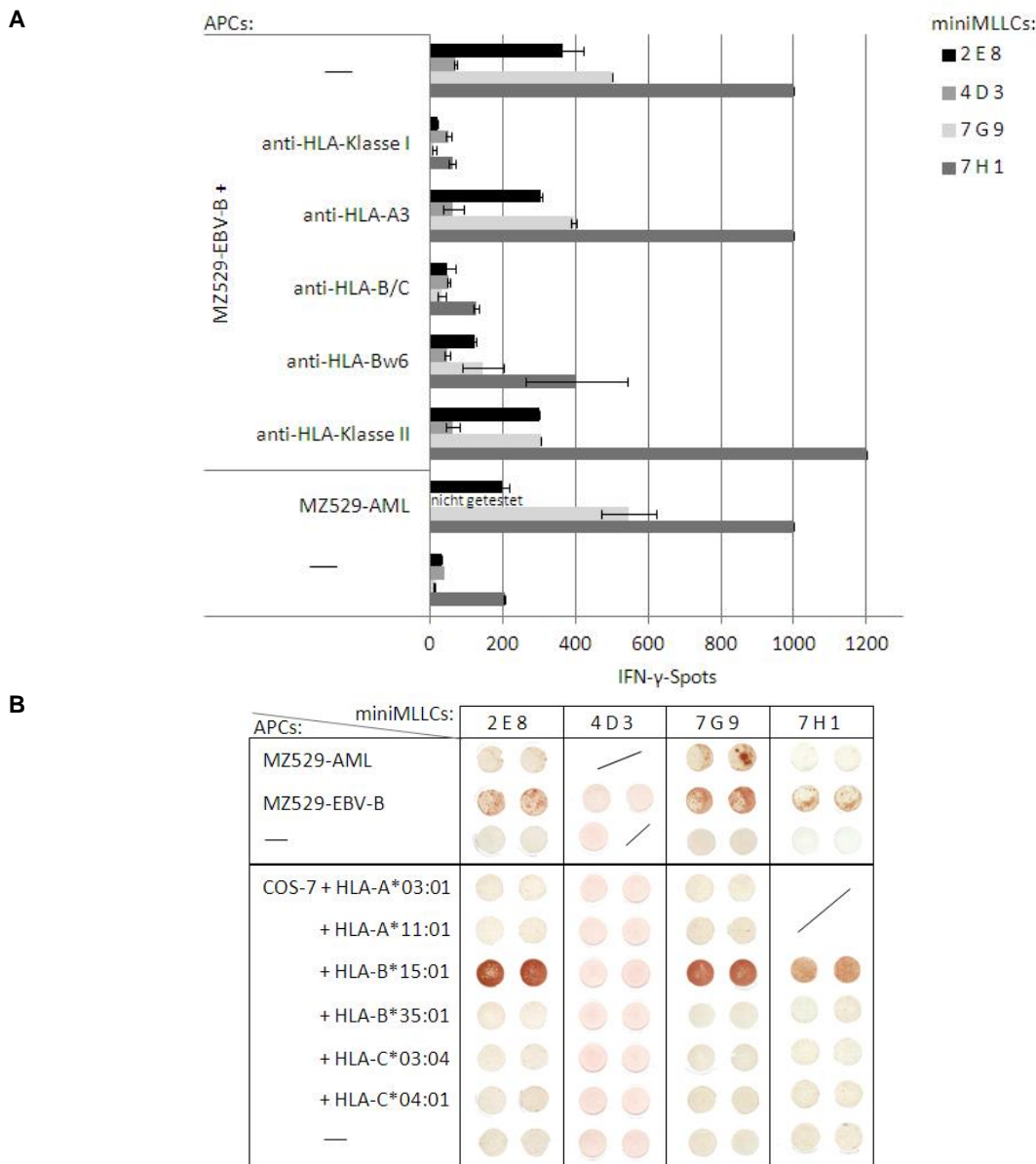


Abb.3.10: HLA-Restriktion der miniMLLCs 2E8, 4D3, 7G9 und 7H1 aus Buffy Coat 730

In einem IFN- γ -ELISpot-Assay wurde die Erkennung der AML- und EBV-B-Zellen des Patienten MZ529 (je 5×10^4 Zellen / TE) durch die miniMLLCs 2E8 (1×10^4 Zellen / TE), 4D3 ($1,5 \times 10^4$ Zellen / TE), 7G9 (1×10^4 Zellen / TE) und 7H1 (1×10^4 Zellen / TE) analysiert. Dabei wurden die MZ529-EBV-B-Zellen auch mit HLA-spezifischen Antikörpern koinkubiert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus Doppelbestimmungen mit der dazugehörigen Standardabweichung (**A**).

Neben der Reaktivität der miniMLLCs 2E8, 4D3, 7G9 und 7H1 (je 1×10^4 Zellen / TE) gegenüber MZ529-EBV-B- und -AML-Zellen (je 5×10^4 Zellen / TE) wurden COS-7-Zellen (2×10^4 Zellen / TE), die mit den HLA-Allelen des Patienten MZ529 transfiziert waren, als Zielzellen in IFN- γ -ELISpot-Assays untersucht (**B**).

Aufgrund der Ähnlichkeit des Erkennungsmusters der drei miniMLLCs 4D3, 7G9 und 7H1 zu dem Reaktionsmuster der miniMLLC 2E8 wurden diese direkt auf ihre Reaktivität gegenüber

dem cDNA-Klon *CYBA* Exon 1-6 (bp1-588) #428.67.4, seiner für die Epitopidentifizierung entscheidenden Fragmente [*CYBA* Exon 4 (bp1-231), (bp1-228)] sowie den vier *CYBA*-Peptiden (*CYBA*-72Y / H₆₉₋₇₇, *CYBA*-72Y / H₆₈₋₇₇) untersucht. Sowohl die cDNAs *CYBA* Exon 1-6 (bp1-588) #428.67.4 und *CYBA* Exon 1-4 (bp1-231) als auch die Peptide *CYBA*-72Y₆₉₋₇₇ und *CYBA*-72Y₆₈₋₇₇ wurden von allen vier miniMLLCs des Modells MZ529-AML/*Buffy Coat* 730 erkannt (**Abb.3.11**).

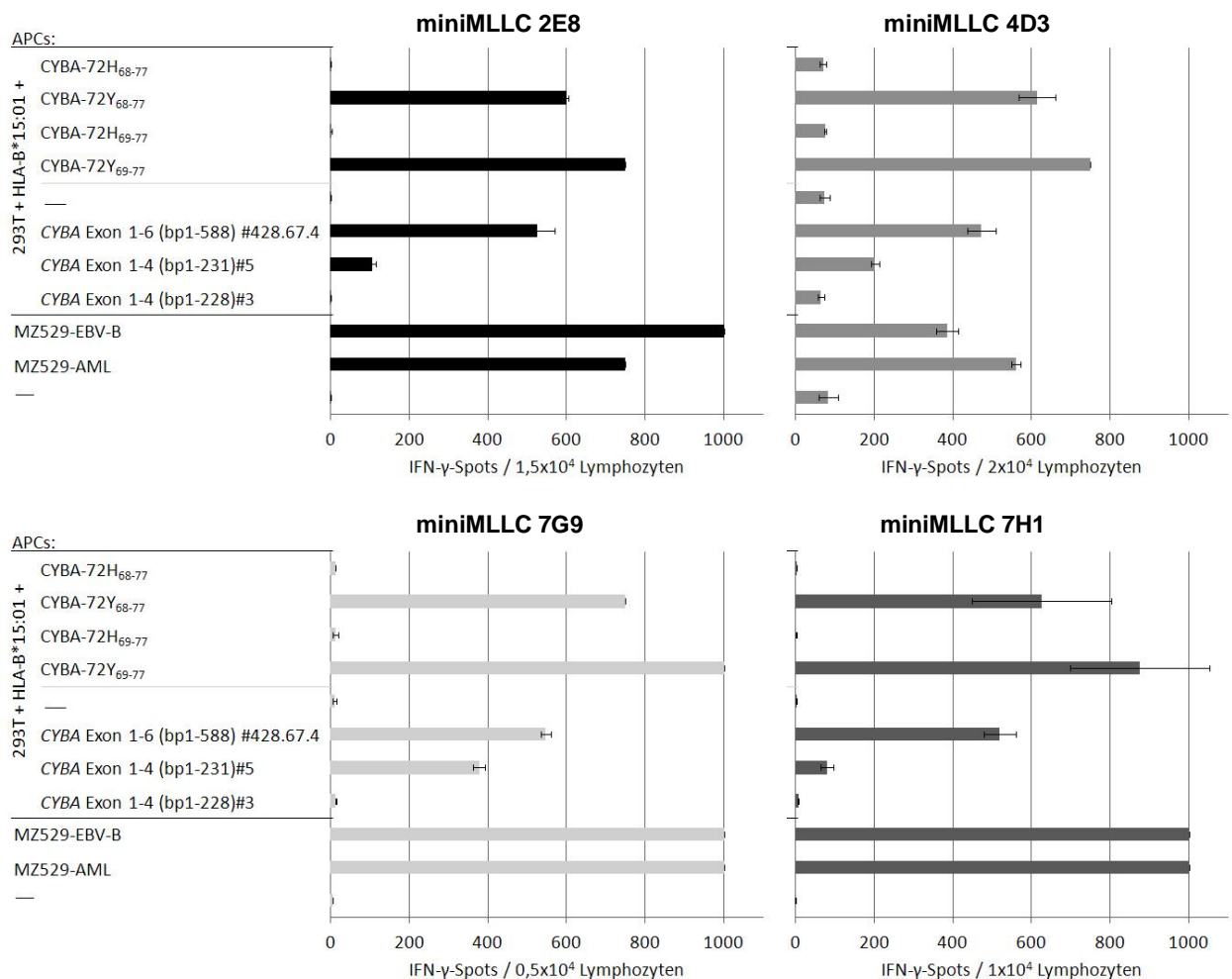


Abb.3.11: Erkennung von *CYBA*-72Y durch die miniMLLCs 2E8, 4D3, 7G9 und 7H1 aus *Buffy Coat* 730
 HLA-B*15:01-transfizierte 293T-Zellen wurden mit dem cDNA-Klon *CYBA* Exon 1-6 (bp1-558) #428.67.4 oder dessen klonierten Fragmenten [*CYBA* Exon 1-4 (bp1-228), (bp1-231)] kotransfiziert bzw. mit den *CYBA*-Peptiden (*CYBA*-72Y / H₆₉₋₇₇, *CYBA*-72Y / H₆₈₋₇₇) in einer Endkonzentration von 5 µg/ml beladen. Diese Zellen (2x10⁴ Zellen / TE) sowie MZ529-EBV-B- und -AML-Zellen (je 5x10⁴ Zellen / TE) wurden in IFN-γ-ELISpot-Assays auf Erkennung durch die miniMLLCs 2E8 (1,5x10⁴ Zellen / TE), 4D3 (2x10⁴ Zellen / TE), 7G9 (0,5x10⁴ Zellen / TE) und 7H1 (1x10⁴ Zellen / TE) getestet. Es wurde der Mittelwert aus Doppelbestimmungen gebildet und mit der dazugehörigen Standardabweichung dargestellt.

Für die Untersuchung der Avidität der vier miniMLLCs aus *Buffy Coat* 730 wurden Peptidtitrationen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die beiden Peptide *CYBA*-72H₆₉₋₇₇ und *CYBA*-72H₆₈₋₇₇ keine Erkennung induzierten und dass das Nonamer *CYBA*-72Y₆₉₋₇₇ von allen miniMLLCs besser erkannt wurde als das Decamer *CYBA*-72Y₆₈₋₇₇. Bei allen miniMLLCs bewirkte eine gegenüber dem Decamer zehnfach niedrigere Konzentration des Nonamers die halbmaximale

IFN- γ -Freisetzung (**Abb.3.12**). Am besten wurden die beiden Peptide von den miniMLLCs 7H1 und 7G9 erkannt, wobei die Nonamerkonzentration für die halbmaximale IFN- γ -Freisetzung bei etwa 10 ng/ml lag. Die schwächste Reaktivität zeigte die miniMLLC 4D3, deren halbmaximale IFN- γ -Freisetzung durch eine Nonamerkonzentration von 30 ng/ml induziert wurde. Dabei war die Lymphozytenzahl doppelt so hoch wie bei den anderen miniMLLCs.

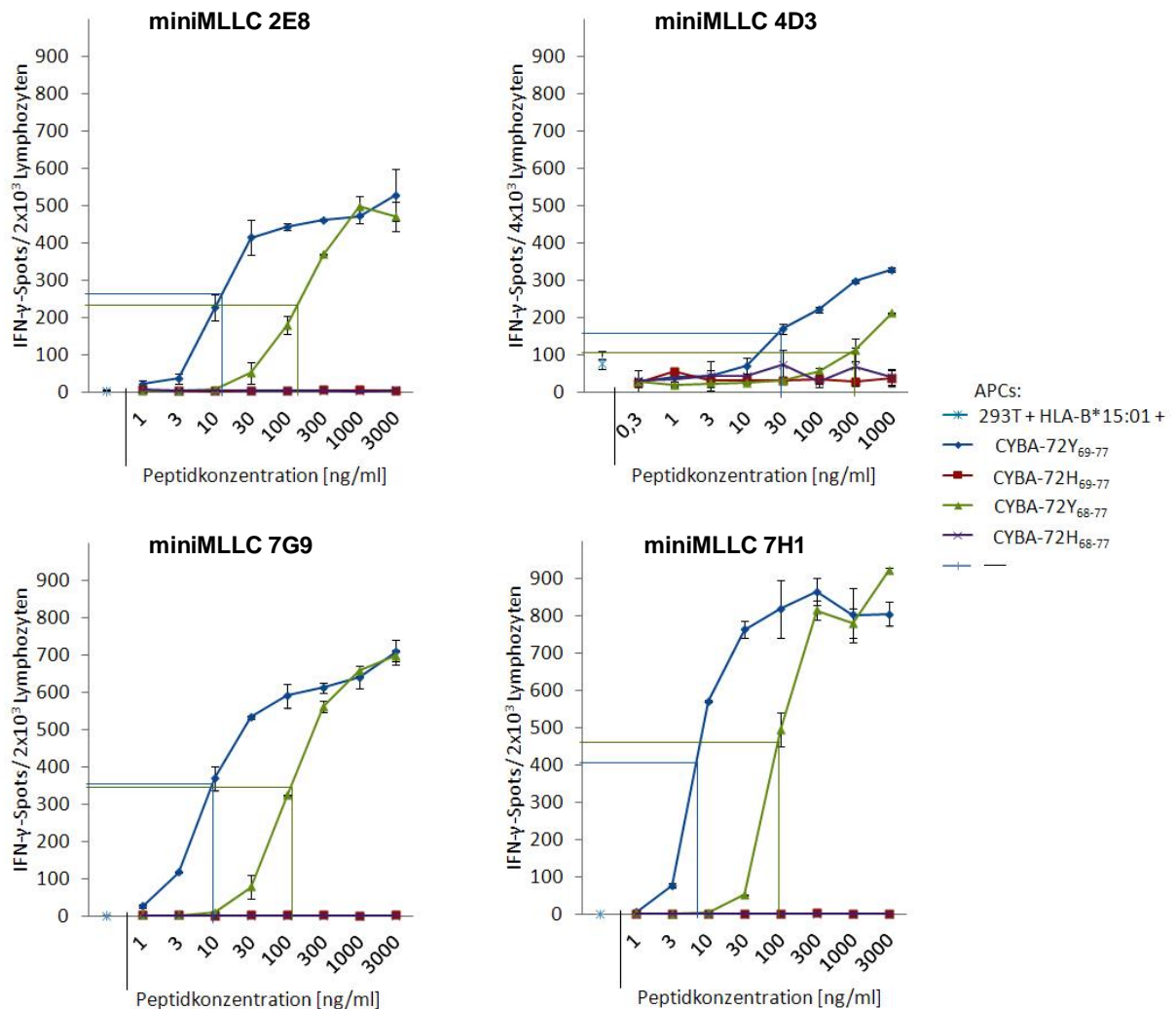


Abb.3.12: Erkennung titrierter CYBA-Peptide durch die miniMLLCs 2E8, 4D3, 7G9 und 7H1 aus Buffy Coat 730

Für IFN- γ -ELISpot-Assays wurden 293T-Zellen (2×10^4 Zellen / TE) mit HLA-B*15:01 transfiziert, anschließend mit den angegebenen Konzentrationen der CYBA-Nonamere (CYBA-72Y / H₆₉₋₇₇) und -Decamere (CYBA-72Y / H₆₈₋₇₇) beladen und auf Erkennung durch die miniMLLCs 2E8 (2×10^3 Zellen / TE), 4D3 (4×10^3 Zellen / TE), 7G9 (2×10^3 Zellen / TE) und 7H1 (2×10^3 Zellen / TE) getestet. Es wurde der Mittelwert aus Doppelbestimmungen gebildet und mit der dazugehörigen Standardabweichung dargestellt. Markiert sind die Peptidkonzentrationen, bei denen jeweils die halbmaximale IFN- γ -Freisetzung erreicht wurde.

Das Antigen CYBA-72Y wurde über HLA-B*15:01 nicht nur von der miniMLLC 2E8 erkannt, sondern auch von drei weiteren, unabhängig generierten miniMLLCs des *Buffy Coats* 730 (4D3, 7G9, 7H1). Von allen miniMLLCs wurde das Peptid CYBA-72Y₆₉₋₇₇ in der niedrigsten Konzentration erkannt.

3.8 Identifizierung des Antigens der miniMLLCs 2B8 und 2D10 aus dem Modell MZ987-AML/Buffy Coat 940

In dem Modell MZ987-AML/Buffy Coat 940 wurden durch Stimulation von CD8⁺-Lymphozyten des HLA-Klasse I-übereinstimmenden *Buffy Coat*-Spenders 940 (HLA-A*02:01, -B*15:01, -B*15:17, -C*03:04, -C*07:01) mit AML-Blasten des Patienten MZ987 (FAB M4) die miniMLLCs 2B8 und 2D10 generiert (s. **Materialien & Methoden 2.2.1.5**) (Albrecht *et al.*, 2011).

HLA-Blockadeexperimente zeigten, dass beide miniMLLCs durch HLA-B-Allele restringiert waren (**Abb.3.13A**). Die Transfektion der einzelnen HLA-Moleküle des Modells in COS-7-Zellen führte zur Erkennung von HLA-B*15:01-transfizierten COS-7-Zellen durch die miniMLLCs 2B8 und 2D10 (**Abb.3.13B**).

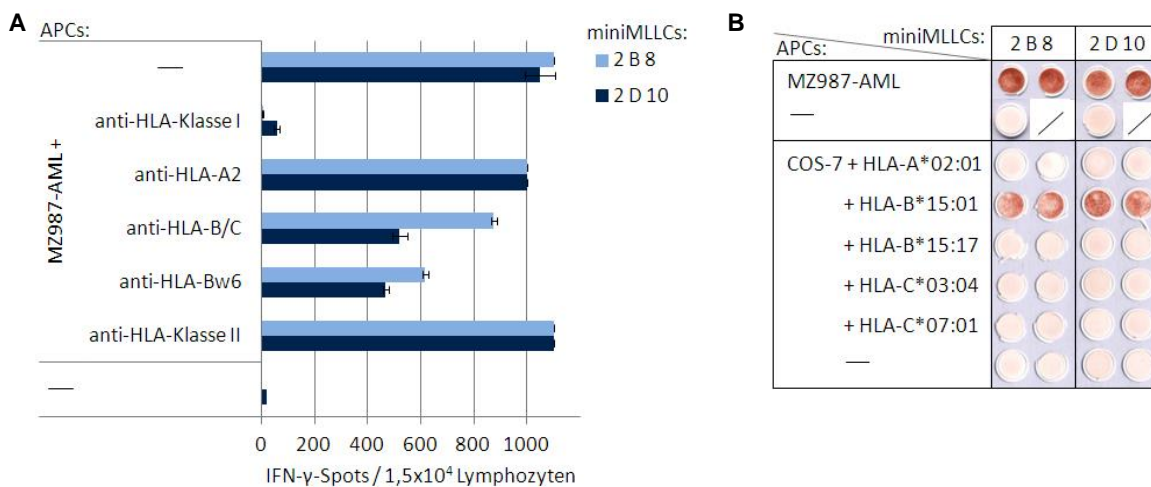


Abb.3.13: HLA-Restriction der miniMLLCs 2B8 und 2D10 aus Buffy Coat 940

Die AML-Zellen des Patienten MZ987 (5×10^4 Zellen / TE) wurden mit HLA-spezifischen Antikörpern koinkubiert und die Reaktivität der miniMLLCs 2B8 und 2D10 (je $1,5 \times 10^4$ Zellen / TE) ihnen gegenüber in einem IFN- γ -ELISpot-Assay analysiert. Der Mittelwert aus Doppelbestimmungen wurde berechnet und mit der dazugehörigen Standardabweichung dargestellt (**A**).

COS-7-Zellen (2×10^4 Zellen / TE) wurden mit den HLA-Molekülen des Patienten MZ987 transfiziert und ebenso wie MZ987-AML-Zellen (5×10^4 Zellen / TE) in Doppelwerten in einem IFN- γ -ELISpot-Assay auf Erkennung durch die miniMLLCs 2B8 und 2D10 (je $1,5 \times 10^4$ Zellen / TE) getestet (**B**).

Aufgrund der festgestellten Ähnlichkeit mit dem Reaktionsmuster der miniMLLCs des Modells MZ529-AML/Buffy Coat 730 (**Abb.3.10**) wurde zunächst die Reaktivität der miniMLLCs 2B8 und 2D10 gegenüber Zellen des ebenfalls HLA-B*15:01-positiven Patienten MZ529 überprüft. In einem Kreuzreaktivitätstest zeigte sich, dass die miniMLLCs 2B8 und 2D10 aus *Buffy Coat* 940 neben den EBV-transformierten B- und AML-Zellen des Patienten MZ987 auch die des Patienten MZ529 erkannten und umgekehrt die vier miniMLLCs des Modells MZ529-AML/Buffy Coat 730 (2E8, 4D3, 7G9, 7H1) die EBV-transformierten B- und AML-Zellen des Patienten MZ987 (**Abb.3.14**).

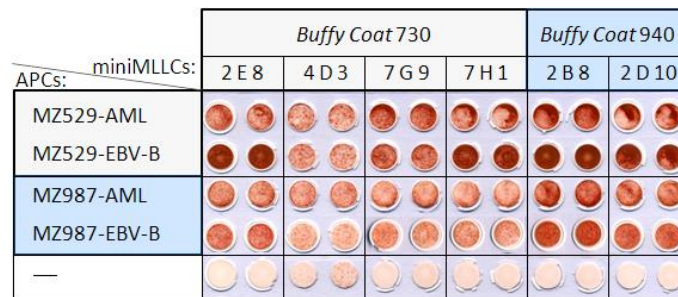


Abb.3.14: Wechselseitige Kreuzreaktivität der miniMLLCs aus den Modellen MZ987-AML/Buffy Coat 940 und MZ529-AML/Buffy Coat 730

In IFN- γ -ELISpot-Assays wurde in Doppelwerten die Reaktivität der miniMLLCs des *Buffy Coats* 940 (1×10^4 2B8, 2×10^4 2D10 bzw. je $1,5 \times 10^4$ Lymphozyten bei MZ987-EBV-B / TE) und des *Buffy Coats* 730 ($1,5 \times 10^4$ 2E8, 2×10^4 4D3, $0,5 \times 10^4$ 7G9, 1×10^4 7H1 bzw. je $1,5 \times 10^4$ Lymphozyten bei MZ987-EBV-B / TE) gegenüber den EBV-transformierten B- und AML-Zellen der beiden Patienten MZ987 und MZ529 (je 5×10^4 Zellen / TE) untersucht.

Daraufhin wurden die beiden miniMLLCs 2B8 und 2D10 auf ihre Reaktivität gegenüber CYBA-72Y getestet. Beide miniMLLCs erkannten den cDNA-Klon CYBA Exon 1-6 (bp1-588) #428.67.4 und dessen Fragment CYBA Exon 1-4 (bp1-231) sowie die Peptide CYBA-72Y₆₉₋₇₇ und CYBA-72Y₆₈₋₇₇. Die Peptide CYBA-72H₆₉₋₇₇ und CYBA-72H₆₈₋₇₇ wurden ebenso wenig erkannt wie der das CYBA-Protein bis zur 76.AS kodierende cDNA-Klon CYBA Exon 1-4 (bp1-228) (Abb.3.15).

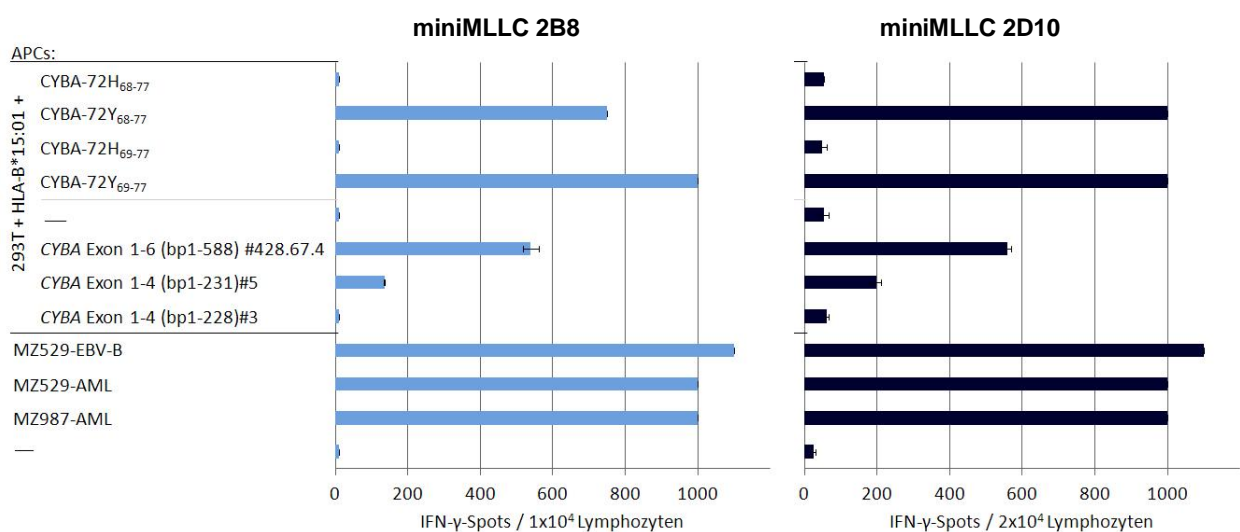


Abb.3.15: Erkennung von CYBA-72Y durch die miniMLLCs 2B8 und 2D10 aus Buffy Coat 940

Für einen IFN- γ -ELISpot-Assay wurden 293T-Zellen mit HLA-B*15:01 transfiziert und mit dem cDNA-Bank-Klon CYBA Exon 1-6 (bp1-588) #428.67.4 oder dessen klonierten Fragmenten [CYBA Exon 1-4 (bp1-231), (bp1-228)] kotransfiziert bzw. mit den CYBA-Peptiden (CYBA-72Y / H₆₉₋₇₇, CYBA-72Y / H₆₈₋₇₇) in einer Endkonzentration von 5 μ g/ml beladen. Die Erkennung von diesen Zellen (je 2×10^4 Zellen / TE) sowie von MZ529-EBV-B-, MZ529-AML- und MZ987-AML-Zellen (je 5×10^4 Zellen / TE) durch die miniMLLCs 2B8 (1×10^4 Zellen / TE) und 2D10 (2×10^4 Zellen / TE) wurde überprüft. Dargestellt ist der Mittelwert aus Doppelbestimmungen mit der dazugehörigen Standardabweichung.

Bei der Untersuchung der Reaktivität gegenüber den CYBA-Peptiden zeigte sich, dass auch die miniMLLCs 2B8 und 2D10 das Nonamer CYBA-72Y₆₉₋₇₇ um ein Zehnfaches besser

erkannten als das Decamer CYBA-72Y₆₈₋₇₇. Bei beiden miniMLLCs wurde die halbmaximale IFN- γ -Freisetzung durch eine Nonamerkonzentration von etwa 20 ng/ml ausgelöst. Die beiden Peptide CYBA-72H₆₉₋₇₇ und CYBA-72H₆₈₋₇₇ induzierten keine Erkennung (**Abb.3.16**).

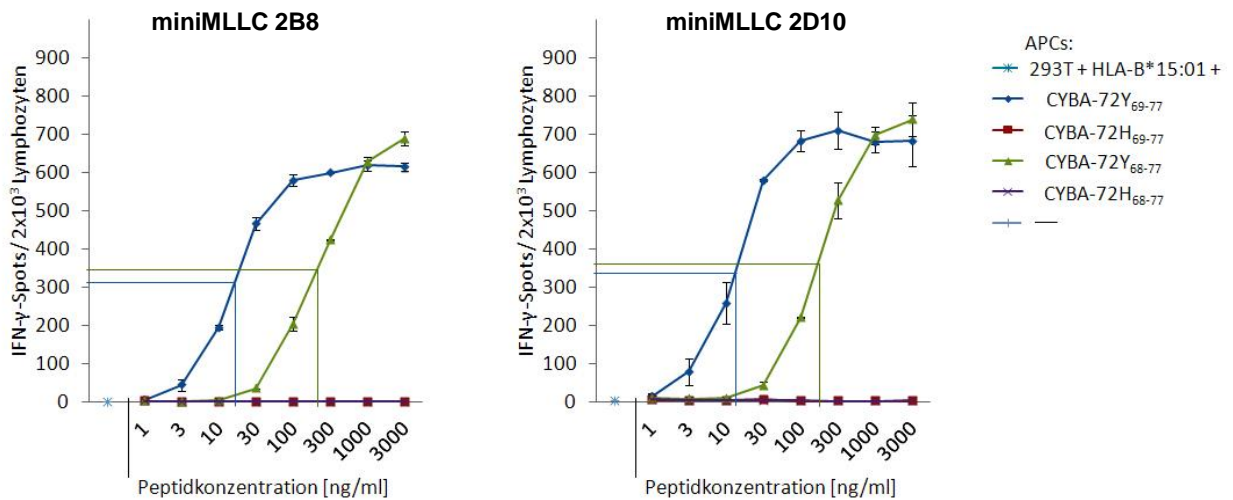


Abb.3.16: Erkennung titrierter CYBA-Peptide durch die miniMLLCs 2B8 und 2D10 aus *Buffy Coat* 940

HLA-B*15:01-transfizierte 293T-Zellen (2×10^4 Zellen / TE) wurden mit CYBA-Nonameren (CYBA-72Y / H₆₉₋₇₇) und -Decameren (CYBA-72Y / H₆₈₋₇₇) in den angegebenen Konzentrationen beladen, um sie in einem IFN- γ -ELISpot-Assay auf Erkennung durch die miniMLLCs 2B8 und 2D10 (je 2×10^3 Zellen / TE) zu testen. Von Doppelbestimmungen wurde jeweils der Mittelwert gebildet und mit der dazugehörigen Standardabweichung graphisch dargestellt. Markiert sind die Peptidkonzentrationen, bei denen jeweils die halbmaximale IFN- γ -Freisetzung erreicht wurde.

Die zwei miniMLLCs des Modells MZ987-AML/*Buffy Coat* 940 2B8 und 2D10 wiesen dieselbe Antigenspezifität auf wie die vier miniMLLCs des Modells MZ529-AML/*Buffy Coat* 730 (2E8, 4D3, 7G9, 7H1). Sie erkannten das über HLA-B*15:01 präsentierte CYBA-Peptid GQKYMTAVV in niedrigster Konzentration.

3.9 Präsentation von CYBA-72Y über verschiedene HLA-B15-Allele

Verschiedene HLA-B15-Allele wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, über die Präsentation von CYBA-72Y eine Erkennung durch die CYBA-72Y-reaktiven miniMLLCs aus den *Buffy Coats* 730 (2E8, 4D3, 7G9, 7H1) und 940 (2B8, 2D10) auszulösen.

Recherchen in Datenbanken zur HLA-Bindungsvorhersage (www.bimas.cit.nih.gov, www.cbs.dtu.dk, www.syfpeithi.de) ergaben (Larsen *et al.*, 2010; Parker *et al.*, 1994), dass die CYBA-Peptide sowohl an HLA-B*15:01 als auch an HLA-B*15:03 binden können (**s. Anhang 5.8**). Weitere HLA-B15-Allele, die zur experimentellen Überprüfung der Antigenpräsentation zur Verfügung standen, waren in den Datenbanken nicht erfasst (HLA-B*15:04, -B*15:07) oder banden die Peptide laut Vorhersage nicht (HLA-B*15:17).

Neben HLA-B*15:01 war nur HLA-B*15:07 in der Lage, eine Erkennung des kotransfizierten cDNA-Klons CYBA Exon 1-6 (bp1-588) #428.67.4 durch die CYBA-72Y-reaktiven miniMLLCs aus den beiden *Buffy Coats* zu bewirken (**Abb.3.17**).

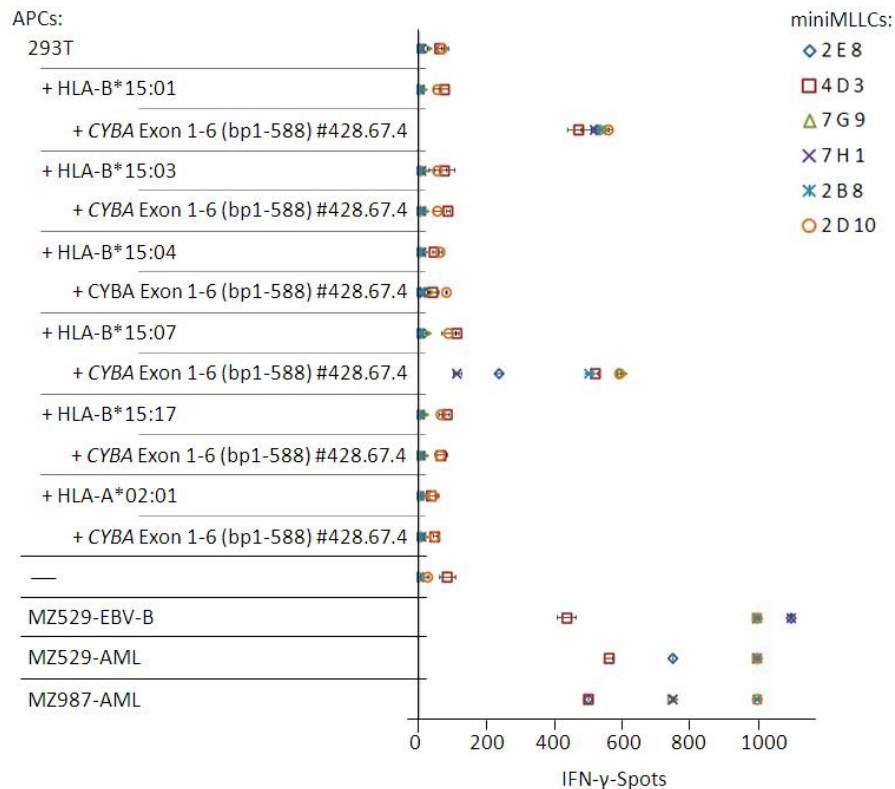


Abb.3.17: Präsentation von CYBA-72Y über verschiedene HLA-B15-Allele

293T-Zellen wurden mit HLA-B*15:01, -B*15:03, -B*15:04, -B*15:07, -B*15:17 bzw. -A*02:01 (s. Anhang 5.5) allein oder zusammen mit dem cDNA-Klon *CYBA* Exon 1-6 (bp1-588) #428.67.4 transfiziert. Die Transfektanten (2×10^4 Zellen / TE) wurden ebenso wie MZ529-EBV-B-, MZ529-AML- und MZ987-AML-Zellen (je 5×10^4 Zellen / TE) im IFN- γ -ELISpot-Assay auf Erkennung durch die miniMLLCs aus dem *Buffy Coat* 730 ($1,5 \times 10^4$ 2E8, 2×10^4 4D3, $0,5 \times 10^4$ 7G9, 1×10^4 7H1 / TE) und dem *Buffy Coat* 940 (1×10^4 2B8, 2×10^4 2D10 / TE) getestet. Von Doppelbestimmungen wurde jeweils der Mittelwert berechnet und mit der dazugehörigen Standardabweichung dargestellt.

Von fünf getesteten HLA-B15-Allelen (HLA-B*15:01, -B*15:03, -B*15:04, -B*15:07, -B*15:17) erwiesen sich nur HLA-B*15:01 und HLA-B*15:07 in der Lage das Antigen *CYBA*-72Y zu präsentieren und lösten eine Erkennung durch die miniMLLCs der *Buffy Coats* 730 und 940 aus.

3.10 Untersuchung der Frequenzverteilung der *CYBA*-242-Genotypen

Die Sequenzierung der *CYBA*-Transkripte von Zellen des AML-Patienten MZ529 und der miniMLLC 2E8 des HLA-Klasse I-passenden *Buffy Coat*-Spenders 730 sowie von AML-Zellen des Patienten MZ987 und der miniMLLC 2D10 des HLA-Klasse I-identen *Buffy Coat*-Spenders 940 zeigte, dass beide *Buffy Coat*-Spender homozygot für das *CYBA*-242C-Allel waren und somit ausschließlich *CYBA*-72H exprimierten. Während der Patient MZ529 heterozygot war, erwies sich MZ987 als homozygot für das *CYBA*-242T-Allel (Abb.3.18). Folglich exprimierten die Zellen beider Patienten *CYBA*-72Y. COS-7-Zellen waren ebenfalls homozygot für das *CYBA*-242T-Allel, 293T-Zellen dagegen für das *CYBA*-242C-Allel (s. Anhang 5.6).

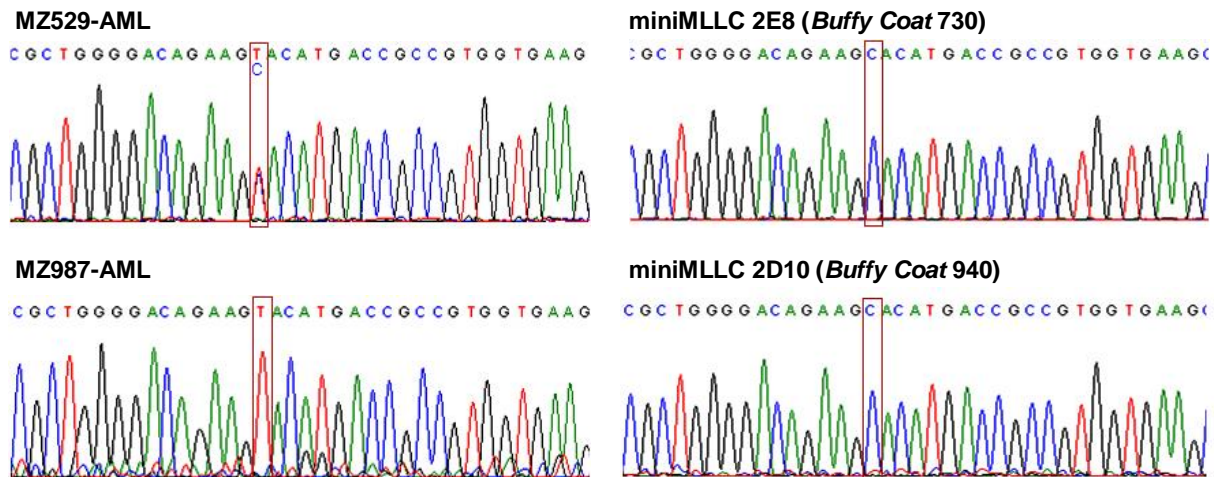


Abb.3.18: CYBA-242-Typisierung der AML-Patienten MZ529 und MZ987 sowie der Buffy Coat-Spender 730 und 940

Aus den AML-Zellen der beiden Patienten MZ529 und MZ987 sowie den miniMLLCs 2E8 (*Buffy Coat* 730) und 2D10 (*Buffy Coat* 940) wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Nach Amplifikation der *CYBA*-Transkripte mit den Primern *CYBA.p-15ATG.se* und *CYBA.p488.rev* wurden die PCR-Produkte sequenziert. In den Sequenzen ist der Polymorphismus rs4673 rot umrandet.

Für die Untersuchung der Verteilung von den *CYBA-242T*- und *CYBA-242C*-Allelen wurde ein Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) genutzt. Bei Vorhandensein des *CYBA-242T*-Allels liegt um die Nukleotidposition 242 die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *RsaI* (GTAC) vor. Diese ist auf dem *CYBA-242C*-Allel an der homologen Position nicht vorhanden. Daher wurde aus Zellen von gesunden Spendern und Patienten mit unterschiedlichen malignen Erkrankungen die genomische DNA oder RNA, die anschließend in cDNA umgeschrieben wurde, isoliert. Nach einer *CYBA*-spezifischen PCR wurde jeweils das aufgereinigte Reaktionsprodukt mit der Endonuklease *RsaI* verdaut und zur Allelbestimmung gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anhand der Größe der entstandenen Fragmente wurde der *CYBA-242*-Genotyp bestimmt. Wie schematisch dargestellt (**Abb.3.19A**), lagen bei Verwendung von cDNA als Matrize für die *CYBA*-spezifische PCR innerhalb des PCR-Produkts zwei *RsaI*-Schnittstellen vor, unabhängig von dem Polymorphismus rs4673. Deswegen entstanden bei einem homozygoten *CYBA-242C*-Genotyp nach dem Restriktionsverdau des PCR-Produkts drei Fragmente unterschiedlicher Größe (124 bp, 52 bp, 330 bp). Die zusätzliche Schnittstelle auf dem *CYBA-242T*-Allel führte zur Bildung des 124 bp und des 52 bp großen Fragments sowie eines 55 bp und eines 275 bp großen Fragments. In dem PCR-Produkt der genomischen DNA war nur bei Vorliegen des *CYBA-242T*-Allels eine *RsaI*-Schnittstelle vorhanden (**Abb.3.19B**). Dadurch entstanden nach dem *RsaI*-Verdau des 380 bp langen PCR-Produkts ein 308 bp und ein 72 bp großes Fragment. Exemplarisch sind in **Abb.3.19** Agarosegele abgebildet, auf die Proben mit unterschiedlichem *CYBA-242*-Genotyp (CC, TC, TT) aufgetragen wurden. Die Ergebnisse des *RsaI*-Verdau wurden durch Sequenzierung von 20 Proben sowie Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte von 23 Proben bestätigt (**Abb.3.18; s. Anhang 5.6**).

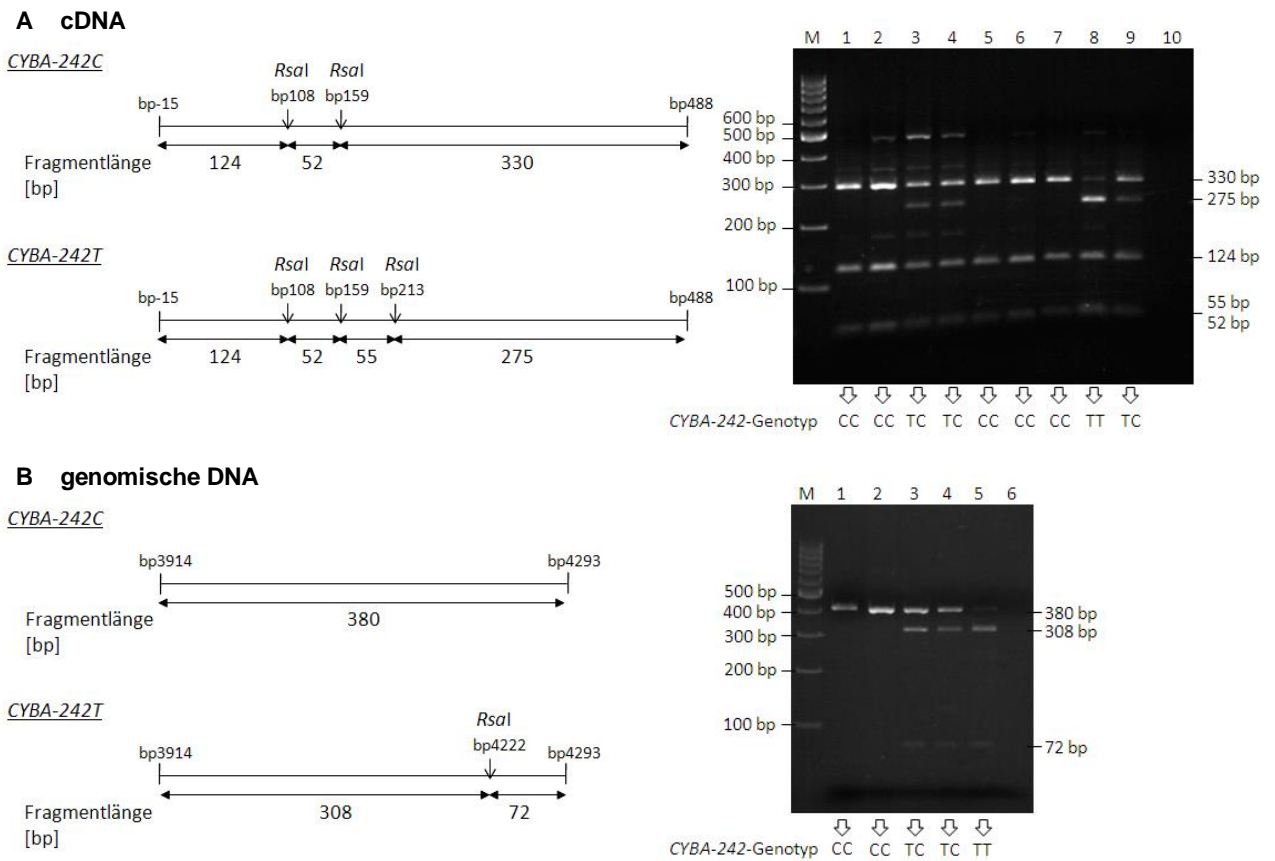


Abb.3.19: Bestimmung von CYBA-242-Genotypen mittels RsaI-Restriktionsverdau von PCR-Produkten

Schematisch sind die Produkte von CYBA-spezifischen PCRs mit den darin enthaltenen RsaI-Schnittstellen und den daraus resultierenden Fragmenten dargestellt (links). Die obere Beschriftung gibt die Positionierung der RsaI-Schnittstellen sowie des jeweiligen Amplikons innerhalb des CYBA-Transkripts (A) bzw. -Gens (B) wieder.

In 2%-igen Agarosegelen wurden die mit RsaI verdauten Produkte der CYBA-spezifischen PCRs zusammen mit Wasserkontrollen (A: 10.; B: 6.) und einem 100 bp-Marker (M) elektrophoretisch aufgetrennt (rechts). Für die CYBA-spezifischen PCRs, bei denen cDNAs als Matrize verwendet wurden, wurden die Primer CYBA.p15ATG.se und CYBA.p488.rev eingesetzt. Auf das Gel A wurden die verdauten PCR-Produkte von cDNAs aus Zellen des Buffy Coat-Spenders 730 (1. miniMLLC 2E8, 2. EBV-transformierte B-Zellen), des Patienten MZ529 (3. EBV-transformierte B-Zellen, 4. AML-Zellen) und des Buffy Coat-Spenders 940 (5. miniMLLC 2D10, 6. EBV-transformierte B-Zellen) sowie des AML-Patienten MZ169 (7.) und der Buffy Coat-Spender BC017 (8.) und BC987 (9.) aufgetragen. Bei genomischen DNA-Proben wurde CYBA mit Hilfe der Primer CYBA.ex3p168.se und CYBA.ex4p286.rev amplifiziert. Gel B wurde mit den verdauten PCR-Produkten der genomischen DNA von Zellen des Buffy Coat-Spenders 730 (1. miniMLLC 2E8, 2. EBV-transformierte B-Zellen), des Patienten MZ529 (3. EBV-transformierte B-Zellen, 4. AML-Zellen) und des Buffy Coat-Spenders BC460 (5.) beladen. Die sich aus dem Bandenmuster ergebenden CYBA-242-Genotypen der Proben sind unterhalb der Gele angegeben.

Mit Hilfe des RsaI-Restriktionsverdaus wurden 481 gesunde Spender und Patienten mit unterschiedlichen malignen Erkrankungen für CYBA-242 genotypisiert. Von den Untersuchten trugen insgesamt 55,9% das CYBA-242T-Allel, wobei 6,4% dafür homozygot waren (Abb.3.20).

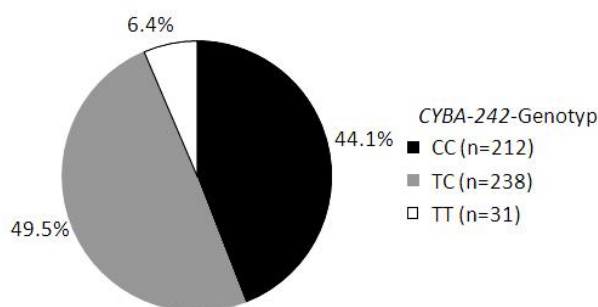


Abb.3.20: CYBA-242-Genotypverteilung

Aus den Zellen von insgesamt 481 gesunden und erkrankten Individuen wurde die genomische DNA oder RNA isoliert. Anschließend wurde die genomische DNA sowie die aus der RNA generierte cDNA als Matrize für CYBA-spezifische PCRs verwendet. Mit Hilfe des Restriktionsverdau der PCR-Produkte mit der Endonuklease *RsaI* und der anschließenden gelelektrophoretischen Auftrennung wurde der CYBA-242-Genotyp der Probanden bestimmt (n: Anzahl an Individuen).

In der CYBA-242-Genotypverteilung und der Frequenzverteilung der CYBA-242T- und CYBA-242C-Allele gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen gesunden Spendern (n=217) und Patienten mit unterschiedlichen malignen Erkrankungen (n=264). Von den gesunden Spendern waren 47,0% heterozygot und 5,5% homozygot für das CYBA-242T-Allel. Bei den Patienten waren dies 51,5% bzw. 7,2% (Tab.3.1). Einzelne Patientengruppen wiesen Unterschiede zu diesem Verteilungsmuster auf, aber aufgrund der niedrigen Patientenzahlen können diese nur als tendenziell angesehen werden (s. Anhang 5.7).

	Anzahl	CYBA-242-Genotyp			CYBA-242-Allelfrequenz	
		CC (%)	TC (%)	TT (%)	C	T
Gesunde	217	103 (47,5)	102 (47,0)	12 (5,5)	0,71	0,29
Malignompatienten	264	109 (42,3)	136 (51,5)	19 (7,2)	0,67	0,33

Tabelle 3.1: Verteilung der CYBA-242-Genotypen und -Allelfrequenzen bei Gesunden und Malignompatienten

Bei Eingrenzung auf HLA-B*15:01- bzw. HLA-B*15:07-positive Individuen zeigte sich, dass von den 30 gesunden Spendern keiner homozygot für das CYBA-242T-Allel war. Für das CYBA-242C-Allel waren 73,3% (n=22) homozygot, entsprechend waren die restlichen 26,7% (n=8) heterozygot. Bei den Patienten (n=41) trug ein Anteil von 53,7% (n=22) mindestens ein CYBA-242T-Allel, von denen 9,8% (n=4) dafür homozygot waren (Daten nicht gezeigt). Ähnlich waren die Verteilungen bei HLA-B15-positiven Spendern (n=47) und Patienten (n=52) (Daten nicht gezeigt).

Die Genotypisierung von gesunden und erkrankten Individuen für CYBA-242 erfolgte mit Hilfe einer Schnittstelle für *RsaI*, die nur auf dem Thyminallel vorhanden ist. Da es keinen Unterschied in der Genotyp- und Allelverteilung zwischen den beiden Kollektiven gab, wurden sie zusammengefasst. Daraus ergab sich, dass 49,5% der Untersuchten heterozygot und 6,4% für das CYBA-242T- bzw. 44,1% für das CYBA-242C-Allel homozygot waren.

3.11 Erkennung von nicht-malignen Zellen der Hämatopoese durch CYBA-72Y-spezifische T-Lymphozyten

Die NADPH-Oxidasen 1 bis 4, die die von *CYBA* kodierte membrangebundene p22phox-Untereinheit enthalten, sind in unterschiedlichen Zelltypen zu finden. Doch wurde die Expression von *CYBA* vor allem in hämatopoetischen Zellen nachgewiesen (www.proteinatlas.org, Uhlen *et al.*, 2010 & 2005).

Zur Untersuchung der Expression und Erkennung des Antigens CYBA-72Y wurden hämatopoetische Subpopulationen von drei gesunden *Buffy Coat*-Spendern (BC579, BC967, DH), die HLA-B*15:01-positiv waren und mindestens ein *CYBA-242T*-Allel trugen, auf Erkennung durch die CYBA-72Y-spezifische miniMLLC 2E8 getestet. Dafür wurden Granulozyten sowie aus den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) Monozyten, T- und B-Lymphozyten isoliert. Nachdem durchflusszytometrisch die Reinheit der gewonnenen Subpopulationen überprüft worden ist (Daten nicht gezeigt), wurde ihre Erkennung durch die miniMLLC in IFN- γ -ELISpot-Assays untersucht. Die PBMCs aller drei BC-Spender wurden von der CYBA-72Y-spezifischen miniMLLC 2E8 erkannt. Eine besonders starke Reaktivität induzierten die Monozyten der BC-Spender. Die B-Lymphozyten von zwei der drei BC-Spender wurden schwach erkannt. Weder die T-Lymphozyten noch Granulozyten bewirkten eine Erkennung durch die miniMLLC (**Abb.3.21**).

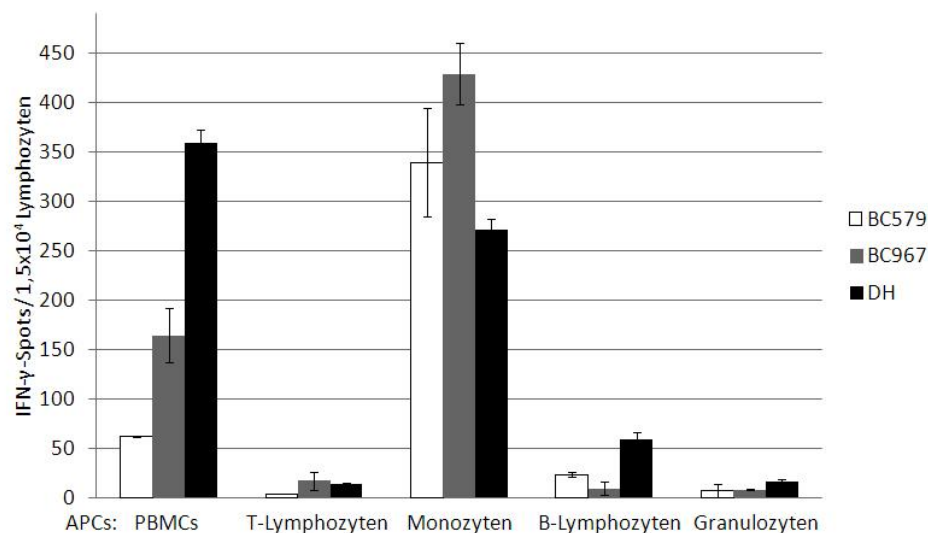


Abb.3.21: Erkennung von nicht-malignen Zellen der Hämatopoese HLA-B*15:01-positiver *Buffy Coat*-Spender durch die CYBA-72Y-spezifische miniMLLC 2E8

Von den *Buffy Coat*-Spendern BC579, BC967 und DH, die HLA-B*15:01-positiv und Träger mindestens eines *CYBA-242T*-Allels waren, wurden über Dichtegradientenzentrifugation PBMCs gewonnen. Mit Hilfe von *Micro Beads*, an denen spezifische anti-CD-Antikörper gekoppelt waren, wurden aus den PBMCs Monozyten ($CD14^+$), B- ($CD19^+CD20^+$) und T-Lymphozyten ($CD4^+CD8^+$) angereichert. Granulozyten wurden aus dem Vollblut bei BC579 und BC967 über Dichtegradientenzentrifugation bzw. bei DH mittels anti-CD66abce-markierter *Micro Beads* separiert (s. **Materialien & Methoden 2.2.1.3**). Von BC579 und BC967 wurden jeweils 1×10^4 APCs pro TE im IFN- γ -ELISpot-Assay verwendet. Die APCs des Spenders DH wurden nach 48-stündiger Inkubation mit jeweils 3×10^4 Zellen pro TE bzw. $0,7 \times 10^4$ Monozyten pro TE eingesetzt. Die APCs der drei *Buffy Coat*-Spender wurden auf Erkennung durch die miniMLLC 2E8 ($1,5 \times 10^4$ Zellen / TE) getestet. Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen und die dazugehörigen Standardabweichungen.

Von den beiden Spendern BC967 und DH sowie drei weiteren HLA-B*15:01-positiven *Buffy Coat*-Spendern (BC087, BC241, BC848) sind außerdem über Plastikadhärenz Monozyten angereichert worden, die anschließend durch entsprechende Zytokincocktails zu unreifen (engl. *immature dendritic cells*, iDCs) bzw. reifen dendritischen Zellen (engl. *mature dendritic cells*, mDCs) ausdifferenziert wurden. Mit Hilfe spezifischer Reifungsmarker wurden die Monozyten, iDCs und mDCs durchflusszytometrisch überprüft (Daten nicht gezeigt). Die beiden dendritischen Zelltypen wurden von der CYBA-72Y-spezifischen miniMLLC 2E8 stärker erkannt als die Monozyten. Die Zellen von BC848, der im Gegensatz zu den anderen *Buffy Coat*-Spendern kein CYBA-242T-Allel trug, induzierten keine Reaktivität bei der miniMLLC (**Abb.3.22**).

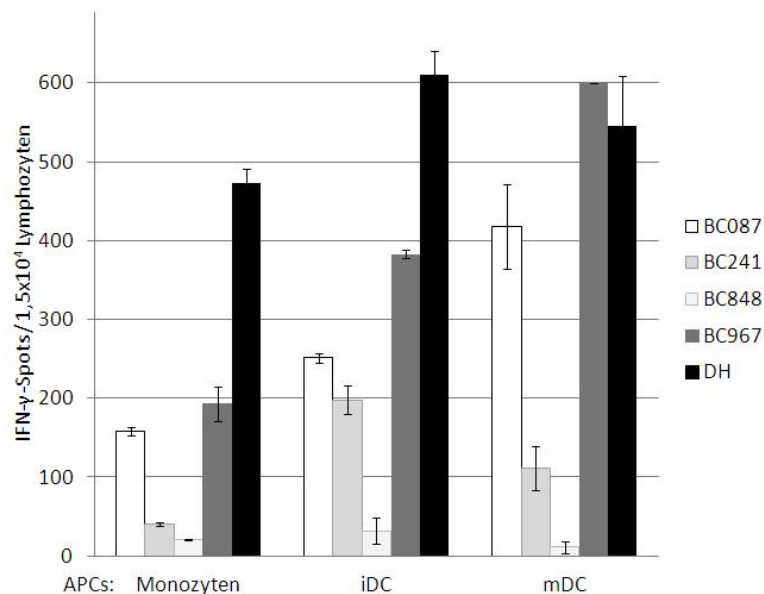


Abb.3.22: Erkennung von Monozyten und dendritischen Zellen HLA-B*15:01-positiver *Buffy Coat*-Spender durch die CYBA-72Y-spezifische miniMLLC 2E8

Aus den PBMCs der HLA-B*15:01-positiven *Buffy Coat*-Spender BC087, BC241, BC848, BC967 und DH, die alle außer BC848 mindestens ein CYBA-242T-Allel trugen, wurden über Plastikadhärenz Monozyten aufgereinigt. Durch die Behandlung mit entsprechenden Zytokincocktails differenzierten die Monozyten innerhalb von zwei Tagen über unreife (iDCs) zu reifen dendritischen Zellen (mDCs) aus (**s. Materialien & Methoden 2.2.1.4**). Während von BC087, BC848 und BC967 jeweils 5x10⁴ APCs pro TE in IFN-γ-ELISpot-Assays auf Erkennung durch die miniMLLC 2E8 (1,5x10⁴ Zellen / TE) getestet wurden, standen von BC241 und DH 3x10⁴ Zellen pro TE zur Verfügung. Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen und die dazugehörigen Standardabweichungen.

Zusätzlich wurden die unterschiedlichen hämatopoetischen Zelltypen (PBMCs, Monozyten, T-, B-Lymphozyten, Granulozyten, dendritische Zellen) der HLA-B*15:01-positiven *Buffy Coat*-Spender BC241 und DH auf Erkennung durch die CYBA-72Y-spezifische miniMLLC 2D10 aus *Buffy Coat* 940 untersucht. Dabei zeigte sich das gleiche Erkennungsmuster wie bei der miniMLLC 2E8 aus *Buffy Coat* 730 (Daten nicht gezeigt).

Monozyten, unreife und reife dendritische Zellen sowie in deutlich geringerem Maß B-Lymphozyten gesunder HLA-B*15:01-positiver *Buffy Coat*-Spender, die mindestens ein *CYBA-242T*-Allel trugen, wurden von *CYBA-72Y*-spezifischen T-Lymphozyten erkannt, ihre Granulozyten und T-Lymphozyten dagegen nicht.

3.12 Erkennung HLA-B*15:01-positiver Malignome durch *CYBA-72Y*-spezifische T-Lymphozyten

Um den Anteil HLA-B*15:01-positiver Malignome, die durch *CYBA-72Y*-reaktive T-Lymphozyten erkannt werden, zu bestimmen, wurde die Reaktivität der miniMLLC 2E8 gegenüber HLA-B*15:01-positiven Leukämiezellen sowie Zelllinien von soliden Tumoren unterschiedlichen Ursprungs untersucht. Die getesteten Zellen wurden durch RFLP-Analysen mit der Endonuklease *RsaI* für *CYBA-242* genotypisiert (**Tab.3.2**).

Alle Malignome, die mindestens ein *CYBA-242T*-Allel trugen und HLA-B*15:01-positiv waren, wurden von der miniMLLC 2E8 erkannt (**Tab.3.2**). Von den getesteten dreizehn AMLs induzierten neun Reaktivität bei der miniMLLC. Nur MZ987-AML war homozygot für das *CYBA-242T*-Allel, die restlichen erkannten AMLs waren heterozygot für *CYBA-242*. Von den fünf getesteten Melanomlinien induzierten drei eine Erkennung bei der *CYBA-72Y*-spezifischen miniMLLC 2E8. Zwei dieser Melanome waren homozygot für das *CYBA-242T*-Allel. Auch die EBV-transformierten B-Lymphozyten von AML- und Melanompatienten, deren malignen Zellen eine Reaktivität bei der miniMLLC induzierten, wurden erkannt. Malignomzellen von Patienten, die homozygot für das *CYBA-242C*-Allel (z.B. CLLs, Nierenzell-, Pankreaskarzinome) bzw. nicht HLA-B*15:01-positiv (MZ11-MEL, SW480) waren, wurden hingegen nicht erkannt. Zwei Melanomzelllinien, die Mutationen im β_2 -Mikroglobulin aufwiesen und deshalb keine oberflächenständigen HLA-Moleküle besaßen (MA86B-, MA86F-MEL), induzierten ebenfalls keine Reaktivität bei der miniMLLC 2E8 (Daten nicht gezeigt).

Malignom	Patientenbezeichnung	CYBA-242-Genotyp	Erkennung im IFN- γ -ELISpot-Assay
akute myeloische Leukämie (AML)	MZ19	TC	+
	MZ50	TC	++
	MZ71	TC	++
	MZ169 (M4)	CC	-
	MZ213	CC	-
	MZ529 (M1)	TC	++
	MZ574 (M4eo)	CC	-
	MZ632 (M5a)	TC	++
	MZ683 (M2)	TC	++
	MZ903 (M4)	CC	-
	MZ911 (M5)	TC	+
	MZ911 Rezidiv	TC	+
	MZ987 (M4)	TT	+++
chronische lymphatische Leukämie (CLL)	MZ202	CC	-
	MZ230	CC	-
Melanom	MA86A	TC	++
	MZ8	TT	++
	MZ11 *	TC	-
	D17#3	TT	++
	SK37	CC	-
Nierenzellkarzinom	FM-KOT	CC	-
	1846	CC	-
Pankreaskarzinom	MZ1	CC	-
	MZ2	CC	-
Kolonkarzinom	SW480 ^	TC	-
EBV-Transformation	MZ529	TC	++
	MZ987	TT	+++
	MA86	TC	+
	D17	TT	++

Tabelle 3.2: CYBA-242-Genotypisierung und Erkennung HLA-B*15:01-positiver Malignome durch die CYBA-72Y-spezifische miniMLLC 2E8

Leukämiezellen, wobei bei den AMLs soweit bekannt die FAB-Klassifizierung angegeben ist, und Zelllinien von soliden Tumoren unterschiedlicher Histologie wurden mittels *RsaI*-Restriktionsverdau für *CYBA-242* genotypisiert und in IFN- γ -ELISpot-Assays (je 5×10^4 Malignomzellen / TE) auf Erkennung durch die miniMLLC 2E8 ($1,5 \times 10^4$ Zellen / TE) getestet. Die Erkennung wurde wie folgt graduiert: (-) <100 IFN- γ -Spots, (+) >100 IFN- γ -Spots, (++) >300 IFN- γ -Spots, (+++) ≥ 1000 IFN- γ -Spots / TE (*: HLA-B*15:21; ^: HLA-B*15:18).

Leukämie- und Melanomzellen sowie EBV-transformierte B-Zellen von Malignompatienten wurden von der CYBA-72Y-spezifischen miniMLLC 2E8 erkannt, sofern sie HLA-B*15:01-positiv waren und mindestens ein *CYBA-242T*-Allel trugen. Insgesamt induzierten neun von dreizehn getesteten AMLs und drei von fünf untersuchten Melanomlinien eine CYBA-72Y spezifische Erkennung.

3.13 Identifizierung CYBA-72Y-reaktiver T-Lymphozyten in HLA-B*15:01-positiven Patienten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation und in HLA-B*15:01-positiven *Buffy Coat*-Spendern

Sowohl HLA-B*15:01-positive Patienten mit unterschiedlichen malignen Erkrankungen als auch ihre Stammzellspender wurden durch RFLP-Analysen mit der Endonuklease *RsaI* für *CYBA-242* genotypisiert (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigte sich, dass sich insgesamt 52% der transplantierten Patienten ($n_{\text{gesamt}}=23$) in ihrem *CYBA-242*-Genotyp zu ihren Stammzellspendern unterschieden. Doch nur bei etwa einem Viertel der Transplantationen ($n=5$) war ein *Mismatch* gegeben, der zu einer *CYBA-72Y*-spezifischen T-Zellantwort führen konnte. Diese Patienten trugen mindestens ein *CYBA-242T*-Allel und ihre Spender waren homozygot für das *CYBA-242C*-Allel, sodass *CYBA-72Y*-spezifische T-Lymphozyten der Spender das Antigen auf Patientenzellen erkennen konnten. Bei der Betrachtung aller transplantierten Patienten, unabhängig von ihrem HLA-Genotyp ($n=94$), zeigte sich eine vergleichbare Verteilung (Daten nicht gezeigt).

Von zwei von sechs HLA-B*15:01-positiven Patienten, bei denen nach einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation ein kompletter Spenderchimärismus festgestellt wurde, standen nach Transplantation hämatopoetische Zellen zur Verfügung. Bei beiden Patienten, die an einer AML bzw. CML erkrankt waren, waren die Blutzellen vor der allogenen Stammzelltransplantation heterozygot für *CYBA-242* und danach homozygot für das *CYBA-242C*-Allel. Die Blutzellen der beiden transplantierten Patienten wurden für die Untersuchung auf die Anwesenheit *CYBA-72Y*-spezifischer T-Lymphozyten verwendet. Bei dem CML-Patienten wurden die aus der Spenderhämatopoese stammenden $CD8^+$ -Lymphozyten mit autologen dendritischen Zellen stimuliert, die mit *CYBA-242T*-kodierender IVT-RNA transfiziert waren. Für die Stimulation der aus der Spenderhämatopoese hervorgegangenen $CD8^+$ -Lymphozyten des AML-Patienten wurden $CD8^+$ -Lymphozyten mit dem Nonamer *CYBA-72Y*₆₉₋₇₇ beladen. Bei Testung dieser Ansätze nach zwei Stimulationen bei dem CML-Patienten bzw. drei Stimulationen bei dem AML-Patienten konnten keine *CYBA-72Y*-reaktiven Lymphozyten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auch bei dem Stammzellspender des AML-Patienten (DKMS2870406) waren nach *In vitro*-Peptidstimulation keine *CYBA-72Y*-reaktiven T-Zellen im peripheren Blut nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Von den HLA-B*15:01-positiven *Buffy Coat*-Spendern BC906 und BC153, die homozygot für das *CYBA-242C*-Allel waren, wurden wiederholt PBMCs bzw. $CD8^+$ -Lymphozyten mit dem Peptid *CYBA-72Y*₆₉₋₇₇ stimuliert. Angesetzt wurden von dem BC906 94 und 64 Minikulturen mit $1,5 \times 10^5$ PBMCs bzw. $1,7 \times 10^4$ $CD8^+$ -Lymphozyten pro KE, die anschließend auf *CYBA-72Y*-Reaktivität untersucht wurden. Mit 1×10^5 PBMCs bzw. $1,6 \times 10^4$ $CD8^+$ -Lymphozyten pro KE wurden von dem BC153 jeweils 94 Minikulturen angesetzt und nach wiederholter Stimulation getestet. Nur die Minikultur #83 von BC153 erwies sich als *CYBA-72Y*-reaktiv. Damit lagen bei BC153 *CYBA-72Y*-reaktive T-Lymphozyten in einer Frequenz von 1 in 10^7 PBMCs vor. Wiederholt konnte die HLA-B*15:01-abhängige Reaktivität der Minikultur #83 gegenüber dem im cDNA-Bank-Screening identifizierten Klon *CYBA* Exon 1-6 (bp1-588) #428.67.4 und dem Nonamer *CYBA-72Y*₆₉₋₇₇ nachgewiesen werden (**Abb.3.23**).

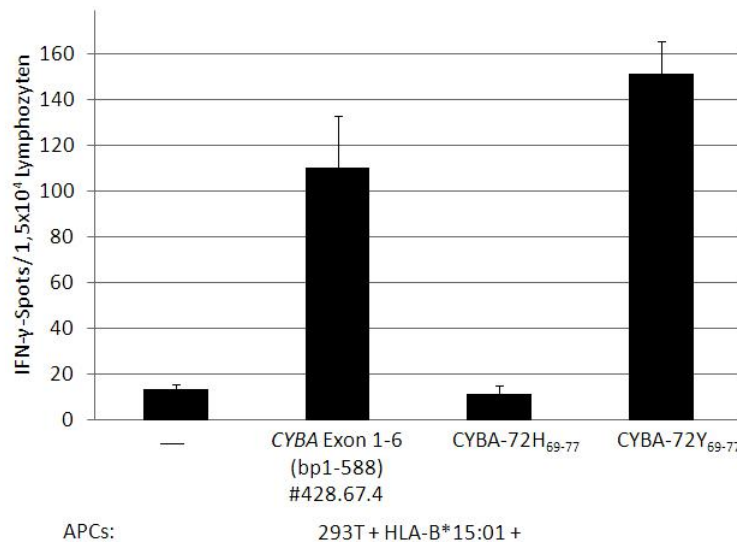


Abb.3.23: CYBA-72Y-spezifische Reaktivität der Minikultur #83 des *Buffy Coat*-Spenders BC153 nach *In vitro*-Peptidstimulation

In 96 KE-Platten wurde durch wöchentliche Stimulation von PBMCs (1×10^5 Zellen / KE) des HLA-B*15:01-positiven Spenders BC153, der homozygot für das *CYBA-242C*-Allel war, mit dem Nonamer CYBA-72Y₆₉₋₇₇ u.a. die Minikultur #83 generiert (s. **Materialien & Methoden 2.2.1.7**). Nach acht Stimulationen wurde die Minikultur #83 ($1,5 \times 10^4$ Zellen / TE) auf Erkennung von HLA-B*15:01-transfizierte 293T-Zellen (2×10^4 Zellen / TE), die mit dem cDNA-Bank-Klon *CYBA* Exon 1-6 (bp1-588) #428.67.4 kotransfiziert oder mit dem Nonamer CYBA-72Y₆₉₋₇₇ bzw. CYBA-72H₆₉₋₇₇ in einer Endkonzentration von 5 μ g/ml beladen waren, in einem IFN- γ -ELISpot-Assay getestet. Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen und die dazugehörigen Standardabweichungen.

Etwa ein Viertel der stammzelltransplantierten HLA-B*15:01-positiven Patienten war heterozygot für *CYBA-242* oder homozygot für das *CYBA-242T*-Allel, während ihre Spender homozygot für das *CYBA-242C*-Allel waren. In zwei solcher Leukämiepatienten mit komplettem Spenderchimärismus konnten nach allogener Stammzelltransplantation keine CYBA-72Y-reaktiven T-Lymphozyten nachgewiesen werden. In einem von drei gesunden HLA-B*15:01-positiven Spendern, die homozygot für das *CYBA-242C*-Allel waren, konnte hingegen die Präsenz von CYBA-72Y-reaktiven T-Zellen belegt werden. Insgesamt wurden somit in drei von fünf BC-Spendern, aber in keinem transplantierten Leukämiepatienten CYBA-72Y-reaktive T-Lymphozyten gefunden werden.

3.14 Untersuchung einer HLA-A2-abhängigen Präsentation des CYBA-Antigens

Das in der kaukasischen Bevölkerung sehr häufig vorkommende Allel HLA-A*02:01 bindet präferenziell Peptide mit Ankeraminosäuren wie sie in den identifizierten CYBA-Peptiden vorhanden sind (Tian *et al.*, 2009; Desmet *et al.*, 2005). Es weist laut Epitopvorhersage (www.syfpeithi.de) die gleiche Bindungsfähigkeit für die Nonamere CYBA-72Y₆₉₋₇₇ und CYBA-72H₆₉₋₇₇ auf wie HLA-B*15:01. Für die Decamere CYBA-72Y₆₈₋₇₇ und CYBA-72H₆₈₋₇₇ ist diese sogar stärker als bei HLA-B*15:01 (s. **Anhang 5.8**). Deshalb wurde untersucht, ob die CYBA-Peptide an

HLA-A*02:01-Moleküle binden und ob CYBA-72/HLA-A2-spezifische T-Lymphozyten in gesunden Spendern nachweisbar sind.

Für den Nachweis der Präsentation des CYBA-Antigens durch HLA-A2 wurden in einem Peptid-Shift-Assay HLA-A*02:01- und HLA-B*51:01-positive T2-Zellen verwendet. Diese sind aufgrund ihrer TAP-Defizienz nicht in der Lage HLA-Moleküle mit endogenen Peptiden zu beladen und als Komplex zur Zelloberfläche zu transportieren. Die Bindung exogener Peptide hingegen stabilisiert oberflächenständige HLA-Moleküle, wodurch im Durchflusszytometer eine Zunahme an HLA-Molekülen auf den T2-Zellen sichtbar wird. Die Inkubation der T2-Zellen mit den vier CYBA-Peptiden (CYBA-72Y / H₆₉₋₇₇, CYBA-72Y / H₆₈₋₇₇) hatte keinen solchen Effekt (**Abb.3.24A**). Die beiden Kontrollpeptide der Tyrosinase (MLLAVLYCL, YMDGTMSQV) verursachten hingegen die erwartete Zunahme von HLA-A*02:01 auf den Zellen ebenso wie das N-WASP-Peptid YPPPPPALL von HLA-B*51:01. Das als Negativkontrolle verwendete Sirtuin 2-Peptid KIFSEVTPK, das über HLA-A*03:01 präsentiert wird, veränderte dagegen die Oberflächenpräsenz der HLA-Moleküle nicht (**Abb.3.24B**).

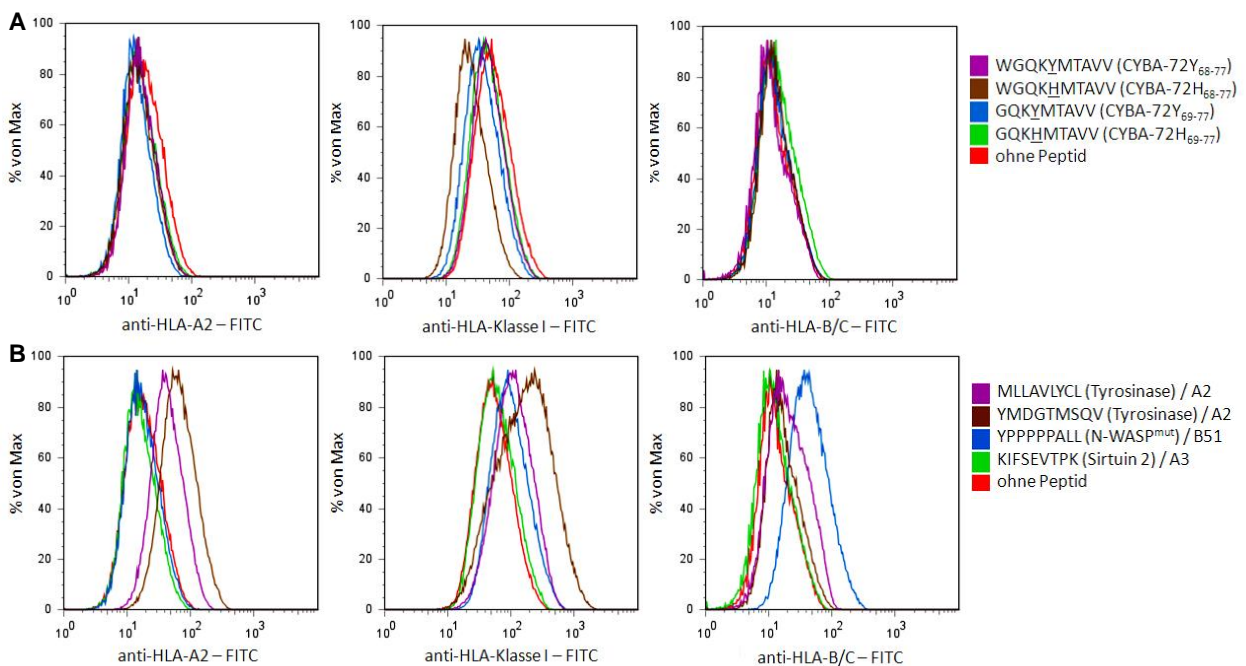


Abb.3.24: Peptid-Shift-Assay mit HLA-A*02:01-positiven T2-Zellen und den Peptiden CYBA-72Y / H₆₉₋₇₇ und CYBA-72Y / H₆₈₋₇₇

T2-Zellen, die HLA-A*02:01- und HLA-B*51:01-positiv, aber TAP-defizient sind, wurden mit den CYBA-Peptiden (CYBA-72Y / H₆₉₋₇₇: GQKY/HMTAVV; CYBA-72Y / H₆₈₋₇₇: WGQKY/HMTAVV) (**A**) sowie den über HLA-A*02:01-präsentierten Kontrollpeptiden MLLAVLYCL und YMDGTMSQVA (Tyrosinase), dem HLA-B*51:01-restringierten YPPPPPALL- (N-WASP^{mut}) und dem HLA-A*03:01-restringierten KIFSEVTPK-Peptid (Sirtuin 2) (**B**) jeweils in einer Endkonzentration von 2 mg/ml für 24 Stunden inkubiert (**s. Materialien & Methoden 2.1.10, 2.2.1.11**). Für die anschließenden durchflusszytometrischen Untersuchungen der Zellen wurden diese mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert, die gegen die HLA-Klasse I-, HLA-B/C- bzw. HLA-A2-Moleküle gerichtet waren.

Da mit Hilfe des Shift-Assays keine Bindungsaffinität der CYBA-Peptide an HLA-A*02:01 belegt werden konnte, wurde versucht, CYBA-72Y / H-reaktive T-Lymphozyten im peripheren Blut

von elf gesunden HLA-A2-positiven BC-Spendern nachzuweisen. Dafür wurden deren PBMCs bzw. CD8⁺-Lymphozyten mit autologen Monozyten, die mit *CYBA*-kodierender IVT-RNA transfiziert worden sind, oder mit PBMCs, die mit einem *CYBA*-Nonamer beladen worden sind, wöchentlich stimuliert.

Mit Hilfe von RFLP-Analysen mit *RsaI* wurde festgestellt, dass zwei *Buffy Coat*-Spender (BC098, BC355) homozygot für das *CYBA-242T*-Allel waren. Ihre Lymphozyten wurden entsprechend mit *CYBA-242C*-kodierender IVT-RNA bzw. dem Peptid *CYBA-72H*₆₉₋₇₇ stimuliert. Die restlichen neun *Buffy Coat*-Spender waren homozygot für das *CYBA-242C*-Allel, sodass die Stimulationen mit *CYBA-242T*-kodierender IVT-RNA bzw. dem Peptid *CYBA-72Y*₆₉₋₇₇ durchgeführt wurden (**Tab.3.3**). Nach mindestens zwei Stimulationen wurden die Spenderlymphozyten in IFN- γ -ELISpot-Assays auf eine HLA-A2-abhängige Erkennung des Antigen *CYBA-72Y* bzw. *CYBA-72H* getestet. Dabei konnte keine *CYBA*-spezifische Reaktivität nachgewiesen werden, weder gegen *CYBA-72H* noch gegen *CYBA-72Y*.

Spender	<i>CYBA-242</i> -Genotyp	Effektorzellen	antigen-präsentierende Zellen	Stimulans		Anzahl Mini-kulturen
				polyA IVT-RNA	Peptid	
BC098	TT	PBMCs	PBMCs	/	<i>CYBA-72H</i> ₆₉₋₇₇	94
BC355	TT	CD8 ⁺	Monozyten	<i>CYBA-242C</i>	/	18
BC102	CC	PBMCs	PBMCs	/	<i>CYBA-72Y</i> ₆₉₋₇₇	94
		CD8 ⁺	PBMCs	/	<i>CYBA-72Y</i> ₆₉₋₇₇	155
BC153	CC	PBMCs	PBMCs	/	<i>CYBA-72Y</i> ₆₉₋₇₇	94
		CD8 ⁺	PBMCs	/	<i>CYBA-72Y</i> ₆₉₋₇₇	94
BC393	CC	CD8 ⁺	Monozyten	<i>CYBA-242T</i>	/	28
BC824	CC	PBMCs	PBMCs	/	<i>CYBA-72Y</i> ₆₉₋₇₇	94
		CD8 ⁺	PBMCs	/	<i>CYBA-72Y</i> ₆₉₋₇₇	94
BC902	CC	PBMCs	PBMCs	/	<i>CYBA-72Y</i> ₆₉₋₇₇	94
BC906	CC	PBMCs	PBMCs	/	<i>CYBA-72Y</i> ₆₉₋₇₇	94
		CD8 ⁺	PBMCs	/	<i>CYBA-72Y</i> ₆₉₋₇₇	64
BC908	CC	PBMCs	PBMCs	/	<i>CYBA-72Y</i> ₆₉₋₇₇	94
BC953	CC	PBMCs	PBMCs	/	<i>CYBA-72Y</i> ₆₉₋₇₇	94
DKMS 2870406	CC	Leukapheresat	Leukapheresat	/	<i>CYBA-72Y</i> ₆₉₋₇₇	94

Tabelle 3.3: *CYBA-72Y*- bzw. *CYBA-72H*-Stimulations-Assays mit HLA-A2-positiven *Buffy Coats*

HLA-A2-positive BC-Spender wurden mit Hilfe des *RsaI*-Verdau für *CYBA-242* genotypisiert. In 96 KE-Platten wurden die Effektorzellen von *CYBA-242C*- bzw. *CYBA-242T*-homozygoten Spendern mindestens zweimal mit autologen antigenpräsentierenden Zellen, die mit dem *CYBA*-Antigen in Form von IVT-RNA oder als Peptid ausgestattet waren, stimuliert und anschließend in IFN- γ -ELISpot-Assays auf eine HLA-A2-restringierte *CYBA-72Y*- bzw. *CYBA-72H*-Reaktivität untersucht.

Die Spender BC153, BC906 und DKMS2870406 waren serologisch positiv für HLA-A2 und -B62 (entspricht HLA-B*15:01) und wurden daher auf eine HLA-A*02:01- und HLA-B*15:01-abhängige Erkennung von *CYBA-72Y* getestet (**s. Abschnitt 3.13**).

Es konnte nicht belegt werden, dass die *CYBA-72Y*- bzw. *CYBA-72H*-Peptide (*CYBA-72Y* / *H*₆₈₋₇₇, *CYBA-72Y* / *H*₆₉₋₇₇) von HLA-A*02:01 präsentiert und von T-Lymphozyten in diesem Kontext erkannt werden.

3.15 Charakterisierung der T-Zellrezeptoren von den CYBA-72Y-spezifischen miniMLLCs 2E8, 4D3, 7G9 und 7H1 (*Buffy Coat* 730) sowie 2B8 und 2D10 (*Buffy Coat* 940)

Über HLA-Moleküle auf Zelloberflächen präsentierte Antigene werden von T-Lymphozyten über T-Zellrezeptoren (TZR) erkannt. TZR zeichnen sich durch eine hohe Antigenspezifität und aufgrund der V(D)J-Rekombination in der α - und β -Kette durch eine große Variabilität aus. Die Klonalität von T-Lymphozyten lässt sich anhand des für jeden Lymphozytenklons einzigartigen TZR nachweisen (Janeway *et al.*, 2002).

Die CYBA-72Y-spezifischen miniMLLCs der *Buffy Coat*-Spender 730 (2E8, 4D3, 7G9, 7H1) und 940 (2B8, 2D10) wurden zunächst durchflusszytometrisch mit Antikörpern, die spezifisch gegen die V-Region der TZR- β -Ketten gerichtet waren, auf ihre Klonalität überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass die miniMLLC 2E8 nicht klonal war. Sie setzte sich aus einer Hauptpopulation, deren TZR- β -Kette zu der V β 17 (TRBV19)-Familie gehörte, und zwei Subpopulationen mit TZR- β -Ketten der V β 14 (TRBV27)- bzw. V β 13.2 (TRBV6-2)-Familie zusammen. Die miniMLLC 4D3 trug zu annähernd 90% TZR- β -Ketten der V β 2 (TRBV20-1)-Familie. Die drei klonalen miniMLLCs 7H1 (*Buffy Coat* 730), 2B8 und 2D10 (*Buffy Coat* 940) trugen ebenfalls TZR- β -Ketten der V β 2-Familie. Die klonale miniMLLC 7G9 von *Buffy Coat*-Spender 730 hingegen trug eine TZR- β -Kette der V β 11 (TRBV25-1)-Familie (**Abb.3.25**).

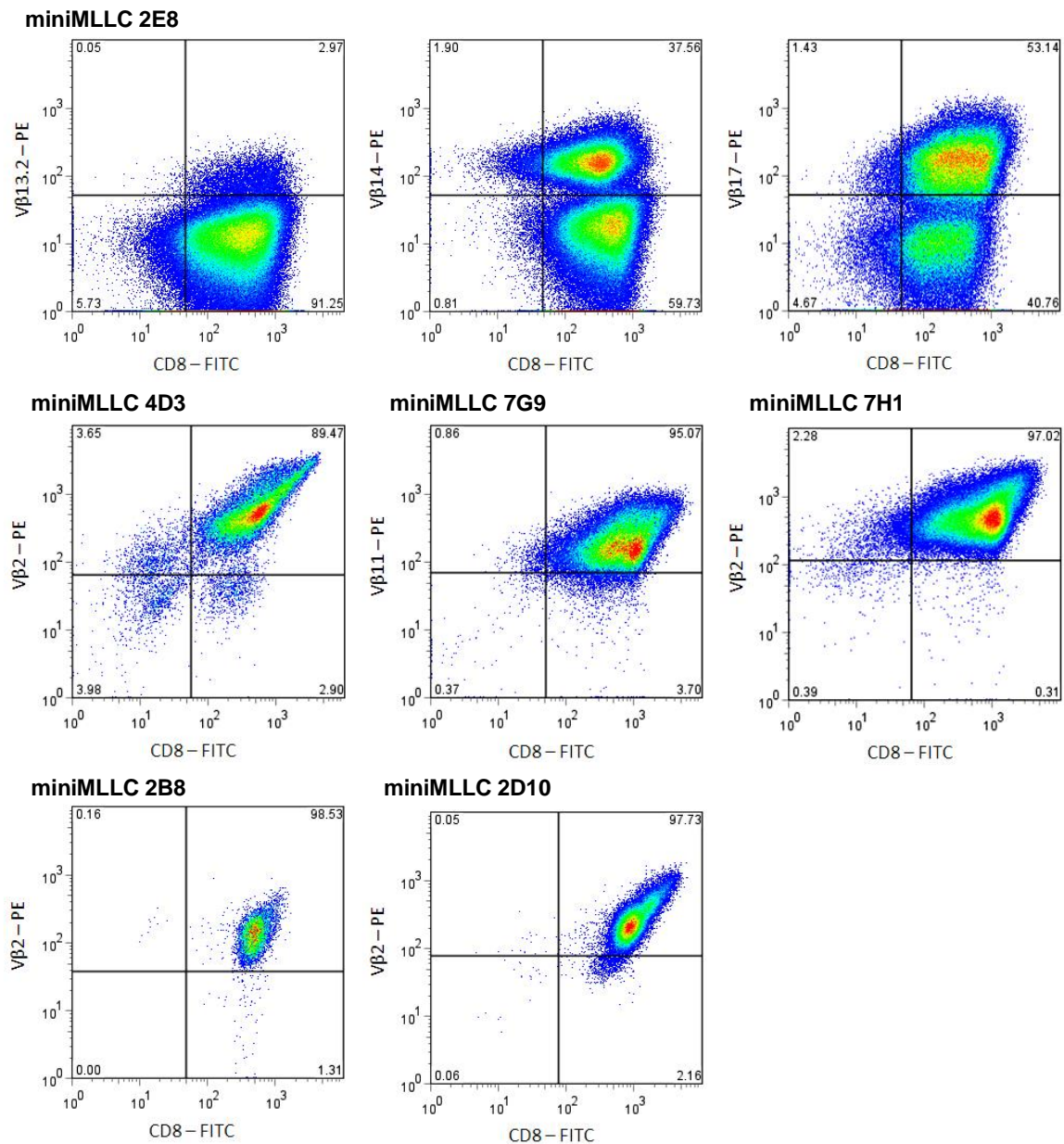


Abb.3.25: Durchflusszytometrische Bestimmung der Klonalität CYBA-72Y-spezifischer miniMLLCs aus *Buffy Coat* 730 (2E8, 4D3, 7G9, 7H1) und *Buffy Coat* 940 (2B8, 2D10) mit Hilfe der V-Region ihrer TZR- β -Ketten

Die miniMLLCs 2E8, 4D3, 7G9 und 7H1 aus *Buffy Coat* 730 sowie 2B8 und 2D10 aus *Buffy Coat* 940 wurden mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern, die gegen die V β -Ketten ihrer T-Zellrezeptoren und den T-Lymphozyten-Marker CD8 gerichtet waren, inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch gemessen.

Für die weitere Charakterisierung der in die Erkennung von CYBA-72Y involvierten TZR β -Ketten wurden mit Hilfe kettenspezifischer Primer die TZR- α - und TZR- β -Ketten der sechs CYBA-72Y-spezifischen miniMLLCs kloniert und sequenziert (s. **Materialien & Methoden 2.2.2.17**). Dadurch konnte jeweils neben dem variablen Bereich, der von den V-, J- bzw. D-Genen kodiert wird, und der durch das C-Gen kodierten konstanten Region auch die für die Antigenerkennung entscheidende hypervariable junktionale Region (engl. *complementarity determining region 3*, CDR3) bestimmt werden (www.imgt.org, Brochet *et al.*, 2008).

Die Sequenzierung der TZR- β -Ketten bestätigte bei Vergleich mit der Durchflusszytometrie die Expression des TRBV20-1 ($V\beta 2$)-Gens durch die vier miniMLLCs 4D3, 7H1, 2B8 und 2D10. Zudem wiesen die TZR der miniMLLCs 7H1, 2B8 und 2D10 das gleiche J-Allel (TRBJ2-3*01) auf, weshalb sich ihre junktionalen Regionen ähnelten. Die drei Rezeptorketten der miniMLLC 2E8 unterschieden sich von denen der anderen miniMLLCs stark. Außer übereinstimmenden J-Allelen von zwei dieser Ketten mit denen der miniMLLC 4D3 (TRBJ2-1*01) bzw. 7G9 (TRBJ2-7*01) sowie gleichen D-Allelen und der daraus resultierenden Ähnlichkeit in der junktionalen Region konnte keine Gemeinsamkeit zu den β -Ketten der restlichen miniMLLCs festgestellt werden (**Tab.3.4**).

Modell	mini MLLC	V-Allel	J-Allel	D-Allel	C-Allel	junktionale Region (AS)
MZ529-AML/ Buffy Coat 730	2E8	TRBV6-2*01	TRBJ1-2*01	TRBD1*01	TRBC1*01	CASSLTVLMDYGYTF
		TRBV19*01	TRBJ2-1*01	TRBD1*01	TRBC2*01	CASREQTYNEQFF
		TRBV27*01	TRBJ2-7*01	TRBD2*02	TRBC2*01	CASLLAGGLYEQYF
	4D3	TRBV20-1*01	TRBJ2-1*01	TRBD2*02	TRBC2*01	CSAMSLSGSSDEQFF
	7G9	TRBV25-1*01	TRBJ2-7*01	TRBD1*01	TRBC2*01	CASRGGQGDEQYF
MZ987-AML/ Buffy Coat 940	7H1	TRBV20-1*01	TRBJ2-3*01	TRBD2*01	TRBC2*01	CSARETRLTSTDTQYF
	2B8	TRBV20-1*02	TRBJ2-3*01	TRBD1*01	TRBC2*01	CSARGRDRALDTQYF
MZ987-AML/ Buffy Coat 940	2D10	TRBV20-1*02	TRBJ2-3*01	TRBD2*01	TRBC1*02	CSARGPSGVTDQYF

Tabelle 3.4: β -Ketten der T-Zellrezeptoren der miniMLLCs 2E8, 4D3, 7G9 und 7H1 aus Buffy Coat 730 sowie der miniMLLCs 2B8 und 2D10 aus Buffy Coat 940

Ausgehend von der RNA der miniMLLCs 2E8, 4D3, 7G9 und 7H10 (*Buffy Coat* 730) sowie 2B8 und 2D10 (*Buffy Coat* 940) wurden mit spezifischen Primern die β -Ketten der T-Zellrezeptoren amplifiziert, in pcDNA3.1/V5-His TOPO einkloniert und sequenziert (AS: Aminosäure) (Nomenklatur nach www.imgt.org).

Bei der Sequenzierung der TZR- α -Ketten zeigte sich, dass die fünf miniMLLCs 4D3, 7G9, 7H1, 2B8 und 2D10 das gleiche $V\alpha$ -Allel (TRAV10*01) exprimierten. Die miniMLLC 7G9 trug außerdem das gleiche J-Allel (TRAJ42*01) wie die beiden miniMLLCs des *Buffy Coats* 940 (2B8, 2D10). Entsprechend groß war die Ähnlichkeit ihrer junktionalen Regionen. Die Aminosäuresequenz der TZR- α -Ketten der miniMLLCs 2B8 und 2D10 war sogar identisch. Von der miniMLLC 2E8 wurden drei TZR- α -Ketten isoliert, die sich von denen der anderen miniMLLCs komplett unterschieden (**Tab.3.5**).

Modell	miniMLLC	V-Allel	J-Allel	C-Gen	junktionale Region (AS)
MZ529-AML/ Buffy Coat 730	2E8	TRAV13-1*02	TRAJ32*02	TRAC01	CAAPSRG#GATNKLIF
		TRAV21*02	TRAJ20*01	TRAC01	CAVGGNDYKLSF
		TRAV29/DV5*01	TRAJ39*01	TRAC01	CAAPLNAGNMLTF
	4D3	TRAV10*01	TRAJ29*01	TRAC01	CVVTRVSGNTPLVF
	7G9	TRAV10*01	TRAJ42*01	TRAC01	CVVSAIWGSQGNLIF
MZ987-AML/ Buffy Coat 940	7H1	TRAV10*01	TRAJ35*01	TRAC01	CVVSPVGF
	2B8	TRAV10*01	TRAJ42*01	TRAC01	CVVSRIYGGSQGNLIF
	2D10	TRAV10*01	TRAJ42*01	TRAC01	CVVSRIYGGSQGNLIF

Tabelle 3.5: α -Ketten der T-Zellrezeptoren der miniMLLCs 2E8, 4D3, 7G9 und 7H1 aus Buffy Coat 730 sowie der miniMLLCs 2B8 und 2D10 aus Buffy Coat 940

Nach Isolation der RNA aus den miniMLLCs 2E8, 4D3, 7G9 und 7H1 (*Buffy Coat* 730) sowie 2B8 und 2D10 (*Buffy Coat* 940) und cDNA-Synthese wurden mit Hilfe einer α -Ketten-spezifischen PCR die jeweilige $V\alpha$ -Familie bestimmt, um dann mit spezifischen Primern die α -Ketten der miniMLLCs zu amplifizieren, klonieren und sequenzieren (#: *out-of-frame-junction*; AS: Aminosäure) (Nomenklatur nach www.imgt.org).

Die Funktionalität der isolierten T-Zellrezeptorketten wurde an dem TZR der CYBA-72Y-spezifischen miniMLLC 2D10 des *Buffy Coat*-Spenders 940 überprüft. Dessen α - und β -Kette wurden von den am häufigsten von den CYBA-72Y-spezifischen miniMLLC-TZRs verwendeten Allelen kodiert (**Tab.3.4, 3.5**). Von beiden T-Zellrezeptorketten wurde polyadenylierte IVT-RNA hergestellt und in CD8⁺-Lymphozyten von BC-Spendern elektroporiert. Der erfolgreiche Transfer der TZR-Ketten wurde durchflusszytometrisch anhand der Expression der β -Kette geprüft (**Abb.3.26A**). Für den Nachweis der Expression der α -Kette stand kein spezifischer Antikörper zur Verfügung. Bei drei unabhängigen Ansätzen führte der Transfer des TZR der miniMLLC 2D10 zu einer Erkennung des CYBA-72Y-Antigens. Sobald die α - und die β -Kette des T-Zellrezeptors gemeinsam in die BC-Lymphozyten übertragen wurden, induzierten sowohl der cDNA-Bank-Klon CYBA Exon 1-6 (bp1-588) #428.67.4 als auch das Nonamer CYBA-72Y₆₉₋₇₇ eine Erkennung (**Abb.3.26B**).

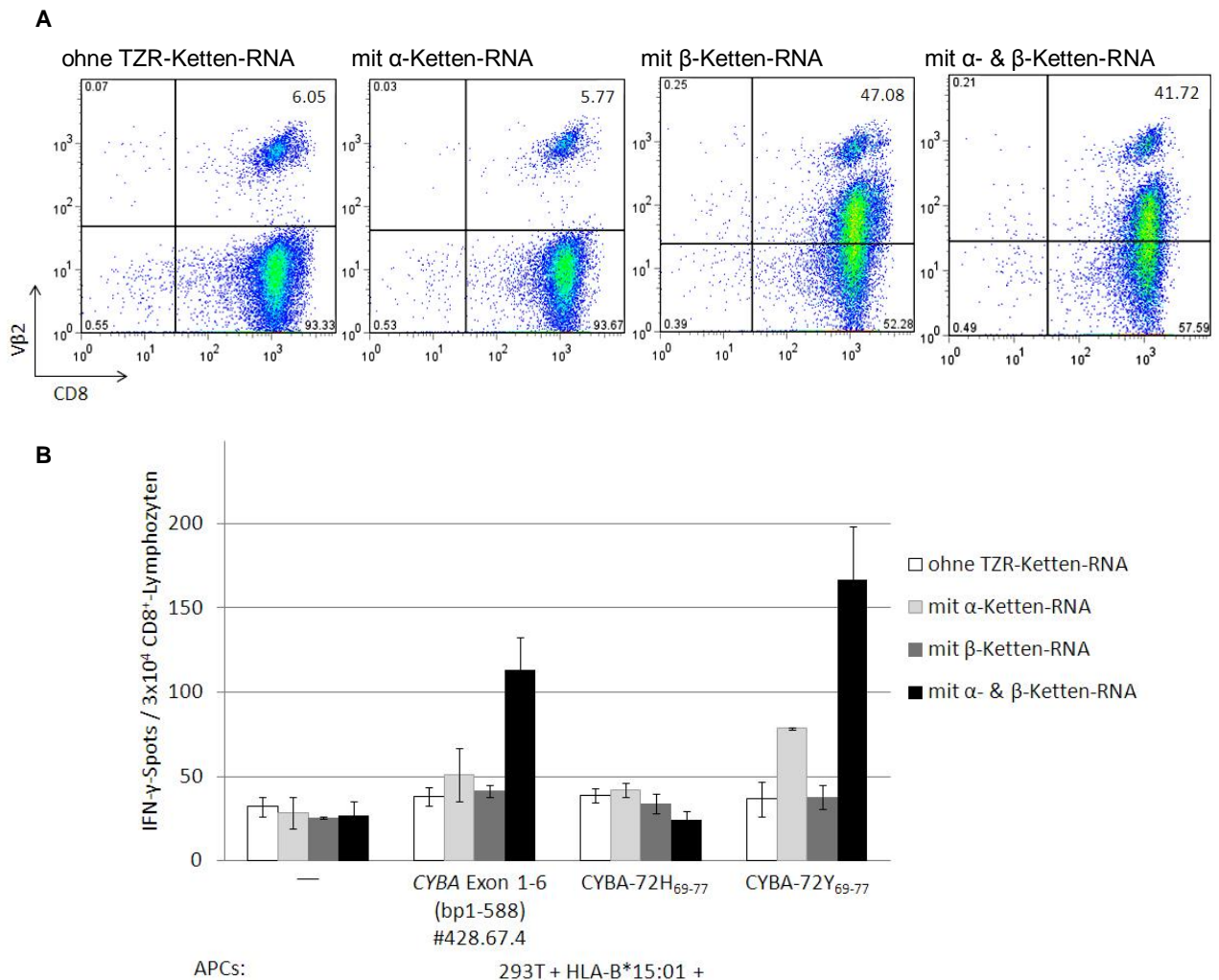


Abb.3.26: Transfer von T-Zellrezeptorketten der miniMLLC 2D10 aus *Buffy Coat* 940
(Text s. Seite 81)

Text zu **Abb.3.26: Transfer von T-Zellrezeptorketten der miniMLLC 2D10 aus *Buffy Coat* 940** (s. Seite 80)
Von der α - und der β -Kette des T-Zellrezeptors der miniMLLC 2D10 (*Buffy Coat* 940) wurde polyadenylierte IVT-RNA hergestellt und einzeln oder zusammen in $CD8^+$ -Lymphozyten des Spenders BC560 elektroporiert (s. **Materialien & Methoden 2.2.2.17**).

Durchflusszytometrisch wurde mit Hilfe eines $V\beta 2$ -spezifischen Antikörpers und des T-Zellmarkers CD8 die Expression der $V\beta 2$ (TRBV20-1)-Kette in den transfizierten T-Lymphozyten überprüft (A).

In einem 10Std-IFN- γ -ELISpot-Assay wurde die Reaktivität der transfizierten Lymphozyten (3×10^4 Zellen / TE) gegenüber HLA-B*15:01-transfizierten 293T-Zellen (2×10^4 Zellen / TE) überprüft, die mit dem cDNA-Bank-Klon CYBA Exon 1-6 (bp1-588) #428.67.4 kotransfiziert oder mit dem Nonamer CYBA-72Y₆₉₋₇₇ bzw. CYBA-72H₆₉₋₇₇ in einer Endkonzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ beladen waren. Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen und die dazugehörigen Standardabweichungen (B).

Aus den CYBA-72Y-reaktiven miniMLLCs der *Buffy Coats* 730 (2E8, 4D3, 7G9, 7H1) und 940 (2B8, 2D10) wurden die T-Zellrezeptorketten isoliert und sequenziert. Dabei stellte sich heraus, dass mindestens drei $V\beta$ -Familien sowie zwei $V\alpha$ -Familien an einer Erkennung des CYBA-72Y-Antigens beteiligt waren. Vier bzw. fünf miniMLLCs enthielten in ihren T-Zellrezeptorketten eine TRBV20-1 ($V\beta 2$)- oder TRAV10-Region. Der T-Zellrezeptor der miniMLLC 2D10 setzte sich aus Ketten mit diesen Regionen zusammen. Durch RNA-Elektroporation in $CD8^+$ -Lymphozyten gesunder Spender wurde die antigenspezifische Funktionalität der klonierten TZR-Ketten nachgewiesen.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollten mit Hilfe der T-Zell-basierten cDNA-Expressionsklonierung Zielantigene alloreaktiver T-Lymphozyten identifiziert werden, die leukämische Zellen von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) erkannten. Dafür standen aus den beiden Modellsystemen MZ529-AML/*Buffy Coat* 730 und MZ987-AML/*Buffy Coat* 940 allogene leukämiereaktive T-Lymphozyten zur Verfügung. Diese waren durch Stimulation von HLA-Klasse I-übereinstimmenden Spenderlymphozyten mit Blasten der AML-Patienten in so genannten miniMLLCs (engl. *mixed lymphocyte leukemia cultures*) generiert worden (Albrecht *et al.*, 2011). Das Screenen einer cDNA-Bank aus Zellen des AML-Patienten MZ529 mit der miniMLLC 2E8 des HLA-kompatiblen *Buffy Coat*-Spenders 730 führte zur Identifizierung des über HLA-B*15:01 präsentierten Minorhistokompatibilitätsantigens (mHA_g) CYBA-72Y. Dieses mHA_g wurde von drei weiteren unabhängig generierten miniMLLCs des gleichen Modells (4D3, 7G9, 7H1) über unterschiedliche T-Zellrezeptoren erkannt. Darüber hinaus erkannten die miniMLLCs 2B8 und 2D10 des zweiten Modellsystems, MZ987-AML/*Buffy Coat* 940, ebenfalls CYBA-72Y in Assoziation mit HLA-B*15:01.

4.1 Wissensstand zu dem Cytochrom b₂₄₅ α-Polypeptid (CYBA, p22phox)

Der cDNA-Bank-Klon #428.67.4, der mittels T-Zell-basierter cDNA-Expressionsklonierung aus der cDNA-Bank des AML-Patienten MZ529 isoliert wurde, kodierte für die α-Polypeptidkette des Cytochroms b₂₄₅ (Genbezeichnung: *CYBA*; Proteinbezeichnung: p22phox) (**s. Ergebnisse 3.3; s. Anhang 5.2**). Das Antigen wurde in Assoziation mit HLA-B*15:01 von vier miniMLLCs des Modells MZ529-AML/*Buffy Coat* 730 sowie zwei miniMLLCs des Modells MZ987-AML/*Buffy Coat* 940 erkannt (**s. Ergebnisse 3.7, 3.8**).

CYBA kodiert für die membrangebundene Untereinheit p22phox der NADPH-Oxidasen (NOXs) 1 bis 4 (Katsuyama, 2010; Krause, 2004; Bokoch & Knaus, 2003; Vignais, 2002; Babior, 1999). Diese Untereinheit ist essenziell für die Reifung, Lokalisation und Oxidaseaktivität der NOX-Komplexe (Ambasta *et al.*, 2004; Sumimoto, 2008; Sheppard *et al.*, 2005; Dahan *et al.*, 2002). *CYBA* ist 8,5 kb lang und auf Chromosom 16 lokalisiert. Es setzt sich aus sechs Exons und fünf Introns zusammen und kodiert das aus 195 Aminosäuren bestehende p22phox (San José *et al.*, 2008; Bu-Ghanim *et al.*, 1990). Bisher wurden 19 Mutationen und sieben kodierende nicht-synonyme SNPs in *CYBA* identifiziert (Bedard *et al.*, 2009; von Löhneysen *et al.*, 2008). Das Protein p22phox ist in allen Zellen (z.B. Endothelzellen, Fibroblasten, glatte Gefäßmuskelzellen), aber vor allem in myeloischen Zellen nachweisbar (Bedard & Krause, 2007; Cheng *et al.*, 2001; Azumi *et al.*, 1999).

Als Bestandteil der NADPH-Oxidasen 1 bis 4 ist p22phox essenziell an der Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (engl. *reactive oxygen species*, ROS) beteiligt, die meist durch Stimuli (z.B. Phorbolmyristataacetat, N-Formylmethionyl-Lencyl-Phenylalanin, Angiotensin II, *transforming growth factor-β*) angeregt wird (Li & Frei, 2009; Sumimoto, 2008; Harrison *et al.*, 2003). ROS oxidieren Proteine, Lipide sowie Nukleinsäuren. Dadurch dienen sie der Beseitigung von Pathogenen und malignen Zellen, aber auch als Signalmoleküle durch Interaktion mit

Komponenten (z.B. Ras, MAPKs, NF- κ B, AP-1) unterschiedlicher Kaskaden (Krause, 2004; Viedt *et al.*, 2004; Brar *et al.*, 2003b; Griendling *et al.*, 2000; Forman & Thomas, 1986). Sie regulieren Ionenflüsse (z.B. H⁺, K⁺) und die Expression vieler Gene (z.B. von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen), die an der Proliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose sowie Immunreaktionen und Endothelfunktionen beteiligt sind (Lam *et al.*, 2010; Bedard & Krause, 2007; Kyaw *et al.*, 2004; Henderson *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1996). Ebenso sind sie in den Aufbau der extrazellulären Matrix, die Angiogenese und Blutdruckregulation involviert (Montezano *et al.*, 2011; Kyaw *et al.*, 2004; Griendling *et al.*, 2000). Bei Fehlregulation, wie sie z.B. bei Leberfibrose, Diabetes und Bluthochdruck vorkommen, führen ROS allerdings zu Endothelschäden und Gewebsverletzungen sowie Mutagenese und Tumorgenese (Guichard *et al.*, 2008; Klaunig & Kamendulis, 2004; Channon & Guzik, 2002). Insbesondere kardiovaskuläre Erkrankungen (z.B. Bluthochdruck, Diabetes, Herzversagen), neurodegenerative Erkrankungen und Ischämie bzw. Reperfusionverletzungen werden mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht (Sedeek *et al.*, 2009; San José *et al.*, 2008; Zekry *et al.*, 2003). Eine zu geringe ROS-Produktion ist mit hyperinflammatorischen Erkrankungen (z.B. Arthritis) sowie Autoimmunerkrankungen (z.B. multiple Sklerose, Guillian-Barrè-Syndrom) assoziiert (Sareila *et al.*, 2011; Huberle *et al.*, 2009; Hultqvist *et al.*, 2009; Schäppi *et al.*, 2008; Olofsson *et al.*, 2007). Gendefekte in den Untereinheiten der NADPH-Oxidase von Phagozyten verursachen die seltene chronische Granulomatose (Meissner *et al.*, 2010; Roos *et al.*, 1996; Porter *et al.*, 1993). ROS und ihre Produktion verändernde Polymorphismen in den NOX-Untereinheiten beeinflussen die Wirkung von Chemotherapeutika der Krebstherapie (z.B. Anthrazykline) und umgekehrt wird die Expression der Untereinheiten und die ROS-Produktion von diesen (z.B. Arsentrioxid, Cannabidol, Röntgenstrahlen) verändert (Hoffmann *et al.*, 2010; Rossi *et al.*, 2009; McKallip *et al.*, 2006; Wojinowski *et al.*, 2005; Chou *et al.*, 2004; Minotti *et al.*, 2004; Grad *et al.*, 2001).

4.2 Der Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) *CYBA-242T/C* (rs4673) generiert das mHAg *CYBA-72Y*

4.2.1 Wissensstand zu dem SNP *CYBA-242T/C* (rs4673)

Die peptidkodierende Region des identifizierten mHAg *CYBA-72Y* enthält den bekannten Einzelnukleotidpolymorphismus rs4673 (*CYBA-242T/C*), der zu einem Austausch an Aminosäureposition 72 des durch *CYBA* kodierten Proteins p22phox führt (**s. Ergebnisse 3.4, 3.5**). Während das *CYBA-242T*-Allel für Tyrosin (Y) als 72.Aminosäure kodiert, kodiert das *CYBA-242C*-Allel an dieser Position für Histidin (H).

Der SNP *CYBA-242T/C* beeinflusst die Enzymstruktur der NADPH-Oxidasen und betrifft eine potenzielle Hämbindungsstelle bzw. eine für die Reifung der Nox-Untereinheiten wichtige Stelle (San José *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2006; Soccio *et al.*, 2005; Channon & Guzik, 2002). Sowohl eine verringerte ROS-Produktion in Phagozyten, Gefäß- und Endothelzellen als auch eine Erhöhung der NOX-Aktivität in Neutrophilen und differenzierten myeloischen HL60-Zellen wird mit der Anwesenheit des *CYBA-242T*-Allels in Verbindung gebracht (San José *et al.*, 2008; Soccio *et*

al., 2005; Shimo-Nakanishi *et al.*, 2004; Wyche *et al.*, 2004; Guzik *et al.*, 2000). Untersuchungen zu Assoziationen der *CYBA-242T*- und *CYBA-242C*-Allele mit Herz-Kreislaufkrankungen (z.B. Atherosklerose, kardioembolische Infarkte, Diabetes) führten zu widersprüchlichen Ergebnissen (Di Castelnovo *et al.*, 2008; Genius *et al.*, 2008; San José *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2006; Zalba *et al.*, 2005). Trotz der Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies an der Tumorgenese konnte bisher kein Zusammenhang zwischen dem SNP *CYBA-242T/C* und Malignomen festgestellt werden (Wang *et al.*, 2009; Tahara *et al.*, 2008; van der Logt *et al.*, 2005).

In dieser Arbeit konnte die Immunogenität von *CYBA-72Y*, nicht aber von *CYBA-72H* nachgewiesen werden (**s. Ergebnisse 3.7, 3.8**). Es ist bereits bekannt, dass bei den meisten autosomal-kodierten mHAgS nur eines der beiden Allele immunogen ist (Feng *et al.*, 2008). Dagegen wurde die Immunogenität der Produkte beider Allele, eine so genannte reziproke allelische mHAg-Erkennung, beispielsweise bei den mHAgS HB-1, ACC-1 und ACC-2 festgestellt (Bleakley & Riddell, 2011; Feng *et al.*, 2008, Akatsuka *et al.*, 2007).

4.2.2 Häufigkeitsverteilung der Allele *CYBA-242T* und *CYBA-242C*

Polymorphismen in *CYBA* (z.B. -930^{A/G}) scheinen mit der Ausbildung von unterschiedlichen Erkrankungen (z.B. Bluthochdruck, Myokardinfarkt, Koronarsklerose, zerebrovaskuläre Erkrankungen, Nephropathie) assoziiert zu sein (San José *et al.*, 2008; Zalba *et al.*, 2005; Yokoyama *et al.*, 2000). Zudem beeinflussen Polymorphismen in den Untereinheiten der NADPH-Oxidasen die Produktion der malignomfördernden ROS (Bedard *et al.*, 2009; Fried & Arbiser, 2008; Ushio-Fukai & Nakamura, 2008; Brar *et al.*, 2003a & 2002). Um die potenzielle Bedeutung des SNP *CYBA-242T/C* bei malignen Erkrankungen und darüber hinaus bei allogenen Transplantationen einzuschätzen, wurde die Frequenzverteilung der *CYBA-242T*- und *CYBA-242C*-Allele bei Patienten mit unterschiedlichen Malignomen und gesunden Spendern untersucht. Dafür wurden die Probanden wie bei anderen Studien mittels RFLP-Analyse genotypisiert (Liu *et al.*, 2009; Di Castelnovo *et al.*, 2008; Tahara *et al.*, 2008). Insgesamt wurde von 217 gesunden Spendern und 254 Patienten mit unterschiedlichen malignen Erkrankungen der *CYBA-242*-Genotyp bestimmt. Die Auswahl der Probanden erfolgte ohne Kenntnis ihrer Charakteristika (z.B. Alter, Geschlecht). Von den Untersuchten trugen insgesamt 55,9% das *CYBA-242T*-Allel, das bei 6,4% dieser Probanden homozygot vorlag (**s. Ergebnisse 3.10**).

Wie bei anderen *CYBA*-SNPs (z.B. *CYBA-521*) sowie bei bekannten mHAgS (z.B. ACC-2) hängt die Verteilung der *CYBA-242*-Allele u.a. von der ethnischen Herkunft ab (Bedard *et al.*, 2009; San José *et al.*, 2008; Spierings *et al.*, 2007; Soccio *et al.*, 2005). Während das *CYBA-242T*-Allel bei asiatischen Bevölkerungsgruppen sehr selten vorkommt, ist es bei über der Hälfte der Italiener vorhanden (Tahara *et al.*, 2008; Forrest *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2001). Die im Rahmen dieser Arbeit festgestellte Genotypverteilung gesunder Spender entspricht dem Mittel von Studien mit gesunden Kaukasiern (Bedard *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2006). Von den gesunden Spendern waren 47,0% heterozygot und 5,5% homozygot für das *CYBA-242T*-Allel, d.h. das *CYBA-242T*-Allel war insgesamt in einer Frequenz von 29% vertreten (**s. Ergebnisse 3.10**).

Zwischen gesunden und erkrankten Individuen konnte kein Unterschied in der Genotypverteilung und Allelfrequenz für *CYBA-242* festgestellt werden. Denn von den Patienten

waren 51,5% heterozygot und 7,2% homozygot für das *CYBA-242T*-Allel. Demzufolge lag das *CYBA-242T*-Allel insgesamt in einer Frequenz von 33% vor (**s. Ergebnisse 3.10**). Dasselbe Verteilungsmuster fand sich bei Patienten mit AML (n=99) oder CML (n=50), bei denen die Frequenz des *CYBA-242T*-Allels bei 33% bzw. 34% lag (**s. Anhang 5.7**). Obwohl in einer finnischen Studie eine ähnlich große Anzahl an Patienten mit akuten Leukämien untersucht wurde, war die Verteilung der *CYBA-242CC*- und *CYBA-242TC*-Genotypen mit 68 - 70% bzw. 24 - 32% umgekehrt zu der im Rahmen dieser Arbeit festgestellten. Auch in der finnischen Studie wurde kein Unterschied in der *CYBA-242*-Genotypverteilung zwischen gesunden Spendern und Patienten mit akuter Leukämie festgestellt (Choi *et al.*, 2005). Bei den genotypisierten Patienten mit lymphatischen Leukämien (ALL: n=25; CLL: n=13) und Nierenzellkarzinom (n=16) war das Fehlen von homozygoten *CYBA-242T*-Allel-Trägern auffallend. Dagegen war bei Gruppen mit ähnlicher Patientenanzahl wie Non-Hodgkin-Lymphom- (n=14) oder Melanompatienten (n=12) dieser Genotyp sogar doppelt so oft anzutreffen wie im Durchschnitt. Während in einer Studie ein erhöhtes Risiko für Non-Hodgkin-Lymphome mit dem *CYBA-242TT*-Genotyp in Verbindung gebracht worden ist, konnte dies in weiteren Studien nicht belegt werden (Rossi *et al.* 2009; Lan *et al.*, 2007; Forrest *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). Ein Zusammenhang zwischen der Verteilung der *CYBA-242T*- und *CYBA-242C*-Allele und malignen Erkrankungen unterschiedlichen Ursprungs (z.B. Kolorektal-, Magen-, Zervixkarzinome) konnte wie in anderen Studien (Wang *et al.*, 2009; Tahara *et al.*, 2008; van der Logt *et al.*, 2005) im Rahmen dieser Arbeit, in der nur kleine Patientengruppen betrachtet worden sind, nicht festgestellt werden.

4.3 HLA-Assoziation des mHAg CYBA-72Y

Peptidantigene werden durch T-Lymphozyten in Assoziation mit dem antigenpräsentierenden HLA-Molekül erkannt. Die Blockade der Antigenerkennung durch HLA-spezifische Antikörper und Transfektion von COS-7-Zellen mit HLA-Allelen führte bei den sechs untersuchten miniMLLCs der beiden Modellsysteme zur Identifizierung von HLA-B*15:01 als *CYBA-72Y*-präsentierendes Molekül (**s. Ergebnisse 3.7, 3.8**). Bei einer Häufigkeit des *CYBA-242T*-Allels von etwa 56% (**s. Ergebnisse 3.10**) und des HLA-B*15:01-Allels von 8% (www.allelefrequencies.net, Gonzalez-Galarza *et al.*, 2011) ist diese immunogene Konstellation bei 4,5% der Bevölkerung in Deutschland anzutreffen. Damit liegt *CYBA-72Y* im Vergleich zu anderen mHAgS in seiner Verbreitung im unteren Mittelfeld (Akatsuka *et al.*, 2007). Doch die Verteilung von HLA-Allelen wird u.a. von der ethnischen Herkunft beeinflusst. So kommt insbesondere in asiatischen Bevölkerungsgruppen wie Japanern und Indern HLA-B*15:01 im Vergleich zu Kaukasiern mit Frequenzen von 29 - 65% bzw. 17,2% gehäuft vor (www.allelefrequencies.net). Allerdings ist gerade in asiatischen Bevölkerungsgruppen das *CYBA-242T*-Allel seltener vertreten als bei Kaukasiern. Nur 13,0 - 20,4% der Japaner tragen das *CYBA-242T*-Allel (Kuroda *et al.*, 2007; Shimo-Nakanishi *et al.*, 2004). Dennoch ist bei Japanern und vor allem bei Indern der HLA-B*15:01- und *CYBA-72Y*-positive Bevölkerungsanteil gegenüber dem hier festgestellten mit einer Frequenz von 7,8% bzw. 11,6% deutlich erhöht. Während dies bei den Japanern durch die sehr hohe Frequenz des HLA-B*15:01 begründet ist, ist das bei der indischen Population vorrangig

durch die starke Verbreitung des *CYBA-242T*-Allels von bis zu 70% verursacht (Vibhuti *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2001). Die Relevanz des mHAg *CYBA-72Y/HLA-B*15:01* bei allogenen Transplantationen variiert demnach in Abhängigkeit von dem ethnischen Hintergrund.

Aufgrund der Präsentation von mHAgS über mehrere HLA-Allele, wie beispielsweise HA-1 über *HLA-A*02:01*, *-A*02:06* und *-B60* oder *BCL2A1* über *HLA-A*24:02* und *-B*44:03* (Akatsuka *et al.*, 2007; Bleakley & Riddell, 2004; Mommaas *et al.*, 2002), kann der Anteil von Transplantationskandidaten mit einem immunogenen *Mismatch* deutlich erhöht werden. Mit Hilfe von mehreren HLA-Bindungsalgorithmen (www.syfpeithi.de, www-bimas.cit.nih.gov, www.cbs.dtu.dk) wurden deshalb weitere potenzielle HLA-Moleküle gesucht, die eine hohe Affinität zu den identifizierten *CYBA*-Peptiden aufweisen (Larsen *et al.*, 2010; Rammensee *et al.*, 1999; Parker *et al.*, 1994). Zwar führte dies zum Teil zu widersprüchlichen Vorhersagen, aber laut allen drei beeinflusste die Anwesenheit von Histidin oder Tyrosin an vierter bzw. fünfter Position der *CYBA*-Nonamere und -Decamere nicht die Bindungswahrscheinlichkeit an unterschiedliche HLA-Moleküle (**s. Anhang 5.8**). Als besonders vielversprechende Kandidaten für die Bindung der Nona- und Decamere wurden *HLA-B*51:01* und *-B*52:01* vorhergesagt, die bei bis zu 23% bzw. etwa 1% der Kaukasier vorkommen (www.allelefreqencies.net). Für die Nonamere kommen noch *HLA-B*27:05* und *-B*39:02* und für die Decamere *HLA-B*07:02*, *-B*51:02* und *-B*51:03* hinzu. Ihre Fähigkeit, das *CYBA-72Y*-Antigen zu präsentieren, muss noch experimentell untersucht werden. Die identifizierten *CYBA*-Peptide werden laut Epitopvorhersage (www.syfpeithi.de) von *HLA-A*02:01* ähnlich stark bzw. stärker gebunden als von *HLA-B*15:01* (**s. Anhang 5.8**) und enthalten typische Ankeraminosäuren, die von *HLA-A*02:01*-Molekülen zur Antigenpräsentation benötigt werden (Tian *et al.*, 2009; Desmet *et al.*, 2005). Da *HLA-A*02:01* eines der am häufigsten vorkommenden HLA-Allele bei Kaukasiern ist (www.allelefreqencies.net), kann es zu einer starken Erhöhung des Anteils allogener Transplantationen mit einem immunogenen *CYBA-72Y-Mismatch* führen. Beispielsweise liegt der Anteil an Transplantationen mit einem immunogenen *Mismatch* in dem über *HLA-A*02:01* präsentierten mHAg HA-1 bei 10% (Akatsuka *et al.*, 2007). Daher wurde die Präsentation von *CYBA-72Y* über *HLA-A2* eingehender untersucht. Die Stimulation von Lymphozyten *HLA-A2*-positiver, *CYBA-242*-homozygoter BC-Spender mit autologen *CYBA-72H*- bzw. *CYBA-72Y*-präsentierenden Zellen führte allerdings zu keiner Identifizierung von *CYBA-72Y*- bzw. *CYBA-72H*-reaktiven T-Zellen (**s. Ergebnisse 3.14**). Wie der Nachweis von *CYBA-72Y/HLA-B*15:01*-spezifischen T-Lymphozyten in einem BC-Spender, der serologisch positiv für *HLA-A2*- und *HLA-B62* (entspricht *HLA-B*15:01*) war, zeigte (**s. Ergebnisse 3.13**), ist der fehlende Beleg von *CYBA-72/HLA-A2*-spezifischen T-Lymphozyten nicht auf die verwendeten Stimulationsbedingungen zurückzuführen. Allerdings konnte mit Hilfe von T2-Zellen die Bindung der *CYBA*-Peptide an *HLA-A*02:01*-Moleküle nicht bewiesen werden (**s. Ergebnisse 3.14**). Daher liegt ein Fehlen *CYBA-72Y*-spezifischer T-Lymphozyten, die das Antigen über *HLA-A2* erkennen könnten, aufgrund einer fehlenden Antigenpräsentation nahe.

Aufgrund der Polyspezifität von TZR, d.h. der Fähigkeit eines TZR unterschiedliche Antigen-HLA-Komplexe zu erkennen (Morris & Allen, 2012), wurde zusätzlich die Antigenerkennung der sechs *CYBA-72Y*-reaktiven miniMLLCs in Assoziation mit unterschiedlichen *HLA-B15*-Allelen untersucht. Dafür standen im Laborbereich neben *HLA-B*15:01* *HLA-B*15:03*, -

B*15:04, -B*15:07 und -B*15:17 zur Verfügung. Nur HLA-B*15:07, das sich in einer Aminosäure von HLA-B*15:01 unterscheidet, induzierte neben HLA-B*15:01 über Präsentation des CYBA-72Y-Antigens eine Erkennung durch die sechs miniMLLCs (**s. Ergebnisse 3.9**). Da HLA-B*15:07 in einer sehr niedrigen Frequenz (<0,2%) im europäischen Raum vertreten ist, spielt es hier bei der CYBA-72Y-Präsentation kaum eine Rolle. Anders verhält es sich beispielsweise in Argentinien, wo es in einer Frequenz von 12,5% vorhanden ist (www.allelefrequencies.net). Die anderen getesteten HLA-B15-Allele, HLA-B*15:03, -B*15:04 und -B*15:17, weisen im Vergleich zu HLA-B*15:01 größere Sequenzunterschiede auf, die die Regionen zur Antigenbindung sowie zur Kontaktierung der T-Zellrezeptoren betreffen (**s. Anhang 5.5**). Ebenso wie HLA-B*15:18 und -B*15:21 waren sie nicht in der Lage, eine CYBA-72Y-spezifische Erkennung durch die miniMLLCs zu vermitteln (**s. Ergebnisse 3.9, 3.12**). Trotzdem wurde neben HLA-B*15:01 auch HLA-B*15:03 in dem Vorhersageprogramm www.cbs.dtu.dk als schwacher Bindungspartner für die CYBA-Peptide angegeben (**s. Anhang 5.8**). Insbesondere für HLA-B*15:03 muss demnach noch experimentell die Präsentation des CYBA-72Y-Antigens durch Stimulation von entsprechenden Spenderlymphozyten belegt werden.

Darüber hinaus bietet es sich an, in Assoziation mit verschiedenen HLA-Molekülen weitere CYBA-Peptide zu testen, die die polymorphe 72.Aminosäure des CYBA-kodierten Proteins an unterschiedlichen Positionen beinhalten. Laut Peptid-HLA-Bindungswahrscheinlichkeit (www.syfpeithi.de, www.bimas.cit.nih.gov, www.cbs.dtu.dk) zeigen insbesondere Nona- und Decamere, die Histidin bzw. Tyrosin als zweite Aminosäure besitzen (KY/HMTAVVKL bzw. KY/HMTAVVKLF), eine hohe Bindungswahrscheinlichkeit für mehrere HLA-Moleküle (z.B. HLA-A*02:01, -A*24:02, -A*24:03) (**s. Anhang 5.9**). Diese Peptide stellen für bestimmte HLA-Moleküle (z.B. HLA-A24, -B*39:01) Agreotope da. Das bedeutet, dass abhängig davon welche Aminosäure an der zweiten Position vorhanden ist, die homologen Peptide sehr unterschiedliche Bindungswahrscheinlichkeiten aufweisen (**s. Anhang 5.9**). Anderen Peptidkandidaten mit der polymorphen Aminosäure (z.B. Y/HMTAVVKLF, STMERWGQKY) wird ebenfalls eine starke Bindung an einzelne HLA-Moleküle (z.B. HLA-B*15:03, HLA-A*26:03 und -B*15:17) vorhergesagt, die die Bindungswahrscheinlichkeit der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten CYBA-Peptide gegenüber HLA-B*15:01 oft stark übersteigt (**s. Anhang 5.8, 5.9**). Obwohl diese unterschiedlichen CYBA-Peptide um die 72.Aminosäure sehr vielversprechende Antigenkandidaten darstellen, bleibt ihre natürliche Prozessierung und Immunogenität noch zu klären.

4.4 Charakterisierung CYBA-72Y-spezifischer miniMLLCs

4.4.1 Klonalität CYBA-72Y-reaktiver miniMLLCs

Durch die Generierung von miniMLLCs wurde versucht, monoklonale leukämiereaktive zytotoxische T-Lymphozyten zu erhalten (Albrecht *et al.*, 2011; Distler *et al.*, 2008). Wie die Immunphänotypisierung der sechs CYBA-72Y-reaktiven miniMLLCs der beiden Modellsysteme MZ529-AML/*Buffy Coat* 730 und MZ987-AML/*Buffy Coat* 940 zeigte, gelang dies bei allen miniMLLCs außer der miniMLLC 2E8 (**s. Ergebnisse 3.15**). Dabei wurden miniMLLCs, bei denen

über 90% der CD8⁺-T-Lymphozyten die gleiche TZR-β-Kette trugen, als klonal angesehen. Bei der miniMLLC 2E8 waren Populationen mit drei verschiedenen T-Zellrezeptoren nachweisbar. Die für die Erkennung des mHAg CYBA-72Y verantwortliche Population der miniMLLC konnte nicht eindeutig identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

4.4.2 Peptidspezifität der miniMLLCs gegen CYBA-72Y

Zur Untersuchung der antigenspezifischen Avidität der CYBA-72Y-reaktiven miniMLLCs von den beiden Modellsystemen MZ529-AML/*Buffy Coat* 730 und MZ987-AML/*Buffy Coat* 940 wurden jeweils die identifizierten CYBA-Nonamere und -Decamere getestet sowie die Menge an Peptidantigen bestimmt, die eine effiziente Aktivierung von antitumoralen Effektorfunktionen (z.B. Zytokinfreisetzung, zytolytische Aktivität) bewirkt.

Im IFN-γ-ELISpot-Assay zeigte sich, dass sowohl das Nonamer CYBA-72H₆₉₋₇₇ als auch das Decamer CYBA-72H₆₈₋₇₇ selbst in hohen Konzentrationen bei keiner miniMLLC eine Erkennung induzierten. Da diese Peptide laut dreier Peptid-HLA-Bindungsalgorithmen (www.syfpeithi.de, www.bimas.cit.nih.gov, www.cbs.dtu.dk) eine ähnliche Bindungswahrscheinlichkeit gegenüber HLA-B*15:01 aufweisen wie homologe Peptide mit Tyrosin anstelle von Histidin (**s. Anhang 5.8**), beruht die fehlende Erkennung wahrscheinlich nicht auf der Ausbildung eines Agretops. Das mHAg CYBA-72Y scheint vielmehr wie die mHAg TRIM22-442C und HA-1 aufgrund des Sequenzunterschieds im Epitop (Bleakley & Riddell, 2011; Wölfel *et al.*, 2008) oder wie die mHAg SP110 und HA-8 aufgrund des Einflusses ihres SNP auf die Antigenprozessierung bzw. -präsentation von allo genen T-Lymphozyten erkannt zu werden (Brickner *et al.*, 2006; Warren *et al.*, 2006). Im IFN-γ-ELISpot-Assay zeigte sich außerdem, dass von den sechs miniMLLCs das Nonamer CYBA-72Y₆₉₋₇₇ in niedrigster Konzentration erkannt wurde. Dadurch wurden Vorhersagen von HLA-Bindungsalgorithmen (www.syfpeithi.de, www.bimas.cit.nih.gov, www.cbs.dtu.dk) bestätigt, die eine stärkere Bindung der CYBA-Nonamere gegenüber den CYBA-Decameren an HLA-B*15:01 angeben (**s. Anhang 5.8**). Fünf der sechs miniMLLCs (2E8, 7G9, 7H1, 2B8, 2D10) wiesen eine ähnliche Avidität zu dem CYBA-72Y-Nonamer und -Decamer auf (**s. Ergebnisse 3.7, 3.8**). Bei ihnen löste eine Nonamerkonzentration von 10 - 20 ng/ml die halbmaximale IFN-γ-Freisetzung aus. Die dafür notwendige Decamerkonzentration lag um ein Zehnfaches höher. Bei dem mHAg LRH-1 betrug dieser Unterschied zwischen dem Antigennonamer und -decamer nur einen Faktor von 2,5 (de Rijke *et al.*, 2005). Für die halbmaximale IFN-γ-Freisetzung der CYBA-72Y-spezifischen miniMLLC 4D3 hingegen war eine Nonamerkonzentration von über 30 ng/ml notwendig, wobei eine doppelt so hohe Zellzahl wie bei den anderen miniMLLCs eingesetzt werden musste (**s. Ergebnisse 3.7**). Da die CD8-Expression der miniMLLC 4D3 der der anderen miniMLLCs entsprach, scheint eine fehlende Kostimulation durch den Korezeptor nicht für die schwächere Reaktivität dieser miniMLLC verantwortlich zu sein. Zwar besaßen die 4D3-Lymphozyten eine hohe Oberflächenpräsenz ihres T-Zellrezeptors (**s. Ergebnisse 3.15**), doch sagt dies nichts über dessen Affinität zu dem CYBA-72Y-Antigen aus. Die funktionelle Avidität wird aber nicht nur von der T-Zellrezeptoraffinität und CD8-Expression beeinflusst (Ford & Evavold, 2004; Rice *et al.*, 2004). Bereits in den

Lymphozytenspendern, aber auch während der *In vitro*-Stimulation der miniMLLCs könnten unterschiedlich stark averse CYBA-72Y-spezifische T-Lymphozyten generiert worden sein, wie niedrigaverse 4D3- und hochaverse 7H1-Lymphozyten. Funktionell hochaverse zytotoxische T-Zellen zeichnen sich gegenüber niedrigaversen durch eine effektivere Beseitigung von malignen sowie virusinfizierten Zellen aus (Kroger & Alexander-Miller, 2007a & b; Bleakley & Riddell, 2004; Derby *et al.*, 2001; Slifka & Whitton, 2001).

Zudem wurde die CYBA-72Y-spezifische Lyse von Zielzellen, die mit dem CYBA-72Y-Nonamer bzw. -Decamer beladen wurden, sowie von EBV-transformierten B- und AML-Zellen des Patienten MZ529 durch die CYBA-72Y-reaktive miniMLLC 2E8 belegt (**s. Ergebnisse 3.6**). Dabei wurde das Nonamer CYBA-72Y₆₉₋₇₇ ebenfalls in niedrigster Konzentration erkannt und die CYBA-72H-Peptide selbst in hohen Konzentrationen nicht. Diesem Test entsprechend, wies die miniMLLC 2E8 im Vergleich zu antiviralen T-Zellen und T-Lymphozyten, die gegen mutierte melanomspezifische Antigene bzw. mHAgs (z.B. HA-2, HB-1, ACC-6, CTSH) gerichtet waren (Kawase *et al.*, 2007; Torikai *et al.*, 2006; Lennerz *et al.*, 2005; Derby *et al.*, 2001; Pierce *et al.*, 2001; Slifka & Whitton, 2001; Dolstra *et al.*, 1999), eine niedrige Avidität zu den Antigenpeptiden auf. In dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Lyseassay wurden peptidbeladene L721.221-Zellen, die stabil mit HLA-B*15:01 transfiziert waren, als Zielzellen verwendet. Im IFN- γ -ELISpot-Assay hatte sich gezeigt, dass diese Zellen CYBA-72Y-spezifische T-Lymphozyten schlechter aktivierten als peptidbeladene 293T-Zellen (**s. Ergebnisse 3.6**). Der halbmaximale Effekt im IFN- γ -ELISpot-Assay und demnach vermutlich auch im Lyse-Assay wurde mit L721.221-Zellen durch eine etwa einhundertfach höhere Nonamerkonzentration als mit 293T-Zellen ausgelöst. Verursacht wurde dies wahrscheinlich durch Unterschiede in der Kostimulation, die in Abhängigkeit von den Zielzellen die Verwendung unterschiedlicher Peptidkonzentrationen zur Stimulation von T-Lymphozyten notwendig machen (Palmowski *et al.*, 2002).

4.5 Charakterisierung der T-Zellrezeptoren CYBA-72Y-spezifischer miniMLLCs

4.5.1 Polyklonalität der CYBA-72Y-spezifischen T-Zellantwort bei den *Buffy Coat*-Spendern 730 und 940

Zur näheren Charakterisierung der sechs CYBA-72Y-spezifischen miniMLLCs wurden die α - und β -Ketten ihrer T-Zellrezeptoren untersucht. Anstelle von vielen subtypspezifischen PCRs (Zhao *et al.*, 2005; Heemskerk *et al.*, 2003) wurde dafür ein universell anwendbares PCR-Protokoll zur TZR-Identifizierung eingesetzt (Birkholz *et al.*, 2009). Die Sequenzierung der auf diese Weise isolierten TZR-Ketten der miniMLLCs zeigte, dass alle sechs CYBA-72Y-spezifischen miniMLLCs von unterschiedlichen T-Zellklonen abstammten. Sie trugen trotz gleicher Antigenspezifität unterschiedliche TZRs (**s. Ergebnisse 3.15**). Aber es wurde eine Präferenz in der Verwendung einzelner Gensegmente der TZR-Ketten festgestellt. Bei fünf der sechs CYBA-72Y-reaktiven miniMLLCs (alle außer 2E8) enthielt die α -Kette der TZRs eine TRAV10-Region und bei den vier miniMLLCs 4D3, 7H1, 2B8 und 2D10 die β -Kette eine TRBV20-1 (V β 2)-Region (**s. Ergebnisse 3.15**). Die variablen Regionen der α - und β -Kette enthalten die Sequenzen für die CDR1 und

CDR2 (engl. *complementarity determining region*, CDR), die vor allem für den Kontakt mit dem antigenpräsentierenden HLA-Molekül verantwortlich sind (Morris & Allen, 2012; Janeway *et al.*, 2002). Da alle miniMLLCs das CYBA-72Y-Antigen assoziiert mit HLA-B*15:01 erkannten, scheint die Verwendung gleicher V-Gene demnach naheliegend. Die Existenz von unterschiedlichen T-Lymphozyten mit gleichen V-Regionen in ihren TZR bei gleicher Antigen-spezifität wurde bereits nachgewiesen. Beispielsweise wurden nach einer Spender-Lymphozyten-Infusion in einem CML-Patienten T-Lymphozyten mit gleichen variablen Regionen gefunden, die spezifisch für das über HLA-A2 präsentierte mHAg HA-2 waren. Gemeinsam war ihnen allen die gleiche J-Region der α -Kette (Heemskerk *et al.*, 2003). Unter den sechs CYBA-72Y-spezifischen miniMLLCs fanden sich jeweils nur drei miniMLLCs mit übereinstimmender J-Region in der TZR- α -Kette (TRAJ42 bei 7G9, 2B8, 2D10) bzw. TZR- β -Kette (TRBJ2-3 bei 7H1, 2B8, 2D10) (**s. Ergebnisse 3.15**).

Aufgrund der somatischen Rekombination unterschiedlicher V- und J-Gensegmente sowie zusätzlich der D-Segmente bei der β -Kette der TZRs und Nukleotidveränderungen an deren Ligationsstellen unterschieden sich die isolierten TZR-Ketten der CYBA-72Y-spezifischen miniMLLCs besonders stark in der CDR3 (junktionale Region) (**s. Ergebnisse 3.15**). Dieser hypervariable Bereich ist für die Antigenbindung von TZRs verantwortlich (Yassai *et al.*, 2009; Janeway *et al.*, 2002). Die Nukleotidveränderungen an den Ligationsstellen verursachten trotz dem Vorhandensein von gleicher TRAV10- und TRAJ42-Regionen Sequenzunterschiede zwischen den α -Ketten der miniMLLCs 7G9, 2B8 und 2D10. Ebenso fanden sich große Unterschiede zwischen der CDR3 der β -Ketten von den miniMLLCs 7H1 und 2D10, deren Gensegmente (TRBV20-1, TRBD2, TRBJ2-3) bis auf den Allelsubtyp der V-Region übereinstimmten (**s. Ergebnisse 3.15**). Das Gleiche wurde für HA-2-spezifischen TZRs, die von gleichen Gensegmenten kodiert wurden, beschrieben (Heemskerk *et al.*, 2003).

Bei dem Vergleich der α - und β -Ketten der CYBA-72Y-spezifischen miniMLLCs zeigte sich, dass die T-Zellrezeptorketten der beiden miniMLLCs 2B8 und 2D10 des Modells MZ987-AML/*Buffy Coat* 940 die größte Ähnlichkeit zueinander aufwiesen. Die Aminosäuresequenz ihrer α -Ketten war sogar in der CDR3 (CVVSRYYGGSQGNLIF) identisch (**s. Ergebnisse 3.15**). Aber in der Nukleotidsequenz der CDR3 unterschieden sich die α -Ketten der miniMLLCs 2B8 (sRly.11A10A42L14) und 2D10 (sRly.41A10A42L14) um ein Basenpaar (Nomenklatur nach Yassai *et al.*, 2009). Eine solche Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz der CDR3 trotz unterschiedlicher Nukleotidsequenzen wurde bei den β -Ketten von influenzaspezifischen TZRs bereits beschrieben (Yassai *et al.*, 2009). Obwohl die α -Ketten von den TZRs der beiden miniMLLCs 2B8 und 2D10 auf Aminosäureebene identisch sind, belegen der Nukleotidunterschied zwischen ihren CDR3 sowie die Verwendung verschiedener D- und C-Regionen und Nukleotidunterschiede in der CDR3 der β -Ketten (**s. Ergebnisse 3.15**), dass die beiden CYBA-72Y-spezifischen miniMLLCs des *Buffy Coat*-Spenders 940 nicht von demselben T-Zellklon abstammten. Demnach lagen im *Buffy Coat*-Spender 940 ebenso wie im *Buffy Coat*-Spender 730 polyklonale T-Zellantworten vor, die gegen CYBA-72Y gerichtet waren. Polyklonale T-Zellantworten wurden beispielsweise für das mHAg HA-2 und für ein über HLA-A2 präsentierte Influenzapeptid bereits nachgewiesen (Yassai *et al.*, 2009; Heemskerk *et al.*, 2003).

4.5.2 *In vitro*-Transfer CYBA-72Y-spezifischer T-Zellrezeptorketten

Nach einer allogenen Stammzelltransplantation können antigenspezifische T-Lymphozyten zur Verstärkung des *graft-versus-leukemia* (GvL)- bzw. *graft-versus-tumor* (GvT)-Effekts adoptiv transferiert werden. Doch die Expansion der T-Lymphozyten ist sehr aufwendig (Ochi *et al.*, 2010; Barrett, 2008; Akatsuka *et al.*, 2007; Bobisse *et al.*, 2007). Alternativ können T-Lymphozyten mit T-Zellrezeptoren von zytotoxischen T-Zellen, die für Antigene von malignen Zellen spezifisch sind, ausgestattet und expandiert werden (Ochi *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010; Cesco-Gaspere *et al.*, 2009). Entsprechend wurden erste Untersuchungen zu dem Transfer von CYBA-72Y-spezifischen TZR-Ketten durchgeführt.

Die Funktionalität und Spezifität der isolierten Rezeptorketten von CYBA-72Y-reaktiven T-Lymphozyten wurde exemplarisch an dem TZR der miniMLLC 2D10 überprüft. Die Ketten dieses TZR enthielten die am häufigsten vorkommenden Regionen in den TZRs der CYBA-72Y-reaktiven miniMLLCs (**s. Ergebnisse 3.15**). Die TZR- α - und TZR- β -Kette der CYBA-72Y-spezifischen miniMLLC 2D10 wurden in Form von polyadenylierten IVT-RNAs in CD8⁺-Lymphozyten elektroporiert. Es wurde bereits gezeigt, dass die Anwesenheit des CD8-Korezeptors für transferierte MelanA/MART-1- und MAGE-A4-spezifischen TZRs essenziell ist (Birkholz *et al.*, 2009; Hiasa *et al.*, 2009 & 2008; Yang *et al.*, 2008). Allerdings können einige transferierte T-Zellrezeptoren (z.B. NY-ESO-1-, gp100-, HIVgag-spezifisch) sowohl in CD8⁺- als auch CD4⁺-Lymphozyten Effektormechanismen auslösen (Birkholz *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2005; Morgan *et al.*, 2003). Die Bedeutung der Korezeptoren für CYBA-72Y-spezifische T-Zellantworten muss noch untersucht werden.

Durchflusszytometrisch wurde die Expression der transferierten TZR- β -Kette der miniMLLC 2D10 überprüft, indem dessen V β 2-Region nachgewiesen wurde. Wie bei anderen Studien (Xue *et al.*, 2005) trug eine Subpopulation von den CD8⁺-Lymphozyten des BC-Spenders bereits eine TZR- β -Kette der V β 2-Familie. Nach Elektroporation mit der β -Kette allein oder gemeinsam mit der α -Kette des 2D10-TZRs erhöhte sich der Anteil der CD8⁺-T-Lymphozyten, die oberflächenständige V β 2-Moleküle besaßen, von etwa 6% auf über 40% (**s. Ergebnisse 3.15**). Eine ähnlich starke Transgenexpression wurde durch die Elektroporation von Lymphozyten mit RNA, die die beiden TZR-Ketten eines NY-ESO-1- bzw. MelanA/MART-1-spezifischen T-Zellklons kodierte, erreicht (Zhao *et al.*, 2006 & 2005). Im Gegensatz zu retroviral transferierten TZRs (Thomas *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2005) konnte bei dem CYBA-72Y-spezifischen TZR, der durch Elektroporation transient übertragen worden ist, keine Erhöhung der TZR-Expression durch eine antigenspezifische Stimulation erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

Nur der gemeinsame Transfer der α - und β -Kette des TZRs der miniMLLC 2D10 bewirkte eine Erkennung des Antigens CYBA-72Y, das in Form des identifizierten Nonamers CYBA-72Y₆₉₋₇₇ oder nach cDNA-Transfektion über HLA-B*15:01 präsentiert wurde (**s. Ergebnisse 3.15**). Für verschiedene antigenspezifische TZRs (z.B. gp100-, MAGE-A4-, MelanA/MART-1-, NY-ESO-1-, HIVgag-spezifisch), die in primäre T-Lymphozyten oder in die humane Jurkat-T-Zelllinie transfiziert wurden, wurde bereits die Auslösung unterschiedlicher Effektormechanismen (z.B. Zytokinfreisetzung, Proliferation, Zytotoxizität) aufgrund der Erkennung peptidbeladener Zellen bzw. spezifischer Tumorzelllinien belegt (Birkholz *et al.*, 2009; Hiasa *et al.*, 2008; Schaft *et al.*,

2006 & 2003; Zhao *et al.*, 2006 & 2005). Der Nachweis der Expression des funktionellen T-Zellrezeptors und seiner Erkennung des CYBA-72Y-Antigens bestätigt die mögliche Verwendung der isolierten TZR-Ketten für einen stabilen Transfer der CYBA-72Y-Spezifität. Für eine stabile Transfektion von Zellen mit CYBA-72Y-reaktiven T-Zellrezeptoren bieten sich bereits etablierte virale Expressionssysteme an, die auf Retro- oder Lentiviren basieren (Ochi *et al.*, 2010; Voss *et al.*, 2010; Sadelain, 2009; Uckert & Schumacher, 2009; Hiasa *et al.*, 2008).

Bei T-Lymphozyten mit retroviral oder in Form von RNA transferierten TZRs, die für WT1 bzw. gp100 spezifisch waren, wurden Effektormechanismen (z.B. Zytotoxizität, Zytokinfreisetzung) durch ähnliche Peptidkonzentrationen wie bei den ursprünglichen T-Lymphozyten induziert (Schaft *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2005; Morgan *et al.*, 2003). Die mit dem CYBA-72Y-spezifischen TZR ausgestatteten CD8⁺-Lymphozyten wiesen allerdings im Vergleich zu der miniMLLC 2D10 eine schwache IFN- γ -Freisetzung nach Antigenkontakt auf (Daten nicht gezeigt). Eine Ursache dafür könnte die Fehlpaarung der transferierten TZR-Ketten mit den endogenen TZR-Ketten der CD8⁺-Lymphozyten sein. Genetische Veränderungen der T-Zellrezeptoren (z.B. murine konstante TZR-Region, zusätzliche Disulfidbrücken, Codonoptimierung, einzelkettige TZRs) und *silencing* der endogenen T-Zellrezeptoren (z.B. durch siRNA) bzw. TZR-Transfers in $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden bereits erprobt, um eine erhöhte Expression übertragener T-Zellrezeptoren und Reduzierung von Fehlpaarungen mit endogenen T-Zellrezeptoren zu erreichen (Ochi *et al.*, 2010; Bendle *et al.*, 2009; Hiasa *et al.*, 2009; Kuball *et al.*, 2009; Sadelain, 2009; Schmitt *et al.*, 2009b). Durch den Transfer von T-Zellrezeptoren in Gedächtniszellen, naive oder virusspezifische T-Zellen bzw. hämatopoetische Stammzellen konnten lang anhaltende antitumorale Reaktivitäten etabliert werden (Ochi *et al.*, 2010; Hinrichs *et al.*, 2009; van Loenen *et al.*, 2009; Heemskerk *et al.*, 2008 & 2004). Solche Modifikationen und Transferversuche für eine optimale Expression von CYBA-72Y-spezifische TZRs stehen noch an, bevor die TZRs gentherapeutisch angewendet werden könnten. Für gentherapeutisch interessante TZRs, die über weitverbreitete HLA-Moleküle (z.B. HLA-A2, -A24) präsentierte Antigene (z.B. MelanA/MART-1, WT1, HA-1, HA-2) erkennen, wurden nach adoptiven Transfer in T-Lymphozyten sowohl *in vitro* als auch im Mausmodell die Peptid-HLA-Restriktion sowie antitumorale Aktivität (z.B. Zytokinfreisetzung, Zytotoxizität) bereits belegt (van Loenen *et al.*, 2011; Ochi *et al.*, 2010; Cesco-Gaspere *et al.*, 2009; Xue *et al.*, 2005; Bleakley & Riddell, 2004; Clay *et al.*, 1999). Der therapeutische Einsatz von Lymphozyten mit transferierten TZRs, die spezifisch für das melanosomale Antigen MelanA/MART-1 bzw. gp100 waren, wurde sogar schon klinisch erprobt. In den behandelten Melanompatienten konnte der Erhalt der Antigenpezifität, das Persistieren und die Tumorreaktivität der übertragenen Lymphozyten belegt werden (Johnson *et al.*, 2009; Duval *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2006). Klinische Studien für TZR-Transfers bei hämatologischen und anderen soliden Malignomen sind noch in Vorbereitung (Ochi *et al.*, 2010).

4.6 Potenzielle Bedeutung des mHAg CYBA-72Y für die Auslösung einer GvHD sowie von GvL- und GvT-Effekten

4.6.1 Häufigkeit des immunogenen CYBA-72Y-Mismatch bei allogenen Stammzelltransplantationen

Die Verteilung der immunogenen Konstellation von CYBA-72Y und HLA-B*15:01 gibt Auskunft über die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines CYBA-72Y-vermittelten GvL-Effekts sowie GvHD nach allogenen Stammzelltransplantationen. Von den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten HLA-B*15:01-positiven Patienten unterschieden sich etwa ein Viertel zu ihren Stammzellspendern in dem *CYBA-242*-Genotyp derart, dass eine CYBA-72Y-spezifische T-Zellantwort möglich wäre (s. **Ergebnisse 3.13**). Ein immunogener *Mismatch* lag bei transplantierten Patienten vor, die mindestens ein *CYBA-242T*-Allel trugen, während ihre Stammzellspender homozygot für das *CYBA-242C*-Allel waren. Unter Berücksichtigung der Häufigkeit von HLA-B*15:01 ist ein immunogener *Mismatch* des mHAg CYBA-72Y bei etwa 2% der Transplantationen in Deutschland von potenzieller Relevanz. Damit ist dieser *Mismatch* deutlich häufiger vertreten als immunogene *Mismatches* der meisten bekannten mHAgS (z.B. HA-2, HB-1), die jeweils bei weniger als 1% der Transplantationen vorkommen (Spierings *et al.*, 2007). Aber es wurden auch mHAgS (z.B. HA-1, HA-8, ACC-1) beschrieben, bei denen ein immunogener *Mismatch* in etwa 10% der allogenen Transplantationen vorhanden ist (Akatsuka *et al.*, 2007; Spierings *et al.*, 2007).

4.6.2 CYBA-72Y-spezifische Erkennung von nicht-malignen Zellen der Hämatopoese

Von besonderem Interesse in der Immuntherapie hämatologischer Malignome sind Antigene, die von hämatopoetischen Zellen exprimiert werden. Diese vermitteln nach einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation die Beseitigung von leukämischen Blasten und normalen hämatopoetischen Patientenzellen, von dessen Vorläufern die malignen Zellen abstammen, durch Spenderlymphozyten (Vincent *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2009). Bei der Untersuchung der Erkennung von hämatopoetischen Subpopulationen durch die zwei unabhängig generierten CYBA-72Y-spezifischen miniMLLCs 2E8 und 2D10 zeigte sich, dass Monozyten und dendritische Zellen sowie in weit geringerem Maße B-Zellen gesunder HLA-B*15:01-positiver BC-Spender, die mindestens eine *CYBA-242T*-Allel trugen, erkannt wurden. Deren T-Zellen und Granulozyten induzierten keine Reaktivität (s. **Ergebnisse 3.11**). Die bekannte Fähigkeit von Makrophagen und B-Lymphozyten sowie Granulozyten einen *respiratory burst* durchzuführen, der vor allem auf der Produktion von ROS durch NOXs und somit auf der Expression von CYBA basiert (Batot *et al.*, 1998; Roos *et al.*, 1996; Yagisawa *et al.*, 1996), lies eine Erkennung dieser Zelltypen erwarten.

Die Erkennung von Monozyten durch die CYBA-72Y-spezifischen miniMLLCs war schwächer als die dendritischer Zellen (s. **Ergebnisse 3.11**). Dendritische Zellen besitzen ebenso wie Monozyten alle Komponenten der NOXs, aber im Vergleich zu Makrophagen ist ihre Expression der NOX-Untereinheiten niedrig und sie produzieren ROS nicht sehr effizient (Kraaij *et al.*, 2010; Bedard & Krause, 2007; Elsen *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 1986). Die trotzdem starke

Erkennung der dendritischen Zellen durch antigenspezifische T-Lymphozyten ist zum einen begründbar durch die vor allem in DCs vorliegende Beteiligung der produzierten ROS an der Proteindegradation und der resultierenden Förderung der Antigenpräsentation (Lam *et al.*, 2010; Hultqvist *et al.*, 2009; Bedard & Krause, 2007). Zum anderen präsentieren dendritische Zellen aufgrund ihres Phänotyps als professionelle antigenpräsentierende Zellen, welcher durch eine hohe Dichte von Peptid-MHC-Komplexen und kostimulatorischen Molekülen gekennzeichnet ist, am effizientesten Antigene (Schuurhuis *et al.*, 2006).

B-Lymphozyten von zwei der drei BC-Spender wurden schwach durch die CYBA-72Y-spezifische miniMLLC 2E8 erkannt (**s. Ergebnisse 3.11**). Die Spezialisierung der B-Zellen auf die Aktivierung von CD4⁺-Lymphozyten über MHC-Klasse II-Moleküle (Maddaly *et al.*, 2010; Batista & Harwood, 2009) trug sicherlich zu dieser schwachen Erkennung durch CD8⁺-T-Lymphozyten bei. Dennoch exprimieren auch B-Zellen MHC-Klasse I-Moleküle. Aber abhängig von ihrem Aktivierungs- bzw. Differenzierungszustand, der u.a. die Expression kostimulatorischer Moleküle (z.B. ICAM-1, B7) beeinflusst, können B-Zellen T-Lymphozyten unterschiedlich stark aktivieren oder anergisch wirken (Höllsberg *et al.*, 1996; Dennig *et al.*, 1994; Gilbert & Weigle, 1994; Eynon & Parker, 1992; Linsley *et al.*, 1990; Freedman *et al.*, 1987). Selbst aktivierte B-Zellen sind im Vergleich zu dendritischen Zellen nur schwache antigenpräsentierende Zellen (Cassell & Schwartz, 1994). Zudem exprimieren B-Zellen und ebenfalls EBV-transformierte B-Zelllinien die CYBA-kodierte NOX-Untereinheit p22phox nur in geringen Mengen, weshalb sie auch nur wenige ROS produzieren können (Bedard & Krause, 2007; Batot *et al.*, 1998; Condino-Neto & Newburger, 1998; Chetty *et al.*, 1995; Maly *et al.*, 1990; Volkman *et al.*, 1984). Dennoch wurden EBV-transformierte B-Zellen durch CYBA-72Y-spezifische miniMLLCs im Gegensatz zu B-Zellen stark erkannt (**s. Ergebnisse 3.11, 3.12**). Das könnte auf die durch die EBV-Infektion ausgelöste Stimulation der B-Zellen und Erhöhung der Expression von Aktivierungsmarkern (z.B. ICAM-1, LFA-1, MHCII), die an der T-Zellaktivierung beteiligt sind, zurückzuführen sein (Saha & Robertson, 2011; Freedman *et al.*, 1987).

CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten wurden durch die CYBA-72Y-spezifischen miniMLLCs nicht erkannt (**s. Ergebnisse 3.11**), obwohl T-Zellen grundsätzlich als APCs fungieren können (Dionne *et al.*, 2001; Celis *et al.*, 1992). Allerdings führen Interaktionen zwischen T-Zellen, insbesondere mit regulatorischen T-Zellen, zur Herabregulation von T-Zellreaktionen. Dadurch sollen eine unkontrollierte T-Zellproliferation und autoaggressive Immunantworten verhindert werden (Rudd *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2004). Zudem exprimieren T-Zellen NOX-Untereinheiten derart, dass nur eine geringe ROS-Produktion ermöglicht wird (Thayer *et al.*, 2011; Tse *et al.*, 2010; Gülow *et al.*, 2005; Remans *et al.*, 2005; Jackson *et al.*, 2004).

Neutrophile Granulozyten wurden ebenfalls nicht durch die CYBA-72Y-spezifischen miniMLLCs erkannt (**s. Ergebnisse 3.11**). Da vor allem Granulozyten für ihren *respiratory burst* bekannt sind, der durch die ROS-Produktion der NOX2 ermöglicht wird (Lam *et al.*, 2010; Bedard & Krause, 2007; Yagisawa *et al.*, 1996), ist die fehlende Erkennung nicht begrifflich. Sicherlich sind daran beteiligt die geringe Expression kostimulatorischer Moleküle durch Granulozyten und das während der Aufarbeitung der Zellen verwendete Ammoniumchlorid im Lysepuffer, das mit einer

gestörten Antigenprozessierung in Verbindung gebracht wird (Akuthota *et al.*, 2010; Potter & Harding, 2001; Ziegler & Unanue, 1982).

Im Vorfeld von Stammzelltransplantationen durchgeführte Behandlungen und die Entwicklung eines GvL-Effekts bzw. einer GvHD nach Transplantation lösen inflammatorische Immunantworten in Leukämiepatienten aus (Hambach *et al.*, 2008; Subramaniam *et al.*, 2007; Blazer & Murphy, 2005). Der Einfluss proinflammatorischer Moleküle auf die Erkennung hämatopoetischer Subpopulationen durch CYBA-72Y-spezifische T-Lymphozyten wurde anhand von Monozyten, T-, B-Lymphozyten und Granulozyten eines HLA-B*15:01-positiven Spenders untersucht. Nach 24-stündiger Stimulation der hämatopoetischen Zellen mit Lipopolysaccharid, IFN- γ bzw. IL-1 β war die Erkennung durch die CYBA-72Y-spezifische miniMLLC 2E8 im Vergleich zu unstimulierten Zellen unverändert (Daten nicht gezeigt). Dennoch ist insbesondere IFN- γ dafür bekannt, die Expression von MHC-Molekülen bei unterschiedlichen Zelltypen (z.B. Makrophagen, Granulozyten, Leukämiezellen, T-Zelllymphome) zu erhöhen und dadurch die T-Zellerkennung zu fördern (Regis *et al.*, 2009; Chakravarti *et al.*, 2007; Schroder *et al.*, 2004; Potter & Harding, 2001; Dermime *et al.*, 1997; Neuman *et al.*, 1992). Die Expression von CYBA wird aber im Gegensatz zu anderen Zellen (z.B. Aortenendothelzellen) in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten weder durch Lipopolysaccharid noch durch IFN- γ oder IL-1 β beeinflusst (Manea *et al.*, 2010; Li & Frei, 2009; Cassatella *et al.*, 1990). Demnach hat die Stimulation der hämatopoetischen Zellen mit proinflammatorischen Molekülen unter den verwendeten Bedingungen wahrscheinlich keine Veränderung in der Expression von CYBA bewirkt, die über eine entsprechende Antigenpräsentation nachweisbar gewesen wäre.

Neben der Optimierung der Aufarbeitung hämatopoetischer Zellen, insbesondere Granulozyten, ist in nachfolgenden Arbeiten eine Quantifizierung der CYBA-Expression in den verschiedenen Zellpopulationen notwendig, um sie mit dem Erkennungsmuster von CYBA-72Y-spezifische T-Lymphozyten zu korrelieren und um die potenzielle Bedeutung von CYBA-72Y an der Beseitigung von hämatopoetischen Zellen transplantierten Patienten und der Induktion einer GvHD besser abschätzen zu können.

4.6.3 Graft-versus-host disease (GvHD) bei CYBA-72-Mismatch-transplantierten HLA-B*15:01-positiven Leukämiepatienten

Liegt bei einer allogenen Stammzelltransplantation ein immunogener *Mismatch* in einem ubiquitär exprimierten mHAg zwischen Spender und Empfänger vor, kann neben dem GvL-Effekt die schädigende GvHD entstehen (Bleakley & Riddell, 2004). Die aus der Literatur bekannte Expression von CYBA durch viele unterschiedliche Zelltypen (z.B. Endothel-, Muskelzellen, Melanozyten) (Bedard & Krause, 2007; Brar *et al.*, 2002) wurde im Rahmen dieser Arbeit für verschiedene Gewebe (z.B. Gehirn, Herz, Niere) bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die Erkennung von Patienten-Fibroblasten durch CYBA-72Y-spezifische miniMLLCs unterstreicht die ubiquitäre Expression des CYBA-72Y-Antigens weiter (Albrecht *et al.*, 2011). Allerdings wurde bereits gezeigt, dass ubiquitär exprimierte mHAGs nicht zwangsläufig zu einer GvHD führen müssen (Goulmy *et al.*, 1996). Vielmehr scheint ein bestimmtes Expressionslevel der mHAGs und antigenpräsentierenden HLA-Moleküle notwendig zu sein, um eine GvHD auszulösen (Bleakley &

Riddell, 2004; Dolstra *et al.*, 1999; Niederwieser *et al.*, 1993). Wenn ein mHAg (z.B. *UTY*) von Leukämiezellen hoch exprimiert wird und nur eine niedrige Expression durch andere Gewebe vorhanden ist, kann dies zu einem GvL-Effekt führen, ohne dass eine fassbare GvHD entsteht (Bleakley & Riddell, 2004). Außerdem können polymorphe Proteine in verschiedenen Zelltypen aufgrund von unterschiedlichen Proteasomen und spezifischer mRNA-Spleißvarianten unterschiedlich prozessiert und präsentiert werden (Falkenburg *et al.*, 2002; Palmowski *et al.*, 2002). Eine Quantifizierung der Expression von *CYBA* in unterschiedlichen Zelltypen sowie eine umfassende Untersuchung der Zellerkennung durch *CYBA*-72Y-spezifische Lymphozyten stehen noch aus. Diese sind notwendig, um das GvHD-Risiko bei allogenen Transplantationen mit immunogenem *CYBA*-72Y-*Mismatch* abzuklären.

Für die Einschätzung der potenziellen Relevanz von *CYBA*-72Y für die Ausbildung einer GvHD konnten sechs HLA-B*15:01-positive transplantierte Patienten mit unterschiedlichen hämatologischen Malignomen (2 AMLs, 1 ALL, 1 CML, 1 CLL, 1 MDS), bei denen ein immunogener *CYBA*-72Y-*Mismatch* gegenüber ihren Stammzellspendern vorlag, herangezogen werden. Alle wiesen nach allogener Transplantation einen kompletten Spenderchimärismus auf. Eine auffällige GvHD-Prädisposition war nicht festzustellen (Daten nicht gezeigt). Nur drei Leukämiepatienten zeigten unterschiedlich starke Anzeichen einer chronischen GvHD, von denen einer außerdem unmittelbar nach Transplantation eine beherrschbare akute GvHD entwickelt hatte. Alle Patienten erreichten eine andauernde komplette Remission. Ein immunogener *Mismatch* zwischen Transplantatempfänger und -spender für das mHAg HA-1 ist dagegen meist mit der Ausbildung einer GvHD assoziiert. Diese wird wahrscheinlich aufgrund der Antigenpräsentation durch verbliebene DCs und Langerhanssche Zellen der Patienten ausgelöst (Sellami *et al.*, 2010; Goulmy *et al.*, 1996).

Für die Ausbildung einer GvHD nach allogener Stammzelltransplantation oder Spender-Lymphozyten-Infusion in Leukämiepatienten ist die Anwesenheit von T-Lymphozyten verantwortlich, die spezifisch für ubiquitär exprimierte mHAgS wie HA-8, UGT2B17 und SMCY sind (Bleakley & Riddell, 2004; Niederwieser *et al.*, 1993). Bei der Untersuchung des peripheren Blutes von zwei in Mainz transplantierten HLA-B*15:01-positiven Patienten, die gegenüber ihren Stammzellspendern jeweils einen immunogenen *CYBA*-72Y-*Mismatch* aufwiesen, konnten nach allogener Transplantation keine *CYBA*-72Y-spezifischen CD8⁺-Lymphozyten nachgewiesen werden (**s. Ergebnisse 3.13**). Doch stand von den transplantierten Leukämiepatienten für die experimentelle Expansion *CYBA*-72Y-spezifischer Lymphozyten deutlich weniger Ausgangsmaterial zur Verfügung als von gesunden BC-Spendern, bei denen *CYBA*-72Y-reaktive T-Lymphozyten in einer Frequenz von 1 in 10⁷ PBMCs gefunden worden sind (**s. Ergebnisse 3.13**). Um die Verbreitung von *CYBA*-72Y-spezifischen T-Lymphozyten nach Transplantationen zu bestimmen, muss zudem noch eine deutlich größere Anzahl von Patienten untersucht werden. Dabei ist auch zu beachten, dass Lymphozyten von transplantierten Patienten meist unter dem Einfluss von Immunsuppressiva stehen (Bleakley & Riddell, 2011). Die Transplantationen bei den beiden untersuchten Malignompatienten lagen zudem jeweils schon über ein Jahr zurück, so dass die Frequenz der übertragenen *CYBA*-72Y-spezifischen T-Lymphozyten in der Peripherie gering sein könnte. Dies wurde beispielsweise für einem allogenen transplantierten CML-Patienten nach

einer Spender-Lymphozyten-Infusion beschrieben. Ein Jahr nach der Infusion sank die Frequenz von T-Lymphozyten, die spezifisch für das mHAg LRH-1 waren, von 1% auf 0,1% (de Rijke *et al.*, 2005). Ein weiterer Grund für den nicht erfolgreichen Nachweis CYBA-72Y-spezifischer T-Lymphozyten in den *CYBA-242-Mismatch*-transplantierten Patienten, könnte das Fehlen CYBA-72Y-spezifischer T-Lymphozyten in ihren Stammzellspendern sein. In der Tat waren im Blut des Stammzellspenders eines der beiden *CYBA-72-Mismatch*-transplantierten Leukämiepatienten keine CYBA-72Y-reaktiven Lymphozyten nachweisbar (**s. Ergebnisse 3.13**). Doch wurden insgesamt in drei von fünf gesunden BC-Spendern CYBA-72Y-reaktive T-Zellen gefunden (**s. Ergebnisse 3.7, 3.8, 3.13**) (Albrecht *et al.*, 2011). Somit ist zu erwarten, dass bei über der Hälfte der allogenen Transplantationen bzw. Spender-Lymphozyten-Infusionen CYBA-72Y-spezifische T-Lymphozyten übertragen werden.

4.6.4 CYBA-72Y-vermittelte Erkennung HLA-B*15:01-positiver Leukämiezellen

Bei den CYBA-72Y-spezifischen miniMLLCs der beiden Modellsysteme MZ529-AML/*Buffy Coat* 730 und MZ987-AML/*Buffy Coat* 940 wurden aufgrund der Erkennung der leukämischen Zellen, mit denen sie generiert worden sind, sowohl zytotoxische Effektorfunktionen als auch die Zytokinfreisetzung induziert (**s. Ergebnisse 3.6, 3.7, 3.8**) (Albrecht *et al.*, 2011).

Es ist bekannt, dass humane myeloische Leukämiezelllinien (z.B. HL-60, U937) ebenso wie Phagozyten vor ihrer Differenzierung die Untereinheiten der Phagozyten-Oxidase nur in geringem Maße exprimieren und mit zunehmender Differenzierung zusammen mit der NADPH-Oxidaseaktivität u.a. die Expression des CYBA-kodierten p22phox ansteigt (Inoue *et al.*, 2001; deMendez & Leto, 1995; Kikuchi *et al.*, 1994; Levy *et al.*, 1990; Cassatella *et al.*, 1989). Daher wurde die CYBA-72Y-spezifische Erkennung von HLA-B*15:01-positiven AMLs, die aufgrund der unterschiedlichen Differenzierungsstadien bzw. Zelltypen ihrer leukämischen Blasten unterschiedlichen Subtypen zugeordnet worden sind, untersucht. Neben den beiden AMLs, die zur Generierung der miniMLLCs verwendet worden sind, eine akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung (MZ529-AML: FAB M1) und eine akute myelomonozytäre Leukämie (MZ987-AML: FAB M4), wurden von der CYBA-72Y-spezifischen miniMLLC 2E8 eine akute myeloische Leukämie mit Ausreifung (MZ683-AML: FAB M2), zwei akute Monoblasten-Leukämien (MZ632-AML, MZ911-AML: FAB M5) sowie ein Rezidiv einer der Monoblasten-Leukämien (MZ911-AML) erkannt (**s. Ergebnisse 3.12**). Ein Muster in der Erkennungsstärke der AMLs war nicht ersichtlich.

Bei CMLs ist die Expression der NOX-Untereinheit p22phox und die Produktion von ROS durch NADPH-Oxidasen ebenfalls belegt (Cassatella *et al.*, 1989; Harper *et al.*, 1984). Somit ist davon auszugehen, dass alle malignen Hämoblastosen myeloischen Ursprungs bei Vorliegen des *CYBA-242T*-Allels und von HLA-B*15:01 das Antigen CYBA-72Y präsentieren. Maligne Hämoblastosen lymphatischen Ursprungs wurden nicht in ausreichendem Umfang getestet, um eine Aussage zur CYBA-72Y-Präsentation treffen zu können.

4.6.5 CYBA-72Y-vermittelte Erkennung HLA-B*15:01-positiver solider Malignome

Der Einsatz von allogenen T-Lymphozyten in Form von Stammzelltransplantationen, Spender-Lymphozyten-Infusionen oder adoptiven T-Zell-Transfers ist nicht nur für die Behandlung

von hämatologischen Malignomen von Interesse, sondern aufgrund des Antigen-vermittelten *graft-versus-tumor* (GvT)-Effekts zunehmend auch für die Behandlung einiger solider Tumore (z.B. metastasierende Nierenzell-, Brust-, Kolon-, Ovarkarzinome) (Johnson *et al.*, 2009; Ringdén *et al.*, 2009; Demirer *et al.*, 2008; Kausche *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2006; Lundqvist & Childs, 2005). Die Identifizierung von Antigenen (z.B. HA-1), die von Zellen solider Tumore (z.B. metastasierendes Brustkarzinom) präsentiert und von allogenen T-Lymphozyten erkannt werden, ermöglicht die Verbesserung der adoptiven Immuntherapie bei Tumoren (Hambach *et al.*, 2008).

Es ist bereits bekannt, dass humane Malignome unterschiedlichen Ursprungs (z.B. Melanome, Ovar-, Brust-, Prostata-, Lungen-, Pankreas-, Nierenzell-, Kolon-, Adenokarzinome) *CYBA* exprimieren und in der Lage sind über NADPH-Oxidasen ROS zu produzieren (Edderkaoui *et al.*, 2011 & 2005; Fried & Arbiser, 2008; Lee *et al.*, 2007; Vaquero *et al.*, 2004; Brar *et al.*, 2003b & 2002). Bei der Untersuchung der Erkennung HLA-B*15:01-positiver Tumore unterschiedlichen Ursprungs durch die *CYBA*-72Y-spezifische miniMLLC 2E8 wurden drei von fünf Melanome aufgrund ihrer Expression des *CYBA*-242T-Allels erkannt (**s. Ergebnisse 3.12**). Die begrenzte Auswahl an Tumormaterial, das sowohl HLA-B*15:01-positiv sein als auch ein *CYBA*-242T-Allel tragen muss, verhinderte die Klärung der Erkennung von Tumoren anderen Ursprungs durch *CYBA*-72Y-spezifische T-Lymphozyten. Dennoch scheint das mHAg *CYBA*-72Y nicht nur für Leukämien ein potenziell relevantes Antigen zu sein, sondern auch für solide Tumore wie die Erkennung der Melanome zeigte. An HA-1, RDR173 und LB-ADIR-1 wurde bereits belegt, dass mHAgs sowohl zum GvL-Effekt bei hämatologischen Malignomen als auch zum GvT-Effekt bei einigen soliden Tumoren (z.B. metastasierendes Nierenzellkarzinom) beitragen können (Feng *et al.*, 2008; Ofran & Ritz, 2008; Akatsuka *et al.*, 2007; Hambach & Goulmy, 2005).

Bekannte mHAgs (z.B. ACC-1, ACC-2) und SNPs können auch innerhalb von malignomassoziierten Antigenen (z.B. BCL2, WT1, IDH1) lokalisiert sein (Bleakley & Riddell, 2011; Marcucci *et al.*, 2011). Charakteristisch für solche Antigene ist ihre malignomspezifische Expressionssteigerung bzw. genetische Veränderung sowie die daraus resultierende malignomfördernde Wirkung (Greiner *et al.*, 2008; Bleakley & Riddell, 2004; Marcucci *et al.*, 2005). Für das Gen *CYBA*, das das mHAg *CYBA*-72Y kodiert, steht eine quantitative Untersuchungen der Expressionsstärke in unterschiedlichen malignen Zelltypen noch aus. Aber bei akuten lymphatischen Leukämien, Prostata- und Brustkarzinomen wurde eine erhöhte *CYBA*-Expression bereits beschrieben (Floriano-Sánchez *et al.*, 2010; He *et al.* 2009; Powell *et al.*, 2002). Mit einer höheren Expression von *CYBA* ergibt sich unter der Voraussetzung, dass auch die anderen Untereinheiten der NOX-Komplexe ausreichend vorhanden sind, eine gesteigerte Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen. Diese sind aufgrund ihrer Unterstützung der Angiogenese sowie antiapoptotischen, proliferationsfördernden und mutagenen Wirkung malignomfördernd (Fried & Arbiser, 2008; Bedard & Krause, 2007; Klaunig & Kamendulis, 2004; Brar *et al.*, 2003a & b; Arbiser *et al.*, 2002). Sowohl bei Leukämiezellen als auch Kolorektal- und Prostatakarzinomzellen wurde ihre inhibitorische Wirkung auf die Apoptose belegt (Brar *et al.*, 2003a; Lin *et al.*, 1999; Clément & Stamenkovic, 1996). Inwieweit *CYBA* tatsächlich als malignomassoziiertes Antigen agieren kann, muss noch abschließend geklärt werden.

Bei einer präferenziellen Expression von *CYBA* durch hämatopoetische und maligne Zellen könnten *CYBA*-72Y-spezifische T-Lymphozyten zur Auslösung eines GvT- bzw. GvL-Effekts bei verschiedenen Malignomen eingesetzt werden und somit malignomübergreifende Therapieansätze ermöglichen (Rice *et al.*, 2006; Kelly & Gilliland, 2002).

4.7 Weiterführende Untersuchungen zur *In vivo*-Relevanz des immunogenen *CYBA*-72Y-Mismatch

4.7.1 Tiermodelle

Sowohl der GvL-Effekt als auch die GvHD, die auf dem mHAg *CYBA*-72Y beruhen könnten, müssen vor einer gezielten klinischen Anwendung des mHAg noch umfassender charakterisiert werden. Dafür ist die Untersuchung der *CYBA*-72Y-spezifischen Erkennung von unterschiedlichen benignen und malignen Zelltypen denkbar. Doch solche *In vitro*-Versuche haben nur eine eingeschränkte Aussagekraft. Zudem sind vor klinischen Anwendungen *In vivo*-Vortests sinnvoll, um u.a. Interaktionen verschiedener Zellen zu berücksichtigen (Offringa, 2009).

Zwischen verschiedenen Säugetieren weist das *CYBA*-kodierte Protein eine Ähnlichkeit von etwa 86% auf und ist stark konserviert (Zhu *et al.*, 2006). Zwar besitzen auch Mäuse und Ratten ein *CYBA*-Homologon, aber in der identifizierten Decamerregion unterscheiden diese sich in drei bzw. zwei Aminosäuren zu dem humanen p22phox (www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/homologene). Dadurch würde wahrscheinlich eine Antigenerkennung von murinen Zellen durch humane *CYBA*-72Y-spezifische T-Lymphozyten verhindert werden. Bei dem mHAg HA-1 verhindert beispielsweise bereits der Unterschied in einer Aminosäure die Erkennung muriner hämatopoetischer Zellen durch humane HA-1-spezifische T-Lymphozyten (Rice *et al.*, 2006). Außerdem weisen Nagetiere und Menschen Abweichungen in der Transkription und den Gensequenzen von Untereinheiten der NADPH-Oxidasen auf, die für die Stabilität des *CYBA*-kodierte Proteins p22phox essenziell sind (Katsuyama, 2010). Die resultierenden Diskrepanzen in dem Muster und der Stärke der *CYBA*-Expression zwischen Menschen und Nagern würden bei Verwendung der Nagermodele zu Ergebnisse führen, die nicht auf den Menschen übertragbar sind. Somit sind Untersuchungen von *CYBA*-72Y-spezifischen Immunreaktionen in diesen Modellorganismen nur eingeschränkt und mit großem Aufwand möglich.

Erst Xenotransplantationen von humanen Stammzellen bzw. *CYBA*-72Y-reaktiven Lymphozyten ermöglichen die Überprüfung des durch *CYBA*-72Y-vermittelten GvL-Effekts sowie GvHD. Der GvL-Effekt kann an Tieren mit Malignomen, die das humane *CYBA*-242T- und HLA-B*15:01-Allel tragen, untersucht werden. Aufgrund der breiten Expression und nachgewiesenen *In vitro*-Erkennung von *CYBA* (**s. Ergebnisse 3.12**) können hierfür verschiedene Malignommodelle (z.B. Leukämien, Melanome) genutzt werden (Mena *et al.*, 2012; Distler *et al.*, 2008; Rosinski *et al.*, 2008; Lapidot *et al.*, 1994). Die erfolgreiche Verwendung von zytotoxischen T-Lymphozyten, die für mHAg (z.B. UTY, HA-1, AAC-6) spezifisch sind, zur Beseitigung von Leukämie- und Melanomzellen wurde bereits in NOD/SCID-Mausmodellen belegt (Akatsuka *et al.*, 2007; Bleakley & Riddell, 2004). In NOD/SCID-IL2Ry^{null}-Mäusen wuchsen erfolgreich AML-Zellen des Patienten

MZ529 an, so dass die Leukämieaktivität der CYBA-72Y-spezifischen miniMLLCs *in vivo* untersucht werden kann (persönliche Mitteilung von Dr. U.Hartwig, Universitätsmedizin Mainz). Für die Untersuchung der Auslösung einer CYBA-72Y-vermittelten GvHD können Tiere verwendet werden, denen menschliche Haut von HLA-B*15:01-positiven Spendern mit CYBA-242T-Allel transplantiert wurde. Die Beseitigung von antigenpräsentierenden Langerhansschen Zellen in humanen Hauttransplantate durch alloreaktive T-Lymphozyten wurde in immunkomprimierten NOD/SCID-IL2Ry^{null}-Mäusen bereits belegt (Hemmerling *et al.*, 2011).

Allerdings ist die Übertragung von Ergebnissen aus Mausversuchen auf allogene Transplantationen bei Menschen wegen der Unterschiede zwischen den Organismen (z.B. Genexpressionstärke) und zwischen deren experimentellen bzw. klinischen Behandlungen (z.B. Bestrahlungsprotokoll, transplantierte Zelltypen) sowie der Heterogenität der menschlichen Populationen schwierig (Schroeder & DiPersio, 2011; Offringa, 2009; Uckert & Schumacher, 2009; Feng *et al.*, 2008; Akatsuka *et al.*, 2007).

4.7.2 Korrelation des immunogenen CYBA-72Y-Mismatch mit klinischen Beobachtungen

Die Rekrutierung und Analyse einer ausreichend großen Anzahl an transplantierten HLA-B*15:01-positiven Malignompatienten, die zu ihren allogenen Stammzellspendern einen immunogenen CYBA-72Y-Mismatch aufweisen, würde notwendige Versuche mit Tiermodellen stark begrenzen und praxisnähere Daten zur *In vivo*-Relevanz des mHAg CYBA-72Y ergeben.

Durch den Nachweis von CYBA-72Y-reaktiven T-Lymphozyten in drei von fünf gesunden HLA-B*15:01-positiven Spendern (**s. Ergebnisse 3.7, 3.8, 3.13**) (Albrecht *et al.*, 2011) konnte belegt werden, dass durch allogene Stammzelltransplantationen und in diesem Zusammenhang verabreichten Spender-Lymphozyten-Infusionen prinzipiell CYBA-72Y-spezifische T-Zellen übertragen werden können. T-Lymphozyten, die für mHAg spezifisch sind, sind für die therapeutische Wirkung der beiden Verfahren verantwortlich, in dem sie ihr Zielantigene (z.B. HA-1, HA-2) auf malignen Zellen erkennen (Ochi *et al.*, 2010; Bleakley & Riddell, 2004). Sowohl die Expression des mHAg CYBA-72Y durch maligne Zellen unterschiedlichen Ursprungs (**s. Ergebnisse 3.12**) (Edderkaoui *et al.*, 2011 & 2005; Fried & Arbiser, 2008; Lee *et al.*, 2007) als auch die CYBA-72Y-vermittelte Auslösung von antitumoralen Effektorfunktionen bei T-Lymphozyten durch diese Zellen konnte belegt werden (**s. Ergebnisse 3.6**). Somit scheint CYBA-72Y grundsätzlich in der Lage zu sein einen GvL- bzw. GvT-Effekt zu induzieren. Übertragene mHAg-spezifische Spenderlymphozyten können aufgrund der ubiquitären Expression von mHAg (z.B. HA-8, UGT2B17) auch eine schädigende GvHD auslösen (Bleakley & Riddell, 2004). Die Erkennung von Zellen mesenchymalen Ursprungs wie Fibroblasten durch CYBA-72Y-spezifische miniMLLCs ist ein Hinweis auf eine solche Expression von CYBA-72Y (Albrecht *et al.*, 2011). Zudem wurde die Expression von CYBA in einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen (z.B. Gefäßmuskel-, Kolonendothelzellen) nachgewiesen (Daten nicht gezeigt) bzw. in der Literatur beschrieben (Bedard & Krause, 2007; Cheng *et al.*, 2001; Azumi *et al.*, 1999). Wie bei den malignen Zellen müssen bei benignen Zellen unterschiedlichen Ursprungs noch die Quantität des exprimierten CYBA und ihre Immunogenität untersucht werden. Nachgewiesen wurde die Erkennung von myeloischen Zellen und B-Lymphozyten durch CYBA-72Y-spezifische T-

Lymphozyten (s. **Ergebnisse 3.11**). Diese kann bei transplantierten Patienten mit hämatopoetischen Malignomen therapeutisch hilfreich sein, weil sie zur Beseitigung verbliebener hämatopoetischer Patientenzellen führen kann. Diese Erkennung nicht-maligner hämatopoetischer Zellen kann allerdings auch zur Auslösung einer schädigenden GvHD durch T-Zellreaktionen gegen gewebeständige Zellen hämatopoetischen Ursprungs (z.B. dendritische Zellen) führen, selbst wenn CYBA-72Y wie das mHAg HA-1 Hämatopoese-spezifisch exprimiert wird (Sellami *et al.*, 2010; Goulmy *et al.*, 1996).

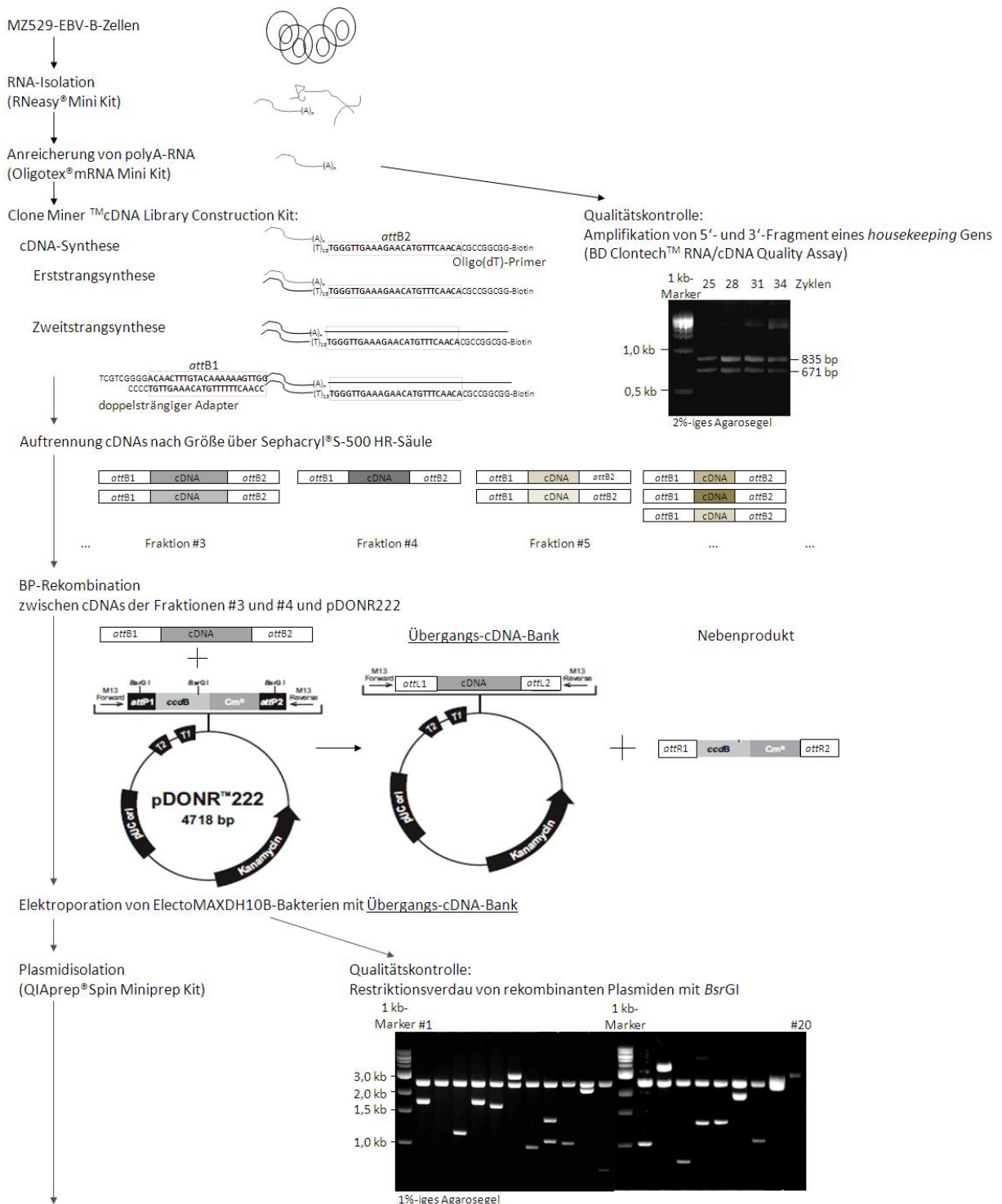
Bei Betrachtung von sechs allogenen transplantierten HLA-B*15:01-positiven Patienten zeigte sich trotz des Vorliegens eines immunogenen CYBA-72-*Mismatch* zu ihren Stammzellspendern keine Prädisposition zur Ausbildung einer GvHD (Daten nicht gezeigt). Doch ist es unverzichtbar eine ausreichend große Gruppe CYBA-72Y-*Mismatch*-transplantierte Patienten auszuwerten, um zu einer besseren Einschätzung des GvHD-Risikos bzw. Potenzials für einen GvL-Effekt zu kommen. In deren Blut müsste die Expansion CYBA-72Y-spezifischer T-Lymphozyten sowie eine Korrelation mit dem GvL- bzw. GvT-Effekt belegt werden. Ist darüber hinaus keine Assoziation der CYBA-72Y-spezifischen T-Zellantwort mit einer fassbaren GvHD nachweisbar, könnte ein gezielter Transfer von CYBA-72Y-spezifischen T-Zellen insbesondere für die Therapie von Leukämiepatienten durchgeführt werden. Für solche adoptiven T-Zelltransfers werden malignomspezifische T-Lymphozyten *ex vivo* expandiert, die zuvor mit Hilfe von Antigen-HLA-Tetrameren oder aufgrund ihrer Zytokinfreisetzung bei Antigenkontakt selektioniert worden sind (Bleakley & Riddell, 2011 & 2004; Falkenburg *et al.*, 2002). Eine erfolgreiche *In vitro*-Expansion von CYBA-72Y-spezifischen T-Lymphozyten gesunder Spender wurde bereits erreicht, sowohl durch allogene Stimulation mit Leukämiezellen (Albrecht *et al.*, 2011) als auch durch Präsentation des identifizierten Peptids CYBA-72Y₆₉₋₇₇ durch autologe Zellen (s. **Ergebnisse 3.13**). Der Transfer von T-Lymphozyten, die spezifisch für mHAgS (z.B. HA-1, HA-2) oder LAAs (z.B. WT1, Proteinase 3) sind, soll eine Verstärkung der Immunantwort und des GvL-Effekts sowie eine Reduzierung des GvHD- und Rezidivrisikos bewirken (Ringdén *et al.*, 2009; Heemskerk *et al.*, 2008; Falkenburg *et al.*, 2002; Mutis *et al.*, 1999). In transplantierten Leukämiepatienten mit Rezidiv konnte bereits eine komplette Remission oder zumindest eine zeitlich begrenzte Kontrolle des Leukämiewachstums erreicht werden, in dem ihnen *in vitro* expandierte, leukämieaktive T-Zelllinien ihrer Stammzellspender bzw. CD8⁺-Lymphozyten, die gegen einzelne mHAgS (z.B. kodiert durch *P2RX7*, *DPH1*, *DDX3Y*) gerichtet waren, verabreicht worden sind (Warren *et al.*, 2010; Marijt *et al.*, 2007). Um die therapeutische Wirkung von transferierten Lymphozyten zu verstärken, können diese mit Genen von Zytotoxinen oder Zytokinen (z.B. TNF, IFN- γ , IL-2) ausgestattet oder die Patienten bzw. ihre Spender mit entsprechenden Antigenen vakziniert werden (Li *et al.*, 2009; Rice *et al.*, 2006; Bordignon *et al.*, 1999). Außerdem können die Lymphozyten für ihre gezielte Beseitigung auch mit Suizidgenen, Apoptoserezeptoren oder Zielmolekülen von Antikörpern (z.B. CD20) ausgestattet werden, die bei Auftreten von lebensbedrohlichen Komplikationen wie Myelosuppression und GvHD induziert werden (Ochi *et al.*, 2010; Berry *et al.*, 2009; Uckert & Schumacher, 2009; Heemskerk *et al.*, 2008; Bordignon *et al.*, 1999). Sollte sich CYBA-72Y tatsächlich als Auslöser für eine schädigende GvHD erweisen, wie es die weit verbreitete Expression von CYBA vermuten lässt (Bedard & Krause, 2007; Cheng *et al.*,

2001; Azumi *et al.*, 1999), wäre es fatal CYBA-72Y-reaktive T-Zellen bei Transplantationen zu übertragen. In diesem Fall sollten aus allogenen Transplantaten und Lymphozyten-Infusionen CYBA-72Y-reaktive Lymphozyten bereits präventiv mit Hilfe von Antigen-HLA-Tetrameren entfernt werden (Heemskerk *et al.*, 2003; Marijt *et al.*, 2003). Solche gezielten Manipulationen von CYBA-72Y-spezifischen T-Zellantworten können den GvL-Effekt verstärken bzw. das GvHD-Risiko verringern und würden somit zu einer Verbesserung der Behandlung von Malignompatienten beitragen.

5 Anhang

5.1 Schema zur Konstruktion der cDNA-Bank des AML-Patienten MZ529 aus EBV-transformierten B-Zellen

Von dem AML-Patienten MZ529 wurde unter Verwendung eines auf dem Bakteriophagen λ basierenden ortsspezifischen Rekombinationssystem mit Hilfe der Gateway™-Technologie eine cDNA-Bank konstruiert (s. **Materialien & Methoden 2.2.2.16**). Die dabei durchgeführten Arbeitsschritte wurden nachfolgend schematisch zusammengefasst (**Abb.5.1**).



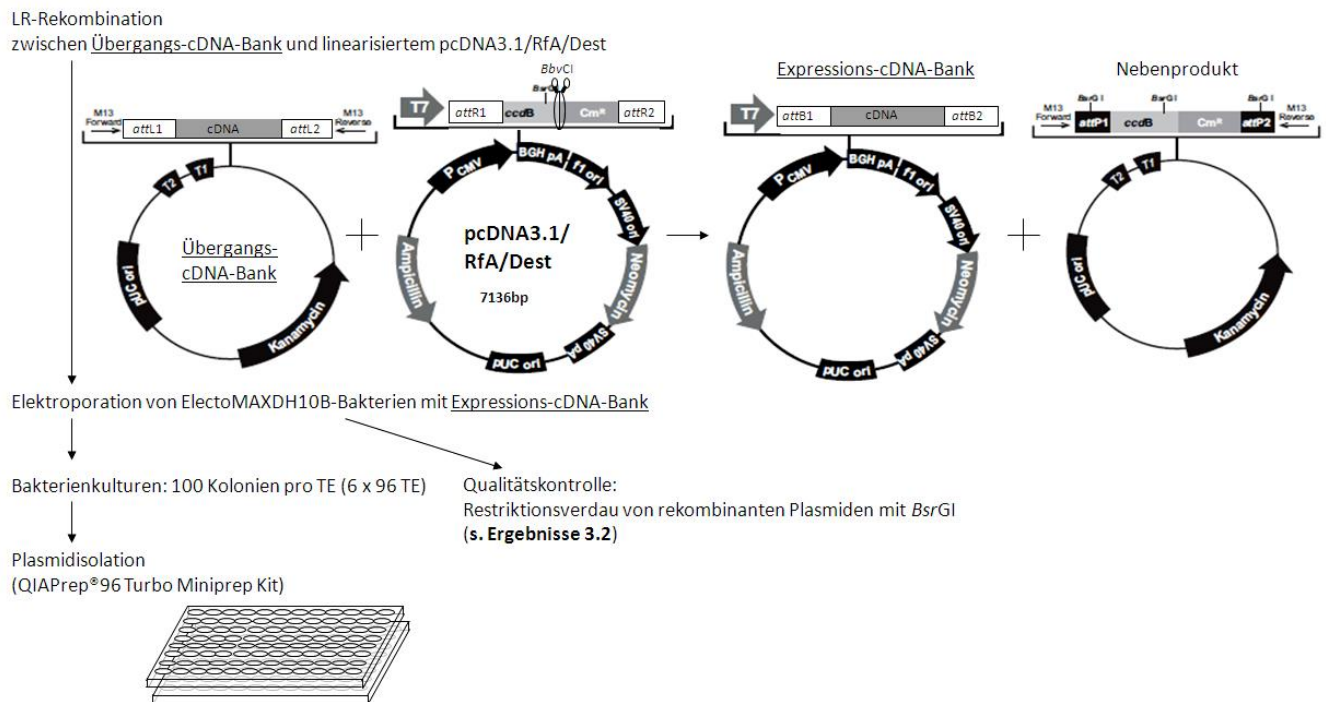


Abb.5.1: Schema zur Konstruktion der cDNA-Bank des AML-Patienten MZ529

In einem Fließschema mit den wichtigsten Arbeitsschritten und -prinzipien zur Konstruktion der MZ529-cDNA-Bank wurden zusätzlich Ergebnisse von Qualitätskontrollen sowie Karten von den verwendeten Plasmiden eingefügt.

Eigenschaften von pDONR222: M13: *forward priming site*; *attP1*, *attP2*: Rekombinationssequenzen; *BsrGI*: Restriktionsschnittstelle; *ccdB*: Toxingen; *Cm^R*: Chloramphenicolresistenzgen; M13: *reverse priming site*; *rrnB T1*, *rrnB T2*: Transkriptionsterminationssequenzen; *pUCori*: Replikationsursprung; Kanamycinresistenzgen (s. Clone Miner™ cDNA Library Construction Kit)

Eigenschaften von pcDNA3.1/RfA/Dest: T7: Promotor / *priming site*; *attR1*, *attR2*: Rekombinationssequenzen; *BsrGI*: Restriktionsschnittstelle; *ccdB*: Toxingen; *Cm^R*: Chloramphenicolresistenzgen; *P_{CMV}*: CMV-Promotor; *BgH pA*: *reverse priming site* / Polyadenylierungssequenz; *f1 ori*: Ursprung einzelsträngiger Replikation; *SV40 ori*: Promotor / *origin*; Neomycinresistenzgen; *SV40 pA*: Polyadenylierungssequenz; *pUC ori*: Replikationsursprung; Ampicillinresistenzgen (s. pcDNA3.1, invitrogen)

5.2 Sequenzvergleich des Klons #428.67.4 aus der cDNA-Bank von AML-Patient MZ529 mit CYBA

Der durch das Expressionsscreening der MZ529-cDNA-Bank mit der miniMLLC 2E8 identifizierte Klon #428.67.4 (s. **Ergebnisse 3.3**) wurde mit Hilfe des T7-Primers, der außerhalb des cDNA-Inserts im Vektor band, sequenziert. Das Sequenzierungsergebnis ist farbig kodiert als Histogramm sowie als Nukleotidfolge wiedergegeben (**Abb.5.2**). Der Vergleich des cDNA-Bank-Klons #428.67.4 mit publizierten Sequenzen von *CYBA* (www.ncbi.nlm.nih.gov) in Form der mRNA (NCBI-Bezeichnung: NM_000101.3) und der kompletten Protein-kodierenden Sequenz (engl. *coding sequence*, CDS) (GenBank BT006861.1) belegt dessen Übereinstimmung mit *CYBA*.

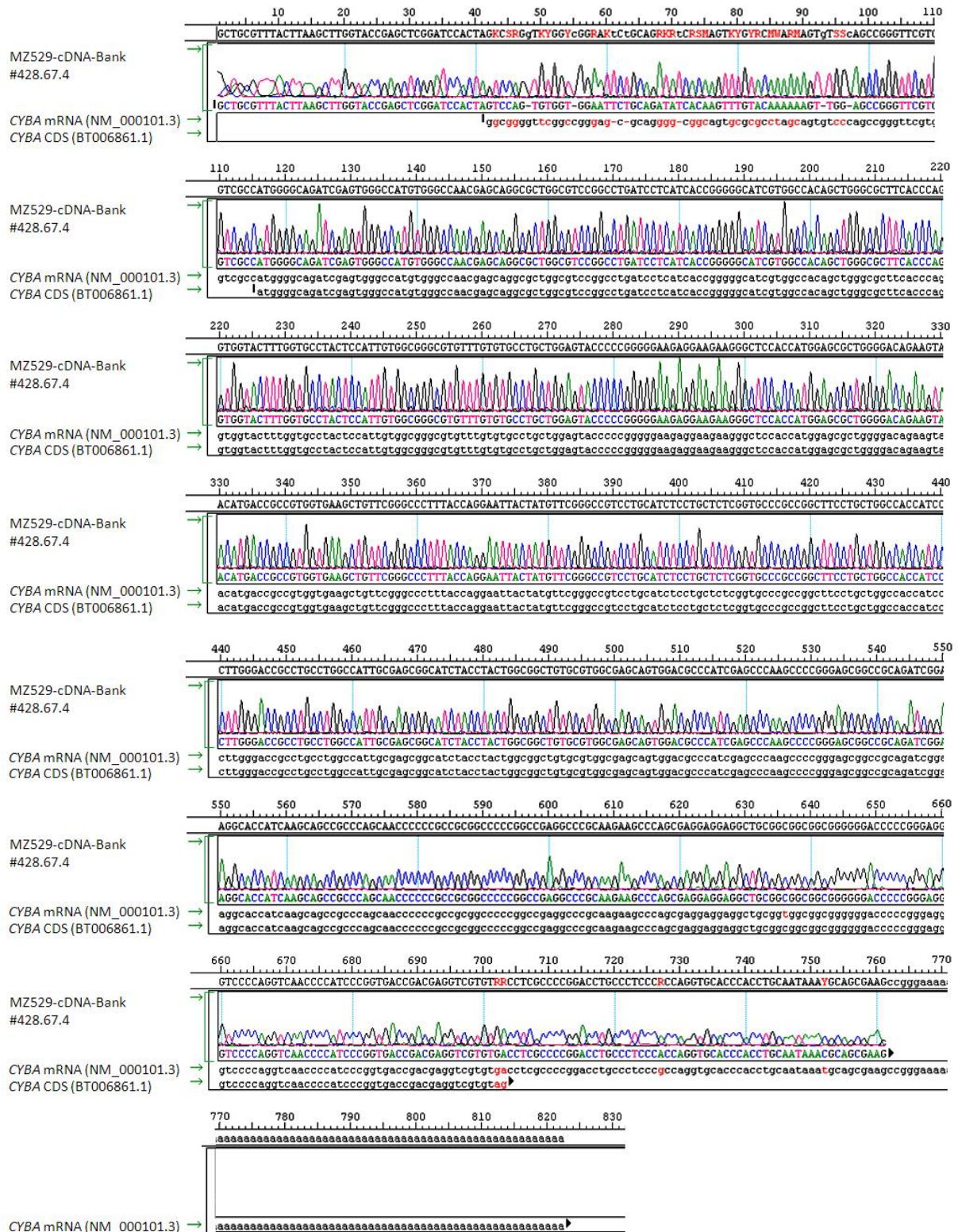


Abb.5.2: Nukleotidsequenzen von dem cDNA-Bank-Klon #428.67.4 und CYBA im Vergleich

Farbkodiert ist die Sequenz des Klons #428.67.4 aus der cDNA-Bank des AML-Patienten MZ529 als Histogramm und Nukleotidfolge dargestellt. Darunter befinden sich die Sequenzen der mRNA von CYBA sowie dessen Protein-kodierende Sequenz (CDS). Unterschiedliche Nukleotide zwischen den Sequenzen sind rot markiert. Unterhalb der Basenpaarnummerierung befindet sich das Vergleichsergebnis der drei Sequenzen.

5.3 Fragmente des MZ529-cDNA-Bank-Klons #428.67.4

Von dem cDNA-Bank-Klon *CYBA* Exon 1-6 (bp1-588) #428.67.4 wurden Fragmente generiert, die sich ausgehend von dem 3'-Ende in ihrer Länge jeweils um ein Exon unterschieden (**Abb.5.3**). Dafür wurden PCRs mit *reverse* Primern durchgeführt, die komplementär zu den Exongrenzen von *CYBA* waren und ein Stoppcodon (TCA) kodierten. Als *sense* Primer wurde jeweils *CYBA.p-15ATG.se* eingesetzt, der die Einhaltung des Leserahmens gewährleistete. Die Fragmente wurden in den Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His TOPO inkloniert, um sie in Kotransfektion mit HLA-B*15:01 auf Erkennung durch die miniMLLC 2E8 zu testen (**s. Ergebnisse 3.4**). Die Sequenzierung der rekombinanten Plasmide mit dem Primer T7 zeigte, dass die Fragmente in dem Vektor richtig orientiert vorlagen und bis auf das Stoppcodon mit der Ursprungssequenz übereinstimmten. Ein Fragment, das Exon 1 bis 5 umfasste, konnte nicht generiert werden.

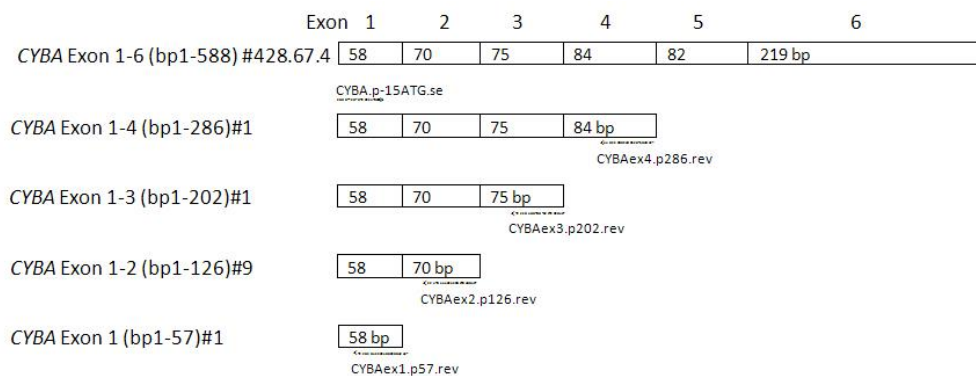


Abb.5.3: Schema der Fragmente des cDNA-Bank-Klons *CYBA* Exon 1-6 (bp1-588) #428.67.4

Neben der Bezeichnung der rekombinanten Plasmide, die die unterschiedlichen Fragmente des cDNA-Klons *CYBA* Exon 1-6 (bp1-588) #428.67.4 kodierten, wurden die Exons, ihre Länge (in bp) sowie die zur Klonierung verwendeten Primer dargestellt.

Das zuvor beschriebene Verfahren ist ebenfalls für die Fragmentierung von Exon 4 des cDNA-Bank-Klons *CYBA* Exon 1-6 (bp1-588) #428.67.4 verwendet worden. Die an ihrem 5'-Ende ein Stoppcodon (CTA) kodierenden *reverse* Primer banden jeweils um ein Codon versetzt innerhalb von Exon 4. Als *sense* Primer wurde stets *CYBA.p-15ATG.se* verwendet. Von dem gesamten Exon sind auf diese Weise 23 Fragmente kloniert und auf Erkennung durch die miniMLLC 2E8 getestet worden (Daten nicht gezeigt). Dargestellt wurden nur die Fragmente, die für die Identifizierung der Antigenregion entscheidend waren (**Abb.5.4; s. Ergebnisse 3.4**). Die getesteten Fragmente waren alle richtig im Expressionsvektor orientiert und wiesen keine Mutationen auf. Ein Fragment, das bis zum 234.bp reichte, konnte nicht generiert werden.

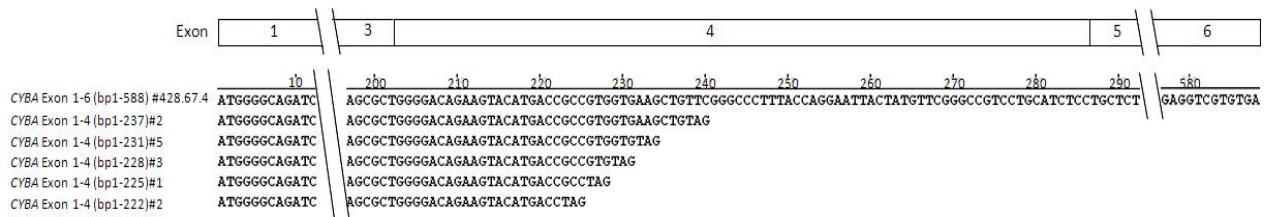


Abb.5.4: Fragmente des 4.Exons von dem cDNA-Bank-Klon CYBA Exon 1-6 (bp1-588) #428.67.4

Die Nukleotidsequenzen der klonierten Fragmente des 4.Exons von dem cDNA-Bank-Klon CYBA Exon 1-6 (bp1-588) #428.67.4 wurden mit ihren unterschiedlichen 3'-Enden in Bezug zu dem cDNA-Bank-Klon zusammengefasst.

5.4 Sequenzvergleich von dem MZ529-cDNA-Bank-Klon #428.67.4 mit der CYBA-kodierenden cDNA von der miniMLLC 2E8 aus *Buffy Coat* 730 und EBV-transformierten B-Zellen des AML-Patienten MZ529

Aus der miniMLLC 2E8 des *Buffy Coat*-Spenders 730 und EBV-transformierten B-Lymphozyten des AML-Patienten MZ529 wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurden deren CYBA-Transkripte in voller Länge durch eine PCR mit den spezifischen Primern CYBA.p-34.se und CYBA.p698.rev amplifiziert, in den Expressionsplasmid pcDNA3.1/V5-His TOPO kloniert und auf Erkennung untersucht (s. **Ergebnisse 3.5**).

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen ergab, dass sich acht getestete cDNA-Klone vom *Buffy Coat*-Spender 730 nur in der 72.Aminosäure zu dem *Insert* des MZ529-cDNA-Bank-Klons #428.67.4 unterschieden (**Abb.5.5**). Dieser Aminosäuretausch zwischen Histidin (H) und Tyrosin (Y) ist zurückzuführen auf eine Cytosin-Thymin-Substitution an Nukleotidposition 242 (rs4673).

		10	20	30	40	50	60	70	80
Buffy Coat 730 CYBA	#1	MGQIEWAMWANEQALASGLILITGGIVATAGRFTQWYFGAYSIVAGVFVCLLEYPRGKRKKGSTMERWGQKHM	TAVV	KLF					
	#3	MGQIEWAMWANEQALASGLILITGGIVATAGRFTQWYFGAYSIVAGVFVCLLEYPRGKRKKGSTMERWGQKHM	TAVV	KLF					
	#4	MGQIEWAMWANEQALASGLILITGGIVATAGRFTAQWYFGAYSIVAGVFVCLLEYPRGKRKKGSTMERWGQKHM	TAVV	KLF					
	#6	MGQIEWAMWANEQALASGLILITGGIVATAGRFTAQWYFGAYSIVAGVFVCLLEYPRGKRKKGSTMERWGQKHM	TAVV	KLF					
	#7	MGQIEWAMWANEQALASGLILITGGIVATAGRFTQWYFGAYSIVAGVFVCLLEYPRGKRKKGSTMERWGQKHM	TAVV	KLF					
	#8	MGQIEWAMWANEQALASGLILITGGIVATAGRFTQWYFGAYSIVAGVFVCLLEYPRGKRKKGSTMERWGQKHM	TAVV	KLF					
#428.67.4	#11	MGQIEWAMWANEQALASGLILITGGIVATAGRFTQWYFGAYSIVAGVFVCLLEYPRGKRKKGSTMERWGQKHM	TAVV	KLF					
	#15	MGQIEWAMWANEQALASGLILITGGIVATAGRFTQWYFGAYSIVAGVFVCLLEYPRGKRKKGSTMERWGQKHM	TAVV	KLF					
		90	100	110	120	130	140	150	160
Buffy Coat 730 CYBA	#1	GPFTRNYVRAVLHLLLSVPAGFLLATILGTACLAIASGIYLLAAVRGEQWTPIEPKPRERQIGGTIKQPPSNPPRPP							
	#3	GPFTRNYVRAVLHLLLSVPAGFLLATILGTACLAIASGIYLLAAVRGEQWTPIEPKPRERQIGGTIKQPPSNPPRPP							
	#4	GPFTRNYVRAVLHLLLSVPAGFLLATILGTACLAIASGIYLLAAVRGEQWTPIEPKPRERQIGGTIKQPPSQPPAASL							
	#6	GPFTRNYVRAVLHLLLSVPAGFLLATILGTACLAIASGIYLLAAVRGEQWTPIEPKPRERQIGGTIKQPPSNPPRPP							
	#7	GPFTRNYVRAVLHLLLSVPAGFLLATILGTACLAIASGIYLLAAVRGEQWTPIEPKPRERQIGGTIKQPPSNPPRPP							
	#8	GPFTRNYVRAVLHLLLSVPAGFLLATILGTACLAIASGIYLLAAVRGEQWTPIEPKPRERQIGGTIKQPPSNPPRPP							
#428.67.4	#11	GPFTRNYVRAVLHLLLSVPAGFLLATILGTACLAIASGIYLLAAVRGEQWTPIEPKPRERQIGGTIKQPPSNPPRPP							
	#15	GPFTRNYVRAVLHLLLSVPAGFLLATILGTACLAIASGIYLLAAVRGEQWTPIEPKPRERQIGGTIKQPPSNPPRPP							
		170	180	190					
Buffy Coat 730 CYBA	#1	AEARKKPSEEEAAVAAGGPPGGPQVNP	PVTDEVV.						
	#3	AEARKKPSEEEAAVAAGGPPGGPQVNP	PVTDEVV.						
	#4	RSMPARI	PARRRLRRRRGGPPGGPQVNLIR.						
	#6	AEARKKPSEEEAAVAAGGPPGGPQVNP	PVTDEVV.						
	#7	AEARKKPSEEEAAVAAGGPPGGPQVNP	PVTDEVV.						
	#8	AEARKKPSEEEAAVAAGGPPGGPQVNP	PVTDEVV.						
#428.67.4	#11	AEARKKPSEEEAAVAAGGPPSGGLQVNL	ISVTDEVV.						
	#15	AEARKKPSEEEAAVAAGGPPGGPQVNP	PVTDEVV.						

Abb.5.5: Vergleich der Aminosäuresequenz von klonierten CYBA-Transkripten des Buffy Coat-Spenders 730 mit der des MZ529-cDNA-Bank-Klons #428.67.4

Grün umrandet ist die potenzielle Peptidregion des CYBA-Antigens und rot der einzige Aminosäureunterschied zwischen den CYBA-Transkripten des Buffy Coat-Spenders 730 und dem cDNA-Bank-Klon #428.67.4.

Der Vergleich der Aminosäuresequenz unterschiedlicher cDNA-Klone, die von den CYBA-Transkripten des AML-Patienten MZ529 generiert wurden, spiegelt die Expression beider CYBA-242-Allele wieder (**Abb.5.6**). Es fanden sich neben Klonen, die mit dem CYBA-242T-Allel als 72.Aminosäure für Tyrosin (Y) kodierten, auch solche, die mit dem CYBA-242C-Allel an homologer Stelle für Histidin (H) kodierten.

		10	20	30	40	50	60	70	80
MZ529-EBV-B CYBA	#1	MGQIEWAMWANEQALASGLILITGGIVATAGRFTQWYFGAYSIVAGVFVCLLEYPRGKRKKGSTMEFWGQKHM TAVV KLF							
	#2	MGQIEWAMWANEQALASGLILITGGIVATAGRFTQWYFGAYSIVAGVFVCLLEYPRGKRKKGSTMEFWGQKHM TAVV KLF							
	#3	MGQIEWAMWANEQALASGLILITGGIVATAGRFTQWYFGAYSIVAGVFVCLLEYPRGKRKKGSTMEFWGQKYM TAVV KLF							
	#7	MGQIEWAMWANEQALASGLILITGGIVATAGRFTQWYFGAYSIVAGVFVCLLEYPRGKRKKGSTMEFWGQKYM TAVV KLF							
	#8	MGQIEWAMWANEQALASGLILITGGIVATAGRFTQWYFGAYSIVAGVFVCLLEYPRGKRKKGSTMEFWGQKHM TAVV KLF							
	#9	MGQIEWAMWANEQALASGLILITGGIVATAGRFTQWYFGAYSIVAGVFVCLLEYPRGKRKKGSTMEFWGQKYM TAVV KLF							
	#11	MGQIEWAMWANEQALASGLILITGGIVATAGRFTQWYFGAYSIVAGVFVCLLEYPRGKRKKGSTMEFWGQKYM TAVV KLF							
	#13	MGQIEWAMWANEQALASGLILITGGIVATAGRFTQWYFGAYSIVAGVFVCLLEYPRGKRKKGSTMEFWGQKYM TAVV KLF							
	#428.67.4	MGQIEWAMWANEQALASGLILITGGIVATAGRFTQWYFGAYSIVAGVFVCLLEYPRGKRKKGSTMEFWGQKYM TAVV KLF							
		90	100	110	120	130	140	150	160
MZ529-EBV-B CYBA	#1	GPFTRNYVRAVLHLLLSVPAGFLLATILGTACLAIASGIYLLAAVRGEQWTPIEPKPRERQIGGTIKQPPSNPPPRPP							
	#2	GPFTRNYVRAVLHLLLSVPAGFLLATILGTACLAIASGIYLLAAVRGEQWTPIEPKPRERQIGGTIKQPPSNPPPRPP							
	#3	GPFTRNYVRAVLHLLLSVPAGFLLATILGTACLAIANGIYLLAAVRGEQWTPIEPKPRERQIGGTIKQPPSNPPPRPP							
	#7	GPFTRNYVRAVLHLLLSVPAGFLLATILGTACLAIASGIYLLAAVRGEQWTPIEPKPRERQIGGTIKQPPSNPPPRPP							
	#8	GPFTRNYVRAVLHLLLSVPAGFLLATILGTACLAIASGIYLLAAVRGEQWTPIEPKPRERQIGGTIKQPPSNPPPRPP							
	#9	GPFTRNYVRAVLHLLLSVPAGFLLATILGTACLAIANGIYLLAAVRGEQWTPIEPKPRERQIGGTIKQPPSNPPPRPP							
	#11	GPFTRNYVRAVLHLLLSVPAGFLLATILGTACLAIASGIYLLAAVRGEQWTPIEPKPRERQIGGTIKQPPSNPPPRPP							
	#13	GPFTRNYVRAVLHLLLSVPAGFLLATILGTACLAIANGIYLLAAVRGEQWTPIEPKPRERQIGGTIKQPPSNPPPRPP							
	#428.67.4	GPFTRNYVRAVLHLLLSVPAGFLLATILGTACLAIASGIYLLAAVRGEQWTPIEPKPRERQIGGTIKQPPSNPPPRPP							
		170	180	190	200	210	220	230	
MZ529-EBV-B CYBA	#1	AEARKKPSEEEAAVAAGPPGGPQVNP I PVTDEVVWPRPGPALPPGAPT CNKCEARERVRRAILQISSVVAARV.							
	#2	AEARKKPSEEEAAVAAGPPGGPQVNP I PVTDEVV.							
	#3	AEARKKPSEEEAAAAAGPPGGPQVNP I PVTDEVV.							
	#7	AEARKKPSEEEAAAAAGPPGGPQVNP I PVTDEVV.							
	#8	AEARKKPSEEEAAVAAGPPGGPQVNP I PVTDEVVWPRPGPALPPGAPT CNKCEAGSA.							
	#9	AEARKKPSEEEAAAAAGPPGGPQVNP I PVTDEVV.							
	#11	AEARKKPSEEEAAAAAGPPGGPQVNP I PVTDEVV.							
	#13	AEARKKPSEEEAAAAAGPPGGPQVNP I PVTDEVV.							
	#428.67.4	AEARKKPSEEEAAAAAGPPGGPQVNP I PVTDEVV.							

Abb.5.6: Vergleich der Aminosäuresequenz von klonierten CYBA-Transkripten des AML-Patienten MZ529 mit der des MZ529-cDNA-Bank-Klons #428.67.4

Grün umrandet ist die potenzielle Peptidregion des CYBA-Antigens und rot der einzige Aminosäureunterschied zwischen einzelnen CYBA-Transkripten des AML-Patienten MZ529 und dem cDNA-Bank-Klon #428.67.4.

5.5 Sequenzvergleich von HLA-B15-Allelen und HLA-A*02:01

Zusammengefasst wurden die Nukleotidsequenzen der HLA-Moleküle HLA-B*15:01, -B*15:03, -B*15:04, -B*15:07 und -B*15:17 sowie HLA-A*02:01 (www.ebi.ac.uk/imgt/hla/allele.html, Robinson *et al.*, 2011 & 2000) (**Abb.5.7**), die in Kotransfektion mit dem cDNA-Bank-Klon CYBA Exon 1-6 (bp-1588) #428.67.4 auf Erkennung durch CYBA-72Y-spezifische miniMLLCs überprüft wurden (**s. Ergebnisse 3.9**). Dabei wurden zum einen die Basen rot hervorgehoben, die sich zwischen den Sequenzen der HLA-Moleküle unterscheiden, und zum anderen die drei hypervariablen Regionen (HVR I - III) markiert, die für eine effektive Antigenbindung verantwortlich sind.

10 20 30 40 50 60 70 80 90
 ATGCGGGTACGGCGCCCGAACCGTCCTCCTGCTGCTCTCGGGAGCCCTGGCCCTGACCGAGACCTGGGCCGCTCCACTCCATGAGG
 HLA-B*15:01 → ATGCGGGTACGGCGCCCGAACCGTCCTCCTGCTGCTCTCGGGAGCCCTGGCCCTGACCGAGACCTGGGCCGCTCCACTCCATGAGG
 HLA-B*15:03 → ATGCGGGTACGGCGCCCGAACCGTCCTCCTGCTGCTCTCGGGAGCCCTGGCCCTGACCGAGACCTGGGCCGCTCCACTCCATGAGG
 HLA-B*15:04 → ATGCGGGTACGGCGCCCGAACCGTCCTCCTGCTGCTCTCGGGAGCCCTGGCCCTGACCGAGACCTGGGCCGCTCCACTCCATGAGG
 HLA-B*15:07 → ATGCGGGTACGGCGCCCGAACCGTCCTCCTGCTGCTCTCGGGAGCCCTGGCCCTGACCGAGACCTGGGCCGCTCCACTCCATGAGG
 HLA-A*02:01 → ATGGCCGTCATGGCGCCCGAACCGTCGCTCCTGCTACTCTCGGGGGTCTGGCCCTGACCGAGACCTGGGCCGCTCTCACTCCATGAGG

100 110 120 130 140 150 160 170 180
 TATTTCTACCCGCCATGTCCCGGCCCGGGCCGCGGGGAGCCCGCTTCATCGCAGTGGGTACGTGGACGACACCCAGTTCGTGAGGTTTC
 HLA-B*15:01 → TATTTCTACCCGCCATGTCCCGGCCCGGGCCGCGGGGAGCCCGCTTCATCGCAGTGGGTACGTGGACGACACCCAGTTCGTGAGGTTTC
 HLA-B*15:03 → TATTTCTACCCGCCATGTCCCGGCCCGGGCCGCGGGGAGCCCGCTTCATCGCAGTGGGTACGTGGACGACACCCAGTTCGTGAGGTTTC
 HLA-B*15:04 → TATTTCTACCCGCCATGTCCCGGCCCGGGCCGCGGGGAGCCCGCTTCATCGCAGTGGGTACGTGGACGACACCCAGTTCGTGAGGTTTC
 HLA-B*15:07 → TATTTCTACCCGCCATGTCCCGGCCCGGGCCGCGGGGAGCCCGCTTCATCGCAGTGGGTACGTGGACGACACCCAGTTCGTGAGGTTTC
 HLA-B*15:17 → TATTTCTACCCGCCATGTCCCGGCCCGGGCCGCGGGGAGCCCGCTTCATCGCAGTGGGTACGTGGACGACACCCAGTTCGTGAGGTTTC
 HLA-A*02:01 → TATTTCTT**CACATCCG**TGTCCCGGCCCGGGCCGCGGGGAGCCCGCTTCATCGCAGTGGGTACGTGGACGACAC**CCAGTTCGTGCGGGTTC**

190 200 210 220 230 240 250 260 270
 GACAGCGACGCGCGAGTCCGAG-GATGGCGCCCGGGCCCATGGATAGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGACCGGGAGACACAGAT
 HLA-B*15:01 → GACAGCGACGCGCGAGTCCGAG-GATGGCGCCCGGGCCCATGGATAGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGACCGGGAGACACAGAT
 HLA-B*15:03 → GACAGCGACGCGCGAGTCCGAG-GAAGCCGCGGGCGCCGTGGATAGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGACCGGGAGACACAGAT
 HLA-B*15:04 → GACAGCGACGCGCGAGTCCGAG-GATGGCGCCCGGGCCCATGGATAGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGACCGGGAGACACAGAT
 HLA-B*15:07 → GACAGCGACGCGCGAGTCCGAG-GATGGCGCCCGGGCCCATGGATAGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGACCGGGAGACACAGAT
 HLA-B*15:17 → GACAGCGACGCGCGAGTCCGAG-GATGGCGCCCGGGCCCATGGATAGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGACCGGGAGACAC**GGAA**
 HLA-A*02:01 → GACAGCGACGCGCGAG**CCAGAG**-GAT**GGAGCCGCGGGCGCCG**TGGATAGAGCAGGAGGG**TCCGGAGTATTGGGACCGGGAGACACGGAA**

HVR I
 280 290 300 310 320 330 340 350 360
 CTCCAAGACCAACACACAGACTTACCAGAGAGCCTGGCGAACCTGCG---CG----GCTACTACAACAGAGCGAGGCCGGGTCTCA
 HLA-B*15:01 → CTCCAAGACCAACACACAGACTTACCAGAGAGCCTGGCGAACCTGCG---CG----GCTACTACAACAGAGCGAGGCCGGGTCTCA
 HLA-B*15:03 → CTCCAAGACCAACACACAGACTTACCAGAGAGCCTGGCGAACCTGCG---CG----GCTACTACAACAGAGCGAGGCCGGGTCTCA
 HLA-B*15:04 → CTCCAAGACCAACACACAGACTTACCAGAGAGCCTGGCGAACCTGCG---CG----GCTACTACAACAGAGCGAGGCCGGGTCTCA
 HLA-B*15:07 → CTCCAAGACCAACACACAGACTTACCAGAGAGCCTGGCGAACCTGCG---CG----GCTACTACAACAGAGCGAGGCCGGGTCTCA
 HLA-B*15:17 → **CATGAAGCCCTCCGCGCAGACTTACCAGAGA**-----ACCTGCG**GATCGCGCTCCG**CTACTACAACAGAGCGAGGCCGGGTCTCA
 HLA-A*02:01 → **AGTGAAAGCCCCTCACAGACTCACCGAGTGGACCTGGGA**CCCTGCG---CG----GCTACTACAACAGAGCGAGGCCGG**TCTCA**

HVR II
 370 380 390 400 410 420 430 440 450
 CACCCCTCCAGAGGATGTACGGCTGCGAGCTGGGGCCGGACGGGCGCTCCTCCGCGGCGATGACAGTCCGCTACGACGGCAAGGATTA
 HLA-B*15:01 → CACCCCTCCAGAGGATGTACGGCTGCGAGCTGGGGCCGGACGGGCGCTCCTCCGCGGCGATGACAGTCCGCTACGACGGCAAGGATTA
 HLA-B*15:03 → CACCCCTCCAGAGGATGTACGGCTGCGAGCTGGGGCCGGACGGGCGCTCCTCCGCGGCGATGACAGTCCGCTACGACGGCAAGGATTA
 HLA-B*15:04 → **CACTTGGCAGACGATGATGGCTGCGAGCTGGGGCCGGACGGGCGCTCCTCCGCGGCGATGACAGTCCGCTACGACGGCAAGGATTA**
 HLA-B*15:07 → CACCCCTCCAGAG**GCATG**TACGGCTGCGAGCTGGGGCCGGACGGGCGCTCCTCCGCGGCGATGACAGTCCGCTACGACGGCAAGGATTA
 HLA-B*15:17 → CACCCCTCCAGAGGATGTACGGCTGCGAGCTGGGGCCGGACGGGCGCTCCTCCGCGG**GTACC**CCAGAGCGCTACGACGGCAAGGATTA
 HLA-A*02:01 → **CACCGTCCAGAGGATGTATGGCTGCGAGCTGGGGTCCGACTGGCGCT**TCTCCGCGG**GTACC**CCAGAT**ACGCT**ACGACGGCAAGGATTA

HVR III
 460 470 480 490 500 510 520 530 540
 CATCGCCCTGAACGAGGACCTGAGCTCCTGGACCCTGGCGGGACCGGACCGCGGCTCAGATCACCAGCGCAAGTGGGAGGGCGGCCCGTGAGGGC
 HLA-B*15:01 → CATCGCCCTGAACGAGGACCTGAGCTCCTGGACCCTGGCGGGACCGGACCGCGGCTCAGATCACCAGCGCAAGTGGGAGGGCGGCCCGTGAGGGC
 HLA-B*15:03 → CATCGCCCTGAACGAGGACCTGAGCTCCTGGACCCTGGCGGGACCGGACCGCGGCTCAGATCACCAGCGCAAGTGGGAGGGCGGCCCGTGAGGGC
 HLA-B*15:04 → CATCGCCCTGAACGAGGACCTGAGCTCCTGGACCCTGGCGGGACCGGACCGCGGCTCAGATCACCAGCGCAAGTGGGAGGGCGGCCCGTGAGGGC
 HLA-B*15:07 → CATCGCCCTGAACGAGGACCTGAGCTCCTGGACCCTGGCGGGACCGGACCGCGGCTCAGATCACCAGCGCAAGTGGGAGGGCGGCCCGTGAGGGC
 HLA-B*15:17 → CATCGCCCTGAACGAGGACCTGAGCTCCTGGACCCTGGCGGGACCGGACCGCGGCTCAGATCACCAGCGCAAGTGGGAGGGCGGCCCGTGAGGGC
 HLA-A*02:01 → CATCGCCCT**GAAGAGGACCTGCGCTT**TGGACCCTGGCGGGACCGGACCGCGGCT**AGACTCAGAC**CACC**AGCAAGTGGGAGGGCGGCCCTAT**TGGC

550 560 570 580 590 600 610 620 630
 GGAGCAGTGAGAGGCTACCTGGAGGGCCGTGCGTGGAGTGCTCCGAGATACCTGGAGAACGGGAGAGAGCGTGACGCGCGCGGA
 HLA-B*15:01 → GGAGCAGTGAGAGGCTACCTGGAGGGCCGTGCGTGGAGTGCTCCGAGATACCTGGAGAACGGGAGAGAGCGTGACGCGCGCGGA
 HLA-B*15:03 → GGAGCAG**CTG**AGAGGCTACCTGGAGGGCCGTGCGTGGAGTGCTCCGAGATACCTGGAGAACGGGAGAGAGCGTGACGCGCGCGGA
 HLA-B*15:04 → GGAGCAGTGAGAGGCTACCTGGAGGGCCGTGCGTGGAGTGCTCCGAGATACCTGGAGAACGGGAGAGAGCGTGACGCGCGCGGA
 HLA-B*15:07 → GGAGCAG**TG**AGAGGCTACCTGGAGGGCCGTGCGTGGAGTGCTCCGAGATACCTGGAGAACGGGAGAGAGCGTGACGCGCGCGGA
 HLA-B*15:17 → GGAGCAG**CTG**AGAGGCTACCTGGAGGGCCGTGCGTGGAGTGCTCCGAGATACCTGGAGAACGGGAGAGAGCGTGACGCGCGCGGA
 HLA-A*02:01 → GGAGCAG**TG**AGAGGCTACCTGGAGGGCC**AGCTGCGTGGAGTGCTCCGAGATACCTGGAGAACGGGAGAGAGCGTGACGCGCGCGGA**

640 650 660 670 680 690 700 710 720
 C-CCCCAAAGACACATGTGACCCACCACCCATCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCTGCGGAGA
 HLA-B*15:01 → C-CCCCAAAGACACATGTGACCCACCACCCATCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCTGCGGAGA
 HLA-B*15:03 → C-CCCCAAAGACACATGTGACCCACCACCCATCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCTGCGGAGA
 HLA-B*15:04 → C-CCCCAAAGACACATGTGACCCACCACCCATCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCTGCGGAGA
 HLA-B*15:07 → C-CCCCAAAGACACATGTGACCCACCACCCATCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCTGCGGAGA
 HLA-B*15:17 → C-CCCCAAAGACACATGTGACCCACCACCCATCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCTGCGGAGA
 HLA-A*02:01 → **CGCCCCAAA-ACGCATATGACTCACACGCTGT**CTCTGACCAT**GAAGCC**ACCCTGAGGTGCTGGGCCCT**GAGCTTCTACCTGCGGAGA**

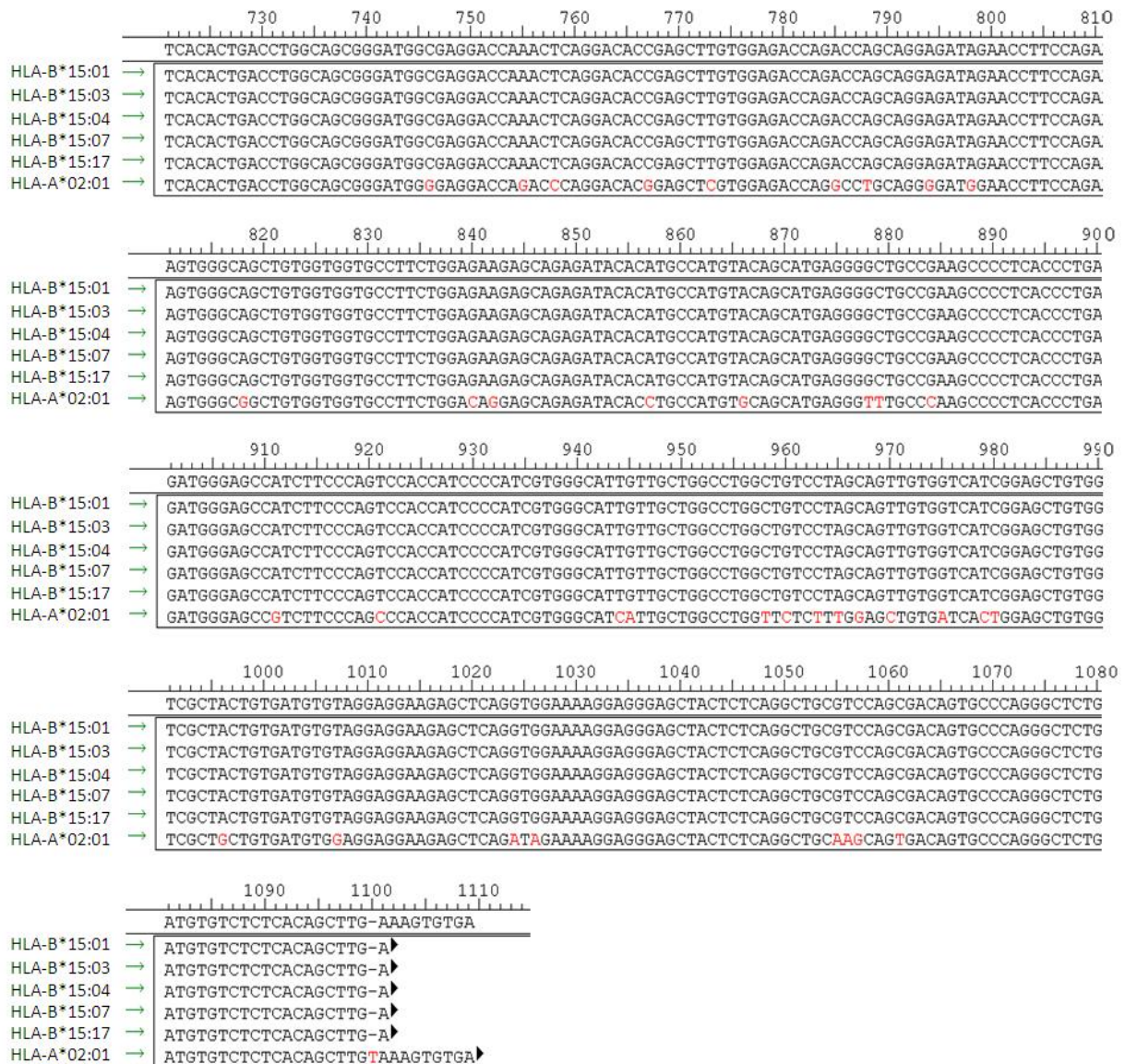


Abb.5.7: Nukleotidsequenzen von HLA-B*15:01, -B*15:03, -B*15:04, -B*15:07 und -B*15:17 sowie HLA-A*02:01

Nukleotidunterschiede zwischen den HLA-Sequenzen wurden rot markiert und die hypervariablen Regionen (HVR I - III) hervorgehoben.

5.6 Bestimmung von CYBA-242-Genotypen durch Sequenzierung und Schmelzkurvenanalyse

Von den Zelllinien 293T und COS-7 wurde die genomische DNA isoliert und CYBA um das polymorphe Nukleotid 242 mit den Primern CYBAex3.p168.se und CYBAex4.p286.rev amplifiziert. Bei der Sequenzierung zeigte sich, dass 293T-Zellen homozygot für das CYBA-242C- und COS-7-Zellen für das CYBA-242T-Allel waren (Abb.5.8).

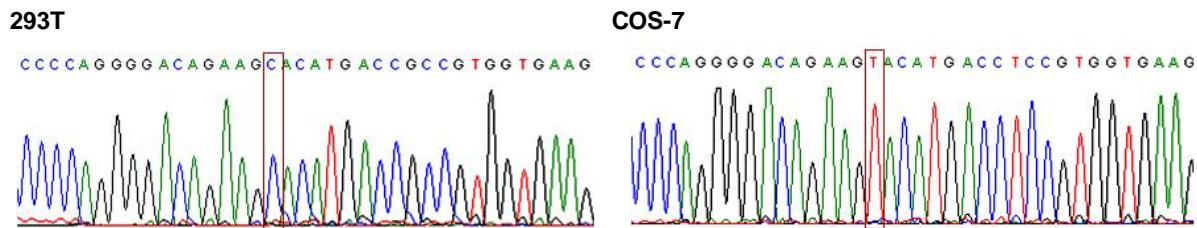


Abb.5.8: CYBA-242-Genotypisierung von 293T- und COS-7-Zellen

Ein Genabschnitt von *CYBA* wurde bei 293T- bzw. COS-7-Zellen mit den Primern CYBAex3.p168.se und CYBAex4.p286.rev amplifiziert und anschließend sequenziert. In den *CYBA*-Sequenzen wurde das polymorphe Nukleotid 242 rot umrandet.

Um die mittels RFLP-Analysen durchgeführten *CYBA-242*-Genotypisierungen (s. **Ergebnisse 3.10**) zu überprüfen, wurden zur Charakterisierung des SNP an der genomischen DNA von 23 Proben Schmelzkurvenanalysen im LightCycler[®] 480 durchgeführt. Dafür wurden die Primer CYBAint3.p4081.se und CYBAex4.p283.rev sowie das LightCycler[®] 480 High Resolution Melting Kit, das einen in doppelsträngige DNA interkalierenden Farbstoff enthält, verwendet. Am Ende der Amplifikation wurden Schmelzkurven von den PCR-Produkten generiert, die sich abhängig von ihrer DNA-Sequenz in ihrer Form unterschieden. Vor allem das Schmelzverhalten von heterozygoten Sequenzen war verschieden zu dem homozygoter Produkte. Eine zuvor sequenzierte Probe jedes *CYBA-242*-Genotyps wurde mitgeführt, so dass durch den Vergleich der Schmelzkurven die unbekanntes Proben automatisch den drei Genotypen zugeordnet wurden (**Abb.5.9**). Den getesteten Proben wurden durch dieses Verfahren die gleichen Genotypen zugeteilt wie durch die RFLP-Analyse mit *RsaI*.

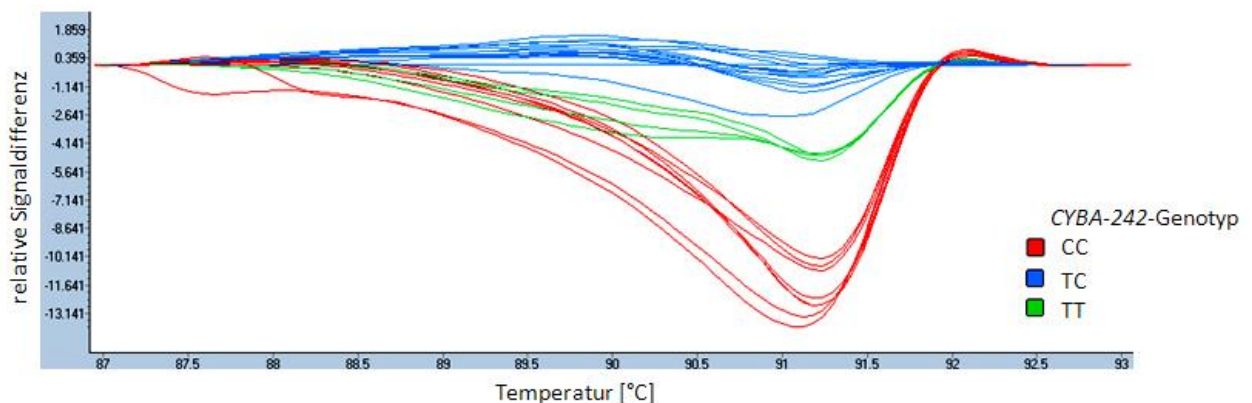


Abb.5.9: Schmelzkurvenanalyse von CYBA-242 in genomischen DNA-Proben

Nach einer *CYBA*-spezifischen PCR wurden die Produkte anhand ihres durch Schmelzkurvenanalyse entstandenen Profils automatisch den *CYBA-242*-Genotypen zugeordnet.

5.7 Verteilung von *CYBA-242*-Genotypen und -Allelfrequenzen bei Patienten mit unterschiedlichen malignen Erkrankungen

Die mittels der RFLP-Analyse für *CYBA-242* genotypisierten Patienten wurden nach ihren Erkrankungen gruppiert und mit der Verteilung ihrer Genotypen sowie Allelfrequenzen für *CYBA-242* zusammengefasst (**Tab.5.1**).

Patienten mit	Anzahl	CYBA-242-Genotyp			CYBA-242-Allelfrequenz	
		CC (%)	TC (%)	TT (%)	C	T
akute myeloische Leukämie (AML)	99	40 (40,4)	53 (53,5)	6 (6,1)	0,67	0,33
chronische myeloische Leukämie (CML)	50	19 (38,0)	28 (56,0)	3 (6,0)	0,66	0,34
akute lymphatische Leukämie (ALL)	25	9 (36,0)	16 (64,0)	0 (0,0)	0,68	0,32
chronische lymphatische Leukämie (CLL)	13	8 (61,5)	5 (38,5)	0 (0,0)	0,81	0,19
Myelodysplastisches Syndrom	3	0 (0,0)	2 (66,7)	1 (33,3)	0,33	0,67
paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie	3	1 (33,3)	2 (66,7)	0 (0,0)	0,67	0,33
aplastische Anämie	3	2 (66,7)	1 (33,3)	0 (0,0)	0,83	0,17
Non-Hodgkin-Lymphom inkl. Multiplem Myelom	14	3 (21,4)	9 (64,3)	2 (14,3)	0,54	0,46
Morbus Hodgkin	2	1 (50,0)	1 (50,0)	0 (0,0)	0,75	0,25
Osteomyelofibrose	2	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (100,0)	0,00	1,00
Melanom	12	4 (33,3)	6 (50,0)	2 (16,7)	0,58	0,42
großzelliges Lungenkarzinom	2	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1,00	0,00
Nierenzellkarzinom	16	12 (75,0)	4 (25,0)	0 (0,0)	0,88	0,13
Pankreaskarzinom	2	2 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1,00	0,00
Kolorektalkarzinom	2	0 (0,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	0,50	0,50
unbekannte Erkrankung	16	6 (37,5)	7 (43,8)	3 (18,8)	0,59	0,41

Tabelle 5.1: Verteilung der CYBA-242-Genotypen und -Allelfrequenzen bei Patienten mit unterschiedlichen malignen Erkrankungen

5.8 Vorhersagen zur Bindung der identifizierten CYBA-Peptide an unterschiedliche HLA-Moleküle mittels Peptid-HLA-Bindungsalgorithmen

Die potenzielle Bindung der identifizierten CYBA-Peptide an HLA-Moleküle ist mit Hilfe von drei Algorithmen (www.syfpeithi.de, www-bimas.cit.nih.gov, www.cbs.dtu.dk) analysiert worden. Bei www.syfpeithi.de ist die Grundlage zur Bewertung der Bindungswahrscheinlichkeit eines Peptids an HLA-Moleküle ein Vergleich der einzelnen Aminosäuren eines Peptids mit deren Beteiligung an bekannte Bindungen an entsprechende HLA-Moleküle. Der maximale Bewertungswert pro Aminosäure liegt bei 10, d.h. je höher der Gesamtwert, desto höher die Wahrscheinlichkeit einer Peptidbindung an ein HLA-Molekül (Rammensee *et al.*, 1999). Da bei www-bimas.cit.nih.gov die Halbwertszeit der Dissoziation eines Peptids von einem HLA-Molekül kalkuliert wird, entsprechen hohe Werte einer hohen Bindungswahrscheinlichkeit (Parker *et al.*, 1994). Dagegen wird bei www.cbs.dtu.dk die Affinität zwischen Peptid und HLA-Molekül vorhergesagt, so dass niedrige Werte eine hohe Bindungswahrscheinlichkeit wiedergeben. Bei Werten unter 500 nM wird von einer schwachen Bindung (WB) und bei unter 50 nM von einer starken Bindung (SB) ausgegangen (Larsen *et al.*, 2010).

In **Tabelle 5.2** sind die HLA-Moleküle zusammengefasst, die laut der Peptid-HLA-Bindungs-Datenbanken die höchsten Bindungswahrscheinlichkeiten für mindestens eines der vier CYBA-Peptide aufweisen.

Peptid	HLA-Molekül	Datenbankvorhersage für Peptid-HLA-Bindung		
		www.syfpeithi.de	www-bimas.cit.nih.gov	www.cbs.dtu.dk [nM]
CYBA-72Y ₆₉₋₇₇ (GQKYMTAVV)	A*02:01	13	0.101	8208
	A*02:03	k.A.	k.A.	56 (WB)
	B*07:02	9	k.A.	23242
	B8	12	0.180	k.A.
	B*15:01 (B62)	13	13.200	102 (WB)
	B*15:03	k.A.	k.A.	321 (WB)
	B*27:05	5	60.000	12243
	B*39:02	14	0.360	k.A.
	B*51:01	12	2.000	28582
	B*51:02	k.A.	1.100	k.A.
	B*51:03	k.A.	2.420	k.A.
B*52:01	k.A.	165.000	k.A.	
CYBA-72H ₆₉₋₇₇ (GQKHMTAVV)	A*02:01	14	0.101	8648
	A*02:03	k.A.	k.A.	21 (SB)
	B*07:02	9	k.A.	23711
	B8	11	0.180	k.A.
	B*15:01 (B62)	13	13.200	107 (WB)
	B*15:03	k.A.	k.A.	302 (WB)
	B*27:05	5	60.000	11814
	B*39:02	14	0.360	k.A.
	B*51:01	12	2.000	28324
	B*51:02	k.A.	1.210	k.A.
	B*51:03	k.A.	2.420	k.A.
B*52:01	k.A.	165.000	k.A.	
CYBA-72Y ₆₈₋₇₇ (WGQKYMTAVV)	A*02:01	12	0.856	24336
	A*02:03	k.A.	k.A.	12044
	B*07:02	10	k.A.	33527
	B8	k.A.	0.006	k.A.
	B*15:01 (B62)	1	0.110	6496
	B*15:03	k.A.	k.A.	8121
	B*27:05	k.A.	1.500	28289
	B*39:02	k.A.	0.120	k.A.
	B*51:01	k.A.	44.000	29361
	B*51:02	k.A.	48.400	k.A.
	B*51:03	k.A.	48.400	k.A.
B*52:01	k.A.	99.000	k.A.	
CYBA-72H ₆₈₋₇₇ (WGQKHMTAVV)	A*02:01	12	0.856	27768
	A*02:03	k.A.	k.A.	13055
	B*07:02	10	k.A.	33807
	B8	k.A.	0.006	k.A.
	B*15:01 (B62)	1	0.110	5818
	B*15:03	k.A.	k.A.	10834
	B*27:05	k.A.	1.500	31025
	B*39:02	k.A.	0.120	k.A.
	B*51:01	k.A.	44.000	29904
	B*51:02	k.A.	48.400	k.A.
	B*51:03	k.A.	48.400	k.A.
B*52:01	k.A.	99.000	k.A.	

Tabelle 5.2: Peptid-HLA-Bindungswahrscheinlichkeiten für CYBA-72Y / H₆₉₋₇₇ und CYBA-72Y / H₆₈₋₇₇ an unterschiedliche HLA-Moleküle laut www.syfpeithi.de, www-bimas.cit.nih.gov bzw. www.cbs.dtu.dk

Bei den vier CYBA-Peptiden wurden jeweils die Werte der Wahrscheinlichkeit für die Bindung an HLA-B*15:01 hervorgehoben (k.A.: keine Angabe, da HLA-Molekül in Datenbank nicht enthalten; SB: starker Bindungspartner; WB: schwacher Bindungspartner).

5.9 Vorhersagen zur Bindung von unterschiedlichen CYBA-Peptiden mit der polymorphen 72.Aminosäure an HLA-Moleküle mittels Peptid-HLA-Bindungsalgorithmen

Die zuvor bereits erklärten Algorithmen der drei Datenbanken www.syfpeithi.de, www-bimas.cit.nih.gov und www.cbs.dtu.dk zur Vorhersage der Bindungswahrscheinlichkeit von Peptiden an HLA-Molekülen (s. **Anhang 5.8**) wurden angewendet, um diese für Peptide zu ermitteln, die die durch den SNP *CYBA-242T/C* kodierte polymorphe Aminosäure von Position 72 enthalten. Sowohl CYBA-Nonamere (**Tab.5.3**) als auch -Decamere (**Tab.5.4**), die die polymorphe 72.Aminosäure und die höchsten Wahrscheinlichkeiten an HLA-Moleküle zu binden aufweisen, wurden mit den entsprechenden HLA-Molekülen zusammengestellt.

HLA-Molekül	Nonamer	Datenbankvorhersage für Peptid-HLA-Bindung		
		www.syfpeithi.de	www-bimas.cit.nih.gov	www.cbs.dtu.dk [nM]
A*02:01	K <u>Y</u> MTAVVKKL	20	0.088	7503
	K <u>H</u> MTAVVKKL	20	0.442	17497
A3	Q K <u>Y</u> MTAVVK	27	0.100	k.A.
	Q K <u>H</u> MTAVVK	23	0.020	k.A.
A24	K <u>Y</u> MTAVVKKL	k.A.	660.000	k.A.
	K <u>H</u> MTAVVKKL	k.A.	1.320	k.A.
A*24:02	K <u>Y</u> MTAVVKKL	24	k.A.	73 (WB)
	K <u>H</u> MTAVVKKL	14	k.A.	4844
A*24:03	K <u>Y</u> MTAVVKKL	k.A.	k.A.	5 (SB)
	K <u>H</u> MTAVVKKL	k.A.	k.A.	3834
B*15:03	<u>Y</u> MTAVVVKLF	k.A.	k.A.	12 (SB)
	<u>H</u> MTAVVVKLF	k.A.	k.A.	44 (SB)
B*15:10	K <u>Y</u> MTAVVKKL	0	k.A.	k.A.
	K <u>H</u> MTAVVKKL	23	k.A.	k.A.
B*27:05	ERWGQK <u>Y</u> MT	14	100.000	780
	ERWGQK <u>H</u> MT	13	100.000	748
B*38:01	K <u>Y</u> MTAVVKKL	13	3.120	18255
	K <u>H</u> MTAVVKKL	23	46.800	4724
B*39:01	K <u>Y</u> MTAVVKKL	15	9.000	4583
	K <u>H</u> MTAVVKKL	25	270.000	57 (WB)
B*52:01	G Q K<u>Y</u> M T A V V	k.A.	165.000	k.A.
	G Q K<u>H</u> M T A V V	k.A.	165.000	k.A.
C*04:01	K <u>Y</u> MTAVVKKL	k.A.	484.000	k.A.
	K <u>H</u> MTAVVKKL	k.A.	0.968	k.A.

Tabelle 5.3: Peptid-HLA-Bindungswahrscheinlichkeiten für CYBA-Nonamere um Aminosäure 72 an unterschiedliche HLA-Moleküle laut www.syfpeithi.de, www-bimas.cit.nih.gov bzw. www.cbs.dtu.dk

In den Nonameren wurde jeweils die polymorphe 72.Aminosäure des *CYBA*-kodierte Proteins unterstrichen. Zudem wurden die Peptide GQKY/HMTAVV hervorgehoben, die den im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Peptiden *CYBA-72Y* / *H₆₉₋₇₇* entsprechen (k.A.: keine Angabe, da HLA-Molekül in Datenbank nicht enthalten; SB: starker Bindungspartner; WB: schwacher Bindungspartner).

HLA-Molekül	Decamer	Datenbankvorhersage für Peptid-HLA-Bindung		
		www.syfpeithi.de	www-bimas.cit.nih.gov	www.cbs.dtu.dk [nM]
A1	<u>S</u> TMERWGQ <u>KY</u>	23	1.250	k.A.
	S <u>T</u> MERWGQ <u>KH</u>	8	0.025	k.A.
A3	GQK <u>Y</u> MTAVVK	22	1.800	k.A.
	GQK <u>H</u> MTAVVK	22	1.800	k.A.
A*23:01	K <u>Y</u> MTAVVKLF	k.A.	k.A.	32 (SB)
	K <u>H</u> MTAVVKLF	k.A.	k.A.	1353
A24	K <u>Y</u> MTAVVKLF	k.A.	420.000	k.A.
	K <u>H</u> MTAVVKLF	k.A.	0.840	k.A.
A*24:02	K <u>Y</u> MTAVVKLF	24	k.A.	55 (WB)
	K <u>H</u> MTAVVKLF	14	k.A.	2660
A*24:03	K <u>Y</u> MTAVVKLF	k.A.	k.A.	4 (SB)
	K <u>H</u> MTAVVKLF	k.A.	k.A.	716
A26	S <u>T</u> MERWGQ <u>KY</u>	23	k.A.	k.A.
	S <u>T</u> MERWGQ <u>KH</u>	13	k.A.	k.A.
A*26:02	S <u>T</u> MERWGQ <u>KY</u>	k.A.	k.A.	37 (SB)
	S <u>T</u> MERWGQ <u>KH</u>	k.A.	k.A.	3913
B*15:03	QK <u>Y</u> MTAVVKL	k.A.	k.A.	7 (SB)
	QK <u>H</u> MTAVVKL	k.A.	k.A.	19 (SB)
	K <u>Y</u> MTAVVKLF	k.A.	k.A.	96 (WB)
	K <u>H</u> MTAVVKLF	k.A.	k.A.	8 (SB)
B*15:17	S <u>T</u> MERWGQ <u>KY</u>	k.A.	k.A.	7 (SB)
	S <u>T</u> MERWGQ <u>KH</u>	k.A.	k.A.	1119
B*27:05	GQK <u>Y</u> MTAVVK	k.A.	200.000	9815
	GQK <u>H</u> MTAVVK	k.A.	200.000	11983
B*38:01	K <u>Y</u> MTAVVKLF	10	2.600	23438
	K <u>H</u> MTAVVKLF	20	39.000	9870
B*52:01	W GQK <u>Y</u> MTAVV	k.A.	99.000	k.A.
	W GQK <u>H</u> MTAVV	k.A.	99.000	k.A.
C*04:01	K <u>Y</u> MTAVVKLF	k.A.	200.000	k.A.
	K <u>H</u> MTAVVKLF	k.A.	0.400	k.A.

Tabelle 5.4: Peptid-HLA-Bindungswahrscheinlichkeiten für CYBA-Decamere um Aminosäure 72 an unterschiedliche HLA-Moleküle laut www.syfpeithi.de, www-bimas.cit.nih.gov bzw. www.cbs.dtu.dk

In den Decameren wurde jeweils die polymorphe 72.Aminosäure des CYBA-kodierten Proteins unterstrichen. Zudem wurden die Peptide WGQKY/HMTAVV hervorgehoben, die den im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Peptiden CYBA-72Y / H₆₈₋₇₇ entsprechen (k.A.: keine Angabe, da HLA-Molekül in Datenbank nicht enthalten; SB: starker Bindungspartner; WB: schwacher Bindungspartner).

Literaturverzeichnis

- Agrawal S, Kishore MC. MHC class I gene expression and regulation. *J Hematother Stem Cell Res.* 2000 Dec;9(6):795-812.
- Akatsuka Y, Morishima Y, Kuzushima K, Kodera Y, Takahashi T. Minor histocompatibility antigens as targets for immunotherapy using allogeneic immune reactions. *Cancer Sci.* 2007 Aug;98(8):1139-46.
- Akuthota P, Wang H, Weller PF. Eosinophils as antigen-presenting cells in allergic upper airway disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;10(1):14-9.
- Albrecht J, Frey M, Teschner D, Carbol A, Theobald M, Herr W, Distler E. IL-21-treated naive CD45RA+ CD8+ T cells represent a reliable source for producing leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes with high proliferative potential and early differentiation phenotype. *Cancer Immunol Immunother.* 2011 Feb;60(2):235-48.
- Ambasta RK, Kumar P, Griendling KK, Schmidt HH, Busse R, Brandes RP. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol Chem.* 2004 Oct 29;279(44):45935-41.
- Arbiser JL, Petros J, Klaffer R, Govindajaran B, McLaughlin ER, Brown LF, Cohen C, Moses M, Kilroy S, Arnold RS, Lambeth JD. Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jan 22;99(2):715-20.
- Armistead PM, Liang S, Li H, Lu S, Van Bergen CA, Alatrash G, St John L, Hunsucker SA, Sarantopoulos S, Falkenburg JH, Molldrem JJ. Common minor histocompatibility antigen discovery based upon patient clinical outcomes and genomic data. *PLoS One.* 2011;6(8):e23217.
- Azumi H, Inoue N, Takeshita S, Rikitake Y, Kawashima S, Hayashi Y, Itoh H, Yokoyama M. Expression of NADH/NADPH oxidase p22phox in human coronary arteries. *Circulation.* 1999 Oct 5;100(14):1494-8.
- Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood.* 1999 Mar 1;93(5):1464-76.
- Bacher U, Kohlmann A, Haferlach T. Gene expression profiling for diagnosis and therapy in acute leukaemia and other haematologic malignancies. *Cancer Treat Rev.* 2010 Dec;36(8):637-46.
- Bae J, Carrasco R, Lee AH, Prabhala R, Tai YT, Anderson KC, Munshi NC. Identification of novel myeloma-specific XBP1 peptides able to generate cytotoxic T lymphocytes: a potential therapeutic application in multiple myeloma. *Leukemia.* 2011 Oct;25(10):1610-9.
- Barnstable CJ, Bodmer WF, Brown G, Galfre G, Milstein C, Williams AF, Ziegler A. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell.* 1978 May;14(1):9-20.
- Barrett AJ, Savani BN. Does chemotherapy modify the immune surveillance of hematological malignancies? *Leukemia.* 2009 Jan;23(1):53-8.
- Barrett AJ. Understanding and harnessing the graft-versus-leukaemia effect. *Br J Haematol.* 2008 Sep;142(6):877-88.
- Basso G, Case C, Dell'Orto MC. Diagnosis and genetic subtypes of leukemia combining gene expression and flow cytometry. *Blood Cells Mol Dis.* 2007 Sep-Oct;39(2):164-8.
- Batista FD, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol.* 2009 Jan;9(1):15-27.
- Batot G, Pacllet MH, Doussi re J, Vergnaud S, Martel C, Vignais PV, Morel F. Biochemical and immunochemical properties of B lymphocyte cytochrome b558. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Mar 5;1406(2):188-202.
- Bedard K, Attar H, Bonnefont J, Jaquet V, Borel C, Plastre O, Stasia MJ, Antonarakis SE, Krause KH. Three common polymorphisms in the CYBA gene form a haplotype associated with decreased ROS generation. *Hum Mutat.* 2009 Jul;30(7):1123-33.
- Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):245-313.
- Bendle GM, Haanen JB, Schumacher TN. Preclinical development of T cell receptor gene therapy. *Curr Opin Immunol.* 2009 Apr;21(2):209-14.
- Berger AE, Davis JE, Cresswell P. Monoclonal antibody to HLA-A3. Hybridoma. 1982;1(2):87-90.
- Berry LJ, Moeller M, Darcy PK. Adoptive immunotherapy for cancer: the next generation of gene-engineered immune cells. *Tissue Antigens.* 2009 Oct;74(4):277-89.
- Betz BL, Hess JL. Acute myeloid leukemia diagnosis in the 21st century. *Arch Pathol Lab Med.* 2010 Oct;134(10):1427-33.

- Birkholz K, Hofmann C, Hoyer S, Schulz B, Harrer T, Kämpgen E, Schuler G, Dörrie J, Schaft N. A fast and robust method to clone and functionally validate T-cell receptors. *J Immunol Methods*. 2009 Jul 31;346(1-2):45-54.
- Blazar BR, Murphy WJ. Bone marrow transplantation and approaches to avoid graft-versus-host disease (GVHD). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005 Sep 29;360(1461):1747-67.
- Bleakley M, Otterud BE, Richardt JL, Mollerup AD, Hudecek M, Nishida T, Chaney CN, Warren EH, Leppert MF, Riddell SR. Leukemia-associated minor histocompatibility antigen discovery using T-cell clones isolated by in vitro stimulation of naive CD8+ T cells. *Blood*. 2010 Jun 10;115(23):4923-33.
- Bleakley M, Riddell SR. Exploiting T cells specific for human minor histocompatibility antigens for therapy of leukemia. *Immunol Cell Biol*. 2011 Mar;89(3):396-407.
- Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer*. 2004 May;4(5):371-80.
- Bobisse S, Zanollo P, Rosato A. T-cell receptor gene transfer by lentiviral vectors in adoptive cell therapy. *Expert Opin Biol Ther*. 2007 Jun;7(6):893-906.
- Bokoch GM, Knaus UG. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends Biochem Sci*. 2003 Sep;28(9):502-8.
- Bonnet D, Warren EH, Greenberg PD, Dick JE, Riddell SR. CD8(+) minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocyte clones eliminate human acute myeloid leukemia stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jul 20;96(15):8639-44.
- Bordignon C, Carlo-Stella C, Colombo MP, De Vincentiis A, Lanata L, Lemoli RM, Locatelli F, Olivieri A, Rondelli D, Zanon P, Tura S. Cell therapy: achievements and perspectives. *Haematologica*. 1999 Dec;84(12):1110-49.
- Brar SS, Corbin Z, Kennedy TP, Hemendinger R, Thornton L, Bommarius B, Arnold RS, Whorton AR, Sturrock AB, Huecksteadt TP, Quinn MT, Krenitsky K, Ardie KG, Lambeth JD, Hoidal JR. NOX5 NAD(P)H oxidase regulates growth and apoptosis in DU 145 prostate cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003 Aug;285(2):C353-69. [a](#)
- Brar SS, Kennedy TP, Quinn M, Hoidal JR. Redox signaling of NF-kappaB by membrane NAD(P)H oxidases in normal and malignant cells. *Protoplasma*. 2003 May;221(1-2):117-27. [b](#)
- Brar SS, Kennedy TP, Sturrock AB, Huecksteadt TP, Quinn MT, Whorton AR, Hoidal JR. An NAD(P)H oxidase regulates growth and transcription in melanoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 Jun;282(6):C1212-24.
- Brickner AG, Evans AM, Mito JK, Xuereb SM, Feng X, Nishida T, Fairfull L, Ferrell RE, Foon KA, Hunt DF, Shabanowitz J, Engelhard VH, Riddell SR, Warren EH. The PANE1 gene encodes a novel human minor histocompatibility antigen that is selectively expressed in B-lymphoid cells and B-CLL. *Blood*. 2006 May 1;107(9):3779-86.
- Brickner AG, Warren EH, Caldwell JA, Akatsuka Y, Golovina TN, Zarlino AL, Shabanowitz J, Eisenlohr LC, Hunt DF, Engelhard VH, Riddell SR. The immunogenicity of a new human minor histocompatibility antigen results from differential antigen processing. *J Exp Med*. 2001 Jan 15;193(2):195-206.
- Brochet X, Lefranc MP, Giudicelli V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jul 1;36(Web Server issue):W503-8.
- Bu-Ghanim HN, Casimir CM, Povey S, Segal AW. The alpha subunit of cytochrome b-245 mapped to chromosome 16. *Genomics*. 1990 Nov;8(3):568-70.
- Bullinger L, Valk PJ. Gene expression profiling in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2005 Sep 10;23(26):6296-305.
- Burnett AK, Knapper S. Targeting treatment in AML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007:429-34.
- Burnett AK. Evaluating the contribution of allogeneic and autologous transplantation to the management of acute myeloid leukemia in adults. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2001 Aug;48 Suppl 1:S53-8.
- Burster T, Macmillan H, Hou T, Boehm BO, Mellins ED. Cathepsin G: roles in antigen presentation and beyond. *Mol Immunol*. 2010 Jan;47(4):658-65.
- Byrne A, Carney DN. Cancer in the elderly. *Curr Probl Cancer*. 1993 May-Jun;17(3):145-218.
- Cassatella MA, Bazzoni F, Flynn RM, Dusi S, Trinchieri G, Rossi F. Molecular basis of interferon-gamma and lipopolysaccharide enhancement of phagocyte respiratory burst capability. Studies on the gene expression of several NADPH oxidase components. *J Biol Chem*. 1990 Nov 25;265(33):20241-6.
- Cassatella MA, Hartman L, Perussia B, Trinchieri G. Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically induce cytochrome b-245 heavy-chain gene expression and nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate hydrogenase oxidase in human leukemic myeloid cells. *J Clin Invest*. 1989 May;83(5):1570-9.

- Cassell DJ, Schwartz RH. A quantitative analysis of antigen-presenting cell function: activated B cells stimulate naive CD4 T cells but are inferior to dendritic cells in providing costimulation. *J Exp Med.* 1994 Nov 1;180(5):1829-40.
- Cavallo F, De Giovanni C, Nanni P, Forni G, Lollini PL. 2011: the immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2011 Mar;60(3):319-26.
- Celis E, Goodwin JJ, Saibara T. Peptide-induced proliferation and lymphokine production in human T cells in the absence of antigen-presenting cells: role of T-cell activation state and costimulatory signals. *Hum Immunol.* 1992 Jul;34(3):173-80.
- Cesco-Gaspere M, Morris E, Stauss HJ. Immunomodulation in the treatment of haematological malignancies. *Clin Exp Med.* 2009 Jun;9(2):81-92.
- Chakravarti A, Allaey I, Poubelle PE. [Neutrophils and immunity: is it innate or acquired?]. *Med Sci (Paris).* 2007 Oct;23(10):862-7.
- Chanan-Khan A, Porter CW. Immunomodulating drugs for chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet Oncol.* 2006 Jun;7(6):480-8.
- Channon KM, Guzik TJ. Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *J Physiol Pharmacol.* 2002 Dec;53(4 Pt 1):515-24.
- Chappell CP, Jacob J. Introduction: the complexities of T-cell heterogeneity. *Microbes Infect.* 2003 Mar;5(3):197-8.
- Chemali M, Radtke K, Desjardins M, English L. Alternative pathways for MHC class I presentation: a new function for autophagy. *Cell Mol Life Sci.* 2011 May;68(9):1533-41.
- Chen C, Johnston TD, Jeon H, Gedaly R, McHugh P, Ranjan D. Cyclosporine promotes epstein-barr virus-infected human B-cell transformation assayed by three correlated assay methods. *Transplant Proc.* 2009 Jan-Feb;41(1):366-70.
- Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene.* 2001 May 16;269(1-2):131-40.
- Chetty M, Thrasher AJ, Abo A, Casimir CM. Low NADPH oxidase activity in Epstein-Barr-virus-immortalized B-lymphocytes is due to a post-transcriptional block in expression of cytochrome b558. *Biochem J.* 1995 Feb 15;306 (Pt 1):141-5.
- Choi EH, Taylor JG, Foster CB, Walsh TJ, Anttila VJ, Ruutu T, Palotie A, Chanock SJ. Common polymorphisms in critical genes of innate immunity do not contribute to the risk for chronic disseminated candidiasis in adult leukemia patients. *Med Mycol.* 2005 Jun;43(4):349-53.
- Choi EH, Zimmerman PA, Foster CB, Zhu S, Kumaraswami V, Nutman TB, Chanock SJ. Genetic polymorphisms in molecules of innate immunity and susceptibility to infection with *Wuchereria bancrofti* in South India. *Genes Immun.* 2001 Aug;2(5):248-53.
- Chou WC, Jie C, Kenedy AA, Jones RJ, Trush MA, Dang CV. Role of NADPH oxidase in arsenic-induced reactive oxygen species formation and cytotoxicity in myeloid leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 30;101(13):4578-83.
- Clay TM, Custer MC, Spiess PJ, Nishimura MI. Potential use of T cell receptor genes to modify hematopoietic stem cells for the gene therapy of cancer. *Pathol Oncol Res.* 1999;5(1):3-15.
- Clément MV, Stamenkovic I. Superoxide anion is a natural inhibitor of FAS-mediated cell death. *EMBO J.* 1996 Jan 15;15(2):216-25.
- Coleman JA, Correa I, Cooper L, Bohnenkamp HR, Poulosom R, Burchell JM, Taylor-Papadimitriou J. T cells reactive with HLA-A*0201 peptides from the histone demethylase JARID1B are found in the circulation of breast cancer patients. *Int J Cancer.* 2011 May 1;128(9):2114-24.
- Condino-Neto A, Newburger PE. NADPH oxidase activity and cytochrome b558 content of human Epstein-Barr-virus-transformed B lymphocytes correlate with expression of genes encoding components of the oxidase system. *Arch Biochem Biophys.* 1998 Dec 15;360(2):158-64.
- Cripe LD. Adult acute leukemia. *Curr Probl Cancer.* 1997 Jan-Feb;21(1):1-64.
- Dahan I, Issaeva I, Gorzalczany Y, Sigal N, Hirshberg M, Pick E. Mapping of functional domains in the p22(phox) subunit of flavocytochrome b(559) participating in the assembly of the NADPH oxidase complex by "peptide walking". *J Biol Chem.* 2002 Mar 8;277(10):8421-32.
- Dauer M, Obermaier B, Herten J, Haerle C, Pohl K, Rothenfusser S, Schnurr M, Endres S, Eigler A. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J Immunol.* 2003 Apr 15;170(8):4069-76.
- Dayyani F, Gallick GE, Logothetis CJ, Corn PG. Novel therapies for metastatic castrate-resistant prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2011 Nov 16;103(22):1665-75.

- de Mendez I, Leto TL. Functional reconstitution of the phagocyte NADPH oxidase by transfection of its multiple components in a heterologous system. *Blood.* 1995 Feb 15;85(4):1104-10.
- De Plaen E, Lurquin C, Lethé B, van der Bruggen P, Brichard V, Renauld JC, Coulie P, Van Pel A, Boon T. Identification of genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Methods.* 1997 Jun;12(2):125-42.
- de Rijke B, van Horssen-Zoetbrood A, Beekman JM, Otterud B, Maas F, Woestenenk R, Kester M, Leppert M, Schattenberg AV, de Witte T, van de Wiel-van Kemenade E, Dolstra H. A frameshift polymorphism in P2X5 elicits an allogeneic cytotoxic T lymphocyte response associated with remission of chronic myeloid leukemia. *J Clin Invest.* 2005 Dec;115(12):3506-16.
- de Rijke B, van Horssen-Zoetbrood A, Veenbergen S, Fredrix H, de Witte T, van de Wiel-van Kemenade E, Dolstra H. Refinement of molecular approaches to improve the chance of identification of hematopoietic-restricted minor histocompatibility antigens. *J Immunol Methods.* 2008 Jan 1;329(1-2):125-37.
- DeLuca DS, Eiz-Vesper B, Ladas N, Khattab BA, Blasczyk R. High-throughput minor histocompatibility antigen prediction. *Bioinformatics.* 2009 Sep 15;25(18):2411-7.
- Demirer T, Barkholt L, Blaise D, Pedrazzoli P, Aglietta M, Carella AM, Bay JO, Arpacı F, Rosti G, Gurman G, Niederwieser D, Bregni M; EBMT Solid Tumors Working Party. Transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells: an emerging treatment modality for solid tumors. *Nat Clin Pract Oncol.* 2008 May;5(5):256-67.
- den Haan JM, Sherman NE, Blokland E, Huczko E, Koning F, Drijfhout JW, Skipper J, Shabanowitz J, Hunt DF, Engelhard VH, et al. Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. *Science.* 1995 Jun 9;268(5216):1476-80.
- Dennig D, Lacerda J, Yan Y, Gasparetto C, O'Reilly RJ. ICAM-1 (CD54) expression on B lymphocytes is associated with their costimulatory function and can be increased by coactivation with IL-1 and IL-7. *Cell Immunol.* 1994 Jul;156(2):414-23.
- Derby M, Alexander-Miller M, Tse R, Berzofsky J. High-avidity CTL exploit two complementary mechanisms to provide better protection against viral infection than low-avidity CTL. *J Immunol.* 2001 Feb 1;166(3):1690-7.
- Dermime S, Mavroudis D, Jiang YZ, Hensel N, Mollndrem J, Barrett AJ. Immune escape from a graft-versus-leukemia effect may play a role in the relapse of myeloid leukemias following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1997 May;19(10):989-99.
- Desmet J, Meersseman G, Boutonnet N, Pletinckx J, De Clercq K, Debulpaep M, Braeckman T, Lasters I. Anchor profiles of HLA-specific peptides: analysis by a novel affinity scoring method and experimental validation. *Proteins.* 2005 Jan 1;58(1):53-69.
- Di Castelnuovo A, Soccio M, Iacoviello L, Evangelista V, Consoli A, Vanuzzo D, Diviaco S, Carluccio M, Rignanese L, De Caterina R. The C242T polymorphism of the p22phox component of NAD(P)H oxidase and vascular risk. Two case-control studies and a meta-analysis. *Thromb Haemost.* 2008 Mar;99(3):594-601.
- Dionne SO, Smith MH, Marincola FM, Lake DF. Antigen presentation of a modified tumor-derived peptide by tumor infiltrating lymphocytes. *Cell Immunol.* 2001 Dec 15;214(2):139-44.
- Distler E, Wölfel C, Köhler S, Nonn M, Kaus N, Schnürer E, Meyer RG, Wehler TC, Huber C, Wölfel T, Hartwig UF, Herr W. Acute myeloid leukemia (AML)-reactive cytotoxic T lymphocyte clones rapidly expanded from CD8(+) CD62L(high) T cells of healthy donors prevent AML engraftment in NOD/SCID IL2Rgamma(null) mice. *Exp Hematol.* 2008 Apr;36(4):451-63.
- Döhner K, Döhner H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2008 Jul;93(7):976-82.
- Dolstra H, Fredrix H, Maas F, Coulie PG, Brasseur F, Mensink E, Adema GJ, de Witte TM, Figdor CG, van de Wiel-van Kemenade E. A human minor histocompatibility antigen specific for B cell acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med.* 1999 Jan 18;189(2):301-8.
- Du C, Wang Y. The immunoregulatory mechanisms of carcinoma for its survival and development. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011 Jan 21;30:12.
- DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol.* 1987 Jan;7(1):379-87.
- Dutreix M, Cosset JM, Sun JS. Molecular therapy in support to radiotherapy. *Mutat Res.* 2010 Apr-Jun;704(1-3):182-9.
- Duval L, Schmidt H, Kaltoft K, Fode K, Jensen JJ, Sorensen SM, Nishimura MI, von der Maase H. Adoptive transfer of allogeneic cytotoxic T lymphocytes equipped with a HLA-A2 restricted MART-1 T-cell receptor: a phase I trial in metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2006 Feb 15;12(4):1229-36.
- Edderkaoui M, Hong P, Vaquero EC, Lee JK, Fischer L, Friess H, Buchler MW, Lerch MM, Pandol SJ, Gukovskaya AS. Extracellular matrix stimulates reactive oxygen species production and increases pancreatic cancer cell survival through 5-lipoxygenase and NADPH oxidase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005 Dec;289(6):G1137-47.

- Edderkaoui M, Nitsche C, Zheng L, Pandol SJ, Gukovsky I, Gukovskaya AS. NADPH oxidase activation in pancreatic cancer cells is mediated through Akt-dependent up-regulation of p22phox. *J Biol Chem.* 2011 Mar 11;286(10):7779-87.
- Ellis TN, Beaman BL. Interferon-gamma activation of polymorphonuclear neutrophil function. *Immunology.* 2004 May;112(1):2-12.
- Elsen S, Doussi re J, Villiers CL, Faure M, Berthier R, Papaioannou A, Grandvaux N, Marche PN, Vignais PV. Cryptic O₂-generating NADPH oxidase in dendritic cells. *J Cell Sci.* 2004 May 1;117(Pt 11):2215-26.
- Eynon EE, Parker DC. Small B cells as antigen-presenting cells in the induction of tolerance to soluble protein antigens. *J Exp Med.* 1992 Jan 1;175(1):131-8.
- Falkenburg JH, Goselink HM, van der Harst D, van Luxemburg-Heijs SA, Kooy-Winkelaar YM, Faber LM, de Kroon J, Brand A, Fibbe WE, Willemze R, et al. Growth inhibition of clonogenic leukemic precursor cells by minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med.* 1991 Jul 1;174(1):27-33.
- Falkenburg JH, Marijt WA, Heemskerk MH, Willemze R. Minor histocompatibility antigens as targets of graft-versus-leukemia reactions. *Curr Opin Hematol.* 2002 Nov;9(6):497-502.
- Fan M, K h nen M, Rontu R, Lehtinen R, Viik J, Niemi M, Nieminen T, Niemel  K, P rsti I, K oobi T, Turjanmaa V, Lehtim ki T. The p22phox C242T gene polymorphism is associated with a reduced risk of angiographically verified coronary artery disease in a high-risk Finnish Caucasian population. The Finnish Cardiovascular Study. *Am Heart J.* 2006 Sep;152(3):538-42.
- Fathi AT, Grant S, Karp JE. Exploiting cellular pathways to develop new treatment strategies for AML. *Cancer Treat Rev.* 2010 Apr;36(2):142-50.
- Feng X, Hui KM, Younes HM, Brickner AG. Targeting minor histocompatibility antigens in graft versus tumor or graft versus leukemia responses. *Trends Immunol.* 2008 Dec;29(12):624-32.
- Ferrara E, Palmieri S, Leoni F. Clinically useful prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008 Jun;66(3):181-93.
- Floriano-S nchez E, Castro-Mar n M, C rdenas-Rodr guez N, Lara-Padilla E. [Evaluation of the expression of p22 phox subunit of NADPH oxidase (NOX) in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: a comparative study]. *Actas Urol Esp.* 2010 Apr;34(4):340-5.
- Ford ML, Evavold BD. Degenerate recognition of T cell epitopes: impact of T cell receptor reserve and stability of peptide:MHC complexes. *Mol Immunol.* 2004 Feb;40(14-15):1019-25.
- Forman HJ, Thomas MJ. Oxidant production and bactericidal activity of phagocytes. *Annu Rev Physiol.* 1986;48:669-80.
- Forrest MS, Skibola CF, Lightfoot TJ, Bracci PM, Willett EV, Smith MT, Holly EA, Roman E. Polymorphisms in innate immunity genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol.* 2006 Jul;134(2):180-3.
- Freedman AS, Freeman G, Horowitz JC, Daley J, Nadler LM. B7, a B-cell-restricted antigen that identifies preactivated B cells. *J Immunol.* 1987 Nov 15;139(10):3260-7.
- Fried L, Arbiser JL. The reactive oxygen-driven tumor: relevance to melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008 Apr;21(2):117-22.
- Garcia RC, Cross AR, Segal AW. The development of cytochrome b-245 in maturing human macrophages. *Biochem J.* 1986 Nov 1;239(3):647-51.
- Genius J, Grau AJ, Lichy C. The C242T polymorphism of the NAD(P)H oxidase p22phox subunit is associated with an enhanced risk for cerebrovascular disease at a young age. *Cerebrovasc Dis.* 2008;26(4):430-3.
- Gilbert KM, Weigle WO. Tolerogenicity of resting and activated B cells. *J Exp Med.* 1994 Jan 1;179(1):249-58.
- Giles FJ, Keating A, Goldstone AH, Avivi I, Willman CL, Kantarjian HM. Acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2002:73-110.
- Giles FJ. Novel agents for the therapy of acute leukemia. *Curr Opin Oncol.* 2002 Jan;14(1):3-9.
- Glik A, Douvdevani A. T lymphocytes: the "cellular" arm of acquired immunity in the peritoneum. *Perit Dial Int.* 2006 Jul-Aug;26(4):438-48.
- Gluzman Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell.* 1981 Jan;23(1):175-82.
- Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Res.* 2011 Jan;39(Database issue):D913-9.
- Gorin NC. Autologous stem cell transplantation in acute myelocytic leukemia. *Blood.* 1998 Aug 15;92(4):1073-90.
- Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JH, Vossen J, Gratwohl A, Vogelsang GB, van Houwelingen HC, van Rood JJ. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical

- donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 1996 Feb 1;334(5):281-5.
- Grad JM, Bahlis NJ, Reis I, Oshiro MM, Dalton WS, Boise LH. Ascorbic acid enhances arsenic trioxide-induced cytotoxicity in multiple myeloma cells. *Blood.* 2001 Aug 1;98(3):805-13.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 1977 Jul;36(1):59-74.
- Grant S. Is the focus moving toward a combination of targeted drugs? *Best Pract Res Clin Haematol.* 2008 Dec;21(4):629-37.
- Green DR, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev.* 2003 Jun;193:70-81.
- Greiner J, Bullinger L, Guinn BA, Döhner H, Schmitt M. Leukemia-associated antigens are critical for the proliferation of acute myeloid leukemia cells. *Clin Cancer Res.* 2008 Nov 15;14(22):7161-6.
- Greiner J, Ringhoffer M, Taniguchi M, Li L, Schmitt A, Shiku H, Döhner H, Schmitt M. mRNA expression of leukemia-associated antigens in patients with acute myeloid leukemia for the development of specific immunotherapies. *Int J Cancer.* 2004 Feb 20;108(5):704-11.
- Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Oct;20(10):2175-83.
- Grimwade D, Hills RK. Independent prognostic factors for AML outcome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009:385-95.
- Guichard C, Moreau R, Pessayre D, Epperson TK, Krause KH. NOX family NADPH oxidases in liver and in pancreatic islets: a role in the metabolic syndrome and diabetes? *Biochem Soc Trans.* 2008 Oct;36(Pt 5):920-9.
- Guinn BA, Mohamedali A, Thomas NS, Mills KI. Immunotherapy of myeloid leukaemia. *Cancer Immunol Immunother.* 2007 Jul;56(7):943-57.
- Gülöw K, Kaminski M, Darvas K, Süß D, Li-Weber M, Krammer PH. HIV-1 trans-activator of transcription substitutes for oxidative signaling in activation-induced T cell death. *J Immunol.* 2005 May 1;174(9):5249-60.
- Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis. *Circulation.* 2000 Oct 10;102(15):1744-7.
- Haferlach T, Kern W, Schnittger S, Schoch C. Modern diagnostics in acute leukemias. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005 Nov;56(2):223-34.
- Hambach L, Goulmy E. Immunotherapy of cancer through targeting of minor histocompatibility antigens. *Curr Opin Immunol.* 2005 Apr;17(2):202-10.
- Hambach L, Vermeij M, Buser A, Aghai Z, van der Kwast T, Goulmy E. Targeting a single mismatched minor histocompatibility antigen with tumor-restricted expression eradicates human solid tumors. *Blood.* 2008 Sep 1;112(5):1844-52.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
- Harper AM, Dunne MJ, Segal AW. Purification of cytochrome b-245 from human neutrophils. *Biochem J.* 1984 Apr 15;219(2):519-27.
- Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol.* 2006 Jun;18(3):349-56.
- Harrison DG, Cai H, Landmesser U, Griendling KK. Interactions of angiotensin II with NAD(P)H oxidase, oxidant stress and cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2003 Jun;4(2):51-61.
- He YL, Cao LZ, Yang J, Yang MH, Xu WQ, Xie M, Shi Z. [Expression of WAVE1 and p22phox in children with acute lymphocytic leukemia and the relationship of WAVE1 with oxidative stress]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 2009 Feb;11(2):88-92.
- Heemskerk MH, Griffioen M, Falkenburg JH. T-cell receptor gene transfer for treatment of leukemia. *Cytotherapy.* 2008;10(2):108-15.
- Heemskerk MH, Hoogeboom M, de Paus RA, Kester MG, van der Hoorn MA, Goulmy E, Willemze R, Falkenburg JH. Redirection of antileukemic reactivity of peripheral T lymphocytes using gene transfer of minor histocompatibility antigen HA-2-specific T-cell receptor complexes expressing a conserved alpha joining region. *Blood.* 2003 Nov 15;102(10):3530-40.
- Heemskerk MH, Hoogeboom M, Hagedoorn R, Kester MG, Willemze R, Falkenburg JH. Reprogramming of virus-specific T cells into leukemia-reactive T cells using T cell receptor gene transfer. *J Exp Med.* 2004 Apr 5;199(7):885-94.

- Hemmerling J, Wegner-Kops J, von Stebut E, Wolff D, Wagner EM, Hartwig UF, André MC, Theobald M, Schopf RE, Herr W, Meyer RG. Human epidermal Langerhans cells replenish skin xenografts and are depleted by alloreactive T cells in vivo. *J Immunol.* 2011 Aug 1;187(3):1142-9.
- Henderson LM, Thomas S, Banting G, Chappell JB. The arachidonate-activatable, NADPH oxidase-associated H⁺ channel is contained within the multi-membrane-spanning N-terminal region of gp91-phox. *Biochem J.* 1997 Aug 1;325 (Pt 3):701-5.
- Herdrich K, Weinberger H. Selected Schedules in the Therapy of Malignant Tumors, Baxter, 15th Edition, 2010.
- Hernandez JB, Newton RH, Walsh CM. Life and death in the thymus--cell death signaling during T cell development. *Curr Opin Cell Biol.* 2010 Dec;22(6):865-71.
- Hiasa A, Hirayama M, Nishikawa H, Kitano S, Nukaya I, Yu SS, Mineno J, Kato I, Shiku H. Long-term phenotypic, functional and genetic stability of cancer-specific T-cell receptor (TCR) alpha beta genes transduced to CD8⁺ T cells. *Gene Ther.* 2008 May;15(9):695-9.
- Hiasa A, Nishikawa H, Hirayama M, Kitano S, Okamoto S, Chono H, Yu SS, Mineno J, Tanaka Y, Minato N, Kato I, Shiku H. Rapid alpha beta TCR-mediated responses in gamma delta T cells transduced with cancer-specific TCR genes. *Gene Ther.* 2009 May;16(5):620-8.
- Higgins MJ, Baselga J. Targeted therapies for breast cancer. *J Clin Invest.* 2011 Oct;121(10):3797-803.
- Hinrichs CS, Borman ZA, Cassard L, Gattinoni L, Spolski R, Yu Z, Sanchez-Perez L, Muranski P, Kern SJ, Logun C, Palmer DC, Ji Y, Reger RN, Leonard WJ, Danner RL, Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptively transferred effector cells derived from naive rather than central memory CD8⁺ T cells mediate superior antitumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Oct 13;106(41):17469-74.
- Hoffmann M, Schirmer MA, Tzvetkov MV, Kreuz M, Ziepert M, Wojnowski L, Kube D, Pfreundschuh M, Trümper L, Loeffler M, Brockmüller J; German Study Group for High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma. A functional polymorphism in the NAD(P)H oxidase subunit CYBA is related to gene expression, enzyme activity, and outcome in non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Res.* 2010 Mar 15;70(6):2328-38.
- Hölsberg P, Batra V, Dressel A, Hafler DA. Induction of anergy in CD8 T cells by B cell presentation of antigen. *J Immunol.* 1996 Dec 15;157(12):5269-76.
- Hombrink P, Hadrup SR, Bakker A, Kester MG, Falkenburg JH, von dem Borne PA, Schumacher TN, Heemskerk MH. High-throughput identification of potential minor histocompatibility antigens by MHC tetramer-based screening: feasibility and limitations. *PLoS One.* 2011;6(8):e22523.
- Huber C, Rammensee HG, Wölfel T, Britten CM, Krebsimmuntherapien – Standards und Innovationen, Deutscher Ärzte-Verlag, 2008.
- Huberle A, Beyeen AD, Ockinger J, Ayturan M, Jagodic M, de Graaf KL, Fissolo N, Marta M, Olofsson P, Hultqvist M, Holmdahl R, Olsson T, Weissert R. Advanced intercross line mapping suggests that ncf1 (ean6) regulates severity in an animal model of guillain-barre syndrome. *J Immunol.* 2009 Apr 1;182(7):4432-8.
- Hultqvist M, Olsson LM, Gelderman KA, Holmdahl R. The protective role of ROS in autoimmune disease. *Trends Immunol.* 2009 May;30(5):201-8.
- Inoue Y, Yagisawa M, Saeki K, Imajoh-Ohmi S, Kanegasaki S, Yuo A. Induction of phagocyte oxidase components during human myeloid differentiation: independent protein expression and discrepancy with the function. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001 Nov;65(11):2581-4.
- Jackson SH, Devadas S, Kwon J, Pinto LA, Williams MS. T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation. *Nat Immunol.* 2004 Aug;5(8):818-27.
- Jacobs P, Myelodysplasia and the Leukemias. *Curr Probl Cancer*, 1998 November / December.
- Jaiswal S, Traver D, Miyamoto T, Akashi K, Lagasse E, Weissman IL. Expression of BCR/ABL and BCL-2 in myeloid progenitors leads to myeloid leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Aug 19;100(17):10002-7.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M, Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag, 5.Auflage, 2002.
- Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, Cassard L, Yang JC, Hughes MS, Kammula US, Royal RE, Sherry RM, Wunderlich JR, Lee CC, Restifo NP, Schwarz SL, Cogdill AP, Bishop RJ, Kim H, Brewer CC, Rudy SF, VanWaes C, Davis JL, Mathur A, Ripley RT, Nathan DA, Laurencot CM, Rosenberg SA. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood.* 2009 Jul 16;114(3):535-46.
- Jordan CT. Unique molecular and cellular features of acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia.* 2002 Apr;16(4):559-62.
- Kalidas M, Kantarjian H, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia. *JAMA.* 2001 Aug 22-29;286(8):895-8.
- Kamimura T, Miyamoto T, Harada M, Akashi K. Advances in therapies for acute promyelocytic leukemia. *Cancer Sci.* 2011 Nov;102(11):1929-37.
- Kampen KR. The discovery and early understanding of leukemia. *Leuk Res.* 2012 Jan;36(1):6-13.

- Kater AP, van Oers MH, Kipps TJ. Cellular immune therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2007 Oct 15;110(8):2811-8.
- Katsuyama M. NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme: its transcriptional regulation and physiological roles. *J Pharmacol Sci*. 2010;114(2):134-46.
- Kausche S, Wehler T, Schnürer E, Lennerz V, Brenner W, Melchior S, Gröne M, Nonn M, Strand S, Meyer R, Ranieri E, Huber C, Falk CS, Herr W. Superior antitumor in vitro responses of allogeneic matched sibling compared with autologous patient CD8+ T cells. *Cancer Res*. 2006 Dec 1;66(23):11447-54.
- Kawahara M, Hori T, Matsubara Y, Okawa K, Uchiyama T. Identification of HLA class I-restricted tumor-associated antigens in adult T cell leukemia cells by mass spectrometric analysis. *Exp Hematol*. 2006 Nov;34(11):1496-504.
- Kawase T, Akatsuka Y, Torikai H, Morishima S, Oka A, Tsujimura A, Miyazaki M, Tsujimura K, Miyamura K, Ogawa S, Inoko H, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Takahashi T. Alternative splicing due to an intronic SNP in HMSD generates a novel minor histocompatibility antigen. *Blood*. 2007 Aug 1;110(3):1055-63.
- Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2002;3:179-98.
- Kessels HW, Wolkers MC, Schumacher TN. Adoptive transfer of T-cell immunity. *Trends Immunol*. 2002 May;23(5):264-9.
- Kikuchi H, Fujinawa T, Kuribayashi F, Nakanishi A, Imajoh-Ohmi S, Goto M, Kanegasaki S. Induction of essential components of the superoxide generating system in human monoblastic leukemia U937 cells. *J Biochem*. 1994 Oct;116(4):742-6.
- Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44:239-67.
- Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP. CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunol Rev*. 2006 Jun;211:214-24.
- Kolb HJ, Schmid C, Chen X, Woiciechowski A, Roskrow M, Weber M, Guenther W, Ledderose G, Schleuning M. Adoptive immunotherapy in chimeras with donor lymphocytes. *Acta Haematol*. 2003;110(2-3):110-20.
- Kolb HJ. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*. 2008 Dec 1;112(12):4371-83.
- Kraaij MD, Savage ND, van der Kooij SW, Koekkoek K, Wang J, van den Berg JM, Ottenhoff TH, Kuijpers TW, Holmdahl R, van Kooten C, Gelderman KA. Induction of regulatory T cells by macrophages is dependent on production of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Oct 12;107(41):17686-91.
- Krause KH. Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn J Infect Dis*. 2004 Oct;57(5):S28-9.
- Kroger CJ, Alexander-Miller MA. Cutting edge: CD8+ T cell clones possess the potential to differentiate into both high- and low-avidity effector cells. *J Immunol*. 2007 Jul 15;179(2):748-51. a
- Kroger CJ, Alexander-Miller MA. Dose-dependent modulation of CD8 and functional avidity as a result of peptide encounter. *Immunology*. 2007 Oct;122(2):167-78. b
- Kuball J, Hauptrock B, Malina V, Antunes E, Voss RH, Wolff M, Strong R, Theobald M, Greenberg PD. Increasing functional avidity of TCR-redirectioned T cells by removing defined N-glycosylation sites in the TCR constant domain. *J Exp Med*. 2009 Feb 16;206(2):463-75.
- Kuroda J, Kitazono T, Ago T, Ninomiya T, Ooboshi H, Kamouchi M, Kumai Y, Hagiwara N, Yoshimura S, Tamaki K, Kusuda K, Fujii K, Nagao T, Okada Y, Toyoda K, Nakane H, Sugimori H, Yamashita Y, Wakugawa Y, Asano K, Tanizaki Y, Kiyohara Y, Ibayashi S, Iida M. NAD(P)H oxidase p22phox C242T polymorphism and ischemic stroke in Japan: the Fukuoka Stroke Registry and the Hisayama study. *Eur J Neurol*. 2007 Oct;14(10):1091-7.
- Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Izawa Y, Kanematsu Y, Tamaki T. Atheroprotective effects of antioxidants through inhibition of mitogen-activated protein kinases. *Acta Pharmacol Sin*. 2004 Aug;25(8):977-85.
- Lam GY, Huang J, Brummel JH. The many roles of NOX2 NADPH oxidase-derived ROS in immunity. *Semin Immunopathol*. 2010 Dec;32(4):415-30.
- Lan Q, Zheng T, Shen M, Zhang Y, Wang SS, Zahm SH, Holford TR, Leaderer B, Boyle P, Chanock S. Genetic polymorphisms in the oxidative stress pathway and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Hum Genet*. 2007 Apr;121(2):161-8.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994 Feb 17;367(6464):645-8.
- Larsen ME, Klopperpris H, Stryhn A, Koefhethile CK, Sims S, Ndung'u T, Goulder P, Buus S, Nielsen M. HLA-restrictor - a tool for patient-specific predictions of HLA restriction elements and optimal epitopes within peptides. *Immunogenetics*. 2010 Nov 16.

- Laubach J, Rao AV. Current and emerging strategies for the management of acute myeloid leukemia in the elderly. *Oncologist.* 2008 Oct;13(10):1097-108.
- Lee JK, Edderkaoui M, Truong P, Ohno I, Jang KT, Berti A, Pandol SJ, Gukovskaya AS. NADPH oxidase promotes pancreatic cancer cell survival via inhibiting JAK2 dephosphorylation by tyrosine phosphatases. *Gastroenterology.* 2007 Nov;133(5):1637-48.
- Lennerz V, Fatho M, Gentilini C, Frye RA, Lifke A, Ferel D, Wölfel C, Huber C, Wölfel T. The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Nov 1;102(44):16013-8.
- Levy R, Rotrosen D, Nagauker O, Leto TL, Malech HL. Induction of the respiratory burst in HL-60 cells. Correlation of function and protein expression. *J Immunol.* 1990 Oct 15;145(8):2595-601.
- Ley TJ, Mardis ER, Ding L, Fulton B, McLellan MD, Chen K, Dooling D, Dunford-Shore BH, McGrath S, Hickenbotham M, Cook L, Abbott R, Larson DE, Koboldt DC, Pohl C, Smith S, Hawkins A, Abbott S, Locke D, Hillier LW, Miner T, Fulton L, Magrini V, Wylie T, Glasscock J, Conyers J, Sander N, Shi X, Osborne JR, Minx P, Gordon D, Chinwalla A, Zhao Y, Ries RE, Payton JE, Westervelt P, Tomasson MH, Watson M, Baty J, Ivanovich J, Heath S, Shannon WD, Nagarajan R, Walter MJ, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Wilson RK. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature.* 2008 Nov 6;456(7218):66-72.
- Li JM, Giver CR, Lu Y, Hossain MS, Akhtari M, Waller EK. Separating graft-versus-leukemia from graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Immunotherapy.* 2009 Jul;1(4):599-621.
- Li L, Frei B. Prolonged exposure to LPS increases iron, heme, and p22phox levels and NADPH oxidase activity in human aortic endothelial cells: inhibition by desferrioxamine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 May;29(5):732-8.
- Li XC, Raghavan M. Structure and function of major histocompatibility complex class I antigens. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010 Aug;15(4):499-504.
- Lichtman MA, Segel GB. Uncommon phenotypes of acute myelogenous leukemia: basophilic, mast cell, eosinophilic, and myeloid dendritic cell subtypes: a review. *Blood Cells Mol Dis.* 2005 Nov-Dec;35(3):370-83.
- Lin KI, Pasinelli P, Brown RH, Hardwick JM, Ratan RR. Decreased intracellular superoxide levels activate Sindbis virus-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1999 May 7;274(19):13650-5.
- Lin TL, Smith BD. Prognostically important molecular markers in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Am J Med Sci.* 2011 May;341(5):404-8.
- Linsley PS, Clark EA, Ledbetter JA. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Jul;87(13):5031-5.
- Liu HG, Liu K, Zhou YN, Xu YJ. Relationship between reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase subunit p22phox gene polymorphism and obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome in the Chinese Han population. *Chin Med J (Engl).* 2009 Jun 20;122(12):1369-74.
- Loss GE Jr, Sant AJ. Invariant chain retains MHC class II molecules in the endocytic pathway. *J Immunol.* 1993 Apr 15;150(8 Pt 1):3187-97.
- Löwenberg B. Acute myeloid leukemia: the challenge of capturing disease variety. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2008:1-11.
- Lowenberg B. Strategies in the treatment of acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2004 Sep;89(9):1029-32.
- Lundqvist A, Childs R. Allogeneic hematopoietic cell transplantation as immunotherapy for solid tumors: current status and future directions. *J Immunother.* 2005 Jul-Aug;28(4):281-8.
- Maddaly R, Pai G, Balaji S, Sivaramkrishnan P, Srinivasan L, Sunder SS, Paul SF. Receptors and signaling mechanisms for B-lymphocyte activation, proliferation and differentiation--insights from both in vivo and in vitro approaches. *FEBS Lett.* 2010 Dec 15;584(24):4883-94.
- Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, LaVecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2012. *Ann Oncol.* 2012 Feb.
- Maly FE, Urwyler A, Tengler R, Steinitz M, Golding B, de Weck AL. Oxidative burst in human Epstein-Barr virus-transformed B-cell lines triggered by immobilized specific antigen. *Scand J Immunol.* 1990 Dec;32(6):661-7.
- Manea A, Tanase LI, Raicu M, Simionescu M. Jak/STAT signaling pathway regulates nox1 and nox4-based NADPH oxidase in human aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Jan;30(1):105-12.
- Marcucci G, Haferlach T, Döhner H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol.* 2011 Feb 10;29(5):475-86.
- Marcucci G, Mrózek K, Bloomfield CD. Molecular heterogeneity and prognostic biomarkers in adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics. *Curr Opin Hematol.* 2005 Jan;12(1):68-75.

- Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, Koboldt DC, Fulton RS, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Locke DP, Magrini VJ, Abbott RM, Vickery TL, Reed JS, Robinson JS, Wylie T, Smith SM, Carmichael L, Eldred JM, Harris CC, Walker J, Peck JB, Du F, Dukes AF, Sanderson GE, Brummett AM, Clark E, McMichael JF, Meyer RJ, Schindler JK, Pohl CS, Wallis JW, Shi X, Lin L, Schmidt H, Tang Y, Haipek C, Wiechert ME, Ivy JV, Kalicki J, Elliott G, Ries RE, Payton JE, Westervelt P, Tomasson MH, Watson MA, Baty J, Heath S, Shannon WD, Nagarajan R, Link DC, Walter MJ, Graubert TA, DiPersio JF, Wilson RK, Ley TJ. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med.* 2009 Sep 10;361(11):1058-66.
- Marijt E, Wafelman A, van der Hoorn M, van Bergen C, Bongaerts R, van Luxemburg-Heijs S, van den Muijsenberg J, Wolbers JO, van der Werff N, Willemze R, Falkenburg F. Phase I/II feasibility study evaluating the generation of leukemia-reactive cytotoxic T lymphocyte lines for treatment of patients with relapsed leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2007 Jan;92(1):72-80.
- Marijt WA, Heemskerk MH, Kloosterboer FM, Goulmy E, Kester MG, van der Hoorn MA, van Luxemburg-Heys SA, Hoogeboom M, Mutis T, Drijfhout JW, van Rood JJ, Willemze R, Falkenburg JH. Hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Mar 4;100(5):2742-7.
- Martin PJ. Increased disparity for minor histocompatibility antigens as a potential cause of increased GVHD risk in marrow transplantation from unrelated donors compared with related donors. *Bone Marrow Transplant.* 1991 Sep;8(3):217-23.
- McKallip RJ, Jia W, Schlomer J, Warren JW, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Cannabidiol-induced apoptosis in human leukemia cells: A novel role of cannabidiol in the regulation of p22phox and Nox4 expression. *Mol Pharmacol.* 2006 Sep;70(3):897-908.
- Meissner F, Seger RA, Moshous D, Fischer A, Reichenbach J, Zychlinsky A. Inflammasome activation in NADPH oxidase defective mononuclear phagocytes from patients with chronic granulomatous disease. *Blood.* 2010 Sep 2;116(9):1570-3.
- Meklat F, Zhang Y, Shahriar M, Ahmed SU, Li W, Voukkalis N, Wang Z, Zhang J, Mastulov S, Jewell A, Giannakouros T, Lim SH. Identification of protamine 1 as a novel cancer-testis antigen in early chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2009 Mar;144(5):660-6.
- Mena S, Rodriguez ML, Ortega A, Priego S, Obrador E, Asensi M, Petschen I, Cerda M, Brown BD, Estrela JM. Glutathione and Bcl-2 targeting facilitates elimination by chemoradiotherapy of human A375 melanoma xenografts overexpressing bcl-xl, bcl-2, and mcl-1. *J Transl Med.* 2012 Jan 10;10(1):8.
- Metzeler KH, Hummel M, Bloomfield CD, Spiekermann K, Braess J, Sauerland MC, Heinecke A, Radmacher M, Marcucci G, Whitman SP, Maharry K, Paschka P, Larson RA, Berdel WE, Büchner T, Wörmann B, Mansmann U, Hiddemann W, Bohlander SK, Buske C; Cancer and Leukemia Group B; German AML Cooperative Group. An 86-probe-set gene-expression signature predicts survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood.* 2008 Nov 15;112(10):4193-201.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.* 2004 Jun;56(2):185-229.
- Moldrem J, Dermime S, Parker K, Jiang YZ, Mavroudis D, Hensel N, Fukushima P, Barrett AJ. Targeted T-cell therapy for human leukemia: cytotoxic T lymphocytes specific for a peptide derived from proteinase 3 preferentially lyse human myeloid leukemia cells. *Blood.* 1996 Oct 1;88(7):2450-7.
- Mommaas B, Kamp J, Drijfhout JW, Beekman N, Ossendorp F, Van Veelen P, Den Haan J, Goulmy E, Mutis T. Identification of a novel HLA-B60-restricted T cell epitope of the minor histocompatibility antigen HA-1 locus. *J Immunol.* 2002 Sep 15;169(6):3131-6.
- Montezano AC, Burger D, Ceravolo GS, Yusuf H, Montero M, Touyz RM. Novel Nox homologues in the vasculature: focusing on Nox4 and Nox5. *Clin Sci (Lond).* 2011 Feb;120(4):131-41.
- Moreno MU, San José G, Fortuño A, Beloqui O, Díez J, Zalba G. The C242T CYBA polymorphism of NADPH oxidase is associated with essential hypertension. *J Hypertens.* 2006 Jul;24(7):1299-306.
- Morgan MA, Reuter CW. Molecularly targeted therapies in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Ann Hematol.* 2006 Mar;85(3):139-63.
- Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science.* 2006 Oct 6;314(5796):126-9.
- Morgan RA, Dudley ME, Yu YY, Zheng Z, Robbins PF, Theoret MR, Wunderlich JR, Hughes MS, Restifo NP, Rosenberg SA. High efficiency TCR gene transfer into primary human lymphocytes affords avid recognition of melanoma tumor antigen glycoprotein 100 and does not alter the recognition of autologous melanoma antigens. *J Immunol.* 2003 Sep 15;171(6):3287-95.
- Morris GP, Allen PM. How the TCR balances sensitivity and specificity for the recognition of self and pathogens. *Nat Immunol.* 2012 Jan 19;13(2):121-8.

- Murata M, Warren EH, Riddell SR. A human minor histocompatibility antigen resulting from differential expression due to a gene deletion. *J Exp Med*. 2003 May 19;197(10):1279-89.
- Mutis T, Verdijk R, Schrama E, Esendam B, Brand A, Goulmy E. Feasibility of immunotherapy of relapsed leukemia with ex vivo-generated cytotoxic T lymphocytes specific for hematopoietic system-restricted minor histocompatibility antigens. *Blood*. 1999 Apr 1;93(7):2336-41.
- Naito T, Tanaka H, Naoe Y, Taniuchi I. Transcriptional control of T-cell development. *Int Immunol*. 2011 Nov;23(11):661-8.
- Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol*. 2011 Nov 11;11(12):823-36.
- Neuman E, Huleatt JW, Vargas H, Rupp EE, Jack RM. Regulation of MHC class I synthesis and expression by human neutrophils. *J Immunol*. 1992 Jun 1;148(11):3520-7.
- Niederwieser D, Grassegger A, Auböck J, Herold M, Nachbaur D, Rosenmayr A, Gächter A, Nussbaumer W, Gaggl S, Ritter M, *et al*. Correlation of minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes with graft-versus-host disease status and analyses of tissue distribution of their target antigens. *Blood*. 1993 Apr 15;81(8):2200-8.
- Nishikawa H, Maeda Y, Ishida T, Grnjatic S, Sato E, Mori F, Sugiyama D, Ito A, Fukumori Y, Utsunomiya A, Inagaki H, Old LJ, Ueda R, Sakaguchi S. Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*. 2012 Feb 8.
- Nowak J. Role of HLA in hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2008 Oct;42 Suppl 2:S71-6.
- Ochi T, Fujiwara H, Yasukawa M. Application of adoptive T-cell therapy using tumor antigen-specific T-cell receptor gene transfer for the treatment of human leukemia. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:521248.
- Offringa R. Antigen choice in adoptive T-cell therapy of cancer. *Curr Opin Immunol*. 2009 Apr;21(2):190-9.
- Ofran Y, Ritz J. Targets of tumor immunity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Cancer Res*. 2008 Aug 15;14(16):4997-9.
- Ofran Y, Rowe JM. Induction and postremission strategies in acute myeloid leukemia: what is new? *Curr Opin Hematol*. 2011 Mar;18(2):83-8.
- Olofsson P, Nerstedt A, Hultqvist M, Nilsson EC, Andersson S, Bergelin A, Holmdahl R. Arthritis suppression by NADPH activation operates through an interferon-beta pathway. *BMC Biol*. 2007 May 9;5:19.
- Omay SB, Vogelbaum MA. Current concepts and newer developments in the treatment of malignant gliomas. *Indian J Cancer*. 2009 Apr-Jun;46(2):88-95.
- Orazi A. Histopathology in the diagnosis and classification of acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes, and myelodysplastic/myeloproliferative diseases. *Pathobiology*. 2007;74(2):97-114.
- Overes IM, Fredrix H, Kester MG, Falkenburg JH, van der Voort R, de Witte TM, Dolstra H. Efficient activation of LRH-1-specific CD8+ T-cell responses from transplanted leukemia patients by stimulation with P2X5 mRNA-electroporated dendritic cells. *J Immunother*. 2009 Jul-Aug;32(6):539-51.
- Palacios R. Cyclosporin A abrogates proliferation of T cells and generation of suppressor and cytotoxic T-cell function induced by Epstein-Barr virus. *Immunobiology*. 1981;160(3-4):321-9.
- Palmowski M, Salio M, Dunbar RP, Cerundolo V. The use of HLA class I tetramers to design a vaccination strategy for melanoma patients. *Immunol Rev*. 2002 Oct;188:155-63.
- Pandolfi F, Cianci R, Pagliari D, Casciano F, Bagalà C, Astone A, Landolfi R, Barone C. The immune response to tumors as a tool toward immunotherapy. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:894704.
- Parisi E, Draznin J, Stoopler E, Schuster SJ, Porter D, Sollecito TP. Acute myelogenous leukemia: advances and limitations of treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002 Mar;93(3):257-63.
- Parker KC, Bednarek MA, Coligan JE. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol*. 1994 Jan 1;152(1):163-75.
- Pawelec G. Tumour escape: antitumour effectors too much of a good thing? *Cancer Immunol Immunother*. 2004 Mar;53(3):262-74. Epub 2003 Dec 18.
- Perreault C, Brochu S. Adoptive cancer immunotherapy: discovering the best targets. *J Mol Med (Berl)*. 2002 Apr;80(4):212-8.
- Petrie K, Zelent A, Waxman S. Differentiation therapy of acute myeloid leukemia: past, present and future. *Curr Opin Hematol*. 2009 Mar;16(2):84-91.
- Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester GR, Taschenatlas der Immunologie, Georg Thieme Verlag, 2.Auflage, 2007.
- Pierce RA, Field ED, Mutis T, Golovina TN, Von Kap-Herr C, Wilke M, Pool J, Shabanowitz J, Pettenati MJ, Eisenlohr LC, Hunt DF, Goulmy E, Engelhard VH. The HA-2 minor histocompatibility antigen is derived from a diallelic gene encoding a novel human class I myosin protein. *J Immunol*. 2001 Sep 15;167(6):3223-30.

- Pinto A, Zulian GB, Archimbaud E. Acute myelogenous leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1998 Feb;27(2):161-4.
- Porter CD, Parkar MH, Levinsky RJ, Collins MK, Kinnon C. X-linked chronic granulomatous disease: correction of NADPH oxidase defect by retrovirus-mediated expression of gp91-phox. *Blood.* 1993 Oct 1;82(7):2196-202.
- Potter NS, Harding CV. Neutrophils process exogenous bacteria via an alternate class I MHC processing pathway for presentation of peptides to T lymphocytes. *J Immunol.* 2001 Sep 1;167(5):2538-46.
- Powell JA, Gardner AE, Bais AJ, Hinze SJ, Baker E, Whitmore S, Crawford J, Kochetkova M, Spendlove HE, Doggett NA, Sutherland GR, Callen DF, Kremmidiotis G. Sequencing, transcript identification, and quantitative gene expression profiling in the breast cancer loss of heterozygosity region 16q24.3 reveal three potential tumor-suppressor genes. *Genomics.* 2002 Sep;80(3):303-10.
- Powell JD, Delgoffe GM. The mammalian target of rapamycin: linking T cell differentiation, function, and metabolism. *Immunity.* 2010 Sep 24;33(3):301-11.
- Prendergast GC. Immune escape as a fundamental trait of cancer: focus on IDO. *Oncogene.* 2008 Jun 26;27(28):3889-900.
- Radka SF, Kostyu DD, Amos DB. A monoclonal antibody directed against the HLA-Bw6 epitope. *J Immunol.* 1982 Jun;128(6):2804-6.
- Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NN, Bachor OA, Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 1999 50: 213-219.
- Rebaï N, Malissen B. Structural and genetic analyses of HLA class I molecules using monoclonal xenoantibodies. *Tissue Antigens.* 1983 Aug;22(2):107-17.
- Regis G, Icardi L, Conti L, Chiarle R, Piva R, Giovarelli M, Poli V, Novelli F. IL-6, but not IFN-gamma, triggers apoptosis and inhibits in vivo growth of human malignant T cells on STAT3 silencing. *Leukemia.* 2009 Nov;23(11):2102-8.
- Remans PH, van Oosterhout M, Smeets TJ, Sanders M, Frederiks WM, Reedquist KA, Tak PP, Breedveld FC, van Laar JM. Intracellular free radical production in synovial T lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2005 Jul;52(7):2003-9.
- Rice J, Buchan S, Dewchand H, Simpson E, Stevenson FK. DNA fusion vaccines induce targeted epitope-specific CTLs against minor histocompatibility antigens from a normal or tolerized repertoire. *J Immunol.* 2004 Oct 1;173(7):4492-9.
- Rice J, Dunn S, Piper K, Buchan SL, Moss PA, Stevenson FK. DNA fusion vaccines induce epitope-specific cytotoxic CD8(+) T cells against human leukemia-associated minor histocompatibility antigens. *Cancer Res.* 2006 May 15;66(10):5436-42.
- Ringdén O, Karlsson H, Olsson R, Omazic B, Uhlin M. The allogeneic graft-versus-cancer effect. *Br J Haematol.* 2009 Dec;147(5):614-33.
- Riva G, Luppi M, Barozzi P, Quadrelli C, Basso S, Vallerini D, Zanetti E, Morselli M, Forghieri F, Maccaferri M, Volzone F, Del Giovane C, D'Amico R, Locatelli F, Torelli G, Comoli P, Potenza L. Emergence of BCR-ABL-specific cytotoxic T cells in the bone marrow of patients with Ph+ acute lymphoblastic leukemia during long-term imatinib mesylate treatment. *Blood.* 2010 Feb 25;115(8):1512-8.
- Robinson J, Malik A, Parham P, Bodmer JG, Marsh SG. IMGT/HLA database--a sequence database for the human major histocompatibility complex. *Tissue Antigens.* 2000 Mar;55(3):280-7.
- Robinson J, Mistry K, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SG. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res.* 2011 Jan;39(Database issue):D1171-6.
- Roos D, de Boer M, Kuribayashi F, Meischl C, Weening RS, Segal AW, Ahlin A, Nemet K, Hossle JP, Bernatowska-Matuszkiewicz E, Middleton-Price H. Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood.* 1996 Mar 1;87(5):1663-81.
- Rosinski KV, Fujii N, Mito JK, Koo KK, Xuereb SM, Sala-Torra O, Gibbs JS, Radich JP, Akatsuka Y, Van den Eynde BJ, Riddell SR, Warren EH. DDX3Y encodes a class I MHC-restricted H-Y antigen that is expressed in leukemic stem cells. *Blood.* 2008 May 1;111(9):4817-26.
- Rossi D, Rasi S, Franceschetti S, Capello D, Castelli A, De Paoli L, Ramponi A, Chiappella A, Pogliani EM, Vitolo U, Kwee I, Bertoni F, Conconi A, Gaidano G. Analysis of the host pharmacogenetic background for prediction of outcome and toxicity in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP21. *Leukemia.* 2009 Jun;23(6):1118-26.
- Rowe JM. Optimal induction and post-remission therapy for AML in first remission. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009:396-405.
- Rudd CE, Taylor A, Schneider H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev.* 2009 May;229(1):12-26.

- Rusakiewicz S, Madrigal A, Travers P, Dodi AI. BCR/ABL-specific CD8+ T cells can be detected from CML patients, but are only expanded from healthy donors. *Cancer Immunol Immunother.* 2009 Sep;58(9):1449-57.
- Russell NH. Biology of acute leukaemia. *Lancet.* 1997 Jan 11;349(9045):118-22.
- Sadelain M. T-cell engineering for cancer immunotherapy. *Cancer J.* 2009 Nov-Dec;15(6):451-5.
- Safran M, Dalah I, Alexander J, Rosen N, Iny Stein T, Shmoish M, Nativ N, Bahir I, Doniger T, Krug H, Sirota-Madi A, Olender T, Golan Y, Stelzer G, Harel A, Lancet D. GeneCards Version 3: the human gene integrator. *Database (Oxford).* 2010 Aug 5;2010:baq020.
- Saha A, Robertson ES. Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphomas: pathogenesis and clinical outcomes. *Clin Cancer Res.* 2011 May 15;17(10):3056-63.
- Salter RD, Cresswell P. Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid. *EMBO J.* 1986 May;5(5):943-9.
- San José G, Fortuño A, Beloqui O, Díez J, Zalba G. NADPH oxidase CYBA polymorphisms, oxidative stress and cardiovascular diseases. *Clin Sci (Lond).* 2008 Feb;114(3):173-82.
- Santana MA, Rosenstein Y. What it takes to become an effector T cell: the process, the cells involved, and the mechanisms. *J Cell Physiol.* 2003 Jun;195(3):392-401.
- Sanz MA, Lo-Coco F. Modern approaches to treating acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2011 Feb 10;29(5):495-503.
- Sareila O, Kelkka T, Pizzolla A, Hultqvist M, Holmdahl R. NOX2 complex-derived ROS as immune regulators. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Oct 15;15(8):2197-208.
- Saunders PM, van Endert P. Running the gauntlet: from peptide generation to antigen presentation by MHC class I. *Tissue Antigens.* 2011 Sep;78(3):161-70.
- Schaft N, Dörrie J, Müller I, Beck V, Baumann S, Schunder T, Kämpgen E, Schuler G. A new way to generate cytolytic tumor-specific T cells: electroporation of RNA coding for a T cell receptor into T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother.* 2006 Sep;55(9):1132-41.
- Schaft N, Lankiewicz B, Gratama JW, Bolhuis RL, Debets R. Flexible and sensitive method to functionally validate tumor-specific receptors via activation of NFAT. *J Immunol Methods.* 2003 Sep;280(1-2):13-24.
- Schäppi MG, Jaquet V, Belli DC, Krause KH. Hyperinflammation in chronic granulomatous disease and anti-inflammatory role of the phagocyte NADPH oxidase. *Semin Immunopathol.* 2008 Jul;30(3):255-71.
- Schiffer CA. Acute myeloid leukemia in adults: where do we go from here? *Cancer Chemother Pharmacol.* 2001 Aug;48 Suppl 1:S45-52.
- Schmitt M, Casalegno-Garduño R, Xu X, Schmitt A. Peptide vaccines for patients with acute myeloid leukemia. *Expert Rev Vaccines.* 2009 Oct;8(10):1415-25. [a](#)
- Schmitt TM, Ragnarsson GB, Greenberg PD. T cell receptor gene therapy for cancer. *Hum Gene Ther.* 2009 Nov;20(11):1240-8. [b](#)
- Scholl S, Fricke HJ, Sayer HG, Höffken K. Clinical implications of molecular genetic aberrations in acute myeloid leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009 Apr;135(4):491-505.
- Schoofs T, Müller-Tidow C. DNA methylation as a pathogenic event and as a therapeutic target in AML. *Cancer Treat Rev.* 2011;37 Suppl 1:S13-8.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004 Feb;75(2):163-89.
- Schroeder MA, DiPersio JF. Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Dis Model Mech.* 2011 May;4(3):318-33.
- Schuler MM, Dönnies P, Nastke MD, Kohlbacher O, Rammensee HG, Stevanovic S. SNEP: SNP-derived epitope prediction program for minor H antigens. *Immunogenetics.* 2005 Dec;57(11):816-20.
- Schuurhuis DH, Fu N, Ossendorp F, Melief CJ. Ins and outs of dendritic cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2006;140(1):53-72.
- Sedeek M, Hébert RL, Kennedy CR, Burns KD, Touyz RM. Molecular mechanisms of hypertension: role of Nox family NADPH oxidases. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2009 Mar;18(2):122-7.
- Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol.* 2003 Sep;4(9):835-42.
- Sellami MH, Torjemane L, Arias AE, Kaabi H, Ladeb S, Poli F, Othmane TB, Hmida S. Does minor histocompatibility antigen HA-1 disparity affect the occurrence of graft-versus-host disease in tunisian recipients of hematopoietic stem cells? *Clinics (Sao Paulo).* 2010;65(11):1099-103.
- Shah M, Agarwal B. Recent advances in management of acute myeloid leukemia (AML). *Indian J Pediatr.* 2008 Aug;75(8):831-7.

- Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, McLaughlin NJ, Banerjee A, Silliman CC. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc Biol.* 2005 Nov;78(5):1025-42.
- Shimizu Y, DeMars R. Production of human cells expressing individual transferred HLA-A,-B,-C genes using an HLA-A,-B,-C null human cell line. *J Immunol.* 1989 May 1;142(9):3320-8.
- Shimo-Nakanishi Y, Hasebe T, Suzuki A, Mochizuki H, Nomiya T, Tanaka Y, Nagaoka I, Mizuno Y, Urabe T. Functional effects of NAD(P)H oxidase p22(phox) C242T mutation in human leukocytes and association with thrombotic cerebral infarction. *Atherosclerosis.* 2004 Jul;175(1):109-15.
- Sijts EJ, Kloetzel PM. The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. *Cell Mol Life Sci.* 2011 May;68(9):1491-502.
- Skipper JC, Hendrickson RC, Gulden PH, Brichard V, Van Pel A, Chen Y, Shabanowitz J, Wolfel T, Slingluff CL Jr, Boon T, Hunt DF, Engelhard VH. An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J Exp Med.* 1996 Feb 1;183(2):527-34.
- Slager EH, Honders MW, van der Meijden ED, van Luxemburg-Heijs SA, Kloosterboer FM, Kester MG, Jedema I, Marijt WA, Schaafsma MR, Willemze R, Falkenburg JH. Identification of the angiogenic endothelial-cell growth factor-1/thymidine phosphorylase as a potential target for immunotherapy of cancer. *Blood.* 2006 Jun 15;107(12):4954-60.
- Slifka MK, Whitton JL. Functional avidity maturation of CD8(+) T cells without selection of higher affinity TCR. *Nat Immunol.* 2001 Aug;2(8):711-7.
- Soccio M, Toniato E, Evangelista V, Carluccio M, De Caterina R. Oxidative stress and cardiovascular risk: the role of vascular NAD(P)H oxidase and its genetic variants. *Eur J Clin Invest.* 2005 May;35(5):305-14.
- Solache A, Morgan CL, Dodi AI, Morte C, Scott I, Baboonian C, Zal B, Goldman J, Grundy JE, Madrigal JA. Identification of three HLA-A*0201-restricted cytotoxic T cell epitopes in the cytomegalovirus protein pp65 that are conserved between eight strains of the virus. *J Immunol.* 1999 Nov 15;163(10):5512-8.
- Spaapen RM, Lokhorst HM, van den Oudenalder K, Otterud BE, Dolstra H, Leppert MF, Minnema MC, Bloem AC, Mutis T. Toward targeting B cell cancers with CD4+ CTLs: identification of a CD19-encoded minor histocompatibility antigen using a novel genome-wide analysis. *J Exp Med.* 2008 Nov 24;205(12):2863-72.
- Spierings E, Brickner AG, Caldwell JA, Zegveld S, Tatsis N, Blokland E, Pool J, Pierce RA, Mollah S, Shabanowitz J, Eisenlohr LC, van Veelen P, Ossendorp F, Hunt DF, Goulmy E, Engelhard VH. The minor histocompatibility antigen HA-3 arises from differential proteasome-mediated cleavage of the lymphoid blast crisis (Lbc) oncoprotein. *Blood.* 2003 Jul 15;102(2):621-9.
- Spierings E, Goulmy E. Expanding the immunotherapeutic potential of minor histocompatibility antigens. *J Clin Invest.* 2005 Dec;115(12):3397-400.
- Spierings E, Hendriks M, Absi L, Canossi A, Chhaya S, Crowley J, Dolstra H, Eliaou JF, Ellis T, Enczmann J, Fasano ME, Gervais T, Gorodezky C, Kircher B, Laurin D, Leffell MS, Loiseau P, Malkki M, Markiewicz M, Martinetti M, Maruya E, Mehra N, Oguz F, Oudshoorn M, Pereira N, Rani R, Sergeant R, Thomson J, Tran TH, Turpeinen H, Yang KL, Zunec R, Carrington M, de Knijff P, Goulmy E. Phenotype frequencies of autosomal minor histocompatibility antigens display significant differences among populations. *PLoS Genet.* 2007 Jun;3(6):e103.
- Stölzel E, Hackmann K, Kuitan F, Mohr B, Füssel M, Oelschlägel U, Thiede C, Röllig C, Platzbecker U, Schetelig J, Illmer T, Schaich M, Seliger B, Hartmann A, Baretton G, Zietz C, Ehninger G, Schrock E, Bornhäuser M. Clonal Evolution Including Partial Loss of Human Leukocyte Antigen Genes Favoring Extramedullary Acute Myeloid Leukemia Relapse After Matched Related Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Transplantation.* 2012 Feb 6.
- Stone RM, O'Donnell MR, Sekeres MA. Acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2004:98-117.
- Stone RM. Novel therapeutic agents in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol.* 2007 Apr;35(4 Suppl 1):163-6.
- Subramaniam DS, Fowler DH, Pavletic SZ. Chronic graft-versus-host disease in the era of reduced-intensity conditioning. *Leukemia.* 2007 May;21(5):853-9.
- Sumimoto H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J.* 2008 Jul;275(13):3249-77.
- Swain SL. Regulation of the generation and maintenance of T-cell memory: a direct, default pathway from effectors to memory cells. *Microbes Infect.* 2003 Mar;5(3):213-9.
- Tahara T, Arisawa T, Shibata T, Nakamura M, Wang F, Yoshioka D, Okubo M, Maruyama N, Kamano T, Kamiya Y, Nakamura M, Fujita H, Nagasaka M, Iwata M, Takahama K, Watanabe M, Yamashita H, Nakano H, Hirata I. Genetic variant of the p22PHOX component of NADPH oxidase C242T and the incidence of gastric cancer in Japan. *Hepatogastroenterology.* 2008 Nov-Dec;55(88):2273-6.

- Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005 Aug 15;106(4):1154-63.
- Taylor PA, Lees CJ, Fournier S, Allison JP, Sharpe AH, Blazar BR. B7 expression on T cells down-regulates immune responses through CTLA-4 ligation via T-T interactions [corrections]. *J Immunol*. 2004 Jan 1;172(1):34-9.
- Thayer TC, Delano M, Liu C, Chen J, Padgett LE, Tse HM, Annamali M, Piganelli JD, Moldawer LL, Mathews CE. Superoxide production by macrophages and T cells is critical for the induction of autoreactivity and type 1 diabetes. *Diabetes*. 2011 Aug;60(8):2144-51.
- Thomas S, Xue SA, Cesco-Gaspere M, San José E, Hart DP, Wong V, Debets R, Alarcon B, Morris E, Stauss HJ. Targeting the Wilms tumor antigen 1 by TCR gene transfer: TCR variants improve tetramer binding but not the function of gene modified human T cells. *J Immunol*. 2007 Nov 1;179(9):5803-10.
- Tian F, Yang L, Lv F, Yang Q, Zhou P. In silico quantitative prediction of peptides binding affinity to human MHC molecule: an intuitive quantitative structure-activity relationship approach. *Amino Acids*. 2009 Mar;36(3):535-54.
- Torikai H, Akatsuka Y, Miyazaki M, Tsujimura A, Yatabe Y, Kawase T, Nakao Y, Tsujimura K, Motoyoshi K, Morishima Y, Koderu Y, Kuzushima K, Takahashi T. The human cathepsin H gene encodes two novel minor histocompatibility antigen epitopes restricted by HLA-A*3101 and -A*3303. *Br J Haematol*. 2006 Aug;134(4):406-16.
- Tse HM, Thayer TC, Steele C, Cuda CM, Morel L, Piganelli JD, Mathews CE. NADPH oxidase deficiency regulates Th lineage commitment and modulates autoimmunity. *J Immunol*. 2010 Nov 1;185(9):5247-58.
- Uckert W, Schumacher TN. TCR transgenes and transgene cassettes for TCR gene therapy: status in 2008. *Cancer Immunol Immunother*. 2009 May;58(5):809-22.
- Uhlén M, Björling E, Agaton C, Szigyarto CA, Amini B, Andersen E, Andersson AC, Angelidou P, Asplund A, Asplund C, Berglund L, Bergström K, Brumer H, Cerjan D, Ekström M, Elobeid A, Eriksson C, Fagerberg L, Falk R, Fall J, Forsberg M, Björklund MG, Gumbel K, Halimi A, Hallin I, Hamsten C, Hansson M, Hedhammar M, Hercules G, Kampf C, Larsson K, Lindskog M, Lodewyckx W, Lund J, Lundberg J, Magnusson K, Malm E, Nilsson P, Odling J, Oksvold P, Olsson I, Oster E, Ottosson J, Paavilainen L, Persson A, Rimini R, Rockberg J, Runeson M, Sivertsson A, Sköllerö M, Steen J, Stenvall M, Sterky F, Strömberg S, Sundberg M, Tegel H, Tourle S, Wahlund E, Waldén A, Wan J, Wernérus H, Westberg J, Wester K, Wrethagen U, Xu LL, Hober S, Pontén F. A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2005 Dec;4(12):1920-32.
- Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, Lundberg E, Jonasson K, Forsberg M, Zwahlen M, Kampf C, Wester K, Hober S, Wernerus H, Björling L, Pontén F. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nat Biotechnol*. 2010 Dec;28(12):1248-50.
- Ushio-Fukai M, Nakamura Y. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Lett*. 2008 Jul 18;266(1):37-52.
- Vago L, Perna SK, Zanussi M, Mazzi B, Barlassina C, Stanghellini MT, Perrelli NF, Cosentino C, Torri F, Angius A, Forno B, Casucci M, Bernardi M, Peccatori J, Corti C, Bondanza A, Ferrari M, Rossini S, Roncarolo MG, Bordignon C, Bonini C, Ciceri F, Fleischhauer K. Loss of mismatched HLA in leukemia after stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2009 Jul 30;361(5):478-88.
- Van Der Logt EM, Janssen CH, Van Hooijdonk Z, Roelofs HM, Wobbes T, Nagengast FM, Peters WH. No association between genetic polymorphisms in NAD(P)H oxidase p22phox and paraoxonase 1 and colorectal cancer risk. *Anticancer Res*. 2005 Mar-Apr;25(2B):1465-70.
- van Loenen MM, de Boer R, Hagedoorn RS, van Egmond EH, Falkenburg JH, Heemskerk MH. Optimization of the HA-1-specific T-cell receptor for gene therapy of hematologic malignancies. *Haematologica*. 2011 Mar;96(3):477-81.
- van Loenen MM, Hagedoorn RS, Kester MG, Hoogeboom M, Willemze R, Falkenburg JH, Heemskerk MH. Kinetic preservation of dual specificity of coprogrammed minor histocompatibility antigen-reactive virus-specific T cells. *Cancer Res*. 2009 Mar 1;69(5):2034-41.
- van Spriël AB, Leusen JH, van Egmond M, Dijkman HB, Assmann KJ, Mayadas TN, van de Winkel JG. Mac-1 (CD11b/CD18) is essential for Fc receptor-mediated neutrophil cytotoxicity and immunologic synapse formation. *Blood*. 2001 Apr 15;97(8):2478-86.
- Vaquero EC, Edderkaoui M, Pandolfi SJ, Gukovsky I, Gukovskaya AS. Reactive oxygen species produced by NAD(P)H oxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem*. 2004 Aug 13;279(33):34643-54.
- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002 Oct 1;100(7):2292-302.
- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009 Jul 30;114(5):937-51.

- Vardiman JW. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chem Biol Interact*. 2010 Mar 19;184(1-2):16-20.
- Vibhuti A, Arif E, Mishra A, Deepak D, Singh B, Rahman I, Mohammad G, Pasha MA. CYP1A1, CYP1A2 and CYBA gene polymorphisms associated with oxidative stress in COPD. *Clin Chim Acta*. 2010 Apr 2;411(7-8):474-80.
- Viedt C, Fei J, Krieger-Brauer HI, Brandes RP, Teupser D, Kamimura M, Katus HA, Kreuzer J. Role of p22phox in angiotensin II and platelet-derived growth factor AA induced activator protein 1 activation in vascular smooth muscle cells. *J Mol Med (Berl)*. 2004 Jan;82(1):31-8.
- Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 2002 Sep;59(9):1428-59.
- Vigneron N, Van den Eynde BJ. Insights into the processing of MHC class I ligands gained from the study of human tumor epitopes. *Cell Mol Life Sci*. 2011 May;68(9):1503-20.
- Vincent K, Roy DC, Perreault C. Next-generation leukemia immunotherapy. *Blood*. 2011 Sep 15;118(11):2951-9.
- Visani G, Olivieri A, Malagola M, Brunori M, Piccaluga PP, Capelli D, Pomponio G, Martinelli G, Isidori A, Sparaventi G, Leoni P. Consolidation therapy for adult acute myeloid leukemia: a systematic analysis according to evidence based medicine. *Leuk Lymphoma*. 2006 Jun;47(6):1091-102.
- Volkman DJ, Buescher ES, Gallin JI, Fauci AS. B cell lines as models for inherited phagocytic diseases: abnormal superoxide generation in chronic granulomatous disease and giant granules in Chediak-Higashi syndrome. *J Immunol*. 1984 Dec;133(6):3006-9.
- von Löhneysen K, Noack D, Jesaitis AJ, Dinauer MC, Knaus UG. Mutational analysis reveals distinct features of the Nox4-p22 phox complex. *J Biol Chem*. 2008 Dec 12;283(50):35273-82.
- Voss RH, Thomas S, Pfirschke C, Hauptrock B, Klobuch S, Kuball J, Grabowski M, Engel R, Guillaume P, Romero P, Huber C, Beckhove P, Theobald M. Coexpression of the T-cell receptor constant alpha domain triggers tumor reactivity of single-chain TCR-transduced human T cells. *Blood*. 2010 Jun 24;115(25):5154-63.
- Wang D, Youngson C, Wong V, Yeger H, Dinauer MC, Vega-Saenz Miera E, Rudy B, Cutz E. NADPH-oxidase and a hydrogen peroxide-sensitive K⁺ channel may function as an oxygen sensor complex in airway chemoreceptors and small cell lung carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 12;93(23):13182-7.
- Wang SS, Bratti MC, Rodríguez AC, Herrero R, Burk RD, Porras C, González P, Sherman ME, Wacholder S, Lan ZE, Schiffman M, Chanock SJ, Hildesheim A. Common variants in immune and DNA repair genes and risk for human papillomavirus persistence and progression to cervical cancer. *J Infect Dis*. 2009 Jan 1;199(1):20-30.
- Wang SS, Davis S, Cerhan JR, Hartge P, Severson RK, Cozen W, Lan Q, Welch R, Chanock SJ, Rothman N. Polymorphisms in oxidative stress genes and risk for non-Hodgkin lymphoma. *Carcinogenesis*. 2006 Sep;27(9):1828-34.
- Wang Z, Zhang Y, Liu H, Salati E, Chiriva-Internati M, Lim SH. Gene expression and immunologic consequence of SPAN-Xb in myeloma and other hematologic malignancies. *Blood*. 2003 Feb 1;101(3):955-60.
- Wang Z, Zhang Y, Mandal A, Zhang J, Giles FJ, Herr JC, Lim SH. The spermatozoa protein, SLLP1, is a novel cancer-testis antigen in hematologic malignancies. *Clin Cancer Res*. 2004 Oct 1;10(19):6544-50.
- Warren EH, Fujii N, Akatsuka Y, Chaney CN, Mito JK, Loeb KR, Gooley TA, Brown ML, Koo KK, Rosinski KV, Ogawa S, Matsubara A, Appelbaum FR, Riddell SR. Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Blood*. 2010 May 13;115(19):3869-78.
- Warren EH, Vigneron NJ, Gavin MA, Coulie PG, Stroobant V, Dalet A, Tykodi SS, Xuereb SM, Mito JK, Riddell SR, Van den Eynde BJ. An antigen produced by splicing of noncontiguous peptides in the reverse order. *Science*. 2006 Sep 8;313(5792):1444-7.
- Ways JP, Parham P. The binding of monoclonal antibodies to cell-surface molecules. A quantitative analysis with immunoglobulin G against two alloantigenic determinants of the human transplantation antigen HLA-A2. *Biochem J*. 1983 Nov 15;216(2):423-32.
- Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*. 2006 Jun;24(6):677-88.
- Wenandy L, Kollgaard T, Letsch A, Andersen RS, Stather D, Seremet T, Svane IM, Vindeløv L, Andersen MH, thor Straten P. The 1170 A-P single-nucleotide polymorphism (SNP) in the Her-2/neu protein (HER2) as a minor histocompatibility antigen (mHag). *Leukemia*. 2009 Oct;23(10):1926-9.
- Wojnowski L, Kulle B, Schirmer M, Schlüter G, Schmidt A, Rosenberger A, Vonhof S, Bickeböller H, Toliat MR, Suk EK, Tzvetkov M, Kruger A, Seifert S, Kloess M, Hahn H, Loeffler M, Nürnberg P, Pfreundschuh M,

- Trümper L, Brockmöller J, Hasenfuss G. NAD(P)H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Circulation*. 2005 Dec 13;112(24):3754-62.
- Wölfel C, Lennerz V, Lindemann E, Hess G, Derigs HG, Huber C, Herr W, Wölfel T. Dissection and molecular analysis of alloreactive CD8+ T cell responses in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Immunol Immunother*. 2008 Jun;57(6):849-57.
- Wölfel T, Van Pel A, Brichard V, Schneider J, Seliger B, Meyer zum Büschenfelde KH, Boon T. Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1994 Mar;24(3):759-64.
- Wu M, Tang SL, Zang RJ, Yu H. Selective killing of tumor cells in vitro by an immunotoxin composed of ricin and monoclonal antibody against Ia antigen. *Int J Immunopharmacol*. 1990;12(2):235-9.
- Wyche KE, Wang SS, Griendling KK, Dikalov SI, Austin H, Rao S, Fink B, Harrison DG, Zafari AM. C242T CYBA polymorphism of the NADPH oxidase is associated with reduced respiratory burst in human neutrophils. *Hypertension*. 2004 Jun;43(6):1246-51.
- Xue SA, Gao L, Hart D, Gillmore R, Qasim W, Thrasher A, Apperley J, Engels B, Uckert W, Morris E, Stauss H. Elimination of human leukemia cells in NOD/SCID mice by WT1-TCR gene-transduced human T cells. *Blood*. 2005 Nov 1;106(9):3062-7.
- Yagisawa M, Yuo A, Yonemaru M, Imajoh-Ohmi S, Kanegasaki S, Yazaki Y, Takaku F. Superoxide release and NADPH oxidase components in mature human phagocytes: correlation between functional capacity and amount of functional proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Nov 12;228(2):510-6.
- Yang S, Cohen CJ, Peng PD, Zhao Y, Cassard L, Yu Z, Zheng Z, Jones S, Restifo NP, Rosenberg SA, Morgan RA. Development of optimal bicistronic lentiviral vectors facilitates high-level TCR gene expression and robust tumor cell recognition. *Gene Ther*. 2008 Nov;15(21):1411-23.
- Yang S, Dudley ME, Rosenberg SA, Morgan RA. A simplified method for the clinical-scale generation of central memory-like CD8+ T cells after transduction with lentiviral vectors encoding antitumor antigen T-cell receptors. *J Immunother*. 2010 Jul-Aug;33(6):648-58.
- Yassai MB, Naumov YN, Naumova EN, Gorski J. A clonotype nomenclature for T cell receptors. *Immunogenetics*. 2009 Jul;61(7):493-502.
- Yin CC, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE. Recent advances in the diagnosis and classification of myeloid neoplasms--comments on the 2008 WHO classification. *Int J Lab Hematol*. 2010 Oct;32(5):461-76.
- Yokoyama M, Inoue N, Kawashima S. Role of the vascular NADH/NADPH oxidase system in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2000 May;902:241-7; discussion 247-8.
- Zalba G, San José G, Moreno MU, Fortuño A, Díez J. NADPH oxidase-mediated oxidative stress: genetic studies of the p22(phox) gene in hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 2005 Sep-Oct;7(9-10):1327-36.
- Zekry D, Epperson TK, Krause KH. A role for NOX NADPH oxidases in Alzheimer's disease and other types of dementia? *IUBMB Life*. 2003 Jun;55(6):307-13.
- Zhang N, Bevan MJ. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity*. 2011 Aug 26;35(2):161-8.
- Zhang P, Chen BJ, Chao NJ. Prevention of GVHD without losing GVL effect: windows of opportunity. *Immunol Res*. 2011 Apr;49(1-3):49-55.
- Zhao Y, Zheng Z, Cohen CJ, Gattinoni L, Palmer DC, Restifo NP, Rosenberg SA, Morgan RA. High-efficiency transfection of primary human and mouse T lymphocytes using RNA electroporation. *Mol Ther*. 2006 Jan;13(1):151-9.
- Zhao Y, Zheng Z, Robbins PF, Khong HT, Rosenberg SA, Morgan RA. Primary human lymphocytes transduced with NY-ESO-1 antigen-specific TCR genes recognize and kill diverse human tumor cell lines. *J Immunol*. 2005 Apr 1;174(7):4415-23.
- Zhu Y, Marchal CC, Casbon AJ, Stull N, von Löhneysen K, Knaus UG, Jesaitis AJ, McCormick S, Nauseef WM, Dinauer MC. Deletion mutagenesis of p22phox subunit of flavocytochrome b558: identification of regions critical for gp91phox maturation and NADPH oxidase activity. *J Biol Chem*. 2006 Oct 13;281(41):30336-46.
- Ziegler HK, Unanue ER. Decrease in macrophage antigen catabolism caused by ammonia and chloroquine is associated with inhibition of antigen presentation to T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Jan;79(1):175-8.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Identifizierung und Charakterisierung von Zielantigenen alloreaktiver zytotoxischer T-Zellen mittels cDNA-Bank-Expressionsklonierung in akuten myeloischen Leukämien“ selbständig verfasst und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Mainz, den 14.Juni 2012

S.Domning

Danksagung

Lebenslauf