

**Evaluation der Leukämie-Reaktivität von
PRAME- und p53-spezifischen T-Zellen
bei lymphohämatopoetischen Neoplasien
im Rahmen einer adoptiven Immuntherapie**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Julia Hoffmann

geb. am 25.09.1979 in Wuppertal

Mainz, im Dezember 2008

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung:

29.06.2009

**Was wir am nötigsten brauchen,
ist ein Mensch, der uns zwingt,
das zu tun, was wir können.**

R.W. Emerson (1803-82)

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Thesis selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Thesis angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung der Johannes Gutenberg - Universität Mainz zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis niedergelegt sind, eingehalten.

Ort, Datum

Julia Hoffmann

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	4
1.1.	Entstehung lymphohämatopoetischer Neoplasien am Beispiel der akuten myeloischen Leukämie.....	4
1.2.	Die Immuntherapie zur Behandlung von hämatologischen Erkrankungen.....	6
1.3.	Tumor-/Leukämie-assoziierte Antigene (TAA).....	8
1.3.1.	PRAME.....	9
1.3.2.	MPP11.....	11
1.4.	Phänotypische und funktionelle Merkmale von T-Lymphozyten.....	13
1.5.	Fragestellung.....	15
2.	Material und Methoden	16
2.1.	Material.....	16
2.1.1.	Chemikalien und Reagenzien.....	16
2.1.2.	Medien und Puffer.....	18
2.1.2.1.	Medien für die Zellkultur.....	18
2.1.2.2.	Medium zur Kryokonservierung.....	19
2.1.2.3.	Puffer für die Gelelektrophorese.....	19
2.1.2.4.	Puffer für FACS Analysen.....	20
2.1.3.	Komponenten für die Kultivierung von Bakterien.....	20
2.1.4.	Kommerzielle Kits.....	20
2.1.5.	Enzyme.....	21
2.1.6.	Primer und Vektoren.....	21
2.1.7.	Peptide.....	22
2.1.8.	Zelllinien und Transfektanten.....	23
2.1.9.	Versuchstiere.....	24
2.1.10.	Geräte.....	25
2.1.11.	Verbrauchsmaterialien.....	25
2.2.	Methoden.....	27
2.2.1.	Molekulargenetische Methoden.....	27
2.2.1.1.	DNS- und RNS-Isolation.....	27
2.2.1.2.	Fotometrische Bestimmung des DNS- bzw. RNS Gehalts.....	27
2.2.1.3.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	27
2.2.1.4.	Reverse Transkription.....	29
2.2.1.5.	Real-Time-PCR (RT-PCR).....	30
2.2.1.6.	Gelelektrophorese.....	31
2.2.1.7.	Glycerol-Stocks.....	32
2.2.1.8.	Transformation und Plasmid-Präparation.....	32
2.2.1.9.	Linearisierung.....	32
2.2.1.10.	Elektroporation.....	33

2.2.2.	Durchflußzytometrie (FACS).....	34
2.2.3.	Gewinnung von murinen Blutproben.....	35
2.2.4.	Zellkulturtechnische Methoden.....	36
2.2.4.1.	Chirurgische Entnahme von Organen.....	36
2.2.4.2.	Kryokonservierung von Zellen.....	36
2.2.4.3.	Passagieren von Zelllinien.....	37
2.2.4.4.	Kultivierung von murinen, peptidspezifischen T-Zellen.....	37
2.2.4.5.	CD56-Depletion mittels direkter MACS-Separation.....	37
2.2.4.6.	Gewinnung von CD34 ⁺ Zellen mittels MACS.....	38
2.2.5.	Chromfreisetzungstest.....	39
2.2.5.1.	CFSE-Test.....	40
2.2.5.2.	Konkurrenz-Test zur Bestimmung der Peptidbindungs-Affinität synthetischer Peptide an HLA-A2.1.....	41
2.2.6.	Peptid-Immunisierungen bei Mäusen zur Generierung peptidspezifischer ZTL.....	42
2.2.7.	Induktion verschiedener spezifischer, muriner Tumore in NOD/SCID γ ^{null} Mäusen.....	42
2.2.7.1.	Applikation p53- und PRAME-spezifischer ZTL als Ansatz der Tumorbekämpfung.....	43
2.2.7.2.	Ex vivo Expansion Tumor-spezifischer ZTL.....	44
2.2.8.	Etablierung einer AML in NOD/SCID/IL2 γ ^{null} Mäusen.....	45
2.2.8.1.	ZTL als Mittel der Immuntherapie bei einer AML.....	46
3.	Ergebnisse	47
3.1.	Untersuchung zur PRAME-Expression in AML Proben und Geweben.....	47
3.2.	Theoretische Selektion potenziell HLA-A2.1-bindender PRAME- und MPP11-Peptide.....	53
3.2.1.	Bindung selektierter synthetischer PRAME- und MPP11-Peptide an HLA-A2.....	54
3.3.	Generierung von PRAME- und MPP11-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen in transgenen Mäusen.....	57
3.3.1.	PRAME ₁₀₀₋₁₀₈ -spezifische CD8 ⁺ T-Zellen: HLA-A2 Restriktion, Peptidspezifität.....	61
3.3.2.	Erkennung von Zelllinien mit endogen prozessiertem PRAME.....	63
3.4.	Zytolytische Aktivität von PRAME-, p53- und HLA-A2-T-Zellen gegen AML-Material.....	66
3.5.	Generierung von p53- und PRAME-Transfektanten.....	74
3.6.	Etablierung eines Tumor-Maus-Modells.....	80
3.7.	Etablierung eines AML-Modells in NOD/SCID/IL2 γ ^{null} Mäusen.....	87
3.7.1.	Zytolytische Aktivität der p53- und PRAME-T-Zellen im in vivo AML-Modell.....	91
4.	Diskussion	94

4.1.	Generierung und funktionelle Analysen ausgewählter PRAME- und MPP11-Peptide.....	94
4.2.	In vivo Modelle zur Charakterisierung der GVT/GVL-Reaktivität von PRAME- und p53-ZTL.....	97
4.3.	Klinische Relevanz.....	101
5.	Zusammenfassung.....	105
6.	Literaturverzeichnis.....	107
7.	Abkürzungen.....	119
8.	Danksagung.....	122
9.	Lebenslauf und Veröffentlichungen.....	123

1. Einleitung

1.1. Entstehung lymphohämatopoetischer Neoplasien am Beispiel der akuten myeloischen Leukämie

Transformierte Zellen, die unkontrolliertes Wachstum zeigen und im Körper metastasieren können, führen zu Tumoren.

Verschiedene Agentien sind in der Lage, zelluläre Transformation auf DNS-Level zu induzieren und werden daher kanzerogene Substanzen genannt (wie z. B. ultraviolettes Licht, freie Radikale, verschiedene organische und anorganische Chemikalien und eine Vielzahl von Viren [1]). Wachstum und Ausbreitung von Tumoren ist durch die proliferative Kapazität der Zellen, sowie ihrer Fähigkeit in Wirtsgewebe einzudringen und mit Nährstoffen versorgt zu werden, verbunden. Obwohl das Immunsystem in der Lage ist, gegen eine Vielzahl von Tumoren zu reagieren, gelingt es Tumorzellen häufig durch Modulation der eigenen Zelloberfläche den Mechanismen zu entkommen bzw. diese zu verhindern („Immunescape“) [2].

Tumorerkrankungen sind eines der größten Gesundheitsprobleme weltweit und ein Hauptgrund für hohe Sterblichkeitszahlen bei Erwachsenen und Kindern. Neben Tumorerkrankungen spielen auch hämatologische Erkrankungen, wie die chronische myeloische und die akute myeloische Leukämie eine Rolle.

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist charakterisiert durch eine Entartung von Vorläuferzellen des myeloischen Systems. Durch genetische Veränderungen verlieren die Zellen die Fähigkeit zur Reifung und unterliegen damit keinen internen Kontrollmechanismen wie Zellwachstum und Differenzierung mehr [3].

Innerhalb des Knochenmarks kommt es durch die abnorme Vermehrung der Leukämiezellen (AML-Blasten) zu Veränderungen und Verdrängung der normalen Hämatopoese. Die jährliche Inzidenz der AML kann nur vermutet werden, da einheitliche Register fehlen. Es wird angenommen, dass die AML ca. 80 % aller akuten Leukämien ausmacht (Kompetenznetz „Akute und chronische Leukämien“). Verlässlichere Zahlen gibt es in den USA, wo die Inzidenz 2,4 pro 100 000 Einwohner beträgt und ab einem Alter von über 65 Jahren auf 12,6 pro 100 000 Einwohner steigt. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt bei unter 15 % für >65 jährige und die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten unter 65 Jahren liegt bei gerade einmal 40 %. Mit steigendem Alter, zum Zeitpunkt der Diagnose, sinkt damit die Überlebenswahrscheinlichkeit rapide ab [4].

Verschiedene Risikofaktoren, wie ionisierende Strahlung und verschiedene Chemikalien, können zur Entstehung einer AML führen. Über den Zusammenhang zwischen erblichen Faktoren und der Entstehung der AML wird diskutiert.

Die Diagnose einer AML basiert auf zytomorphologischen (Blut- und Knochenmarkausstriche) und zytochemischen (z. B. Myeloperoxidase-Reaktion) Beurteilungen.

Die meist genutzte Methode zur Klassifizierung der AML ist die French-American-British (FAB) Gruppierung [5, 6]. Hierbei werden Subtypen (M0, M3v, M4eo bis M7) hinsichtlich ihrer leukämischen Zelldifferenzierung unterschieden.

So ist zum Beispiel das Stadium der FAB-Klassifizierung M0 durch Blasten mit einer minimalen myeloischen Differenzierung gekennzeichnet und tritt in einer Häufigkeit von 2 bis 3 % auf. AML mit einer Einstufung in eine M1-Klassifizierung sind durch wenige ausdifferenzierte Blasten gekennzeichnet und treten mit einer Häufigkeit zwischen 15 bis 20 % auf. Mit steigender FAB-Gruppe steigen Differenzierungsgrad und Anzahl der Blasten. AML der Gruppen M2 und M4 sind mit bis zu 30 % am häufigsten vertreten [3]. Auch immunologische Techniken werden zur Unterscheidung der FAB-Klassen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene chromosomale Veränderungen sowie die Abstammungslinie der AML-Blasten mit einem spezifischen FAB-Typ assoziiert sind [7]. Die Transformation der Blasten geschieht aufgrund genetischer Veränderungen in hämatopoetischen Progenitorzellen. Wie alle malignen Erkrankungen sind akute Leukämien das Ergebnis mehrstufiger Prozesse, bei denen durch somatische Mutationen in den Progenitorzellen zelluläre Regulationsmechanismen ausgeschaltet werden, die normalerweise die Zahl und den Differenzierungsgrad der Zellen regulieren. Chromosomale Aberrationen und Translokationen spielen hierbei eine große Rolle. Mutationen in Genen, die vor allem an der Proliferation, der Differenzierung und am programmierten Zelltod (Apoptose) beteiligt sind, sind in der Pathogenese von Leukämien identifiziert worden. Chromosomenanomalien finden sich in 70 % der Leukämien, hier insbesondere Translokationen, Inversionen, Insertionen und Deletionen [3].

Die Therapie einer AML setzt sich zusammen aus einer Chemotherapie und einer damit assoziierten Behandlung von opportunistischen Infektionen. Erstere bewirkt die myeloablativ Beseitigung sowohl der leukämischen Blasten als auch der normalen Hämatopoese aus dem Knochenmark, die im Folgenden durch eine Transplantation ersetzt werden muss. Ein erheblicher Teil der Patienten mit neu diagnostizierter AML ist jedoch altersbedingt oder aufgrund von Begleiterkrankungen für eine derartige, mit signifikanter Toxizität verbundene Therapie nicht geeignet. In dieser zunehmend wachsenden Gruppe sind nur eingeschränkte Therapiemöglichkeiten vorhanden.

Viele Krebserkrankungen und fast alle hämatologischen Erkrankungen sind mit dem heutigen Stand der Forschung und Behandlungsmethoden nicht dauerhaft heilbar. Somit stellt die Theorie der adaptiven Immuntherapie, welche gezielt gegen Leukämie- bzw. Tumor-assoziierte Antigene gerichtet ist, ein hoffnungsvolles Ziel der heutigen Forschung dar.

1.2. Die Immuntherapie zur Behandlung von hämatologischen Erkrankungen

Der Einsatz von T-Lymphozyten als immuntherapeutisches Mittel bei malignen Erkrankungen ist experimentell und klinisch belegt und am besten im Bereich der allogenen hämatopoetischen Stammzell-Transplantation (HSZT) untersucht worden.

Die HSZT stellt heute eine effektive und Erfolg versprechende Therapie für Patienten mit hämatologischen Erkrankungen, wie zum Beispiel der akuten myeloischen Leukämie (AML), der chronischen myeloiden Leukämie (CML) und den multiplen Myelomen dar.

Die potenziell kurative Wirkung einer HSZT beruht bei hämatologischen Erkrankungen sowie einigen soliden Tumorerkrankungen [8, 9] auf einem immunologischen Effekt, der 1979 erstmals von "Weiden und Mitarbeitern" beschrieben wurde.

Nach erfolgreicher Hochdosis-Therapie oder Bestrahlungstherapie mit Ablation der Empfänger-Hämatopoese wird durch fremde (allogene) Stammzellen (CD34⁺) eine neue Hämatopoese initiiert. Dieser, so genannte Transplantat-gegen-Tumor- bzw. Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt (*graft-versus-tumor/leukemia*, GVT/GVL), beruht auf der Erkennung maligner Zellen durch die vom Spender übertragenen T-Lymphozyten bzw. natürliche Killerzellen (NK-Zellen) innerhalb des Transplantats.

Essenziell für die GVT/L-Reaktion ist die Erkennung von Tumor- bzw. Leukämie-assoziierten Antigenen (TAA/LAA) oder Minor-Histokompatibilitäts Antigenen (mHA) durch zytotoxische T-Zellen (ZTL). Dabei erkennen und zerstören Spender-T-Lymphozyten [10, 11] normale und maligne hämatopoetische Zellen des Rezipienten [12].

Nach heutigem Forschungsstand gibt es zwei mögliche Antigengruppen für GVT- und GVL-Effekte: polymorphe mHA- oder Tumor- bzw. Leukämie-assoziierte Antigene (TAA/LAA). In die letztere Gruppe fallen LAA's, wie zum Beispiel das Protein BCR-ABL und nicht mutierte, aber auf malignen Zellen exprimierte Proteine, wie Proteinkinase 3 [13, 14].

Derzeitige Studien konnten demonstrieren, dass z. B. T-Lymphozyten genetisch so verändert werden können, dass TAA erkannt werden und es so zu einer Regression der Krankheit kommt. Dies gilt für den humanen, wie für den murinen Bereich [15].

Neben der GVL-Reaktivität vermitteln Spender T-Lymphozyten die am häufigsten mit der HSZT assoziierte Komplikation die Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (*graft-versus-host disease*, GVHD). Die GVHD wird durch die Interaktion zwischen antigen-präsentierenden Zellen des Empfängers und T-Zellen des Spenders induziert, welche z. B. mHA des Empfängers erkennen.

Die NK-Zell-Selbstreaktivität reduziert das Risiko einer GVHD, da die NK-Zellen spezifisch nur empfängereigene antigenpräsentierende Zellen (APZ) lysieren und so die Präsentation von Selbstantigenen für Spender T-Zellen verhindern [16].

Methoden zur ex vivo T-Zell Depletion (TZD), d. h. zur Reduzierung bzw. Eliminierung der T-Lymphozyten aus dem Transplantat, als auch eine pharmakologische in vivo TZD werden angewandt, um die Risiken einer GVHD zu vermindern. Diese Verfahren reduzieren das Risiko der GVHD Entstehung, aber erhöhen auch die Risiken einer Infektion und/oder der Entstehung eines Rezidivs.

Verschiedene Gruppen versuchen das Auftreten der GVHD durch adoptiven Transfer von T-Zellen mit definierten Spezifitäten zu umgehen und gleichzeitig den GVT/L-Effekt zu erhöhen.

Mit dem Begriff des adoptiven T-Zelltransfers bzw. der adoptiven Immuntherapie bezeichnet man die Gabe von allogenen (fremden) oder autologen (eigenen) T-Lymphozyten nach erfolgreicher präoperativer Lymphodepletion des Empfängers. Um ihre Effektivität, d. h. die GVL-Reaktivität zu erhöhen, können diese Spender T-Zellen in vitro durch wiederholte Restimulation mit Tumor- oder Leukämie-Präparaten expandiert und dabei die Frequenz leukämie-/tumorreaktiver T-Zellen gesteigert werden. Die Applikation einer Immuntherapie mit allogenen T-Lymphozyten soll im bestmöglichen Fall in einer klonalen, d. h. vollständigen Repopulation des Patienten mit den adoptiv transferierten T-Zellen resultieren.

Der Gedanke der Immuntherapie wurde bestärkt, als gezeigt werden konnte, dass Patienten T-Zellen mit Spezifitäten gegen ihre malignen Erkrankungen besitzen, diese jedoch in zu geringer Frequenz und mit zu geringer Affinität vorhanden sind, als dass die benötigte Stärke der Immunantwort eintreten könnte.

Die Präsenz potenzieller Tumor-bzw. Leukämie-reaktiver T-Zellen im T-Zellrepertoire eines gesunden Spenders ermöglicht die Behandlung maligner Tumore bzw. Leukämien mit eben diesen ex vivo verbesserten T-Zellen.

Die Anwendung von allogenen T-Zellen bietet Möglichkeiten, die Immuntherapie für weitere Erkrankungen einzusetzen [17, 18].

Die Identifizierung von geeigneten Antigenen zur Optimierung der T-Zell-Spezifität, ist dabei eine der Grundlagen für einen klinischen Einsatz der adoptiven Immuntherapie [19].

1.3. Tumor-/Leukämie-assoziierte Antigene (TAA)

Frühe Studien zeigten, dass T-Zellen, welche aus Tumoren von Patienten isoliert (tumorinfiltrierende T-Lymphozyten, TIL), ex vivo expandiert und dann reinjiziert wurden, in der Lage waren, die Tumormasse erfolgreich zu reduzieren [20, 21]. Auf diesen Beobachtungen beruht die Theorie, dass Tumore Zielstrukturen auf ihrer Oberfläche exprimieren, die von T-Zellen erkannt werden können.

Nachfolgend wurden und werden bis heute Antigen-Zielstrukturen für die T-Zell-Erkennung von Tumoren/Leukämien, z. B. durch die von Boon und Mitarbeitern entwickelte Strategie zur Untersuchung von cDNA Banken mit ZTL, erfasst.

Die T-Zellen wurden für diese Untersuchungen aus tumorinfiltrierenden Lymphozyten gewonnen. So wurde es möglich, verschiedene ZTL-Epitope von bis dato unbekanntem Tumor-assoziierten Proteinen zu identifizieren, welche im Kontext von HLA Klasse I- und/oder HLA Klasse II-Molekülen präsentiert werden [22, 23]. Die Melanozyten Differenzierungsantigene wie Tyrosinase, Melan-A/MART-1, welche in Tumoren überexprimiert werden, konnten beispielsweise auf diese Art identifiziert werden, ebenso wie die MAGE, BAGE und GAGE Gruppen der Tumor-assoziierten „Testis“-spezifischen Antigene [24, 25].

Mögliche Tumor- bzw. Leukämie-Antigene bestehen aus kurzen Peptidsequenzen, die nach proteosomaler Degradation mittels des Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse I-Moleküls an die Zelloberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) gebracht und somit zur Erkennung durch den T-Zell Rezeptor (TZR) freigegeben werden.

Man unterscheidet die Tumor-assoziierten Antigene anhand ihrer Expressionsmuster und ihrer Ähnlichkeit zu Selbstproteinen in folgende Unterklassen:

- 1.) Die tumorspezifischen Antigene zu denen häufig mutierte Gene wie p53, oder durch Viren, wie HPV-16 und EBV, transformierte Gene zählen.
- 2.) Die gewebsspezifischen Antigene werden unterteilt in die „cancer-testis“ Gene, zu denen MAGE, BAGE, GAGE und NY-ESO1 gehören, und in die Differenzierungsantigene, zu denen Tyrosinase, gp100, Melan-A/MART-1 und CEA gezählt werden.
- 3.) Die Gruppe der Leukämie oder Tumor überexprimierten Antigene beinhaltet Proteine wie PRAME, MDM2, HER2/neu und p53.

Als ideale Antigene werden Kandidaten bezeichnet, die ausschließlich auf den Tumorzellen exprimiert werden und auf gesunden Geweben nicht vorkommen.

1.3.1.PRAME

Das *preferentially expressed antigen of melanoma* (PRAME) Protein ist für eine T-Zell basierte Immuntherapie eine sehr attraktive Zielstruktur.

Attraktiv aus dem Grund, da PRAME-Expression nicht nur in verschiedensten soliden Tumoren, inklusive Melanomen (95 % der Patienten), Lungenkrebs (50 % der Patienten) und Brustkrebs (27 % der Patienten) zu finden ist, sondern auch in hämatologischen Erkrankungen, wie der akuten myeloischen Leukämie (30 % der Patienten) und dem Multiplen Myelom (52 % der Patienten) [26-28]. Gesundes Gewebe hingegen exprimiert kein PRAME, mit Ausnahme von Hodengewebe und mit schwachem Expressions-Level Endometrium, Ovarium und Nebennieren.

PRAME wurde 1997 von Ikeda und Mitarbeitern entdeckt. Durch einen autologen Tumorspezifischen ZTL Klon der Melanom Zelllinie LB-33.MEL wurde es HLA-A24 restringiert erkannt [29].

Es besteht aus 509 Aminosäuren und Teilsequenzen finden sich ebenfalls in der cDNS von K562-Zellen, HL-60-Zellen und Hodengewebe.

Morphologische Veränderungen einer PRAME-Überexpression mit Verlust von Filopoden, der Vermehrung von Vakuolen im Zytoplasma und der Bildung von apoptotischen Körpern innerhalb der Zelle wurden beschrieben [30].

Intrazelluläre Effekte sind die Induktion eines Caspase-unabhängigen Zelltods und damit verbunden eine geringe Proliferationsrate. Diese Veränderung äußert sich in Zelllinien mit einer PRAME-Expression, verglichen der von Leukämiepatienten, in einer signifikant schwächeren Transkription von S100A4, Hsp27 und p21 [30].

Hingegen ist die Funktion des PRAME-Proteins noch nicht völlig geklärt. Bekannt ist, dass es sich bei PRAME um einen dominanten Hemmer der Retinolsäure-Rezeptor-(RAR)-Signalkaskade handelt [31]. Retinole haben Tumor-suppressive Eigenschaften, folglich werden Defekte im RAR-Signalweg mit Malignität assoziiert [32, 33].

Für die Hypothese spricht, dass das PRAME-Protein sieben mögliche Kernrezeptor-(NR) Boxen enthält, welche die typische LXXLL Sequenz aufweisen. PRAME kann somit als Modulator für Kernrezeptor Signalwege agieren. Die Signale von RAR und die Aktivierung der RAR-Zielgene induzieren Proliferationsstillstand, Differenzierung und Apoptose. PRAME kann anstelle von Retinolsäure (RA) an RAR binden und verhindert Liganden-induzierte Rezeptor-Aktivierung und Zielgen-Transkription.

Zusammenfassend stellt PRAME ein geeignetes Zielantigen für die Immuntherapie dar. Die von Kessler und Mitarbeitern 2001 beschriebenen vier ZTL-Epitope wurden von uns in dieser Arbeit weiterverwendet.

1.3.2. MPP11

Das M-Phase-Phosphoprotein 11 (MPP11), welches auf der kritischen Regionen- 7 q22 bis 7q31 des Chromosoms 7- codiert ist, ist das humane Ortholog zu dem aus *Saccharomyces cerevisiae* bekannten Gen ZUO1 und dem murinen Homolog MIDA1, und wird in den meisten Geweben exprimiert.

Die verschiedenen Bindungs- und Interaktionsmotive mit anderen Proteinen sind zwischen den 3 Proteinen extrem hoch. So konnten z. B. Übereinstimmungen bei DNS J-, Id-1 Interaktionsseiten und Histon H1- ähnlichen Motiven gezeigt werden. Zwischen dem murinen MIDA1 und dem humanen MPP11 besteht noch eine zusätzliche Motiv-übereinstimmung in dem myb DNS Bindungs-Motiv.

Die genaue Funktion von MPP11 konnte noch nicht bestätigt werden. Durch die Konservierung des Genes innerhalb der Evolution können aber Rückschlüsse auf die vermeintlichen Funktionen von MPP11 gezogen werden. MIDA1 ist zum Beispiel am zellulären Differenzierungsprozess beteiligt [38], ZUO1 codiert wahrscheinlich für Ribosomen-assoziierte Chaperone [39].

Für die Auswahl von MPP11 als Tumor/Leukämie-Antigen sprach, dass in humanen Tumoren mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit genetische Veränderungen auf dem Chromosom 7 vorkommen, was der Lokalisierung von MPP11 entspricht. Zum Beispiel ist der Verlust der Heterogenität. bzw. das allel-spezifische Ungleichgewicht dieser Region in verschiedenen Tumorentitäten (Brust-, Prostata-, Pankreas-, Gebärmutterhalskrebs u.v.m.) beschrieben [34-37].

Zusammenfassend scheint MPP11 eine regulatorische Rolle in der mitotischen Phase des Zellzyklus einzunehmen, besonders innerhalb der Regulation der Kinetochor-Funktion. Chromosomen-Abtrennung, Differenzierung und Zellinvasion sind Prozesse, welche mit der Genese und Progression von Tumoren verbunden sind [40]. Analysen der MPP11 Expression in primären Tumoren bestätigten eine starke Expression und daher ist MPP11 ein interessanter Kandidat für weitere Untersuchungen in dieser Arbeit [41].

Durch m-RNS Expressions-Profile konnte MPP11 auch als LAA (Leukämie-assoziiertes Antigen) identifiziert werden [41]. In diesen zeigten 86 % der untersuchten Patientenproben eine signifikante Überexpression von MPP11, jedoch wurde keine Expression in gesunden Patientenproben detektiert.

Untersucht man Normal-Gewebe, so kann eine starke MPP11-Expression nur in Hodengeweben detektiert werden. Eine Expression in Lunge und Leber ist nur nach vielen PCR Zyklen zu erkennen [42], was für die extrem schwache Expression von MPP11 in allen weiteren Geweben spricht.

Zu Beginn unserer Untersuchungen waren noch keine ZTL-Epitope von MPP11 als mögliche Kandidaten für eine adaptive Immuntherapie beschrieben.

1.4. Phänotypische und funktionelle Merkmale von T-Lymphozyten

Während der Entwicklung von Zellen ist die Differenzierung einer pluripotenten Stammzelle in eine lymphatische Vorläuferzelle oder eine myeloische Vorläuferzelle der erste Schritt zwischen der Unterscheidung vom späteren adaptiven Immunsystem zum angeborenen Immunsystem. Anhand der Oberflächenmoleküle, wie z. B. *Cluster of differentiation* (CD) Strukturen, lassen sich T-Zellen unterscheiden und ihrem Differenzierungsstand zuordnen.

Die lymphatische Vorläuferzelle wandert vom Knochenmark zum Thymus, dem Ort der Differenzierung.

Die Interaktion der lymphatischen Vorläuferzelle mit dem thymischen Gewebe bewirkt eine Initialisierungsphase, welche die ersten Oberflächenmarker zur Folge hat (CD2 und CD25) und auch eine Phase starker und unkontrollierter Proliferation. Da diese T-Zellen noch keine der üblichen CD Marker maturaer T-Zellen tragen, wie CD3 (Immunglobulin-ähnliche Oberflächenstruktur, die eng mit dem TZR verknüpft ist), CD4 (T-Zell Korezeptor) oder CD8 (T-Zell Korezeptor), werden sie auch als doppelt-negative (DN) Thymozyten ($CD3^-CD4^-CD8^-$) bezeichnet. Die DN-Thymozyten treten innerhalb des Cortex in engen Kontakt mit Epithelzellen, welche MHC Klasse I und II Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen. Durch die Vielzahl von Epithelzellen und ihrer Form ist gewährleistet, dass alle DN-Thymozyten in Kontakt mit ihnen treten können. Dieser erste Kontakt durch den entstehenden TZR und das MHC-Molekül stellt die primäre Selektion für T-Zellen dar. Diese sogenannte positive Selektion stellt sicher, dass die auf der T-Zelle befindlichen TZR-Moleküle in der Lage sind, alle im Körper vorkommenden Peptid:MHC Molekül-Varianten zu erkennen. Zum Zeitpunkt der positiven Selektion handelt es sich bei dem Thymozyten um große, doppelt-positive (DP) $CD3^+CD4^+CD8^+$ T-Zellen. Etwa 95 % der Thymozyten überleben die positive Selektion nicht und werden apoptotisch. Die nachfolgende negative Selektion eliminiert T-Zellen, die mit einer zu hohen Affinität an Selbst-Peptid:Selbst-MHC Molekül binden und somit potenziell autoreaktiv sind. Die Unterteilung in CD4- oder CD8-T-Zellen findet in diesem Stadium statt. Was genau eine Zelle veranlasst, nur CD4 oder nur CD8 zu exprimieren, ist immer noch Teil der Forschung und wird stark diskutiert. Vor und während der Selektion durchlaufen die Ketten des TZR mehrere festgelegte Umordnungen, die somatische Rekombination.

Eine naive T-Zelle mit einem Korezeptor, entweder CD4 oder CD8 und einem intakten TZR mit einer definierten Spezifität verlässt den Thymus und wandert in die Peripherie aus. Die Aktivierung des TZR resultiert in T-Zell-Proliferation und Differenzierung und bestimmt somit die Immunantwort.

$CD4^+$ T-Zellen sind in der Lage, sich entweder zu T-Helfer 1 (T_H1), oder zu T_H2 -Zellen zu entwickeln, welche unterschiedliche Gruppen von Zytokinen produzieren (z. B.: Inter-

feron- γ (IFN γ), Interleukin-4 (IL-4), IL-5 usw.), wodurch Schutzmechanismen gegen intrazelluläre oder extrazelluläre Pathogene vermittelt werden [43, 44]. T-Helfer-Zellen können des Weiteren in regulatorische Zellen weiterentwickelt werden. Diese wandern zurück in die B-Zell-Zonen des Thymus, wo sie eine T-Zell-vermittelte Antikörper Immunantwort auslösen können. Eine weitere Entwicklung dieser Gruppe von T-Lymphozyten liegt darin, sich zu Suppressor T-Zellen zu differenzieren, die durch Sekretion von inhibitorischen Zytokinen eine zu starke und so potenziell schädliche Immunantwort steuern können [45].

Der Differenzierungsschritt für CD8⁺ T-Zellen ist die Entwicklung zu zytotoxischen T-Zellen, welche ihre Zielzellen durch Granzym B und Perforin innerhalb weniger Minuten vernichten können (z. B.: virusinfizierte Zellen) [46]. Eine weitere lytische Aktivität innerhalb der CD8⁺ T-Zellen geht von der Interaktion von Fas mit seinem Liganden (Fas-L) sowie vom TNF Rezeptor und seinem Liganden aus. Diese lytische Aktivität der zytotoxischen T-Zellen benötigt einen Zeitrahmen von bis zu 24 Stunden, ist aber genauso effektiv und spezifisch wie die Perforin bzw. Granzyme B vermittelte Lyse. Einige der während der ersten Immunantwort gebildeten T-Zellen können über Jahre im Körper zirkulieren. Diese Zellen nennt man Gedächtnis-Zellen. Eine erneute Aktivierung führt durch diese Zellen zu einer schnelleren und effektiveren Immunantwort gegen die Antigene, da es sich um bereits bekannte Antigene handelt [47-49]. Die Fähigkeit, in Abwesenheit von Antigenstimulationen zu überleben ist ein essenzieller Part der T-Zell-Differenzierung [50]. Während naive T-Zellen einen ständigen, aber gering affinen Kontakt mit Selbst-MHC Molekülen benötigen [51, 52], werden Antigen-stimulierte T-Zellen, welche nach der ersten Immunantwort als Gedächtnis-Zellen überleben zu einem MHC unabhängigen Lebenszyklus geleitet.

Die Polarisierung der zytotoxischen T-Zelle während der spezifischen Antigenerkennung durch die Interaktion des TZR mit dem Peptid:MHC Komplex auf der Zielzelle ermöglicht eine Reorganisation innerhalb des kortikalen Aktin Zytoskeletons an der Kontaktstelle mit der Zielzelle. Mit Hilfe von Mikrotubuli (MTOC) werden die spezialisierten Lysosomen (lytische Granula) und auch der Golgi-Apparat in Richtung der Zielzelle ausgerichtet. Die aus dem Golgi stammenden lytischen Granula werden dann am Ort des Zellkontakts freigesetzt und lysieren die Zielzelle.

Generell haben Effektor T-Zellen, also naive T-Zellen, welche bereits in den lymphatischen Geweben aktiviert und differenziert worden sind, einen geringeren Schwellenreiz, der zur Aktivierung der Zellen führt [53-58]. Eine kurze Stimulationsdauer von ca. 30 min. reicht zur Produktion von IFN- γ durch T_H-Zellen aus, während zytotoxische T-Zellen eine wesentlich kürzere Zeit der Stimulation benötigen [59, 60].

1.5. Fragestellung

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Experimente hatten folgende spezifische Ziele:

Neben der Bestimmung der zu untersuchenden Kandidaten-Antigene PRAME und MPP11 sollten zunächst HLA-A*0201 (HLA-A2.1)-bindende und endogen prozessierte Peptide aus dem MPP11-Protein identifiziert werden. Weiterhin gehörte die Verifizierung der Bindung bereits beschriebener Peptide des bekannten Tumorantigens PRAME an HLA-A2.1 zu diesem Aufgabenbereich. Parallel zu diesen Arbeiten sollten Expressionsanalysen der ausgewählten Proteine ihre Verwendbarkeit für die Immuntherapie unterstreichen.

Die identifizierten Peptide sollten im Folgenden hinsichtlich ihrer Immunogenität in HLA-A2-transgenen Mäusen untersucht werden. Die daraus resultierende Generierung von HLA-A2.1-restringierten und MPP11-, bzw. PRAME-peptidspezifischen Tumor- und Leukämie-reaktiven zytotoxischen T-Zellen (ZTL) mit hoher T-Zell-Rezeptor-Affinität stellte die Hauptaufgabe innerhalb der vorliegenden Arbeit dar.

Darüber hinaus sollte im zweiten Teil des Projektes die zytolytische Reaktivität dieser ZTL gegenüber PRAME-exprimierenden Zelllinien, Transfektanten und humanen Tumor-Zelllinien zunächst eingehend in vitro untersucht werden.

Auf der Basis der aus diesen Arbeiten gewonnenen Ergebnisse sollte abschließend die Fähigkeit der ZTL in vivo in murinen Tumor- und Leukämie-Modellen evaluiert werden. Dazu wurde ein spezifisches Tumor-Modell unter Verwendung von PRAME-exprimierenden EL-4 Tumorzelltransfektanten entwickelt sowie die Rekonstitution mit akuten myeloischen Leukämiezellen (AML) in immundefizienten Mäusen etabliert. Mit Hilfe von adoptiven Transferexperimenten wurde anschließend die Tumor- bzw. Leukämieaktivität der generierten T-Zellen in beiden in vivo Modellen für die verwendeten Antigene verifiziert und spezifiziert.

Alle Untersuchungen wurden im Vergleich zu den bereits beschriebenen und charakterisierten p53₂₆₄₋₂₇₂ ZTL vorgenommen [61].

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Agarose	Axon, Kaiserslautern
Aqua dest.	Braun, Melsungen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Chemie, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Sigma Chemie, Steinheim
β_2 Mikroglobulin	Sigma Chemie, Steinheim
CFSE	Invitrogen, Karlsruhe
^{51}Cr (Na^{51}Cr) O_4)	Perkin Elmer, Boston, USA
Destilliertes Wasser	Millipore, Schwalbach
Dimethylsulfoxid DMSO	Sigma, Steinheim
Dextransulfat	Sigma, Steinheim
Dulbecco`s modified eagle medium (DMEM)	Lonza, Verviers, Belgien
Ethylendiamintetraacetate (EDTA)	Sigma, Steinheim
Ethanol (min. 99 %)	AppliChem, Darmstadt
Ethanol vergällt (96 %)	Mundo OHG, Mainz
Ethidiumbromid	Sigma (Fluka), Steinheim
EZMix TM Hefeextrakt	Sigma, Steinheim
Fötales Kälberserum (fetal calf serum, FCS)	PAA, Paschin, Österreich
Gentamycin	Lonza, Verviers, Belgien
Geneticin (G418)	Gibco, Eggensheim
Glycerin, 99 %	Sigma, Steinheim
Humanes AB-Serum	Blutspendezentrale Universitätsklinik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Hu & mu Interferon γ	Sigma, Saint Louis, USA
Mu rekombinantes Interleukin 2(IL-2)	Sigma, Saint Louis, USA
Hu Interleukin 7 (IL-7)-Fc	Merck, Darmstadt
Hygromycin	Invitrogen, Carlsbad, USA
L-Glutamin	Lonza, Verviers, Belgien
Lipopolysaccharid (LPS, <i>S. typhosa</i>)	Sigma, Steinheim
Magnesiumchlorid	Sigma, Steinheim
Natriumchlorid	Sigma, Steinheim
para-Formaldehyd (PFA)	Sigma Chemie, Deisenhofen

PBS (Phosphat gepufferte Saline)	Gibco, Paisley, UK
RPMI 1640	Lonza, Verviers, Belgien
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris-Base)	Sigma, Steinheim
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypsin-EDTA	Lonza, Verviers, Belgien
Tryptophan	Roth, Karlsruhe

2.1.2. Medien und Puffer

2.1.2.1. Medien für die Zellkultur

Alle in der Zellkultur verwendeten Medien und Lösungen wurden vor Gebrauch über einem 0,22µm Filter aufgereinigt und unter aseptischen Bedingungen gehalten.

Medium für Zelllinien und murine TZL (RPMI)

500 ml	RPMI 1640
56 ml	hitzeinaktiviertes FCS (10 %)
5,6 ml	0,2M L-Glutamin
560 µl	Gentamycin (final 50 µg/ml)
28 µl	β-Mercaptoethanol (5x10 ⁻⁵ M)

Medium für humane Leukämiezellen

500 ml	RPMI 1640
56 ml	hitzeinaktiviertes FCS (10 %)
5,6 ml	0,2M L-Glutamin
3 ml	humanes Albumin (final 0,5 %)
560 µl	Gentamycin (50µg/ml)
28 µl	β-Mercaptoethanol (5x10 ⁻⁵ M)

Selektionsmedium für Zelllinien (RPMI+G418)

500 ml	RPMI 1640
56 ml	hitzeinaktiviertes FCS (10 %)
5,6 ml	0,2M L-Glutamin
1,7 ml	G418 (effektive Konzentration 0,28µg/ml)
560 µl	Gentamycin (50µg/ml)
28 µl	β-Mercaptoethanol (5x10 ⁻⁵ M)

Selektionsmedium für Transfektanten (RPMI+ Hygromycin)

500 ml	RPMI 1640
56 ml	hitzeinaktiviertes FCS (10 %)
11,2 ml	Hygromycin (1mg/ml)
5,6 ml	0,2M L-Glutamin
1,7 ml	G418
	(effektive Konzentration 0,28µg/ml)
560 µl	Gentamycin (50µg/ml)
28 µl	β-Mercaptoethanol (5x10 ⁻⁵ M)

MACS Puffer

PBS EDTA pH7.5
0,5 % BSA

2.1.2.2. Medium zur Kryokonservierung

Das Medium besteht für alle Arten von Zellen und Zelllinien aus FCS supplementiert mit 10 % (v/v) DMSO.

2.1.2.3. Puffer für die Gelelektrophorese

5x TBE Puffer

54g (89mM)	Tris-Base
20ml (2mM)	0,5M EDTA, pH 8, 0
27,5g (89mM)	Borsäure

Werden in 1l Milli Q Wasser gelöst.

2%iges Agarose Gel

54g Agarose (2 %w/v) werden in 200ml einfach (1x) TBE Puffer gegeben und erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst ist.

Für jeden weiteren Gebrauch wird die Lösung erneut erhitzt.

2.1.2.4. Puffer für FACS-Analysen

FACS Puffer

PBS mit 0,1 % FCS

FACS-Fixierungspuffer (PFA)

2g Paraformaldehyd (1 % w/v) werden in 200ml PBS bei 60°C für 3-4 h gelöst. Die weitere Lagerung erfolgt bei 4°C.

2.1.3. Lösung für die Kultivierung von Bakterien

10g NaCl
10g Trypton
5g EZMix

Werden in 1l doppelt destilliertem (ddW) Wasser gelöst und durch Zugabe von NaOH auf pH 7 eingestellt. Anschließend wird das LB-Medium autoklaviert.

2.1.4. Kommerzielle Kits

RNS Isolation aus AML Patientenmaterial:

PAXgene Blood RNA System

PreAnalytiX, Qiagen & BD, Hilden

RNS Isolation:

RNeasy[®] Mini Kit

Qiagen, Hilden

DNS Isolation aus Blut und Geweben:

DNeasy[®] Blood & Tissue Kit

Qiagen, Hilden

Plasmidextraktion:

EndoFree Plasmid Maxi Kit

Qiagen, Hilden

cDNS Synthese:

SuperScript[™] III System for RT-PCR

Invitrogen, Carlsbad, USA

DNS-Marker zur Gelelektrophorese:

1 kb & 100 bp DNS-Marker

New England Biolabs, Frankfurt

PCR Kit:

Taq DNA Polymerase, dNTPack

Roche Diagnostics, Mannheim

Zellseparation mit magnetischen „beads“:

MACS Beads
MACS LS Columns

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

2.1.5. Enzyme

Alle verwendeten Enzyme und dazugehörigen Puffer stammten von New England Biolabs, Frankfurt.

BamHI, BsrG1, PvuI, XhoI

2.1.6. Primer und Vektoren

Spezifität	Firma	Sequenz (5`-3`)
Human Chromosom 17	MWG	AATTCAGCTGACTAAACA
		TTTAGTTAGGTGCAGTTAT
Human MPP11	MWG	GCAGAATGTCGTGATGAGAG
		GCTAACCGAGCAGCTTCTA
Human p53 wt	MWG	CAACCTCAGGCGGCTCATAG
		TGCACCAGCAGCTCCTACAC
Human PRAME	MWG	GTTGCTCAGGCACGTGAT
		GAGCCTGGCATGCAGATA
Human TNF	MWG	AGGAACAGCACAGGCCTTAGTG
		AAGACCCCTCCAGATAGATGG
Beta Actin	Sigma	CGTTGCTATCCAGGCTGTGCTATC
		GCACTGTGTTGGCGTACAGGTCTT
TATA box binding Protein	dankend erhalten von Dr. T. Bopp (Institut für Immunologie, Universität Mainz)	
EF1 alpha	dankend erhalten von Dr. M. Koslowski (III. Med. Klinik, Hämatologie & Onkologie, Universität Mainz)	
18s	dankend erhalten von Dr. M. Koslowski (III. Med. Klinik, Hämatologie & Onkologie, Universität Mainz)	

pcDNA3-PRAME
 pDR2-PRAME
 pCEP4-p53wt

Dr. J. Kessler
 Dr. J. Kessler
 Dr. S. Stein

2.1.7. Peptide

In dieser Arbeit verwendete Peptide wurden von der Firma Biosyntan synthetisiert.

Die Reinheit der Peptide betrug stets 95 %.

Die Aminosäure-Sequenzen waren wie folgt:

Peptid	Aminosäuresequenz
MPP 51	QELEDKKEL
MPP 68	LQLEEFMPL
MPP 335	ALLAKKEKDI
MPP 336	LLAKKEKDI
MPP 405	DLQLLIKAV
MPP 406	LQLLIKAVNL
MPP 407	QLLIKAVNL
MPP 430	YMNIHSSSGV
MPP 507	KLLEQALKT
PRAME 100	VLDGLDVLL
PRAME 142	SLYSFPEPEA
PRAME 300	ALYVDSLFFL
PRAME 425	SLLQHLIGL
Flu M1 58	GILGFVFTL
VSV-N 52	RGYVYQGL
p53 264	LLGRNSFEV
HBV Core 128	TPPAYRPPNAPIL

2.1.8. Zelllinien und Transfektanten

In den folgenden Untersuchungen eingesetzte Zelllinien und Transfektanten wurden bereits ausführlich beschrieben.

- 1.) HLA-A2 positive Zellen:
 - a. Die TAP defiziente Zelllinie T2.
 - b. Die konstitutiv A2- positive und p53- defekte Osteosarkom Zelllinie Saos-2, sowie die mit dem humanen p53-Gen transfizierte und eine Mutation an Stelle 143 (V→ A) tragende Saos2/143 Zelllinie [63] wurden zur Erkennung von p53 verwendet.
 - c. MZ1851 und MZ1257, beides Nierenzellkarzinom Zelllinien, und MCF 7, eine Brustkrebs Zelllinie, wurden zur Erkennung von PRAME verwendet.
- 2.) Humane Leukämie Zelllinien:
 - a. Jurkat Zellen, eine T-Zell Leukämie Zelllinie und deren mit HLA-A2 transfizierte Variante (JA2) [62].
 - b. Die humane chronisch myeloische Leukämie Zelllinie (K562) [64] und ihre A2- positive Transfektante (K562-A2).
 - c. Die Zelllinien HL-60 und KG-1, welche von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) erworben wurden.
- 3.) Mauszelllinien:
 - a. Die aus C57BL/6 Maus stammende Thymoma Zelllinie EL4 und die daraus resultierende mit HLA-A2.1/K^b transfizierte EA2K^b Linie [62].

Während dieser Arbeit entstanden EA2K^b Transfektanten mit p53 bzw. PRAME durch Elektroporation der EA2K^b Zellen mit entweder p53 Wildtyp Protein, oder dem PRAME Protein (siehe Abschnitt 2.2.1.10.).

Alle hier aufgeführten Zelllinien wurden im Standardmedium (RPMI 1640 in Gegenwart von 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS), 1 % 0,2M L-Glutamin und 50µg/ml Gentamycin und 5×10^{-5} β-Mercaptoethanol) kultiviert. Zur Kultivierung Neomycin-, oder Hygromycin-resistenter Zellen wurde dem Medium Geneticin (G418) in einer Konzentration von 0,4-1mg/ml oder Hygromycin in einer Konzentration von 0,75-1,5mg/ml zugegeben. Alle Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre kultiviert.

2.1.9. Versuchstiere

In dieser Arbeit wurden transgene (tg) Mäuse verwendet, die das humane MHC Klasse I- Transgen HLA-A2.1 (A2) exprimieren, nachfolgend wurden sie auf den genetischen Hintergrund von C57BL/6- Mäusen eingekreuzt [62, 65]. Folgende Stämme wurden verwendet:

- 1) C57BL/6-Mäuse besitzen den H-2^b-Phänotyp und exprimieren die MHC Klasse I Moleküle H-2K, D, L sowie die MHC Klasse II Moleküle I-A und I-E.
- 2) [huCD8 α/β x A2.1/K^b]_{F1} (CD8 x A2K^b)- transgene Mäuse exprimieren heterozygot chimäres A2K^b und zusätzlich die α - und β -Kette des humanen CD8 Moleküls. Außerdem sind sie homozygot für das H-2^b-Gen.
- 3) CyA2/K^b (CyA2K^b)- transgene Mäuse sind homozygot sowohl für das chimäre MHC Klasse I-Transgen, welches sich aus den beiden humanen α_1 - und α_2 - Domänen von A2 und der murinen α_3 -Domäne von H-2K^b (MHC Klasse I- Molekül der Maus) zusammensetzt, als auch für das H-2^b-Gen.
- 4) B6x A2-tg Mäuse (([A2xC57BL/6] x C57BL/6)_{F1}-Tg) sind homozygot für das H-2^b-Gen und exprimieren heterozygot α_1 -, α_2 - und α_3 -Domänen des humanen HLA-A2 (Schwere und leichte β_2 Mikroglobulin) Kette.
- 5) NOD/SCID/IL2 γ ^{null} Mäuse (NOD/LtSz-scid IL2rg^{-/-}) sind nicht nur homozygot für die NOD und scid Mutationen, sondern auch für entweder die Abwesenheit der IL2 Rezeptor γ Kette oder das Fehlen ihrer intrazytoplasmatischen Domäne [66, 67].

Alle Versuchstiere wurden in der zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz gezüchtet und unter hohen Hygienestandard- (specific-pathogen-free (SPF) –like) Konditionen gehalten.

Alle in diesen Untersuchungen durchgeführten Tierexperimente entsprechen genehmigten Tierversuchsanträgen des Landes Rheinland-Pfalz.

2.1.10. Geräte

Brutschränke (Inkubatoren)	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer, Calibur	BD, Heidelberg
Elektroporations Gerät	BioRad, München
γ -Strahlungsmessgerät (Top Count™ Microplate Scintillation)	Packard Instrument Company, Meriden, USA
Gelelektrophorese Kammern	BioRad, München
iCycler	BioRad, München
Inkubationsschüttler	INFORS AG, Bottmingen, Schweiz
MACS Separations Einheit	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Netzgeräte	Amersham Pharmacia Biotech, Wien
PCR Geräte	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Knick, Berlin
Pipetten	Gilson, Limburg-Offheim
Pipettierhilfe „Pipetboy“	Hirschmann, Eberstadt
Photometer	Amersham Pharmacia Biotech, Wien
Schüttler KS 250	IKA Labortechnik, Staufen
Stickstoff Tank	tec lab, Königstein/Ts.
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Vortexer REAX	Heidolph, Schwabach
Waagen	Satorius AG, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Omnifuge	Heraeus, Hanau

2.1.11. Verbrauchsmaterialien

Jegliche Glaswaren wurden vor Gebrauch 20 min bei 121°C autoklaviert. Alle anderen Verbrauchsgegenstände, wie z. B. Zellkultur-Platten, Pipetten etc. wurden sterilisiert eingekauft.

Cellstar PP- Röhrchen 50 ml, 15 ml	Greiner, Frickenhausen
Cell strainer 40 μ m Nylon	BD Falcon, Bedford, MA
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden

FACS Röhrchen	Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ
Kanülen, versch. Größen	Braun, Melsungen
MACS MS Separation columns	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Magnetstäbchen	Roth, Karlsruhe
Mikroküvette	BioRad, München
Mikroskop- Deckgläschen	Menzel Gläser, Braunschweig
LUMA Platten	Perkin Elmer, Boston, USA
Parafilm	American National Can, Chicago, IL
Pinzette	FST, Heidelberg
Pipettenspitzen Standard tips	Starlab, Ahrensburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Skalpelle, aseptic	Feather Safety Razor Co, Köln
Sterilisationsfilter 22 µm	Millipore, Bedford, USA
Syringe, Injekta F 1, 10, 20 ml	Braun, Melsungen
Zellkultur Flaschen (T25, T75)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkultur Platte, Cellstar 24 Loch	Nunc, Wiesbaden
Zellkultur Platte, Cellstar 96 Loch	Nunc, Wiesbaden

2.2. Methoden

2.2.1. Molekulargenetische Methoden

2.2.1.1. DNS- und RNS-Isolation aus humanem & tierischem Blut, Geweben, Bakterien oder Zellen

Je nach Art des Ausgangsmaterials (Blut oder Zelllinien) und des gewünschten Endproduktes (DNS oder RNS) werden die Proben mit kommerziellen Kits der Firma Qiagen in mehreren Waschschritten nach Herstellerprotokoll über eine Säule aufgereinigt und in eluierter Form bei -20°C gelagert.

Bei der Isolation von RNS aus menschlichem Blut wurde die laut Hersteller angegebenen Lagerungszeiten bei 4°C und RT strikt eingehalten.

2.2.1.2. Fotometrische Bestimmung des DNS- oder RNS-Gehalts

Die DNS oder RNS wurde mit Tris-HCL (pH 7,8) mit einem Verhältnis von 1:50 und einem Endvolumen von 100µl verdünnt und der Gehalt, der zu bestimmenden Nukleinsäure, fotometrisch bei einer optischen Dichte (OD) von 260nm in einer Quarzküvette gemessen.

2.2.1.3. Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Für die selektive Amplifikation von Nukleinsäureabschnitten wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angewandt. Die PCR wurde 1983 entwickelt und ist seitdem eine Standardmethode geworden, die es erlaubt, kleinste Mengen DNS spezifisch zu amplifizieren und zu detektieren.

Für die Detektion der gewünschten Sequenz werden spezifische vorwärts- (forward, for) und rückwärts- (reverse, rev) Primer gewählt, wobei sich die Bezeichnung nach der Orientierung im Vergleich zur 5'-3' (for)-Leserichtung des Nukleinsäure-Stranges bezieht.

Diese Primer dienen der Taq-Polymerase, gewonnen aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*, als Ausgangspunkt zur Synthese eines zur DNS-Matrize (Template) komplementären DNS-Stranges. Da doppelsträngige DNS nicht abgelesen werden kann, muss diese in der Reaktion zunächst durch Erhitzen getrennt, denaturiert, werden. Die

hier verwendete „Hotstart“ Taq-Polymerase benötigt eine Start-Temperatur von 95°C für 5 min. um aktiviert zu werden. Danach folgen erneut 95°C, die Denaturierungsphase, die lediglich 60sec. dauert. Die schnelle Abkühlung auf Temperaturen zwischen 50-65°C verhindert die Rückbildung der Doppelstränge. Die Primer können sich bei einer für sie optimalen Temperatur (Annealing-Temperatur) an die einzelsträngige DNS anlagern, sofern die Template DNS fast völlig mit ihrer Sequenz übereinstimmt. Die Annealing Temperatur befindet sich meistens zwischen 50-65°C, abhängig von dem GC-Gehalt der Primer.

Im nächsten Schritt verlängert die Polymerase den komplementären Strang bis zum Sequenzende (Extension). Die Temperatur der Extensionsphase variiert je nach DNS Polymerase, ist aber meistens bei 72°C anzusiedeln. Die Länge dieser Phase ist abhängig von der verwendeten Polymerase sowie der Fragmentgröße des zu amplifizierenden DNS-Stückes.

Die folgende Verlängerungsphase (Elongation) ist abhängig von der DNS Größe des Templates. In dieser Phase wird sichergestellt, dass alle DNS-Einzelstränge vollständig verlängert worden ist.

So ergibt sich ein PCR-typischer Grundablauf:

Schritt 1: Denaturierung (95°C)

Schritt 2: Anlagerung der Oligonukleotide (Annealing) (50-65°C)

Schritt 3: DNS-Synthese (Extension) (70-72°C)

Schritt 4: Kontrolle (Elongation)

Diese Schritte wurden meist über 30-35 Zyklen wiederholt.

Das PCR Protokoll für p53, hu TNF und hu Chr17 wurde in zwei Abschnitte unterteilt um eine noch spezifischere Amplifikation des Produktes zu ermöglichen und ist wie folgt:

		94°C	5 min.
5 Zyklen	}	50°C	1 min.
		72°C	1 min.
		94°C	1 min.
30 Zyklen	}	54°C	1 min.
		72°C	1 min.
		94°C	1 min.
		72°C	5 min.
		4°C	∞

Das Protokoll für PRAME:

40 Zyklen	}	95°C	15 min.
		94°C	20 sek.
		57°C	45 sek.
		72°C	1 min.
		72°C	10 min.
		4°C	∞

Nach der PCR werden die Proben auf ein Agarose Gel aufgetragen und ausgewertet. Ein typischer Pipettieransatz für eine PCR Reaktion sah folgendermaßen aus:

2-6µl	Template
1µl	for Primer
1µl	rev Primer
5µl	Puffer+ MgCl ₂
1µl	DNTP-Mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
0,5µl	Taq-DNA Polymerase
Xµl	H ₂ O

50µl finales Volumen

Bei den Primerpaaren p53, Chromosom17 und TNF wurde zusätzlich 1µl DMSO (einer 5 % DMSO Lösung) je Ansatz pipettiert. Das DMSO als Additiv erhöhte die Menge des Endproduktes, die Spezifität [68, 69] und die Deutlichkeit der Banden in der abschließenden Gelelektrophorese.

2.2.1.4. Reverse Transkription

Mit Hilfe eines Enzyms, der reversen Transkriptase, wird von einer m-RNS (siehe Abschnitt 2.2.1.1.) eine DNS Matrize hergestellt. Der komplementäre DNS Strang, die cDNS, enthält keine Introns und ist somit kleiner als das das eigentliche Gen.

Die in diesen Untersuchungen durchgeführten reversen Transkriptionen wurden ausschließlich nach Anleitung des verwendeten Kits, SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR der Firma Invitrogen, durchgeführt.

2.2.1.5. Real Time- PCR (RT PCR)

Die Methode der RT-PCR ermöglicht es Daten innerhalb einer PCR zu sammeln. Dies verbindet die Amplifikation und die Detektion des Endproduktes innerhalb nur einer Untersuchung [70]. Dies wird durch verschiedenste fluoreszierende Chemikalien innerhalb der RT-PCR ermöglicht, welche eine Korrelation zwischen PCR-Produkt-Konzentration und Fluoreszenzintensität ermöglichen [71]. Der in diesen Experimenten eingesetzte Farbstoff, SYBR® Green I, kann an die neue doppelsträngige DNS in einem Probenansatz binden. Durch diese Bindung ändert der Farbstoff seine Konformation so dass Fluoreszenz freigesetzt wird. Die Fluoreszenz Intensität ist proportional zu der Menge des spezifischen PCR Produktes.

Die RT-PCR ermöglicht die Sammlung quantitativer Daten über z. B. Genexpressionen verschiedener Gewebe mit einem dynamischen Bereich von 7 bis 8 Log- Stufen und kann ebenso eine einzelne Kopie eines spezifischen Transkripts detektieren [72, 73]. Alle in dieser Arbeit durchgeführten cDNS Synthesen sind in einer Zwei-Stufen-RT-PCR durchgeführt worden. Das bedeutet, dass die Transkription von mRNA in cDNS in einem separatem Experiment durchgeführt worden ist. Dies ermöglichte, mehrere unterschiedliche RT-PCR Experimente durchzuführen, welche alle mit einer Verdünnung aus einem cDNS Stock pipettiert worden sind. Dies ermöglichte eine hohe Reproduzierbarkeit der Experimente [74].

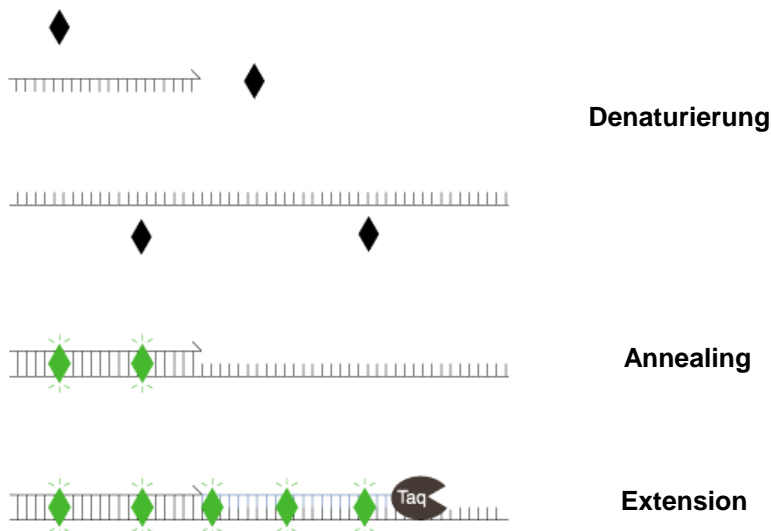


Abb.1: Schematische Darstellung einer RT-PCR mit dem SYBR Green I Farbstoff. Der SYBR Green (schwarze Rauten) wird fluoreszierend (grüne Rauten), wenn er an doppelsträngige DNS bindet. [www.invitrogen.com]

Das Protokoll für einen RT-PCR Ansatz sah wie folgt aus:

15µl	Mischung aus dNTPs, SYBRGreen und Puffer
5µl	cDNS (1:10 verdünnt)
3µl	for Primer (Stocklösung mit 3µM)
3µl	rev Primer (Stocklösung mit 3µM)
4µl	H ₂ O
<u>30µl</u>	Endvolumen

Die Untersuchungen der PRAME-Expression in verschiedenen Geweben und AML-Proben wurden in Zusammenarbeit mit Dr. T. Bopp, Institut für Immunologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, vorgenommen. Dr. M. Koslowski (III. Med. Klinik, Abteilung Hämatologie/Onkologie) stellte die RNS-Proben diverser Gewebe zur Verfügung. Als interne Referenz wurden in jedem Versuchsansatz 18sRNS oder TATA-box binding Protein (TBP), ein RNS Polymerase II Transkriptionsfaktor, mitgeführt. Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen sind auf den Wert von PBMZ normalisiert worden.

2.2.1.6. Gel-Elektrophorese

Die Auftrennung verschiedener DNS-Fragmente im Agarosegel erfolgt nach ihrer Größe. In pH neutraler Lösung ist die 5' Phosphatgruppe einer Nukleinsäuren ionisiert und kann bei angelegter Spannung gemäß ihrer Größe unterschiedlich schnell im elektrischen Feld wandern. Die Geldichte (0,7 % bis 3 %) wurde in Abhängigkeit von der zu erwartenden Fragmentgröße gewählt.

Zur Bestimmung der Fragmentgrößen von DNS-Proben und PCR-Proben wurden diese mit 1/5 (v/v) Blaumarker versetzt und auf ein 2 % Agarosegel in 1x TBE-Puffer aufgetragen und bei 100 V für 1h aufgetrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid versetzt, welches der späteren fotografischen Auswertung auf dem UV-Transluminator dient.

Die zu erwartenden Fragmentgrößen waren wie folgt:

PCR:

Humanes p53	400 bp
Humanes TNF	471 bp
Humanes Chromosom 17	850 bp
Humanes PRAME	457 bp

Linearisierung:

pCEP4wthup53	3 kb
pcDNA3-PRAME	3 kb
pDR2-PRAME	3 kb

2.2.1.7. Glycerol-Stocks

Zur Lagerung aufgereinigter Vektoren, werden so genannte Glycerol Stocks angelegt. 1ml einer Bakterien-Über-Nachtkultur (siehe 2.2.1.8.) wird mit 1ml 80% Glycerol in ein 2ml Reaktionsgefäß gegeben und bei -80°C eingefroren und gelagert.

2.2.1.8. Transformation und Plasmid-Präparation

Als Transformation bezeichnet man die Übertragung von Erbinformationen mit Hilfe isolierter DNS in das Genom von Bakterien. Dafür wurden kompetente Bakterien-Zellen (XL-1 blue; Stratagene) mit 1µl DNS (aus einem Glycerol-Stock) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach folgt eine 45 Sekunden Inkubation in einem 42°C-Wasserbad und wiederum eine Lagerung für 2 Minuten auf Eis. 450 µl vorgewärmtes LB-Medium wird zu dem Ansatz hinzupipettiert und 50 Minuten bei 240 Upm und 37°C im Schüttelinkubator geschüttelt um den Bakterien optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten. 100 µl des Ansatzes werden auf Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht im 37°C-Brutschrank inkubiert. Die auf den Platten entstandenen Klone wurden einzeln gepickt und in einer Plasmidpräparationen eingesetzt.

Zur Präparation der in die Bakterien eingebrachten DNS wurden Qiagen Endofree Plasmid Maxi Kits laut Vorschrift verwendet.

2.2.1.9. Linearisierung

Die für die Elektroporation verwendeten Vektoren werden zuvor enzymatisch linearisiert. Dazu wird entweder das Enzym Pvu I oder BsrG1 verwendet, welches in der Ampicillin-Resistenz-Kassette des Vektors schneidet und so die zirkuläre Form auftrennt. Es hat sich in mehreren Versuchen gezeigt, dass linearisierte Plasmide besser von Zellen aufgenommen werden können.

Das Reaktionsgemisch	2 μ l Enzym
	x μ l Plasmid (ca. 10 μ g)
	6 μ l Enzym- Puffer
	6 μ l BSA
	x μ l H ₂ O
	<hr/>
	25 μ l Mix

wurde für 90min. bei 37°C inkubiert und dann auf ein Agarosegel aufgetragen.

Die zu erwarteten Größen der linearisierten Plasmide liegen bei 3kb (siehe Abschnitt 2.1.6.).

2.2.1.10. Elektroporation

Die Elektroporation ist eine bestimmte Form der Transfektion. Die Zielzellen (Empfängerzellen) werden einem stark elektrischen Stromimpuls ausgesetzt, der für einen kurzen Augenblick die Integrität der Zellmembranen ändert. In dieser Zeit können Plasmide oder RNS in die Zelle diffundieren und werden in das Genom integriert. Für die Elektroporation der hier verwendeten Empfängerzellen (Transfektanten) wird die Ausgangszelllinie EA2K^b verwendet. Durch die Behandlung werden die Zellen stark erhitzt um daher Schädigungen der Zellen zu vermeiden, müssen alle Materialien gut gekühlt sein und die Vorgänge sollten auf Eis stattfinden.

5x10⁶ Zellen wurden in RPMI Medium (ohne Additive) gewaschen, in 200 μ l resuspendiert und in eine Elektroporationskuvette gegeben. Es wurden je Ansatz 10 μ g des gewünschten, linearisierten Plasmids in die Kuvette pipettiert. Als Negativkontrolle diente ein elektroporierter Ansatz ohne Plasmid. Die Ansätze wurden bei einer Rechteckspannung, 300 μ F und 300V 2 Strompulsen ausgesetzt und danach sofort wieder auf Eis gelagert. Die Suspension wurde aus den Küvetten entfernt und in einem Endvolumen von 2ml in einer 24 Lochplatte für 48 h in RPMI Medium inkubiert.

Nach der ersten Inkubation wurden die Zellen in RPMI+G418 Medium aufgenommen um die Expression von HLA-A2 der parentalen Zellen nicht zu mindern. Nach weiteren 24h wurde dem Zellkulturmedium 500 μ g Hygromycin zugesetzt, da die eingebrachten Plasmide eine Hygromycin Resistenzkassette trugen, d.h. dass nur Zellen heranwachsen konnten, die G418 und Hygromycin resistent waren. Die Zugabe von Hygromycin startete bei 0,5mg/ml, da es sich um ein starkes und hoch toxisches Antibiotikum handelt. Der Elektroporationsansatz ohne Plasmid sollte die erste Hygromycin Gabe nicht überleben, da er keine Resistenz gegen dieses Antibiotikum trug. Die anderen Ansätze wurden nach 1 Woche in T25 Flaschen überführt und mit 1mg/ml Hygromycin weiter

behandelt. Zeigten die Kulturen weiteres Zellwachstum wurden sie in einer RT-PCR auf das Vorhandensein des eingebrachten Proteins hin untersucht.

2.2.2. Durchflußzytometrie (FACS)

FACS steht für "Fluorescence Activated Cell Sorting" und ist eine sehr häufig verwendete Methode. Die FACS Analyse ermöglicht nicht nur das maschinelle Zählen von Zellen, sondern auch die Analyse der phänotypischen Eigenschaften.

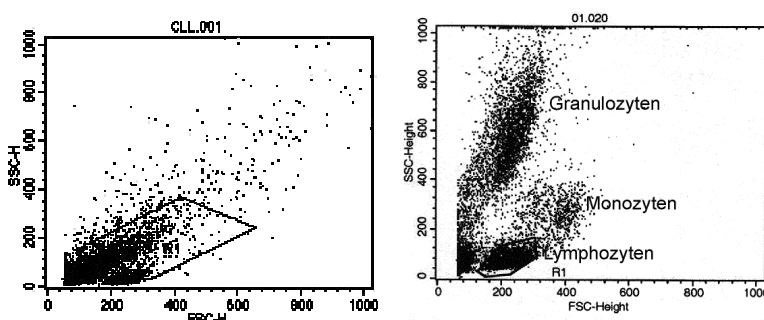


Abb.2: Linke Seite: Ansicht von Mausblut mit humanen Lymphozyten. Rechte Seite: Humane PBMZ. Beides durchflußzytometrisch nach Größe und Granularität der Zellen aufgetrennt.

Die FACS Analyse ist zur Quantifizierung von Zelloberflächen Molekülen und intrazellulären Proteinen in einer Einzelzellsuspension einsetzbar. Diese Technik basiert auf der Antigen-Antikörper Reaktion, wobei die hier zu detektierenden Antigene durch fluorchrom-markierte Antikörper gebunden werden. Das Durchflußzytometer ist in der Lage Einzelzellen aus einer Zellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung aufzunehmen und an einem Laserstrahl vorbeizuführen. Dieser trifft auf die Elektronen der Fluorochrome, welche dadurch aktiviert und in einen höheren Energiezustand transferiert werden. Wenn die Elektronen in ihren Ausgangslevel zurückkehren geben sie detektierbare Energie ab, welche proportional zur Menge des Antikörpers auf der Zelle ist. Durch diese Technik ist es möglich mehrere Moleküle gleichzeitig auf der Oberfläche einer Zelle, mit Hilfe von verschiedenen Fluorchromen, messen zu können. Verschiedene Antikörper auf der Zelle werden durch verschiedene Wellenlängen und ihre typischen Emissions-Spektren gemessen. Zellgröße und Granularität der Zelle werden durch Lichtbrechung und „scattering“, welche durch die Zelle innerhalb des Laserstrahls hervorgerufen wird, gemessen [75].

Für die Oberflächen-Färbung von isolierten Zellen, Blutproben oder Subpopulationen wurden die Zellen mit bis zu 3 verschiedenen Farbstoffen gleichzeitig gefärbt. Standardmäßig wurden die Zellen in FACS Puffer gewaschen und nach Zentrifugation in 200µl FACS Puffer resuspendiert. Der Zugabe von 1,5µl des jeweiligen Antikörpers und

kurzes Vortexen folgte eine Inkubation von 30-45min. bei 4°C. Die Inkubation richtete sich nach der Art des verwendeten Antikörpers und konnte bei besonderen Antikörpern auf 15-20 min. bei RT reduziert werden. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen und in 200µl 1% iger PFA Lösung aufgenommen und im FACS gemessen.

Die Messungen wurden zeitnah an einem FACS Calibur Gerät durchgeführt und umgehend mit der Cell Quest Pro Software analysiert um die prozentualen Anteile verschiedener Oberflächenmoleküle, z. B. CD45, CD33, ermitteln zu können.

Antigen	Reaktivität	Fluoreszenzmarkierung	Firma
CD3	Human	FITC, PE	Beckman Coulter
CD19	Human	FITC,PE	BD
CD33	Human	FITC,PE	BD
CD34	Human	PE	BD
CD45	Human	APC	BD
CD56	Human	APC	BD
CD96	Human	PE	Santa Cruz
HLA-ABC	Human	FITC	BD
HLA-A2	Human	FITC	BD
V beta 3	p53 TZR	PE	BD
CD8	Murin	FITC	BD Pharmingen
CD90.2	Murin	PE	BD Pharmingen
p53	Human	FITC	BD Pharmingen
7-AAD		FITC	BD Pharmingen
CFSE		FITC	Invitrogen

2.2.3. Gewinnung von murinen Blutproben

Für die Gewinnung kleinerer Mengen peripherer mononukleärer Zellen (PBMZ) aus Versuchstieren, während laufender in vivo Experimente, wurde Blut durch Punktion einer Schwanzvene gewonnen. Bei Beendigung des Experiments wurden die Tiere mit einer intraperitonealen Gabe Ketanest/Rompun narkotisiert und Blut durch Herzpunktion gewonnen.

2.2.4. Zellkulturtechnische Methoden

Alle zellkulturtechnischen Methoden wurden unter Sterilbänken durchgeführt, so dass eine Keimfreiheit aller Zellkultur-Materialien gewährleistet werden konnte.

2.2.4.1. Chirurgische Entnahme von Organen

In Abhängigkeit von der Art des Experiments wurden die Tiere entweder durch zervikale Dislokation, oder durch intraperitoneale Gabe von 200µl Ketanest/Rompun getötet. Durch die Verwendung von 70 %-igem und 90 %-igem Ethanol ist eine sterile Entnahme der verschiedenen Organe gewährleistet worden. Die Entnahme erfolgte mit desinfiziertem, chirurgischem Besteck und wurde unter der Sterilbank durchgeführt. Durch einen Schnitt in die rechte Flanke des Tieres wurde die Milz entnommen, wohin gegen die Gewinnung von Knochenmark durch Ausspülen von Tibia und Femur der beiden hinteren Extremitäten vollzogen wurde.

Nach Entnahme der Organe wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt.

Die Milz wurde nach der Entfernung über ein steriles Stahlnetz und durch einen sterilen Nylon-Filter 40µm filtriert. Nach Aufnahme in RPMI Medium und einem Zentrifugationsschritt (1500 UPM, 21°C, 5min.) erfolgt die Resuspendierung im adäquaten Medium.

2.2.4.2. Kryokonservierung von Zellen

Zum Konservieren von humanen und murinen Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierzu wurden die Zellen gezählt und in Portionen von 1 bis 50 Mio. Zellen in 1 bis 2ml Kryomedium aufgenommen, in Kryobehältnisse aliquotiert und für mindestens 48h bei -80°C gelagert. Daraufhin wurden die Zellen in den Stickstofftank (-181°C) überführt und konnten, vorzugsweise in der flüssigkeitsnahen Gasphase, *ad libitum* gelagert werden.

Zum Auftauen wurden die Kryogefäße für ca. 1min. im 37°C Wasserbad vollständig aufgetaut und danach die Zellsuspension mittels steriler Kunststoffpipetten tropfenweise in mindestens 15ml PBS bei RT überführt. Daraufhin erfolgte ein Zentrifugationsschritt (1500 UPM, RT, für 5min.), wonach die Zellen zur weiteren Kultivierung in einer adäquaten Menge des entsprechenden Kulturmediums aufgenommen worden sind.

2.2.4.3. Passagieren von Zelllinien

Alle Zellen, die in diesen Untersuchungen verwendet worden sind, wurden zweimal wöchentlich neu ausgesät. Hierbei wurden je nach Verdünnungsverhältnis und Endvolumen zwischen 0,5 bis 50ml Zellen aus der bestehenden Kultur entnommen und mit neuem Medium in eine Kulturflasche gegeben. Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte bei 37°C und 5 % Co₂ stets unter sterilen Bedingungen.

2.2.4.4. Kultivierung von murinen, peptidspezifischen T-Zellen

Peptidspezifische ZTL für PRAME₁₀₀₋₁₀₈ (PRA100) (CD8xCyA2K^b Mäuse), FluM1 (CD8xCyA2K^bMäuse), p53₂₆₄₋₂₇₂ (A2 Mäuse) und Allo A2 (huCD8 Mäuse) [86] wurden durch wöchentliche Restimulation der Effektorzellen mit entsprechenden Peptid-beladenen Stimulatorzellen etabliert und in Kultur gehalten [76].

Als Stimulatorzellen dienten JA2-Zellen, welche mit 20000 cGy bestrahlt, anschließend in un-supplementiertem RPMI Medium mit 5µg/ml des jeweiligen Peptids und 10µg/ml β₂-Mikroglobulin für 35 bis 40min beladen und schließlich zweimal gewaschen wurden. Die ZTL wurden mit 0,5x10⁶ JA2-Zellen und 6x10⁶ bestrahlten (3000 rad) BL6/J-Milzzellen in einem Endvolumen von 2ml/Loch einer 24 Loch-Platte ausgesät. Den Ansätzen wurde 2 % (v/v) Überstand aus dem Kulturmedium Con A-aktivierter Milzzellen von Lewis- Ratten als Zytokin zugegeben (TCGF) [77].

Bei späteren Restimulationen der ZTL-Populationen wurde anstelle des TCGF IL-2 (100 U/ml) und IL7-Fc (5ng/ml) als Zytokin-Cocktail dazu gegeben.

2.2.4.5. CD56 Depletion mittels direkter MACS-Separation

Die Technik der MACS Separation ermöglicht die Aufreinigung von heterogenen Zellpopulationen. Dabei werden mit magnetischen Partikeln (Beads) konjugierte Antikörper an Oberflächenstrukturen, wie z.B. CD Marker, von Zellen gebunden. Die Zellen durchlaufen ein magnetisches Feld, in dem die Zellen mit den magnetischen Partikeln angereichert werden. Zellen ohne Beads passieren das Magnetfeld.

Zur Depletion von NK Zellen (CD56⁺) innerhalb der AML Probe wurde die Zellsuspension gewaschen, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 80µl per 10⁷ Zellen MACS Puffer resuspendiert. Für 10⁷ Zellen wurden 20µl CD56 Beads dazugegeben und für 15min. bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit MACS Puffer gewaschen und in 500µl Puffer aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde in Separationssäulen überführt, welche in einem starken Magnetfeld montiert worden waren. Das Magnetfeld

hinderte die durch Beads markierten $CD56^+$ Zellen am Durchlauf durch die Säulen. Die $CD56^-$ Fraktion konnte ungehindert aufgefangen werden. Die Säulen wurden dreimal mit 3ml Puffer gespült.

Um die $CD56^+$ Fraktion zu erhalten, wurden die Säulen aus dem Magnetfeld entfernt und die Zellen mit Elutionspuffer ausgespült. Zur Bestimmung der Reinheit der positiven oder negativen Fraktion wurde jeweils eine Probe der Zellsuspensionen im FACS auf die Expression von CD56 hin untersucht.

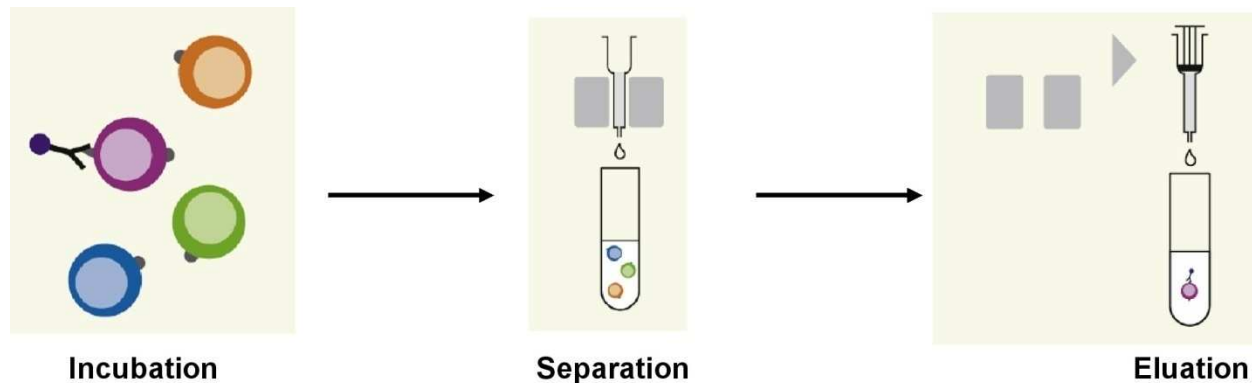


Abb.3: Schematische Darstellung einer MACS® Separation [78].

2.2.4.6. Gewinnung $CD34^+$ Zellen mittels direkter MACS Separation

Die Gewinnung $CD34^+$ Zellen wurde mit Hilfe des „direct $CD34$ progenitor Cell Isolation Kit“ (Miltenyi) durchgeführt. In diesem Fall wurden zuerst $100\mu\text{l}$ FcR Blockierungs-Reagenz (per 10^8 totaler Zellzahl) in die Zellsuspension gegeben. Dieser Schritt verhinderte die spätere unspezifische oder Fc Rezeptor vermittelte Bindung der $CD34$ Beads an nicht $CD34^+$ Zellen. Es folgte die Zugabe von $100\mu\text{l}$ $CD34$ Beads (per 10^8 totaler Zellzahl) und die Inkubation für 30min. bei $6^\circ\text{--}12^\circ\text{C}$, danach die Überführung der Zellen auf MACS-Säulen. Es folgten verschiedenen Waschschrte der Separationssäulen (vergleiche Abschnitt 2.2.4.5.) und die letztendliche Gewinnung der $CD34^+$ Zellen durch die Entnahme der Säulen aus dem magnetischen Feld und der Elution der Zellen. Die Reinheit der Zellpopulationen wurde mittels FACS-Analyse bestimmt.

2.2.5. Chrom-Freisetzungstest

Bei der Verwendung des ^{51}Cr -Freisetzungstests werden die lytischen Eigenschaften von zytotoxischen T-Zellen, welche durch Perforin und Granzym B vermittelt werden, zur Detektion der Lyse von Zielzellen genutzt [79, 80]. Gemessen wird die Strahlung, des bei der Lyse freigesetzten Chroms aus dem Überstand. Als Zielzellen wurden sowohl T2-Zellen verwendet, welche mit relevantem oder irrelevantem Peptid beladen werden können, als auch Tumorzelllinien, die für die Erkennung der endogenen prozessierten spezifischen Antigene genutzt werden können.

Je 5×10^5 Zielzellen wurden für 90 min. mit $150 \mu\text{Ci Na}^{(51}\text{Cr})\text{O}_4$ (1mCi/ml) markiert. Gleichzeitig mit dieser Inkubation wurden bei Peptidkonzentrationstests jeweils $2 \mu\text{l}$ Peptid verschiedener Peptidkonzentrationen in $10 \mu\text{l}$ FCS zu den verwendeten T2 Zellen pipettiert. Die so markierten Zellen werden dreimal bei 1500Upm für 5 min. gewaschen und dann in 10ml RPMI Medium aufgenommen, was zu einer Endkonzentration von $0,5 \times 10^5$ Zellen/ml führt.

Die Effektorzellen, deren Zellzahl sich nachdem Effektor- zu Target- Zell Verhältnis (E/T) berechnet, wurden in RPMI Medium aufgenommen, 0,1ml in eine 96 Loch-Platte überführt und dann im Verhältnis 1/3 verdünnt. Dieser Verdünnungsschritt wird wieder in das nächste Loch überführt und 1/3 verdünnt. Nach 5 Wiederholungen entspricht dies einer Titration von 5 E/T Verhältnissen.

0,1ml der markierten Zielzellen wurden zu den Effektorzellen pipettiert und für 4-6 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

Die Zellen wurden mit Ausnahme der Maximal- Proben, beinhalten nur markierte Zellen, abzentrifugiert (1300 Upm, 9 min, 4°C), $80 \mu\text{l}$ des Üb erstandes auf Luma Platten überführt und über Nacht getrocknet.

Die prozentuale spezifische Lyse ergibt sich aus folgender Gleichung, welche durch die Top Count Software ermittelt wird.

$$\frac{(\text{exp. } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spo. } ^{51}\text{Cr-Freisetzung})}{(\text{max. } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spo. } ^{51}\text{Cr-Freisetzung})} \times 100 = \% \text{ spezifische Lyse}$$

Die maximale ^{51}Cr -Freisetzung entspricht Ansätzen nur von markierten Zielzellen. Die spontane ^{51}Cr -Freisetzung entspricht dem Überstand von Zielzellen ohne Effektorzellen.

2.2.5.1. CFSE-Test

Der CFSE Test nutzt die gleichen Eigenschaften von zytolytischen T-Zellen wie der Chrom- Freisetzungstest. Hierbei wird jedoch kein radioaktives Isotop zur Markierung der Zielzellen verwendet, sondern ein aus Carboxyfluorescein Diazetat Succinimidyl Esther (CFSE) bestehender Farbstoff. Der CFSE-Farbstoff kann spontan in Zellen diffundieren und bindet dort über eine Estherverbindung irreversibel an intrazelluläre Proteine. Bei der Zellteilung wird CFSE an die Tochterzelle abgegeben, welche dann die Hälfte der Fluoreszenz der parentalen Zelle erhält [81, 82].

Der Vorteil gegenüber dem herkömmlichen Chromfreisetzungstest besteht darin, dass dieser in vitro Test über mehrere Stunden, bis hin zu Tagen inkubieren kann. Das hat zur Folge, dass nicht nur die Lyse über Perforin/Granzym gemessen werden kann, sondern auch die langsamere Induktion der Apoptose durch Interaktion des Fas Liganden (FasL) mit dem Fas Rezeptor oder dem Tumor-Nekrose Faktor α (TNF- α) in die zytolytische Reaktivität der T-Zellen mit eingerechnet werden kann. Die Induktion von Apoptose durch FasL oder TNF- α tritt erst nach 12-24h ein [83, 84]. Ein weiterer Vorteil dieser Untersuchung ist heterogene Zielzell Populationen (z. B. AML-Material) problemlos markieren zu können. Zu Grunde liegend dafür ist die passive Diffusion des CFSE-Farbstoffs in alle Zelltypen. Somit können auch Zelltypen untersucht werden, welche in einem Chrom- Freisetzungstest das Problem einer verschiedenen starken Chromierung aufweisen. Dies lässt Rückschlüsse auf eine mögliche Austilgung von malignen Stammzellen zu [85].

Die Zielzellen wurden mit PBS gewaschen und auf eine Konzentration von maximal 2×10^7 Zellen/ml eingestellt. $10 \mu\text{M}$ CFSE wurde zu den Zellen gegeben und im abgedunkelten Wasserbad bei 37°C für 10min. inkubiert. Nach der Inkubation mit dem CFSE-Farbstoff folgte ein sofortiges Abstoppen der Reaktion durch Zugabe desselben Volumens FCS und einer 2min. Inkubation bei Raumtemperatur. Die mit CFSE markierten Zellen (CFSE-Zellen) wurden zweimal gewaschen und bei 1500 UPM, 5 min. abzentrifugiert.

Falls die CFSE-Zellen mit Peptid beladen werden sollten folgte die Peptidbeladung ($5 \mu\text{l}$ Peptid der geforderter Endkonzentration) für 30min. bei 37°C und 5 % CO_2 . Es folgten erneut zwei Waschschrte.

Die Zellen wurden in RPMI Medium in einer Endkonzentration von 5×10^5 Zellen/ml aufgenommen und $100 \mu\text{l}$ dieser Zellsuspension in eine 96 Loch-Platte überführt. Die Effektorzellen wurden in verschiedenen E/T Verhältnissen mit je $100 \mu\text{l}$ direkt auf die Zielzellen pipettiert. Die Kulturplatten wurden 6 oder 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und mit FACS-Puffer gewaschen. Der relevante Antikörper (CD45) wurde in die Suspension

gegeben und einer Inkubation von 30 bis 45min. bei 4°C folgten zwei weitere Waschschriffe mit FACS-Puffer und die Aufnahme in 1 % PFA-Lösung.

Das Ergebnis wurde mittels FACS-Analyse bearbeitet, wobei immer $2,5 \times 10^3$ Zellen durch das Gerät gezählt wurden.

Die Auswertung wurde in % CFSE-Zellen angegeben, kann aber durch folgende Formel auch als % überlebende Zellen angegeben werden.

$$\frac{\text{(absolute Anzahl lebender CFSE}^+ \text{ Zellen)}}{\text{(absolute Anzahl lebender CFSE}^+ \text{ Zellen bei t=0)}} \times 100 = \% \text{ überlebende Zellen}$$

2.2.5.2. Konkurrenz-Test zur Bestimmung der Peptidbindungs-Affinität synthetischer Peptide an HLA-A2.1

Ein Konkurrenztest wurde angewandt, um die Bindung der PRAME- und MPP11- Peptide an A2.1 zu testen. T2-Zellen wurden mit $0,01 \mu\text{g}$ des A2.1-bindenden Peptids p53₂₆₄₋₂₇₂ [86] beladen und nachfolgend $3 \mu\text{g}$ oder $10 \mu\text{g}$ des zu testenden Peptids zur Kompetition hinzugegeben. Das FluM1-Peptid diente als Positivkontrolle, während das VSV-N-Peptid als Negativkontrolle fungierte, da VSV-N ein H-2K^b bindendes Peptid ist [87].

Die A2.1-restringierte und p53₂₆₄₋₂₇₂ spezifische ZTL-Population wurde in verschiedenen E/T Verhältnissen auf ihre lytische Aktivität gegenüber Peptid-beladenen und unbeladenen T2-Zellen in einem Standard-Chromfreisetzungstest (siehe 2.2.6.) untersucht. Die spezifische Lyse im Test zeigte die Fähigkeit der synthetischen Peptide das p53₂₆₄₋₂₇₂ Peptid zu verdrängen. Das Ergebnisse dieser Experimente wurde umgerechnet in % Inhibition [76]. Die prozentuale Inhibition der durch p53-ZTL vermittelten spezifischen Lyse (SL) von p53₂₆₄₋₂₇₂-beladenen T2-Zellen und die der Testpeptide wurde bei einem E/T Verhältnis von 3:1 nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Inhibition} = 100 - \left[\frac{(\% \text{ SL T2+p53+Testpeptid}) - \% \text{ SL T2 ohne Peptid}}{(\% \text{ SL T2+ p53}) - \% \text{ SL T2 ohne Peptid}} \right] \times 100$$

2.2.6. Peptid-Immunisierung bei Mäusen zur Generierung peptidspezifischer ZTL

Zur Generierung HLA-A2 restringierter, peptidspezifischer, zytotoxischer T-Zellen (ZTL) wurden 100µg des Peptides (z. B. PRAME₁₀₀₋₁₀₈) und 120µg HBV Core₁₂₈₋₁₄₀ (ein I-A^b-bindendes synthetisches T-Helfer Peptid) [79] in 150µl inkomplettem Freudschem Adjuvants (IFA) emulgiert und 8 Wochen alten, naiven CD8xCyA2K^b Mäusen subkutan an die Schwanzwurzel appliziert [86].

Nach 10 Tagen wurden die immunisierten Mäuse getötet und die Milzen unter aseptischen Bedingungen entnommen. Diese wurden über ein Hitze-sterilisiertes Eisennetz gerieben und durch ein 40µm Sieb passiert um eine Milzzellsuspension zu erhalten. Nach zweimaligem Waschen (5 min., 1500 Upm, RT) der Zellsuspension wurden die Zellen in einer Konzentration von 7×10^6 Zellen/ml aufgenommen. Je 1 ml wurde in ein Loch einer 24 Loch- Platte zur Kultur gegeben.

Als Stimulatorzellen wurden Lipopolysaccharid stimulierte B-Zell-Blasten (LPS-Blasten) verwendet. Die LPS-Blasten wurden durch dreitägige Stimulation von Milzzellen (1×10^6 Zellen/ml) naiver Mäuse desselben Stammes gewonnen. Die Kultivierung erfolgte in einem speziellen RPMI-Medium, welches 1 % LPS (Salmonella thyposa) und 1 % Dextransulfat enthielt.

Die LPS Blasten wurden mit 3000 cGy (¹²³Cäsium) bestrahlt, zweimal gewaschen, und in 1ml RPMI resuspendiert. Mit 5µg/ml des relevanten Peptides und 10µg/ml β₂-Mikroglobulin wurden sie für 30-45 min. im Wasserbad bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde eine Endkonzentration von 3×10^6 Zellen/ml eingestellt und mit je 1 ml (v/v) zu den Milzzellen der immunisierten Mäuse gegeben.

Die Ansätze wurden für 6 Tage inkubiert und anschließend einem Chrom-Freisetzungstest unterzogen.

2.2.7. Induktion verschiedener, spezifischer, muriner Tumore in NOD/SCIDyc^{null} Mäusen

Die Transfektanten EA2K^b, EA2K^bp53, EA2K^bPRAME sowie die Zelllinien K562, K562-A2, Saos2/143, KG-1 und HL-60 wurden auf ihre Fähigkeit untersucht in NOD/SCIDyc^{null} Mäusen solide Tumore zu entwickeln. Dazu wurden die Tumorzellen in verschiedenen Zellkonzentrationen subkutan (s.c.) am Schwanzansatz in die Mäuse inokuliert. Das Tumorstadium wurde über einen Zeitraum von mehreren Wochen beobachtet.

2.2.7.1. Applikation p53- und PRA100-spezifischer ZTL als protektiver Ansatz der Tumorbekämpfung

Die in 2.2.1.7. erläuterten Tumor-Transfektanten wurden in diesen Experimenten mit den jeweiligen spezifischen ZTL (p53-, PRA100-, Allo A2-T-Zellen) in einer 96 Loch-Platte kokultiviert und nach 24 Stunden i.v. in NOD/SCID γ ^{null} Mäuse injiziert um ihre GVL-Aktivität in einem ersten in vivo Ansatz testen zu können. Im Detail wurden die Tumor-Transfektanten zweimal gewaschen (1500Upm, 5min., RT) und in 1×10^6 Zellen/100 μ l in Medium aufgenommen.

Die murinen ZTL wurden ebenfalls gewaschen und in RPMI Medium mit einer Endkonzentration, die einem E/T Verhältnis zu den Tumorzellen von 5/1 entsprach, aufgenommen.

100 μ l der Tumor-Zellsuspension sowie der ZTL-Suspension wurde in ein Loch einer 96 Loch-Platte pipettiert und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Die Zellsuspensionen wurden abgenommen, gewaschen und in 200 μ l PBS resuspendiert. Die Applikation der Zellen in die Mäuse erfolgte s.c. am Schwanzansatz, welcher zuvor mit Ethanol desinfiziert wurde. Zeitlicher Endpunkt der Experimente war Tag 23, an dem die Tumorgroße mittels einer Schieblehre ermittelt wurde.

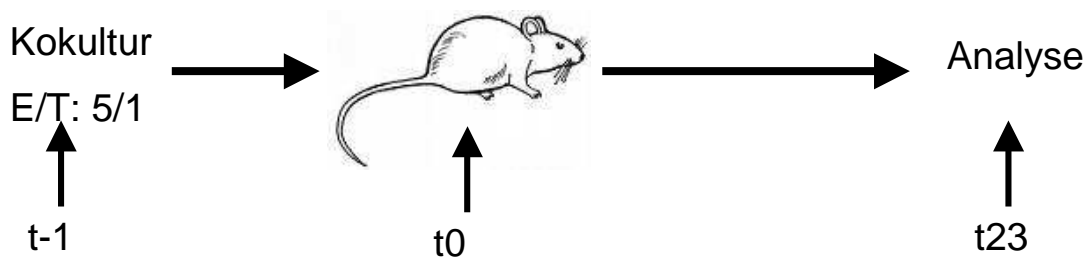


Abb.4: Detailabbildung der Kokultur-Tumor-Experiment Variante 1

Nach der Tötung der Tiere wurden Blut, Milz und der Tumor entnommen. Teile des Tumors wurden für spätere histologische Untersuchungen in 4% Formalin eingebettet und bei 4°C gelagert. Es folgten FACS-Analysen aus Blut und Teilen der Milz auf murines CD3 (muCD3), muCD8, HLA-A2 und im Falle eines Experimentes mit p53 ZTL auf vbeta3.

In einem weiteren Telexperiment dieser Untersuchungsreihen wurden die Tumorzellen und ZTL beide an Tag 0 appliziert. Die Tumorzellen wurden s.c. an den Schwanzansatz der NOD/SCID γ ^{null} appliziert, wohingegen die ZTL in einem E/T Verhältnis von 12:1 gegenüber den Tumorzellen i.v. in die Schwanzvenen injiziert worden sind.

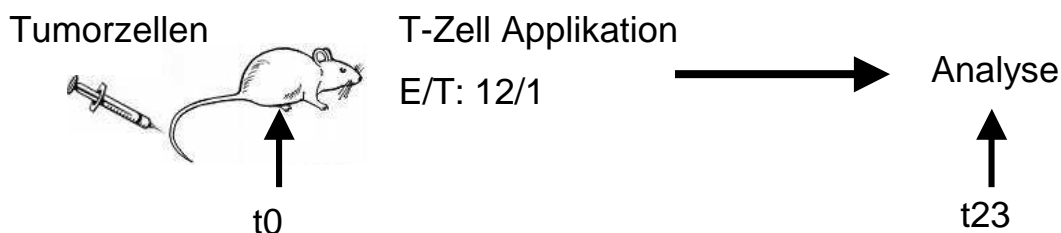


Abb.5: Detailabbildung der Standard-Tumor- Experiment Variante 2

An Tag 23 wurde die TumorgroÙe gemessen und wie in Variante 1 wurden FACS-Analysen der Milz durchgeföhrt und Teile der Tumore für histologische Untersuchungen in Formalin gebettet.

2.2.7.2. Ex vivo Expansion Tumor-spezifischer T-Zellen

Bei den Untersuchungen in 2.2.7.1. wurden Teile der Milzellsuspension in eine 24 Loch-Platte überföhrt und in einem Endvolumen von 2ml/Loch für 6 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte die Expansion der in der Zellsuspension enthaltenen spezifischen T-Zellen. Hierzu wurden wöchentliche Restimulationen der Zellen durchgeföhrt. Für die primären und sekundären Restimulationen wurden JA2-Zellen mit 20000 cGy bestrahlt und mit 5µg/ml des jeweiligen Peptids und 10µg/ml β₂-Mikroglobulin in unsupplementiertem RPMI Medium für 30 bis 45min bei 37°C beladen. Bei Versuchen mit Allo-A2 ZTL wurden die JA2-Zellen keiner Peptidinkubation unterzogen, sondern gleich nach der Bestrahlung weiter verwendet. Nach zwei Waschschrinen wurden 0,5x10⁶ JA2-Zellen in ein Loch einer 24 Loch-Platte gegeben. Die Milzzellen wurden gewaschen und in 1ml RPMI Medium resuspendiert und zu den peptidbeladenen JA2 Zellen gegeben, dazu kamen noch 0,5ml RPMI Medium mit IL-2 und IL-7Fc. Die Zytokin-Endkonzentrationen betragen 100U/ml IL-2 und 5ng/ml IL-7Fc. Nach weiteren 7 Tagen erfolgte die tertiäre Restimulation. Ab diesem Zeitpunkt wurden die ex vivo Milzzellen wie murine ZTL restimuliert (siehe Abschnitt 2.2.4.4.).

Die Zellzahl der ex vivo T-Zellen wurde kontrolliert und ab entsprechenden Zelldichten (min. 2x10⁶ Zellen) wurde ein Chromfreisetzungstest zur Bestimmung der Spezifität der expandierten T-Zellen durchgeföhrt.

2.2.8. Etablierung einer AML in NOD/SCIDyc^{null} Mäusen

Um eine AML in NOD/SCIDyc^{null} Mäusen etablieren zu können, wurde Leukapherese Material, oder peripheres Blut von AML-Patienten aus der III Med. Klinik der Johannes Gutenberg Universität verwandt. Die Patienten-Materialien (AML-Proben) wurden ficollisiert danach mindestens zweimal mit PBS gewaschen und dann entweder eingefroren oder sofort für die weitere Verarbeitung benutzt.

Die AML-Proben wurden zur Weiterverarbeitung mittels MACS Separation (siehe 2.2.5.5. und 2.2.5.5.1.) genutzt. Die so erhaltene CD56-depletierte (CD56⁻) Fraktion, sowie die CD34-angereicherte (CD34⁺) Fraktion wurden wiederum gewaschen und in einer Endkonzentration von 5×10^6 Zellen/200 μ l in PBS aufgenommen. Das Design für ein Standard-Etablierungs-Experiment sah folgendermaßen aus:

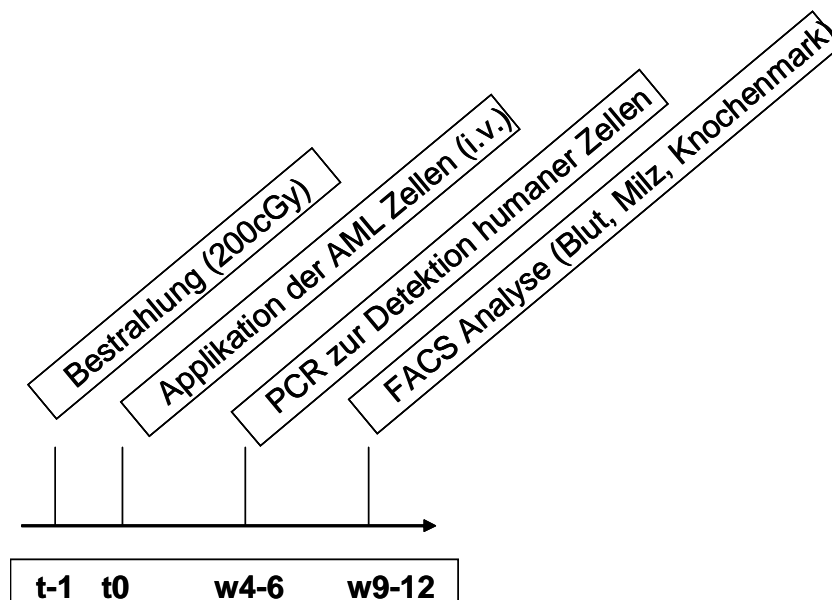


Abb.6: Design eines Standardexperiments zur Etablierung einer humanen AML in NOD/SCIDyc^{null} Mäusen

Die in den hier dargestellten Untersuchungen verwendeten Mäuse waren zwischen 9-13 Wochen alt.

Die Mäuse wurden am Tag -1 mit 200cGy bestrahlt und an Tag 0 mit 200 μ l der AML-Proben intravenös in die Schwanzvene behandelt. Hierbei ergaben sich stets 3 Gruppen von Tieren:

Zum einen die Gruppe, welche die CD56-depletierte Zellen appliziert bekam zum anderen die Gruppe, die CD34-angereicherte Zellen bekam und schließlich die Gruppe unbehandelter AML-Zellen.

In Woche 4-6 nach Applikation wurden den Versuchstieren Blutproben aus der Schwanzvene entnommen, welche mittels genomischer PCR auf das Vorhandensein von humanem Chromosom 17 analysiert wurden. Die daraus resultierenden Ergebnisse

ließen Rückschlüsse auf das Vorhandensein einer humanen AML in den Tieren zu. Erst ab Woche 9 konnten mit FACS-Analysen Gewebe, wie Milz, Knochenmark sowie Blut untersucht werden. Hier war die Detektion des allgemeinen Leukozyten-Markers CD45 eines der wichtigsten Indizien für die Etablierung einer humanen AML. Nur Tiere, die positive Ergebnisse in PCR und FACS brachten, wurden für weitere Untersuchungen verwendet. Insbesondere wurden FACS-Analysen für die humanen Marker CD45, CD3, CD96, CD33, CD34 und CD19 zu Beginn und im weiteren Verlauf des Experimentes getätigt.

2.2.8.1. ZTL als Mittel der Immuntherapie bei einer AML

Wurde, wie in Abschnitt 2.2.8. beschrieben, ein Anwachsen von humanen Zellen in den Versuchstieren mittels PCR detektiert, so wurden diese Tiere zu weiteren Untersuchungen der GVL-Aktivität spezifischer ZTL-Populationen, insbesondere der p53- und PRAME100-spezifischen ZTL, mit einer wöchentlichen Gabe von 1×10^6 T-Zellen (i.v.) weiter behandelt. Zusätzlich zu der wöchentlichen Applikation der T-Zellen wurde IL-2 verabreicht (200U/Maus). Nach mindestens drei bis vier T-Zell-Gaben wurden die Mäuse getötet und Milzzellen, Knochenmarkzellen und peripheres Blut auf das Vorhandensein humaner Zellen untersucht. Zu einer abschließenden Analyse wurden FACS-Ergebnisse der AML-Probe vor der Transplantation (prä TX), bei Detektion humaner Zellen (post Tx) und nach Gabe der T-Zellen mit einander verglichen.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchungen zur PRAME-Expression in AML Proben und Geweben

Die Expression der in dieser Arbeit verwendeten, potenziellen Antigene wurde in ersten Untersuchungen verifiziert.

Die PRAME-Expression in verschiedenen hämatologischen Erkrankungen wurde von mehreren Arbeitsgruppen bereits in der Literatur beschrieben [26, 31, 88].

Zunächst wurden neben Literaturrecherchen zeitgleich Computerrecherchen in der EST-Datenbank („*Expressed Sequence Tags*“, beinhaltet cDNS Informationen zahlreicher Gene und Organismen) durchgeführt, um die Expression von PRAME (NM006115) und MPP11 (X98260) in verschiedenen Geweben und hämatologischen Erkrankungen zu bestimmen.

Die Ergebnisse der Recherchen ermöglichten uns, einen primären Überblick über die Nützlichkeit dieser Proteine zu erlangen, hinsichtlich möglicher Epitope zur T-Zellgenerierung.

Die Untersuchungen machten deutlich, dass sowohl PRAME als auch MPP11 als Zielantigene für eine adaptive Immuntherapie in Frage kommen. Dies konnte vor allem an den Expressionsdaten festgemacht werden.

Die Expression von PRAME in hämatologischen Erkrankungen wird auf 64 %, die von MPP11 auf 86 % beziffert. Die Expression der beiden Antigene konnte in PBMZ gesunder Spender nicht detektiert werden.

Auf Grund der unterschiedlichen PRAME-Expressionsprofile von Geweben innerhalb der Literatur, wurde nach Ermittlung der theoretischen Daten ausschließlich das PRAME-Antigen von uns auf seine Expression untersucht. Literaturergebnisse für eine MPP11-Expression in hämatologischen Erkrankungen zeigten bereits das MPP11 in z. B. 86% der AML-Patienten überexprimiert wird, nicht aber bei gesunden Individuen. Daher wurden MPP11 Untersuchungen lediglich auf ein Minimum beschränkt, da eindeutige erste Untersuchungen unsererseits mit den bekannten Literaturergebnissen kongruent waren.

Für die Expressions-Untersuchungen wurden quantitative RT-PCR Tests durchgeführt. Hierfür wurde frisches peripheres Blut von AML-Patienten in Röhrchen des Paxgene Kits direkt abgenommen und gemäß Vorschrift über mehrere Stunden bei RT und dann bei 4°C gelagert. Die in den Paxgene Röhrchen befindliche Stabilisationsflüssigkeit ist

in der Lage, die m-RNS vor dem Abbau durch Endonukleasen zu bewahren und liefert somit einen genauen Blick auf die Proteinsynthese in den einzelnen Proben.

Nach der vorschriftsmäßigen Lagerung der Proben erfolgte die Isolation der RNS aus Patientenproben. In einem Zwischenschritt vor der reversen Transkription, der Umschreibung der RNS in cDNS, wurde die Integrität der isolierten Nukleinsäure untersucht. Die Stabilität der RNS kann durch Gelelektrophorese ermittelt werden. Hierbei ist das Verhältnis zwischen der 28S ribosomalen und der 18S RNS von entscheidender Bedeutung. Die Bande der 28S RNS hat eine stärkere Intensität verglichen mit der 18S RNS Bande. Beträgt das Verhältnis 2:1 (28S:18S) kann eine gute Qualität der zu verwendeten RNS angenommen werden. Wie in Abb.7 zu erkennen, zeigten alle exemplarisch dargestellten AML- und Zelllinien-RNS-Gele deutliche Banden für die 28S ribosomale- und die 18S RNS, die auch dem 2:1 Verhältnis entsprachen.

Der cDNS Gehalt der Proben wurde danach fotometrisch bestimmt (Abschnitt 2.2.1.2.).

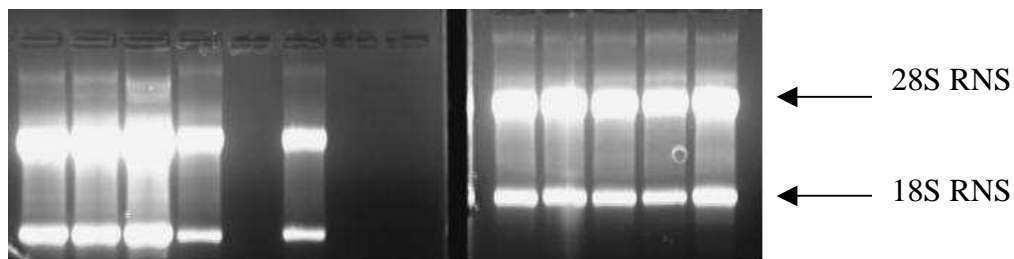


Abb.7: Beispiele für die Reinheit der RNS von AML-Proben (linke Seite) und Zelllinien (rechte Seite). Die Banden zeigen die 28S ribosomale RNS und die 18S RNS.

Die PRAME-Expression wurde anhand von RT-PCR Experimenten an 17 Geweben, 9 Zelllinien und 35 frischen bzw. kryokonservierten AML-Patientenmaterialien in verschiedenen Ansätzen analysiert um die Nützlichkeit des PRAME-Antigens aus den Literaturrecherchen zu bestätigen.

Die Abb.8 bis 11 zeigen die Ergebnisse unserer Untersuchungen und die daraus resultierenden quantitativen Auswertungen.

Eine erhöhte PRAME-Detektion war in mehreren Untersuchungen in gesunden Geweben von Plazenta sowie Milz und Ovar festzustellen. Eine intermediäre Expression wurde in der Lunge, der Niere, dem Thymus, dem Duodenum und dem Endometrium detektiert. Geringe PRAME-Expressionen konnten in allen anderen Organen gesunder Spender gezeigt werden. Auch war festzustellen, dass humane CD34⁺ Stammzellen sowie periphere mononukleäre Zellen (PBMZ) in keiner unserer Untersuchungen eine PRAME-Expression zeigten (siehe Abb.8). In leukämischen Zelllinien, wie K562 und KG-1, konnte durch quantitative RT-PCR Untersuchungen eine deutliche Überexpression von PRAME bestätigt werden. Eine starke Überexpression von PRAME war in knapp 30 % der getesteten AML-Patientenproben zu detektieren. Eine intermediäre Expressi-

on wurde in 25 % und eine geringe bis gar keine Expression in 30 bis 35 % der Proben festgestellt.

Resultierend daraus ergab sich, dass in 20 bis 30 % der von uns getesteten AML-Proben eine PRAME-Überexpression festzustellen war. Dabei war festzustellen, dass Proben des Paxgene-Kits reproduzierbarere Ergebnisse erzielten, als kryokonserviertes Material.

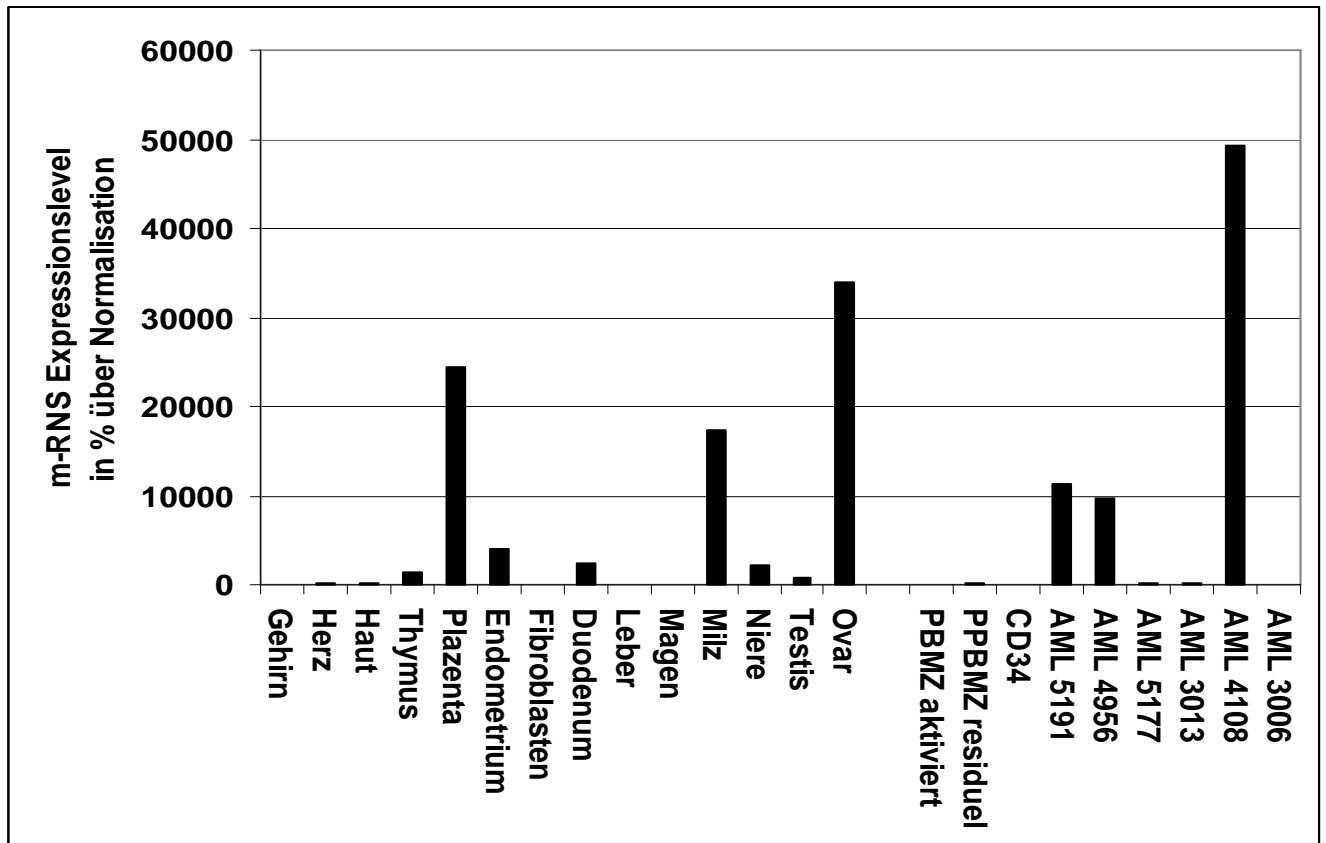


Abb.8: Quantitative RT-PCR Ergebnisse für PRAME-Expressionen von Zelllinien, Geweben und AML-Proben. Ergebnisse normalisiert zu Ösophagus Probe. Interne Referenz Kontrolle war 18s RNS.

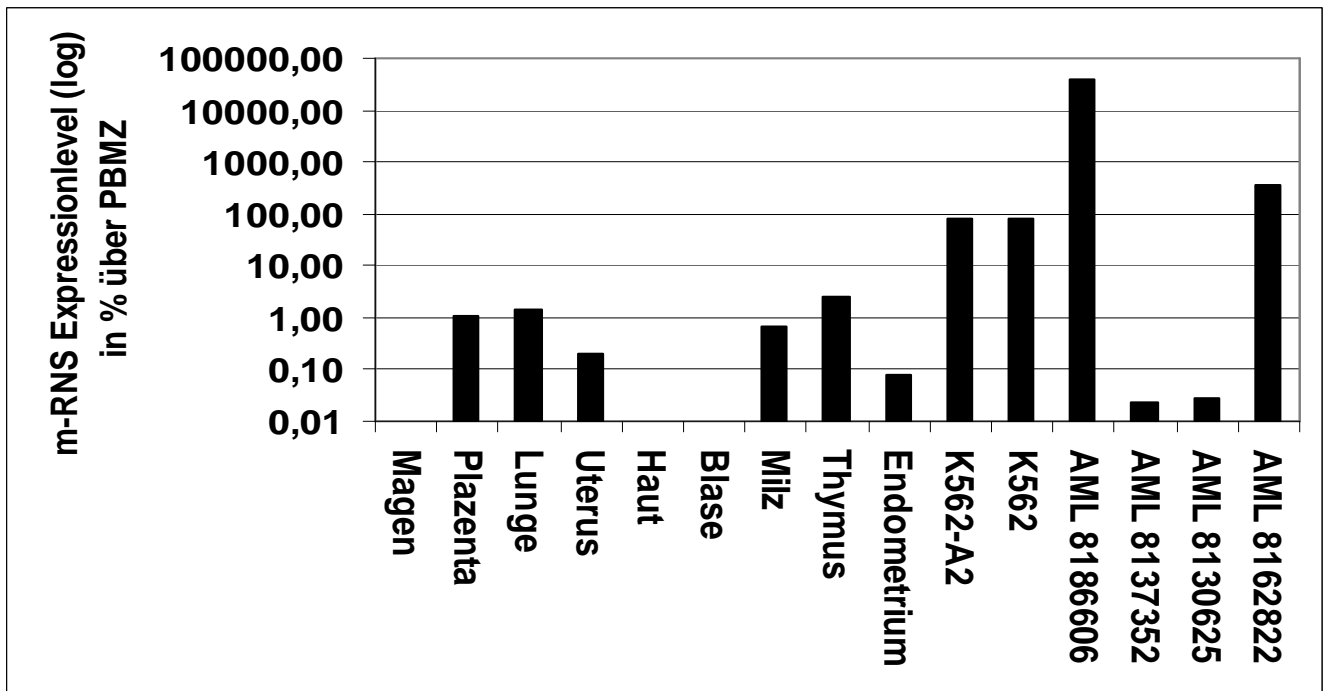
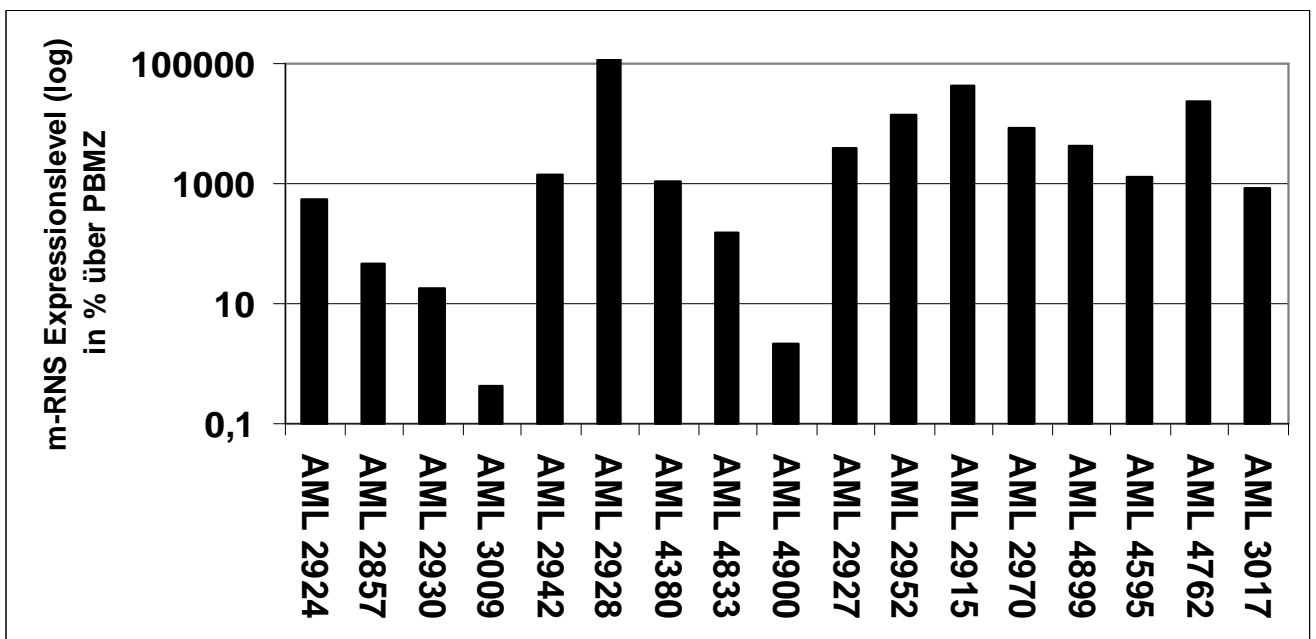


Abb.9: m-RNS Expressionsprofil von PRAME normalisiert zu PBMZ gesunder Spender. Internes Kontrollgen war EF1- α

Die durch die quantitative Bestimmung der RNS-Expression von PRAME in verschiedenen Zelllinien, Geweben und AML-Proben erhaltenen Ergebnisse entsprachen denen in der Literatur beschriebenen Daten [41].



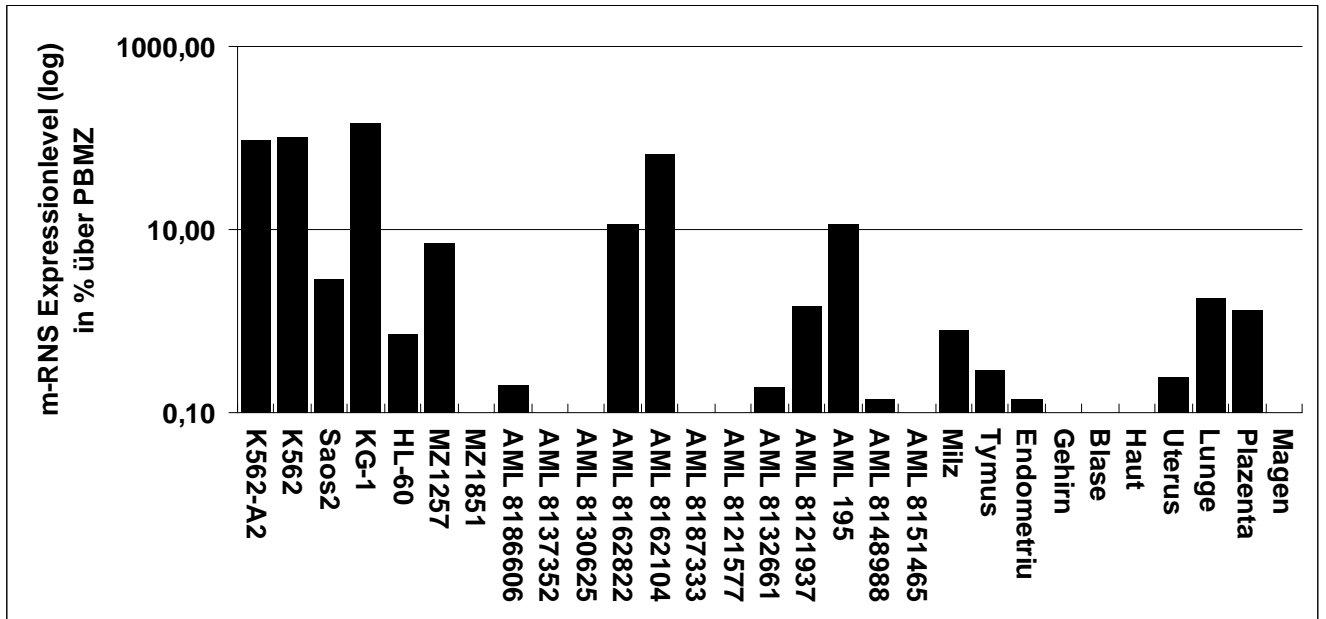


Abb.10: Quantitative Daten des m-RNS Expressionsprofils von PRAME normalisiert zu PBMZ gesunder Spender. Internes Kontroll-Gen war 18sRNS

Die Literaturdaten zeigten für die Expression von MPP11 übereinstimmend, dass dieses Protein in allen Geweben vorhanden ist, nur aber in soliden Tumoren sowie hämatologischen Erkrankungen überexprimiert wird. Es konnte in Übereinstimmung mit den bisher bekannten Daten festgestellt werden, dass sich MPP11 in gesunden Geweben nur nach PCR-Untersuchungen mit mehr als 40 Zyklen detektieren lässt, was Rückschlüsse auf eine sehr schwache Expression vermuten lässt. In AML-Proben konnte eine Expression in allen untersuchten Ansätzen festgestellt werden, was die Nützlichkeit von MPP11 als potenzielles Antigen bestätigte.

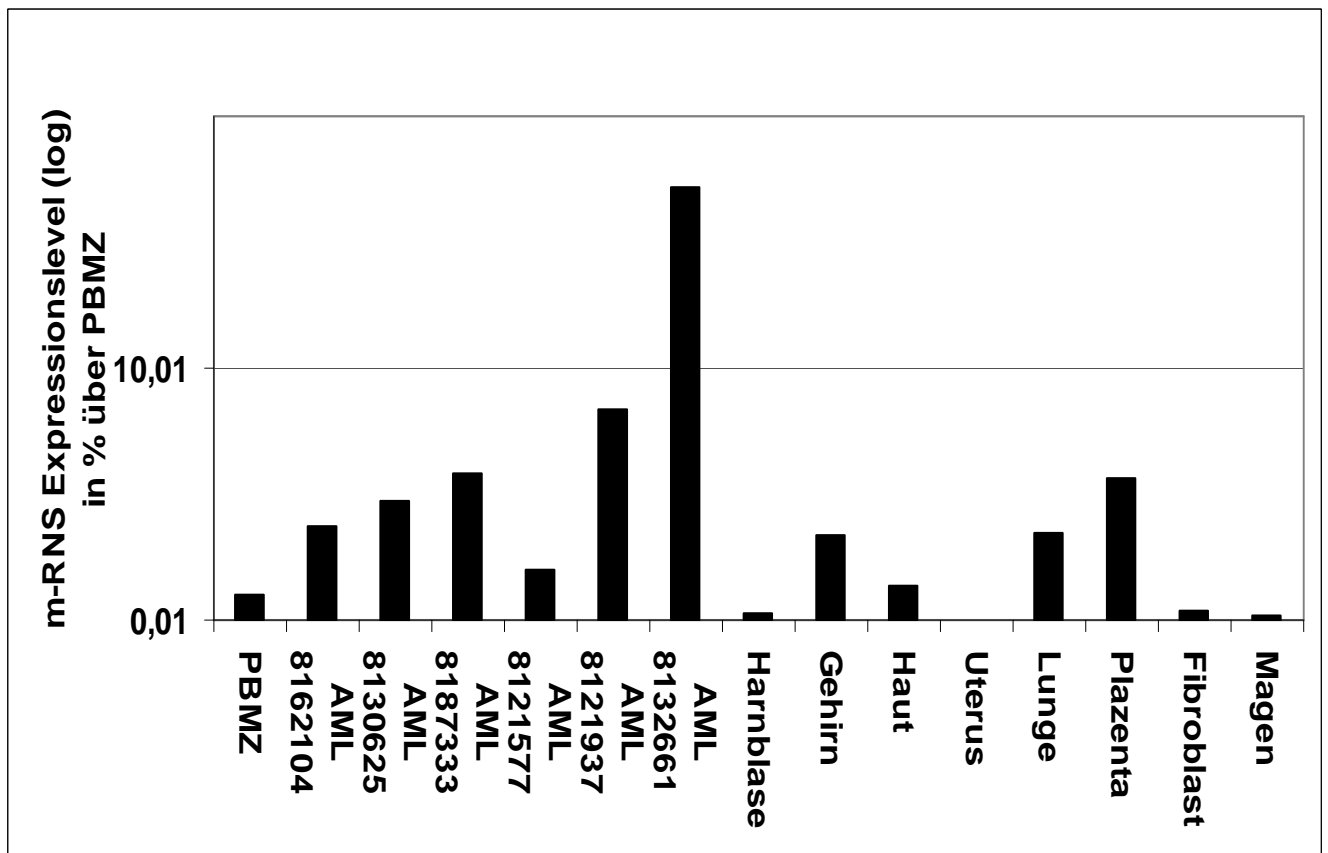


Abb.11: Quantitative PCR Daten zur MPP11-Expression in Geweben und AML-Proben. Normalisiert zu PBMZ, internes Referenzgen war EF1- α .

Die Überexpression von PRAME in verschiedenen AML-Proben sowie die schwächere bis zum Teil fehlende Expression in Normalgeweben macht PRAME zu einem möglichen Zielantigen in der adaptiven Immuntherapie hämatologischer Erkrankungen.

3.2. Theoretische Selektion potenziell HLA-A2.1-bindender PRAME- und MPP11-Peptide

Nach den Untersuchungen zur Expression von MPP11 und PRAME und der erfolgreichen Detektion der Proteine mittels RT-PCR Analysen (siehe Abschnitt 3.1.) in AML-Proben und der daraus resultierenden Nützlichkeit der Antigenkandidaten, wurden die Peptidsequenzen von PRAME und MPP11 hinsichtlich geeigneter Epitope zur ZTL-Erkennung untersucht.

Dabei war zu beachten, dass im Kontext von MHC-Klasse I-Molekülen präsentierte Peptide zwischen 8-10 Aminosäuren lang sein sollten. Die Aminosäuren an bestimmten Positionen, so genannte Ankerpositionen, sind von großer Bedeutung für die Bindung des Peptids an das MHC-Molekül [89-91].

Neben der potenziellen Bindungsaffinität der Peptide wurde hinsichtlich der Immunogenität der aus MPP11 und PRAME abgeleiteten Epitope, ihre Homologie zu den entsprechenden Proteinsequenzen in der Maus als weiteres Auswahlkriterium verwendet. Homologie unter zwei Peptiden beschreibt die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz der beiden Peptide. Es wurde davon ausgegangen, dass nicht-homologe Peptide immunogener sind, da hier keine potenzielle Selbsttoleranz des T-Zellrepertoirs gegen die Antigene vorliegen kann.

Diese Daten-Zusammenstellung und die Ergebnisse verschiedener Vorhersage-Programme, wie SYFPEITHI, bimas, RANKPEP oder PAProc [91-93] mit ihren Bindungs-Vorhersage-Algorithmen, bildeten die theoretische Grundlage der Auswahl geeigneter Epitope.

J.H. Kessler war bereits 2001 in der Lage vier verschiedene PRAME Epitope zu charakterisieren, welche mögliche Zielstrukturen für die Erkennung durch ZTL darstellen [94]. Da es aber hinsichtlich der in vivo Generierung dieser PRAME-Epitope keinerlei Daten gab, wurden diese bereits bekannten Epitope in dieser Arbeit aufgegriffen und erneut getestet.

Im Weiteren werden ausschließlich die bereits von Kessler publizierten PRAME-Epitope verwendet. Im Detail waren es folgende Epitope:

PRAME₁₀₀₋₁₀₈ (PRA100), PRAME₁₄₂₋₁₄₄ (PRA142), PRAME₃₀₀₋₃₀₉ (PRA300), PRAME₄₂₅₋₄₅₂ (PRA425).

Für die Generierung potenzieller MPP11-ZTL-Epitope gab es noch keine Literaturdaten, so dass diese ausschließlich mittels Vorhersage-Programmen erstellt wurden.

Aus über 20 möglichen Peptide-Sequenzen wurden anhand der Ergebnisse der Vorhersage Programme insgesamt 14 Peptide -inklusive der 4 bereits beschriebenen PRAME-Peptide- ausgewählt.

Die in Tab.1 aufgeführten Peptidepitope zeigten die theoretisch besten Ergebnisse in Kombination aller Vorhersagen (bimas, SYFPEITHI, Homologie zwischen Maus und Mensch), der ausgewählten PRAME- und MPP11-Peptide, untereinander.

Protein	Position	Länge	Sequenz	bimas	SYFPEITHI	AS-Unterschiede Maus/Mensch
PRAME	100	9mer	VLDGLDVLL	14.526	26	2
PRAME	142	10mer	SLYSFPEPEA	15.898	20	3
PRAME	300	10mer	ALYVDSL FEL	5015.550	27	5
PRAME	425	9mer	SLQLHLIGL	181.794	29	4
MPP11	51	9mer	QELEDKKEL	6.301	15	0
MPP11	68	9mer	LQLEEF PML	106.128	17	0
MPP11	335	10mer	ALLAKKEKDI	38.601	21	0
MPP11	336	9mer	LLAKKEKDI	17.736	22	0
MPP11	405	9mer	DLQLLIKAV	11.998	24	0
MPP11	406	10mer	LQLLIKAVNL	13.624	16	0
MPP11	407	9mer	QLLIKAVNL	79.041	25	0
MPP11	483	10mer	YMN IHSSGV	231.067	22	1
MPP11	560	9mer	KLLEQALKT	395.664	22	0
MPP11	560	10mer	KLLEQALKTY	9.100	20	0

MPP11 (Q99543); PRAME (NM006115)

Max. bimas Score für MPP11: 395.664 (9mer) und 231.0667 (10mer); PRAME: 446.474 (9mer) und 5015.536 (10mer)

Max. SYFPEITHI Score MPP11 & PRAME: 36

Tab.1: Selektierte PRAME- und MPP11-Peptide nach ersten theoretischen Vorhersagen.

3.2.1. Bindung selektierter synthetischer PRAME- und MPP11-Peptide an HLA-A2.1

Die theoretische Bindungsstärke der selektierten Peptide wurde auf ihre tatsächliche Affinität für HLA-A2.1 getestet. Dabei wurde in einem kompetitiven Bindungstest die Fähigkeit der Peptide untersucht, die HLA-A2.1-Bindung des konkurrierenden synthetischen Peptides-p53₂₆₄₋₂₇₂ –zu inhibieren [86].

Als interne Kontrollen wurden mit FluM1- und VSV-N- sowie nur mit p53-Peptid beladene Zellen verwendet. Letztere dienten als Positiv-Kontrolle. Die T2-Zellen wurden mit p53 und dem konkurrierenden Peptid kokubiert und einem Chromfreisetzungstest unterzogen.

Die Inhibition entsprach der Abnahme der Lyse von p53 beladenen T2-Zellen durch p53₂₆₄₋₂₇₂-spezifische ZTL.

Generell konnten die Peptide nach ihrer Bindungsaffinität in 4 Gruppen unterteilt werden. Von den 14 selektierten Peptiden zeigten 2 keine Bindung (< 10 % Inhibition bei 10µg Testpeptid) an HLA-A2.1, 7 eine mittlere Bindungsstärke, aber immer noch unter-

halb der FluM1 Kontrolle (10 bis 48 % Inhibition) und 3 Peptide zeigten eine Bindung mit hoher Affinität, die über der internen Kontrolle (FluM1) lag (49 bis 80 % Inhibition). Die höchste Bindungsaffinität wurde durch MPP68 sowie drei PRAME-Peptide (100, 142, 425) erreicht (Abb.12). Die beobachtete Inhibition war dosisabhängig, da für alle HLA-A2.1-bindenden Peptide die Inhibitionswerte bei 10µg des eingesetzten p53 Testpeptids deutlich über den 3µg Werten lagen und somit eine deutliche Titration festzustellen war.

Diese Ergebnisse stellten die Grundlage für die weiteren Untersuchungen dar, insbesondere für die folgenden Immunisierungsexperimente.

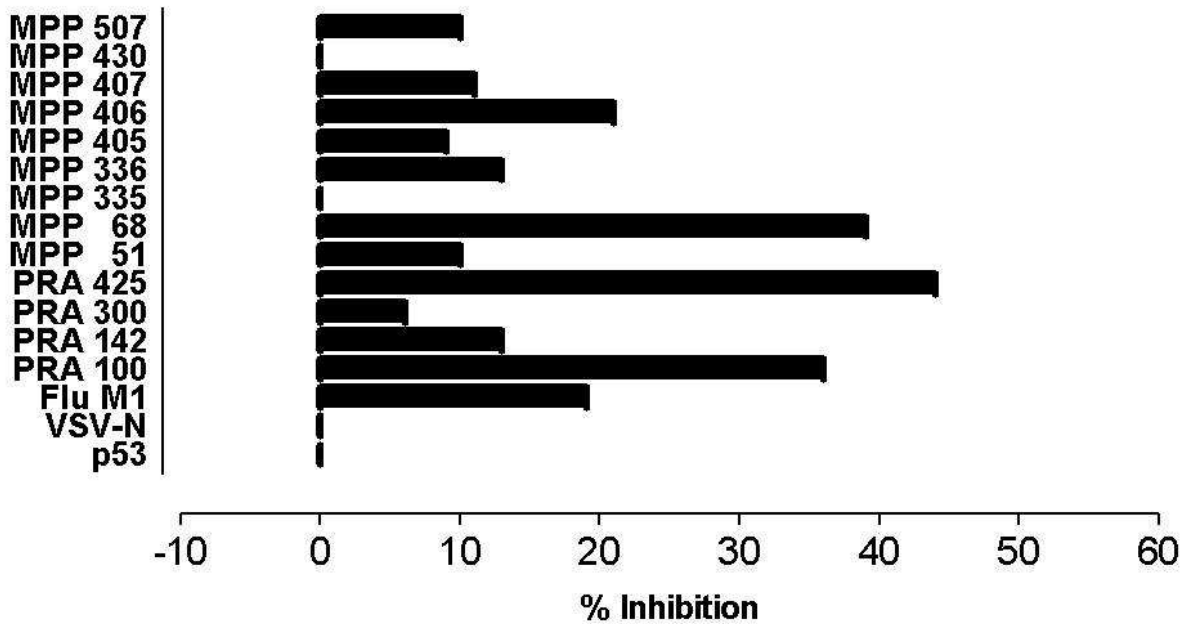
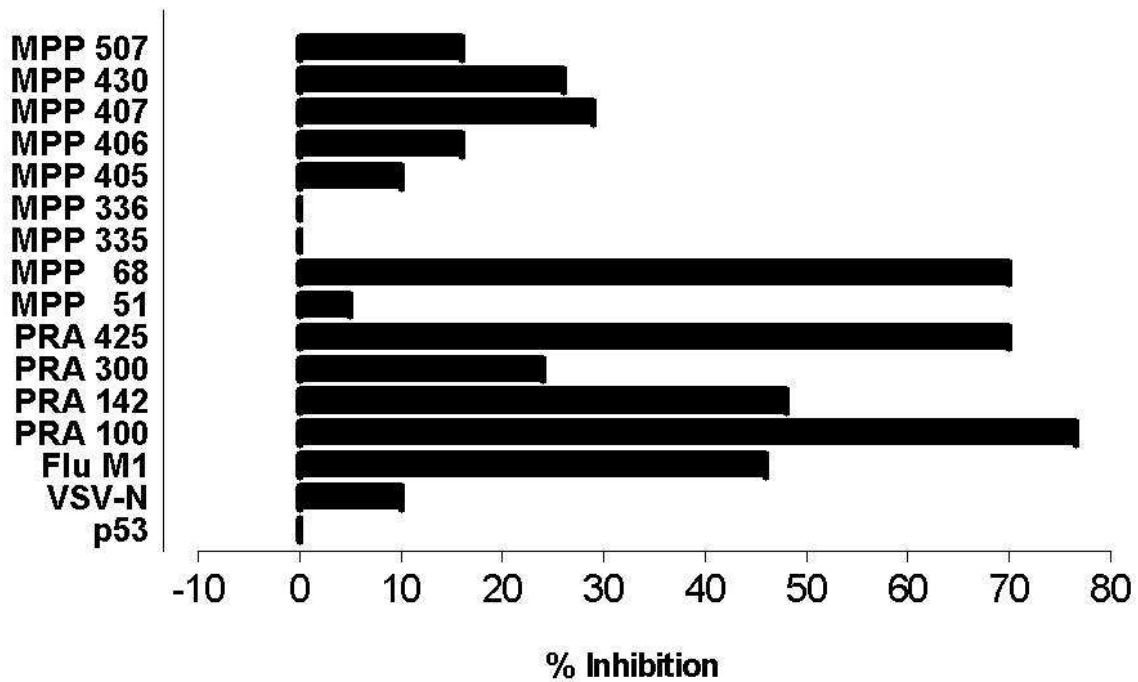


Abb.12: Untersuchung der HLA-A2.1 Bindungsaffinität ausgewählter PRAME- und MPP11-Peptide durch Konkurrenz im Chromfreisetzungstest. Im oberen Teil ist die Inhibition bei 10µg Peptid gezeigt, im unteren Teil bei 3µg Peptid. Beide Tabellen stellen ein E/T Verhältnis von 3:1 dar.

3.3. Generierung von PRAME- und MPP11-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in transgenen Mäusen

Die mittels Konkurrenzuntersuchungen identifizierten HLA-A2-restringierten Peptide von MPP11 und PRAME wurden für die Generierung PRAME- bzw. MPP11-Peptid-reaktiver ZTL in transgenen Mäusen verwendet.

Hierfür wurden A2xB6, CyA2K^b oder CD8xCyA2K^b-transgene Mäuse mit allen vier PRAME- und allen MPP11 Peptidepitopen immunisiert (Tab.1, 2).

Für die Immunisierungen wurde das jeweilige synthetische Peptid zusätzlich mit HBV_{Core}-Peptid und inkomplettem Freudschem Adjuvants vermischt und subkutan an den Schwanzansatz der Mäuse injiziert.

Um eine höhere Affinität des T-Zellrezeptors (TZR) zu erreichen, wurden vorzugsweise CD8xCyA2K^b-, oder A2xB6-transgenen Tiere genutzt. In diesen Tieren kann der murine Korezeptor nicht mit der humanen α_3 -Domäne des HLA-A2.1 interagieren. Die ZTL aus A2xB6 Tieren sind bei der Erkennung HLA-A2.1-exprimierender Zielzellen unabhängig vom muCD8 [62] und somit optimale Kandidaten für einen CD8 unabhängigen T-Zellklon.

Die in CD8xCyA2K^b-transgenen Mäusen generierten T-Zellpopulationen wiederum unterscheiden sich bezüglich ihrer TZR-Affinität nicht gegenüber T-Zellen aus A2K^b Tieren, verfügen allerdings über eine erhöhte huCD8 Korezeptor vermittelte Avidität in der Interaktion mit HLA-A2.1-exprimierenden Zielzellen [77]. Die in diesen Tieren generierten T-Zellen sind somit optimiert für die Erkennung von humanen Zellen, Tumoren und Leukämien und wurden daher vorzugsweise verwendet.

Die Ergebnisse und Anzahl der Immunisierungen sind in der folgenden Tabelle (Tab.2) zusammengefasst.

	Verwendete transgene Mausstämme und Anzahl der Immunisierungen		
	A2xB6	CyA2K ^b	CD8xCyA2K ^b
PRA100			3
PRA142		3	2
PRA300	3	3	8
PRA425	5		3
MPP51			2
MPP68			2
MPP335			5
MPP336			
MPP405			2
MPP406			
MPP407			2
MPP430			
MPP507			2

Tab.2: Zusammenfassung der verschiedenen Peptid-Immunisierungen hinsichtlich des gewählten synthetischen Peptides und des Mausstammes. Bei allen Ansätzen wurden FluM1-Immunisierungen mitgeführt, diese fungierten als Positiv-Kontrolle.

Nachdem Milzzellen der immunisierten Mäuse entnommen und mit Peptid-beladenen LPS-Blasten zu einer primären Kultur (I° Kultur) zusammengesetzt wurden, konnte die spezifische zytolytische Aktivität dieser ZTL 6 Tage später in einem Standard-Chromfreisetzungstest gegen Peptid-beladene T2-Zielzellen getestet werden (Abb.13). Für die Positivkontrolle FluM1 ist bereits eine Induktion HLA-A2.1 restringierter ZTL beschrieben [95].

Weiter verdeutlicht Abb.1 3, dass ZTL mit der erwünschten Spezifität eine Peptid-bedingte Titration in den verschiedenen Effektor-zu-Zielzell (E/T) Verhältnissen zeigten. Lag die spezifische Lyse deutlich über der als Negativkontrolle verwendeten EL4-Zellen, wurden diese T-Zellen für weitere Untersuchungen in Kultur genommen und wöchentlich restimuliert (Abschnitt 2.2.4.4.). Wie in Abb. 13 zu sehen, zeigte die Immunisierung mit FluM1-R2 sowie die Immunisierung mit PRA100-R3 in den CD8xCyA2k^b Mäusen eine deutliche Lyse, was für die erfolgreiche Generierung von CD8⁺ zytolytischen T-Zellen mit der gewünschten Spezifität spricht.

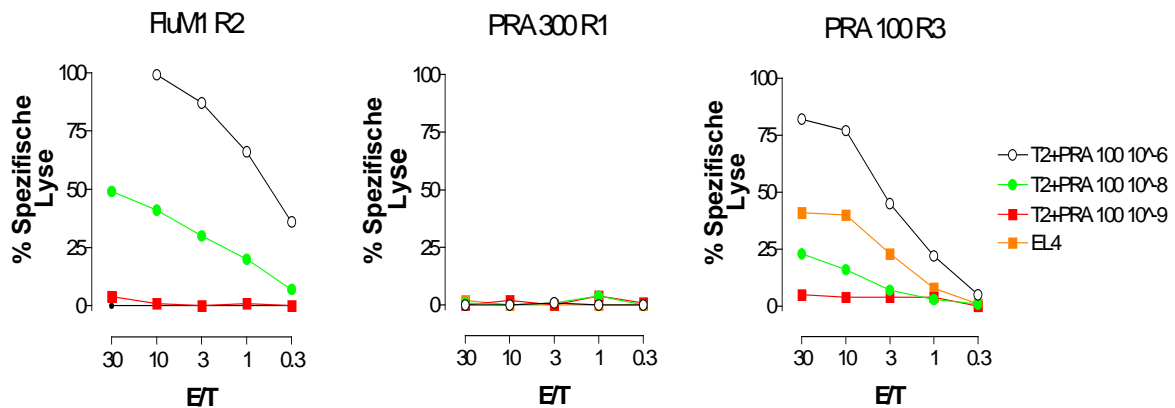


Abb.13: Beispiele für eine Immunisierung mit 2 verschiedenen PRAME-Peptiden PRA100 und PRA300. Gezeigt sind die Ergebnisse eines Chrom- Freisetzungstest nach der ersten Restimulation und FluM1 Kontrolle.

Weitere ^{1°} Kultur-Ergebnisse konnten nur mit MPP335, MPP405 und PRA300 erzielt werden. Es entstanden jedoch innerhalb dieser Untersuchung Kreuzerkennungen zwischen MPP335- und MPP405-Peptid. Dennoch wurden die ZTL nach sekundärer Restimulation (II[°]) in vitro in einem erneuten Chrom-Test untersucht. Allerdings war es bei beiden MPP11-Peptiden nicht möglich in diesem Test die spezifische Lyse zu verbessern. Beide ZTL-Populationen sanken in ihrer lytischen Effektivität um mindestens 40 bis 50 % (Abb.14, 15). In erneuten Immunisierungs-Versuchen konnten keine neuen ZTL gegen MPP335 bzw. MPP405, oder jegliche andere MPP11-Epitope generiert werden. Der Versuch der Generierung von MPP11-ZTL war nicht erfolgreich und wurde beendet.

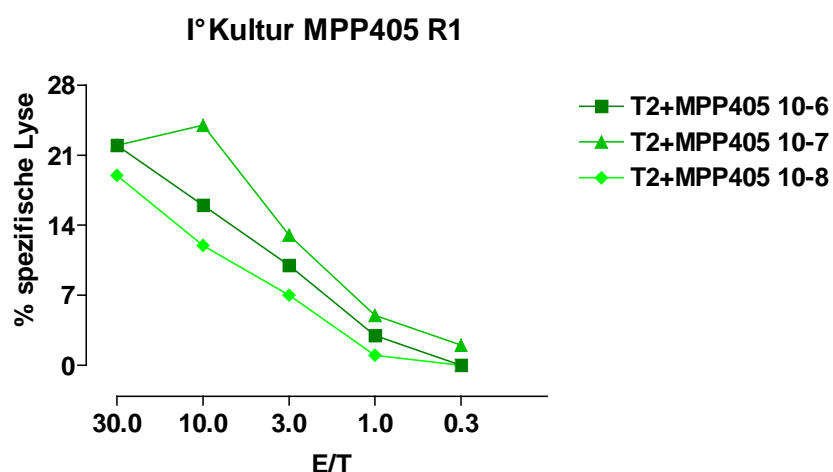


Abb.14: Primärer Chromfreisetzungstest nach Immunisierung von CD8xCyA2K^b Mäusen mit MPP405. Gezeigt ist Responder 1.

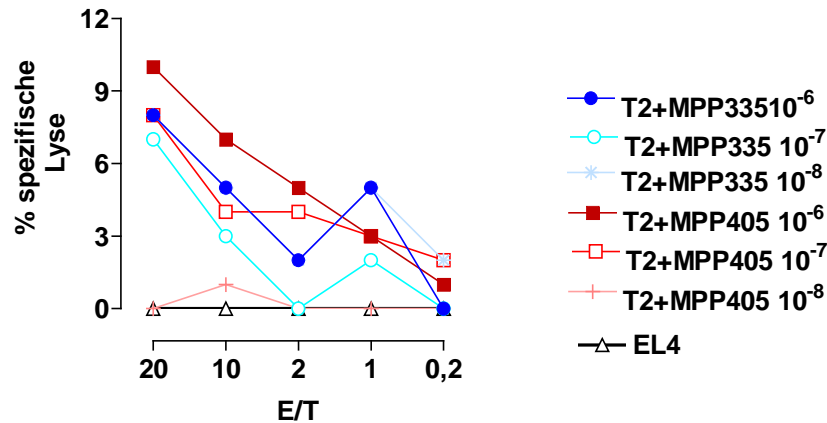


Abb.15: Untersuchung der spezifischen Lyse von MPP405 und MPP335 ZTL nach der II° Restimulation.

Im Fall von PRA300 wurde die mitgeführte Negativkontrolle (EL4) mit ca. 10 % höherer Lyse erkannt, als die mit relevantem Peptid beladenen T2-Zellen. Auch in diesem Fall wurde eine II° in vitro Restimulation, zur Proliferation der spezifischen Zellen, durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Wiederum konnten die Zielzellen im Chromfreisetzungstest keine besseren Ergebnisse erbringen und wurden daher verworfen.

Eine HLA-A2.1 restringierte und spezifische zytotoxische Lyse konnte ausschließlich bei PRAME₁₀₀₋₁₀₈ innerhalb der I° und II° Restimulation festgestellt werden. Jede weitere Immunisierung mit PRAME erbrachte keine CD8 positiven Zellen mit der gewünschten Peptiderkennung.

Alle weiteren Untersuchungen wurden daher nachfolgend mit der PRAME₁₀₀₋₁₀₈ (PRA100) T-Zell-Population durchgeführt.

Es konnten somit nach einmaliger Immunisierung von CD8xCyA2k^b Mäusen und einmaliger in vitro Stimulation mit PRAME100 Peptid hoch avide ZTL generiert werden.

3.3.1. PRAME₁₀₀₋₁₀₈ spezifische CD8⁺ T-Zellen: HLA-A2 Restriktion, Peptidspezifität

Die generierten ZTL wurden einmal wöchentlich mit Peptid-beladenen Stimulatorzellen restimuliert. Auf diese Weise wurde eine stabile ZTL-Linie etabliert, die in den nachfolgenden Untersuchungen auf Spezifität (Abb.16), HLA-A2 Restriktion (Abb.18) und Effizienz der Peptiderkennung (Abb.17) im Chromfreisetzungstest untersucht wurde.

Wie in Abb.16 gezeigt, wurden T2-Zellen, die mit relevantem PRAME100-Peptid beladen wurden, durch die PRA100-spezifischen T-Zellen erkannt. Bei Peptid-Beladungen von 1000nM bis 10nM konnte eine Lyse von 90 % erreicht werden. Im Gegensatz dazu wurde die Negativ-Kontrolle, T2-Zellen mit irrelevantem FluM1-Peptid, nicht erkannt und lysiert. Die fehlende Erkennung der FluM1-Zielzellen war ein Indiz für die Spezifität der untersuchten T-Zellen [95].

Über die Zeit der Kultivierung und wöchentliche Restimulation der PRA100-ZTL konnte die Effektivität der Peptid-Erkennung der ZTL-Linie nicht weiter gesteigert werden.

Die halbmaximale Lyse, EC_{50} Wert, der PRA100 T-Zellen lag bei etwa 0,1nM und war somit in seiner zytolytischen Aktivität mit dem bereits etablierten und gut charakterisierten p53₂₆₄₋₂₇₂ ZTL (EC_{50} : <0,1nM) vergleichbar [61].

Neben der Spezifität zeigte die T-Zell-Population auch in ersten Versuchen eine 30 % Lyse von Zelllinien, welche PRAME endogen prozessieren und kurzzeitig auf ihrer Oberfläche über MHC Klasse I-Moleküle präsentieren. Dies ist in Abb.17 illustriert. Die hier verwendete HLA-A2.1-positive Zelllinie MZ1257 ist bereits als PRAME positive Krebszelllinie bekannt [94]. Die Erkennung von endogen prozessiertem PRAME wurde in weiteren Untersuchungen noch vertieft (Abschnitt 3.3.1.2.).

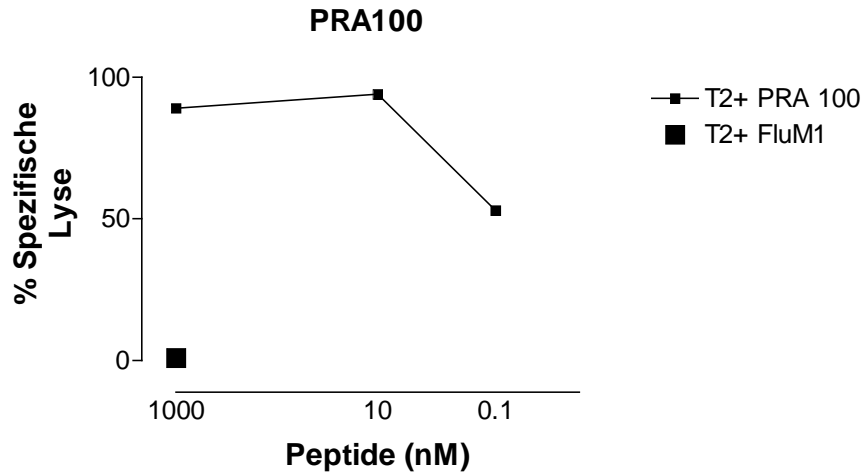


Abb.16: Test zur Effektivität der PRAME-Peptide Erkennung der PRA100-ZTL im Chromfreisetzungstest. T2-Zellen mit unterschiedlicher Peptid-Beladung.

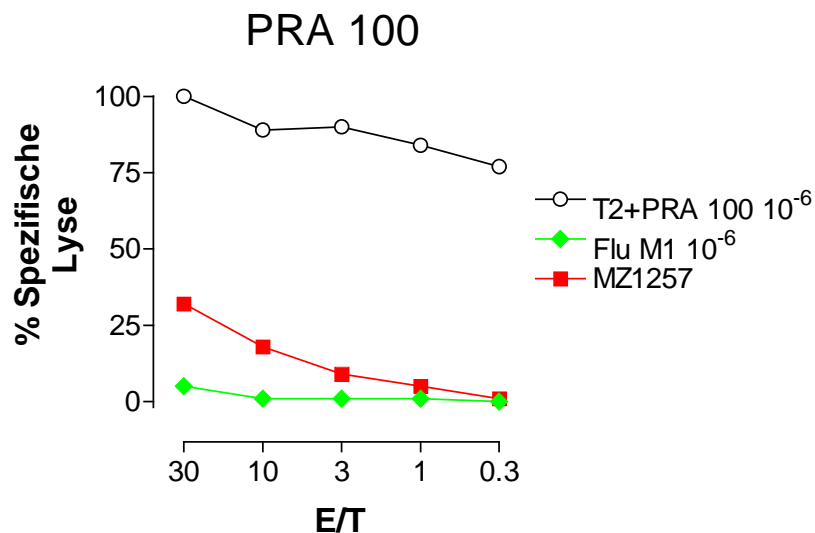


Abb.17: Chromfreisetzungstest der PRA100 ZTL mit relevantem und irrelevantem Peptid. Zusätzliche Erkennung einer PRAME positiven und HLA-A2-positiven Zelllinie (MZ1257).

Weiterhin wurde die Restriktion von PRAME über HLA-A2 untersucht, was in Abb.18 gezeigt ist. Hierfür wurde die leukämische Zelllinie K562 und die HLA-A2.1 transfizierte Variante K562-A2 verwendet. Ergebnisse aus RT-PCR-Untersuchungen (Abschnitt 3.1.) bestätigten, dass K562 sowie K562-A2 PRAME positive Zelllinien sind.

Die Restriktion über HLA-A2 konnte eindeutig über die höhere Lyse der K562-A2-Zellen (50 % Lyse) im Vergleich zu den HLA-A2-negativen K562-Zellen (25 % Lyse) gezeigt werden.

Die Erkennung weiterer Zelllinien bestätigte nicht nur die in Abb. 18 gezeigte Restriktion der T-Zellen, sondern auch die Erkennung verschiedener weiterer Zelllinien (Abschnitt 3.3.1.2.).

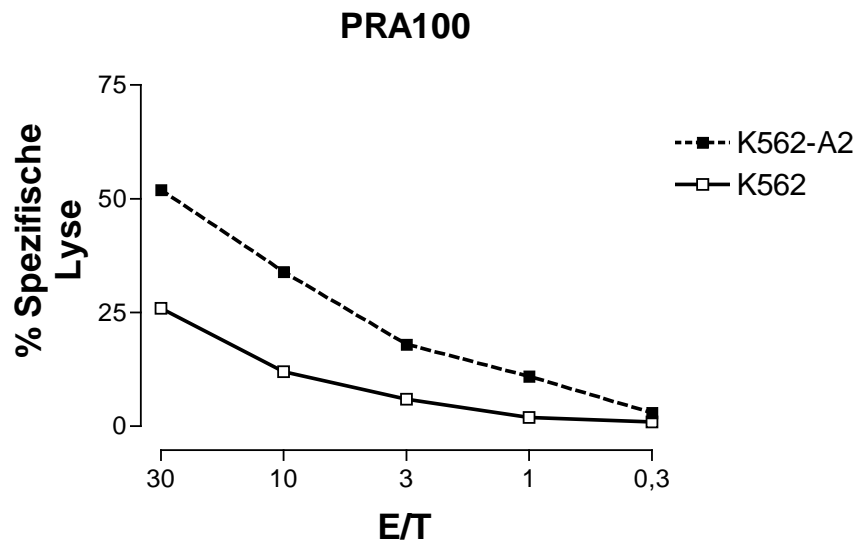


Abb.18: Chromfreisetzungstest zur HLA-Restriktion der PRA100-spezifischen T-Zellpopulation

3.3.2. Erkennung von Zelllinien mit endogenem prozessiertem PRAME

In Abschnitt 3.3.1. wurden die PRA100 T-Zellen hinsichtlich ihrer Erkennung des relevanten Peptides und der HLA-Restriktion bereits untersucht. Auch erste Ergebnisse zu der Erkennung und Lyse von Zelllinien, die PRAME endogen prozessieren, konnten bereits gezeigt werden. Um diese Ergebnisse noch weiter zu vertiefen und eine mögliche Erkennung von verschiedenen primären Tumoren und hämatologischen Erkrankungen abschätzen zu können, wurden die PRA100 T-Zellen gegen Zelllinien im Chromfreisetzungstest eingesetzt. Die Experimente sollten die lytische Kapazität der PRA100-ZTL gegenüber endogen prozessiertem PRAME Antigen auf Zellen veranschaulichen.

Zur Testung wurden die PRA100 T-Zellen im Vergleich mit HLA-A2 spezifischen T-Zellen eingesetzt um die alleinige zytolytische Aktivität der HLA-A2-T-Zellen im Kontrast zu der Erkennung durch die Kombination HLA-A2 plus PRAME-Spezifität (PRA100 T-Zellen) unterscheiden zu können.

Beiden ZTL Populationen wurden in gezeigtem Chromfreisetzungstest vier verschiedenen Zelllinien angeboten, welche alle HLA-A2 positiv waren, sich aber in ihrer PRAME-Expression unterschieden haben [94].

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, dass PRA100-spezifische T-Zellen alle PRAME⁺-Zelllinien erkannten und lysierten. Die PRAME⁻-Zelllinie MZ1851 erzielte eine maximale Lyse von 25 % bei einer E/T von 30/1. Diese Lyse ist auf die Erkennung von HLA-A2 durch die PRA100 T-Zellen zurückzuführen und entspricht den Ergebnissen, die bei der Untersuchung der PRAME-ZTL mit K562- und K562-A2-Zellen gemacht werden konnte (Abb. 18 & 19). Der Vergleich von HLA-A2-ZTL mit PRA100-ZTL zeigte eine reduzierte, spezifische Lyse der PRA100-ZTL bei allen getesteten Zelllinien. Dies kann auf die verminderte Expression des Antigens im Vergleich zum HLA-Molekül zurückgeführt werden. Die Differenz in der Erkennung betrug maximal 50 % bei einer E/T von 30/1 (MZ1257). Hingegen wurden MCF7-Zellen von PRA100-ZTL um nur 15 % schwächer erkannt als von HLA-A2-Kontroll-ZTL.

Diese Resultate bestätigten zum einen die spezifische Erkennung durch PRA100-ZTL, zeigten aber auch, dass die Expression des PRAME Antigens auf der Oberfläche verschiedener Tumorzelllinien stark variiert.

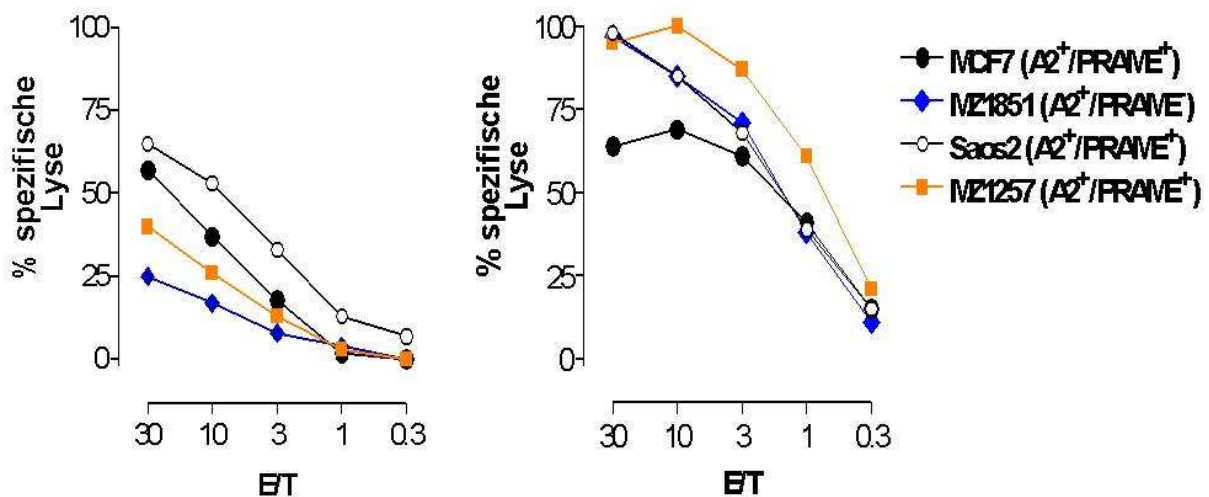


Abb.19: Chromfreisetzungs-Untersuchungen zur Erkennung von endogenem prozessiertem PRAME auf verschiedenen Zelllinien. Im Vergleich auf der linken Seite PRA100-spezifische T-Zellen; rechte Seite HLA-A2-spezifische T-Zellen.

Um die MHC-Expression, und damit die Aktivierung, der Zellen zu erhöhen, wurden die Zielzellen über Nacht mit Interferon (IFN)- γ und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) α behandelt. Dies verstärkt die Expression von MHC-Peptid-Komplex und Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche [96, 97]. Dennoch konnten die spezifischen Lysen der PRA100-T-Zellen nicht erhöht werden (Daten nicht gezeigt).

Daraus kann abgeleitet werden, dass die Präsentation des PRAME-Antigens auf der Zelloberfläche durch eine Zytokininkubation der Zellen nicht gesteigert werden kann.

Alle Beobachtungen zusammengefasst bestätigten, dass hoch averse HLA-A2.1 restringierte ZTL mit Spezifität für PRAME₁₀₀₋₁₀₈ (PRA100) generiert werden konnten, welche endogen prozessiertes Antigen auf der Oberfläche von Tumorzelllinien zu erkennen in der Lage waren.

3.4. Zytolytische Aktivität PRAME₁₀₀₋₁₀₈⁻, p53₂₆₄₋₂₇₂⁻ und HLA-A2 T-Zellen gegen AML-Material

Da PRAME bei malignen hämatologischen Erkrankungen, wie der AML, überexprimiert wird (Abschnitt 3.1.), wurden Patientenproben hinsichtlich ihrer PRAME-Expression untersucht. Denn eine potenzielle, PRA100-spezifische ZTL-vermittelte Immuntherapie beruht darauf, dass gesundes Gewebe und andere nicht krankhaft veränderte Zellen von den verwendeten T-Zellen nicht lysiert werden.

Um die zytolytische Aktivität der in dieser Arbeit verwendeten T-Zell Populationen in vitro zu testen, wurden CFSE-Untersuchungen durchgeführt.

Der CFSE-Test wurde dem Chromfreisetzungstest vorgezogen, da sich die Beladung von AML Zellen, einer in sich äußerst heterogenen Zellsuspension, mit ⁵¹Chrom als schwierig erwies. Die Kennzeichnung von AML-Zellen mit CFSE war sehr homogen und zeigte eine hohe Reproduzierbarkeit.

In ersten Untersuchungen wurde die HLA-Spezifität (Daten nicht gezeigt) des CFSE-Tests sowie die optimale Inkubationszeit der T-Zellen mit den Zielzellen untersucht. CFSE Untersuchungen ermöglichten vergleichbare Ergebnisse zu den zuvor durchgeführten Chromfreisetzungstests hinsichtlich Spezifität, Lyseaktivität und Restriktion [85].

In der nächsten Untersuchung wurde die lytische Effektivität von HLA-A2-, p53- und PRA100-T-Zellen gegen AML-Material im CFSE-Test untersucht.

Die in Abb. 20 dargestellten FACS-Bilder zeigen exemplarische Teilergebnisse einer Standarduntersuchung. Je eine CD45/CFSE Probe wurde für jede Zielzell-Population mitgeführt, um die zu untersuchende Population bestimmen zu können. In Abb.20 ist auf der rechten Seite eine Standard T- Zell Kultur im FACS zu sehen, welche CD45 negativ ist, da es sich um Zellen murinen Ursprungs handelt. Die zweite, CD45 positive, Population beinhaltet JA2-Zellen, die für die Restimulierung der Maus-T-Zellen benötigt wurden. Im Vergleich zu den in Abb.21 gezeigten Grafiken ist diese Population klar und eindeutig von der AML-Population (R4) zu unterscheiden.

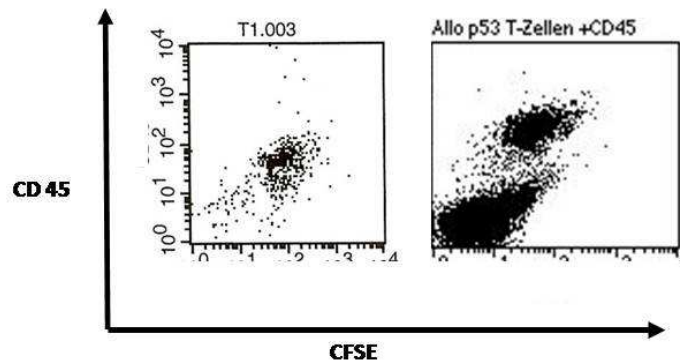


Abb.20: FACS-Bilder eines CFSE-Tests. Die Abbildung auf der linken Seite zeigt eine mit CFSE gefärbte AML-Probe, auf der rechten Seite ist eine T-Zell Kultur zu sehen; die im rechten Teil zu erkennende CD45 positive Fraktion resultierte aus der Stimulation mit JA2-Zellen (vergleiche Abschnitte 2.1.8. und 2.2.4.4.)

Die in Abb. 21 als R4 gekennzeichnete Population stellt die zu untersuchenden AML-Zielzellen dar. Die AML-Blasten Population wurde mit steigendem E/T Verhältnis durch ZTL vermittelte Lyse geringer. In Abb. 21 ist eine solche Abnahme der Zielzell-Population gezeigt. Von links nach rechts sinkt das E/T-Verhältnis. Bei einem Verhältnis von 30/1 ist eine schwache AML-Population zu erkennen, wohingegen bei einem Verhältnis von 1/1 diese Population deutlich vergrößert bleibt.

Um eine vergleichbare Aussage über die T-Zellerkennung innerhalb aller durchgeführten CFSE-Untersuchungen zu ermöglichen, wurde stets eine definierte Zellzahl und Zellpopulation, welche aus der CFSE- und CD45-negativen T-Zellpopulation bestand, eingesetzt und quantitativ bestimmt. Durch die Feststellung der Zellzahlen konnten im Anschluss an die FACS-Untersuchungen die Ergebnisse mathematisch und grafisch aufgearbeitet werden.

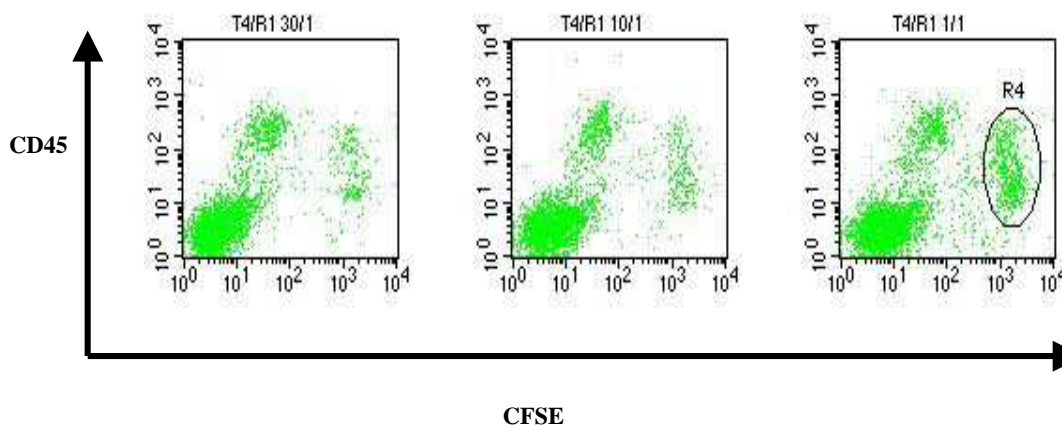


Abb.21: FACS-Bilder eines Standard CFSE-Tests mit HLA-A2-T-Zellen als Effektoren und AML-Zellen als Zielzellen. Gezeigt werden 3 verschiedene E/T Verhältnisse (von links nach rechts; 30/1; 10/1; 1/1). Die Markierung (R4) definierte die AML-Zellen.

Die so ermittelten Ergebnisse wurden im Gegensatz zum Chromfreisetzungstest nicht in % spezifischer Lyse angegeben, sondern in % Überlebender Zielzellen angegeben. Der prozentuale Anteil der überlebenden Zellen ist antiproportional zur spezifischen Lyse durch eingesetzte ZTL. In ersten Untersuchungen zur Etablierung der Experimente, sowie zur Bestimmung der günstigsten E/T Verhältnisse wurden HLA-A2 spezifische CD8 Zellen gegen AML-Zellen von verschiedenen Patientenproben eingesetzt. HLA-A2-spezifische T-Zellen aus dem Grund, da das HLA-Molekül auf allen Proben stets in hoher Zahl exprimiert wird und daher als Etablierungsmodell besonders geeignet ist.

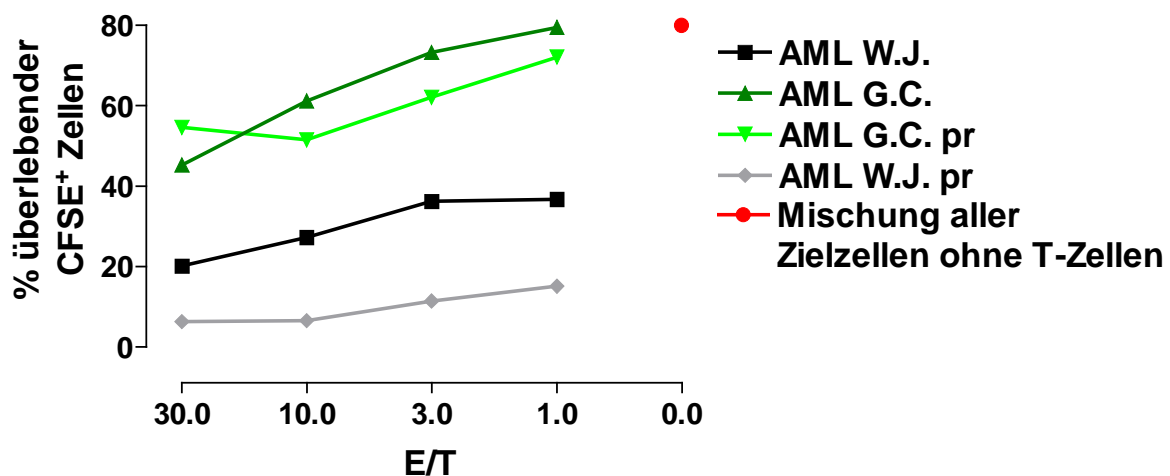


Abb.22: CFSE-Untersuchung zur Erkennung von verschiedenen HLA-A2 positiven AML-Proben durch HLA-A2-T-Zellen. AML-Zellen ohne Vorstimulation und mit Vorstimulation (pr) durch Interferon- γ und TNF- α

Die grafische Aufarbeitung der FACS-Daten zeigte, dass verschiedene AML-Patientenproben von HLA-A2-spezifischen T-Zellen erkannt und lysiert wurden (Abb. 22). Die Vorstimulation der AML-Zellen mit Interferon- γ und TNF- α erbrachte keine steigenden Lysen durch die eingesetzten ZTL. Des Weiteren zeigten die Versuche, dass E/T Verhältnisse von 30/1 gute Resultate erzielten.

Es folgten Untersuchungen zur Inkubationszeit des CFSE-Tests.

HLA-A2-, p53- und PRA100-spezifische T-Zellen wurden in drei verschiedenen Inkubationszeiten gegen entsprechende Zellen bzw. Transfektanten (JA2, EA2K^bp53, EA2K^bPRAME) eingesetzt. Mit diesen Untersuchungen wurde die optimale Inkubationszeit für die weiteren Untersuchungen bestimmt. Die generierten Transfektanten wurden Zelllinien vorgezogen, da diese die Antigene (PRAME oder p53) stabiler und in höherer Anzahl auf ihrer Oberfläche exprimierten (Abb. 30 & Abschnitt 3.3.).

Als Zeitpunkte wurden 4 Stunden, gemäß einem gewöhnlichen Peptid Chromfreisetzungstest, 6 Stunden, entsprechend einer Chrom-Inkubation bei endogener Prozess-

sierung und 24 Stunden Inkubation, um die maximale Zeit dieses Test ermitteln zu können, gewählt.

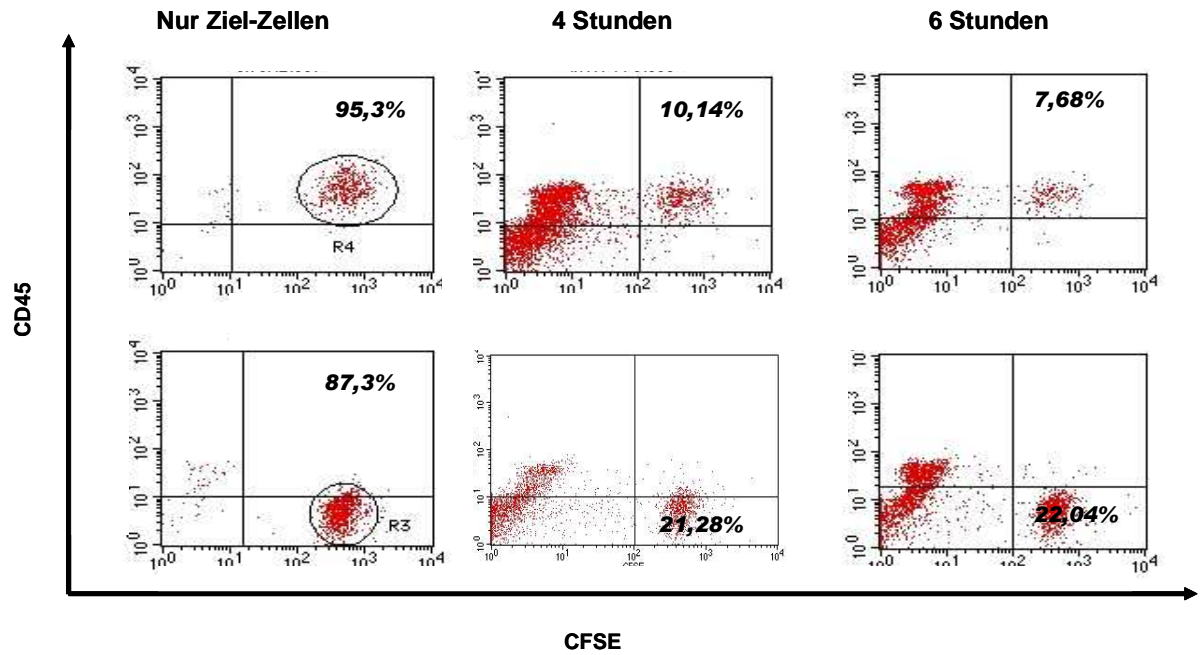
Die in Abbildung 23 gezeigten FACS-Bilder zeigen die jeweiligen prozentualen Zellzahlen der nach Beendigung der Untersuchung verbliebenen CFSE-positiven Zielzellpopulation. Da es sich bei JA2-Zellen (Zielzellen der HLA-A2-ZTL) um humane Zellen handelt, sind diese, im Gegensatz zu den anderen beiden Zielzell-Populationen (EA2K^bp53, EA2K^bPRAME), CD45⁺ (oberste Bildreihe Abb.23). Durch die T-Zell-Kultur, mit ihrer humanen und murinen Zusammensetzung, ergab sich die teilweise Detektion von humanen CD45-positiven Zellen. CD45 positiv waren des Weiteren die Zielzellen der HLA-A2-T-Zellen. Bei allen anderen Zielzelllinien innerhalb dieser Untersuchungen handelte es sich um Zelllinien murinen Ursprungs, welche mit dem anti-human CD45 Antikörper nicht detektierbar sind.

Die in den FACS-Untersuchungen gewonnenen Daten wurden ausgewertet und in grafischer Form aufgearbeitet (Abb. 24). HLA-A2-spezifische T-Zellen lysieren JA2-Zellen nach 4- bis 6-stündiger Inkubationszeit mit maximal 20 bis 60 %. Auch die Erkennung der p53- und PRAME-Transfektanten durch ihre jeweiligen T-Zellen war nach dieser Inkubationszeit in der CFSE-Untersuchung optimal und zeigte bei beiden Ansätzen eine Lyse von 70 %. Hierbei war festzustellen, dass es bei der Erkennung von p53- bzw. PRAME-Transfektanten, durch spezifische ZTL, keine Unterschiede bezüglich Lyse bei Inkubationen von 4 oder 6 Stunden gab. Bei HLA-A2-T-Zellen wurde die Lyse hingegen nach 6h etwa verdreifacht.

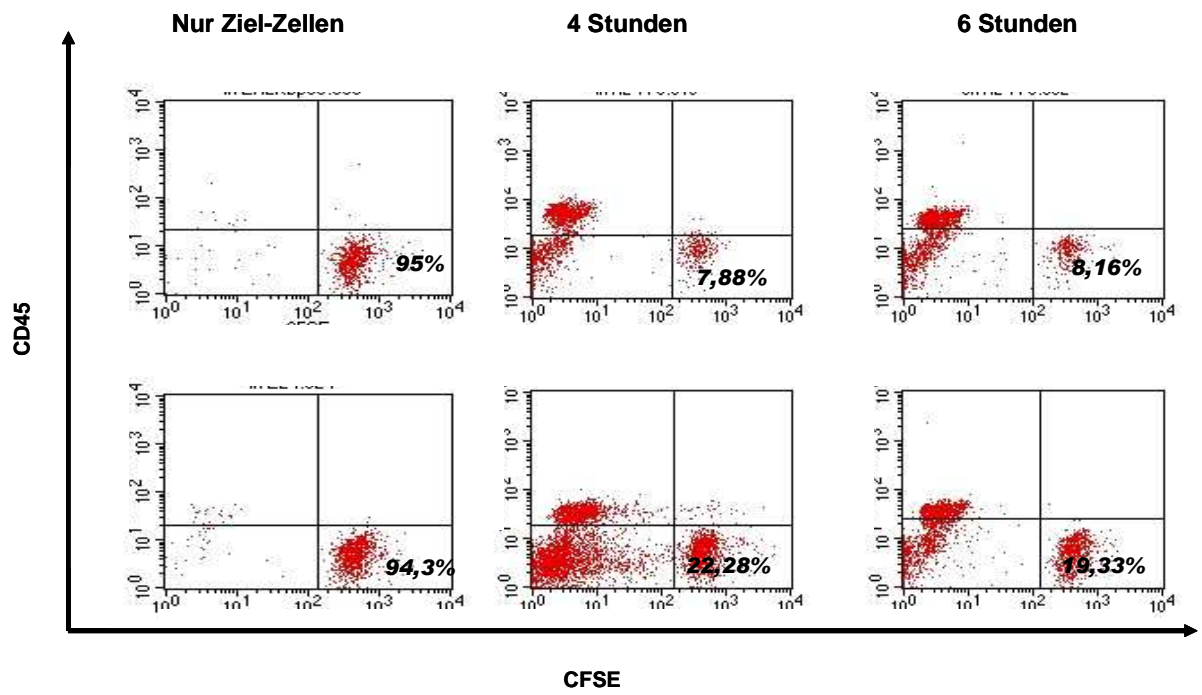
Die jeweils mitgeführte parentale Zelllinie EL4 diente als interne Kontrolle und wurde in allen durchgeführten Tests schlechter erkannt, als die zu untersuchenden Transfektanten.

Neben den Ergebnissen der Optimierung der Inkubationszeiten, zeigten diese Versuche, dass die generierte p53- bzw. PRAME-Transfektante von den ZTL spezifisch erkannt wurde.

A



B



C

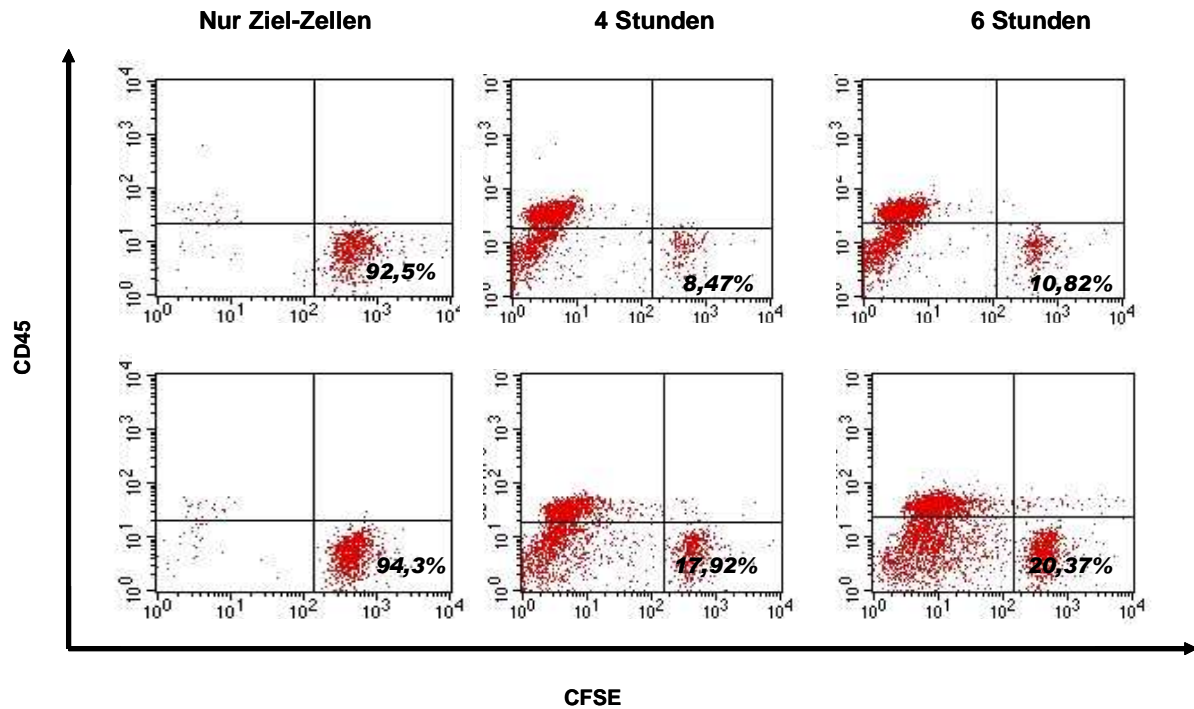


Abb.23: CFSE-Tests zum Vergleich verschiedener Inkubationszeiten. Von oben nach unten A: HLA-A2-, B: p53-, C: PRA100-T-Zellen. Jeweils gegen 2 Targets (JA2, EL4, EA2K^bp53, EL4, EA2K^bPRAME, EL4); E/T betrug 3/1.

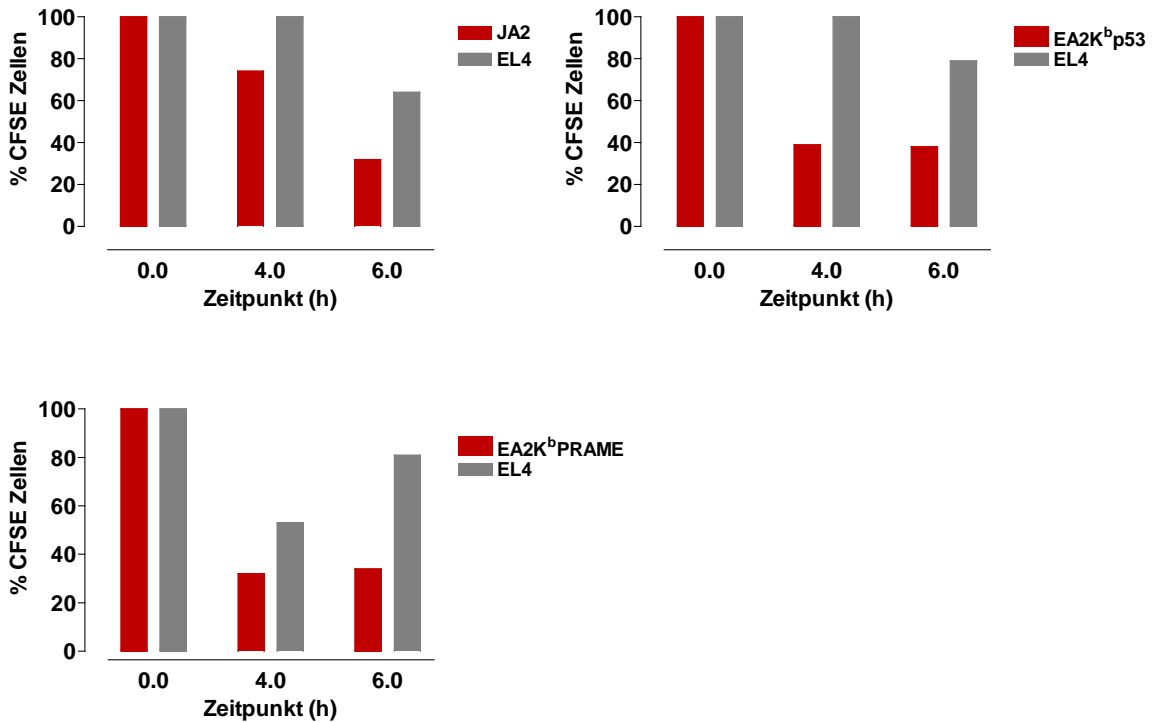


Abb.24: Grafische und mathematische Auswertung der CFSE-FACS-Daten (siehe Abb. 23) Gezeigt sind 3 unterschiedliche Zeitpunkte. Es wurde ein E/T Verhältnis von 3/1 verwendet.

Im nächsten Schritt wurde die Erkennung von AML-Material durch HLA-A2-, p53- und PRA100-spezifische T-Zellen untersucht.

Die Expression von Epitopen für die Erkennung durch PRA100- und HLA-A2-ZTL, war in den verwendeten AML-Proben bekannt. Die Expression von p53 in der getesteten AML-Proben konnte bereits gezeigt (Abb. 30) werden und durch diese Experimente auch funktionell bestätigt werden.

Die Erkennung von AML-Patientenproben durch p53-spezifische T-Zellen war mit der durch HLA-A2 spezifische T-Zellen vergleichbar (Abb. 22 und 25). Die Reduktion der CFSE-positiven Zellen von 80 % auf ca. 10 % spricht für eine signifikante Erkennung und Lyse der Zielzellen durch p53-spezifische T-Zellen.

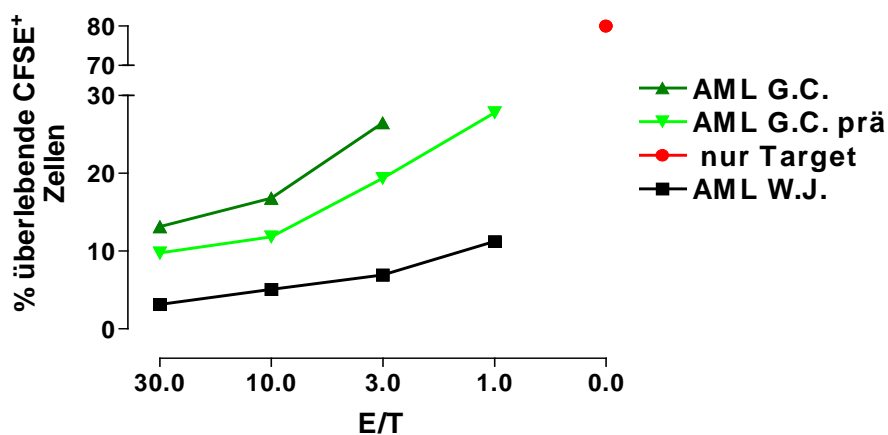


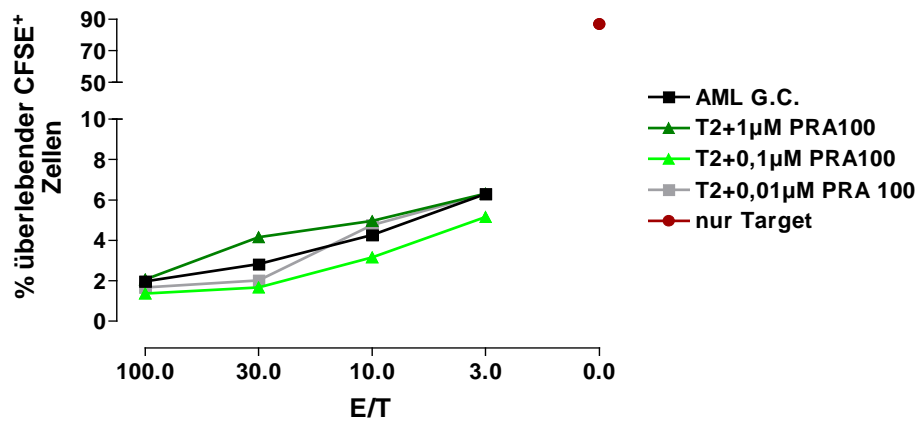
Abb.25: CFSE Test zur Erkennung von AML Proben durch p53₂₆₄₋₂₇₂ T-Zellen.

Um die Erkennung von endogenem prozessiertem PRAME durch PRA100 spezifische T-Zellen mit der Erkennung von PRAME-Peptid durch diese T-Zellen vergleichen zu können, wurden neben einer AML-Probe in diesem CFSE-Test auch T2-Zellen mit unterschiedlichen PRA100-Peptidkonzentrationen mitgeführt. Durch diesen Versuchsansatz sollte es möglich sein, die Sensivität des CFSE-Tests näher zu bestimmen und die endogene Erkennung durch ZTL einem EC₅₀-Wert zu ordnen zu können.

Es war dabei festzustellen, dass AML-Proben in gleicher Weise erkannt wurden, wie mit dem relevanten Peptid beladene Zellen (Abb. 26A). Es wurde weiterhin deutlich, dass der CFSE-Test eine sensitivere Technik als der Chromfreisetzungstest darstellt, da auch T2-Zellen mit 0,01µM PRAME-Peptid noch in hinreichender Anzahl von den T-Zellen erkannt wurden. In Chrom-Untersuchungen konnten PRAME-spezifische ZTL eine ausreichende spezifische Lyse nur bis 0,1µM zeigen (Abschnitt 3.3.1. und Abb. 16).

AML-Proben, derselben Herkunft, wurden durch PRA100 T-Zellen bei einer E/T von 30/1 um den Faktor 10 besser erkannt als durch HLA-A2-, oder p53-T-Zellen, passend zu den bereits in Abschnitt 3.1 gezeigten quantitativen PCR Daten, in denen eine Überexpression von PRAME in Leukämieproben gezeigt wurde.

A



B

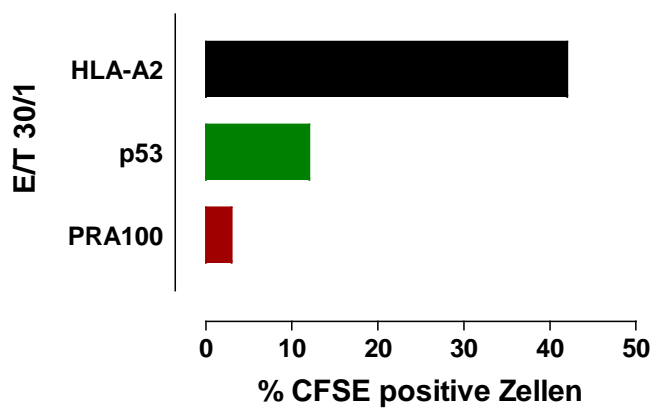


Abb.26: A: CFSE Test zur Untersuchung der PRAME-Erkennung bei leukämischem Patientenmaterial. B: Zusammenfassung der Erkennung von AML-Proben durch HLA-A2-, p53- und PRA100-spezifische ZTL.

Abschließend kann festgehalten werden, dass Antigen-spezifische, im Speziellen die von uns generierten PRA100- sowie p53-spezifischen, murinen T-Zellen mit einer Spezifität gegen humane Antigene in der Lage sind, Leukämiezellen effektiv zu erkennen und zu lysieren (Abb. 26B).

3.5. Generierung von p53- und PRAME-Transfektanten

Um nach Austestung der TZL in vitro entsprechende in vivo Experimente mit den generierten PRA100-spezifischen ZTL sowie p53- und HLA-A2-spezifischen T-Zellen durchführen zu können, wurden zunächst mehrere humane Zelllinien-Kandidaten auf ihr Wachstum in NOD/SCID/IL2 γ ^{null} Mäusen hin untersucht.

Die getesteten Kandidaten sind in ihrem Wachstum in vivo in Tab.3 aufgelistet.

Zelllinie	Wachstum
K562	Nein
K562-A2	Ja > 6 Wochen
Saos2	Nein
Saos2/143	Nein
HL-60	Ja > 8 Wochen
KG-1	Nein
MCF7	Nein
EA2K ^b	Ja < 3 Wochen
EA2K ^b p53	Ja < 3 Wochen
EA2K ^b PRAME	Ja < 3 Wochen

Tab.3: Zusammenstellung der getesteten Zelllinien für in vivo Untersuchungen der generierten ZTL in NOD/SCID/IL2 γ ^{null} Mäusen. Als positives Anwachsen wurden palpatorische Tumore mit einem Durchmesser von min. 1cm betrachtet.

Humane Leukämiezelllinien, wie z. B. Saos2, K562, HL-60 oder KG-1 wurden als mögliche Zielstrukturen für in vivo Tumorversuche getestet, da diese Zellen im Chromfreisetzungstest sehr gute Lysen zeigten und optimale Zielzellen für die zu testenden ZTL darstellten.

Alle Zellen wurden in einer einmaligen Gabe subkutan (s.c.) am Schwanzansatz in NOD/SCID/IL2 γ ^{null} Mäuse appliziert und das Anwachsen der Tumore durch Palpation im Verlauf des Versuchs beobachtet. War innerhalb von 10 Wochen kein Wachstum zu detektieren, wurde der Versuch beendet. Alle Zellen wurden mindestens zweimal in vivo mit jeweils unterschiedlichen Chargen von Zellen getestet. Dies stellte sicher, dass keine Verunreinigungen in der Kultur, suboptimale Kulturbedingungen oder andere äußere Faktoren für die Ergebnisse verantwortlich waren.

Alle humanen Zellen zeigten ein deutlich schwächeres und nicht stabiles Tumorwachstum. Auch benötigten diese Zellen einen längeren Zeitraum, um auf messbare Tumorgrößen anzuwachsen.

Im Gegensatz dazu konnte ein stabiles und rasches Wachstum der murinen Zelllinie EA2K^b in NOD/SCID/IL2γc^{null} Mäusen innerhalb einer dreiwöchigen Inkubation demonstriert werden (Abb. 27). Die Maus-Thymom-Zelllinie EA2K^b, die von der parentalen EL4-Zelllinie abstammt, war bereits mit HLA-A2K^b transfiziert und exprimiert das Molekül unter ständiger Genitocin-Gabe stabil an der Oberfläche, was ein Vorteil darstellte, da die zu testenden ZTL ihre Antigene nur im Kontext von HLA-A2 erkennen.

Im Detail waren innerhalb von 10 Tagen, ohne weitere Applikation, ein deutliches Tumorwachstum zu beobachten. Im Verlauf von 21 Tagen wuchsen die applizierten Tumorzelllinien zu Tumoren bis zu einer Größe von 500mm² heran. Ab einer Größe von etwa 300mm² wurde ein Einwachsen des Tumors in die Bauchhöhle beobachtet (Daten nicht gezeigt).

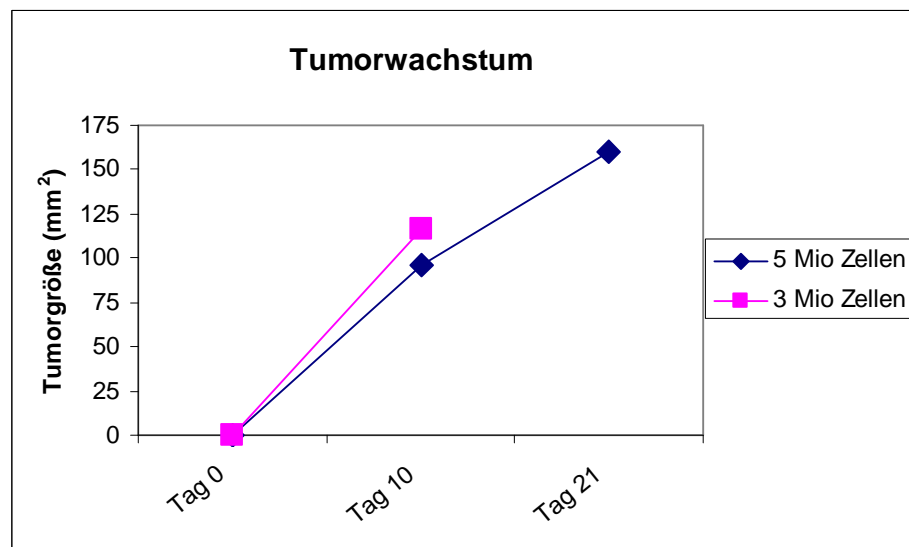


Abb.27: Tumorwachstum der EA2K^b in NOD/SCIDγc^{null} Mäusen. Die Tumorzellen wurden s.c. am Schwanzansatz injiziert.

Um die EA2K^b-Zelllinie mit den spezifischen Antigenen (PRAME, p53) zu versehen, wurden die Zellen mittels Elektroporation mit Plasmiden, die diese Antigene codieren, transfiziert (Abschnitt 2.2.1.10). Es folgte die Selektion der Zellen in antibiotikahaltigem Medium. Nach zwei maligem Passagieren wurden die neugenerierten Transfektanten phänotypisch charakterisiert.

Zu weiteren Testungen der Effektivität der Elektroporation wurden die Zellen zuerst auf PRAME- bzw. p53-DNS Level getestet. Bei der p53-Untersuchung diente Wasser als interne Leerkontrolle, sowie die parental Zelllinie EL4 als Kontrolle. Die in den Untersuchungen verwendeten Primer erkennen sowohl das murine, als auch das humane p53,

was auf eine hohe Homologie der beiden Proteine zurückzuführen ist. Allerdings war es möglich diese, durch die Größe des amplifizierten PCR-Produktes, zu unterscheiden. Das humane Produkt hat eine Größe von etwa 400bp gegenüber dem murinen Produkt mit etwa 290bp. Somit konnte eine kurz nach der Elektroporation eingefrorene EA2K^bp53-Transfektante als Doppel-Positiv Kontrolle genutzt werden, da dort die Bande für das murine, wie das humane p53 Protein zu detektieren sein müsste (Abb. 28).

Als Positivkontrolle für die PRAME-PCR diene die humane Leukämiezelllinie K562-A2; diese Zelllinie zeigte bereits in RT-PCR Ergebnissen (Abschnitt 3.1.) eine hohe PRAME-Expression.

Des Weiteren sollten RT-PCR Untersuchungen (Abb. 29) die Bildung von p53- bzw. PRAME-Protein in den Zellen mittels m-RNS zeigen.

Wie in Abb. 28 & 29 dargestellt, erschien bei beiden Transfektanten eine deutliche Bande bei der zu erwarteten Fragmentgröße, die mit den Kontrollbanden der mitgeführten Zelllinien übereinstimmte.

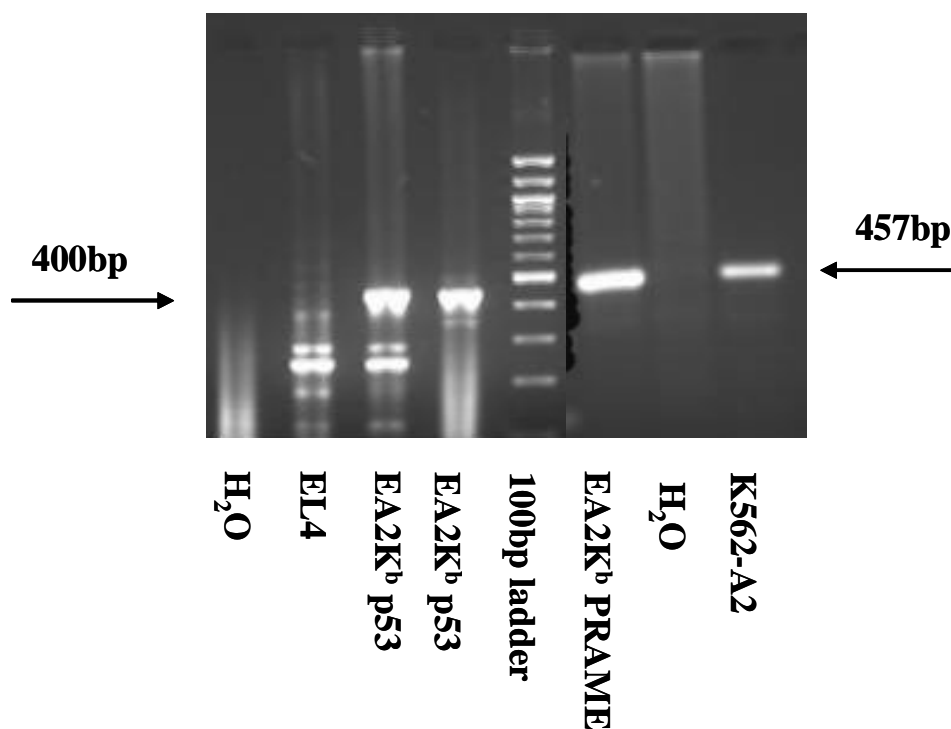


Abb.28: PCR-Untersuchungen zur Expression von PRAME bzw. p53 in EA2K^b Zellen. Ein 2%-Ethidiumbromid-Gel wurde mit den PCR-Produkten beladen und für 1h bei 100V gefahren.

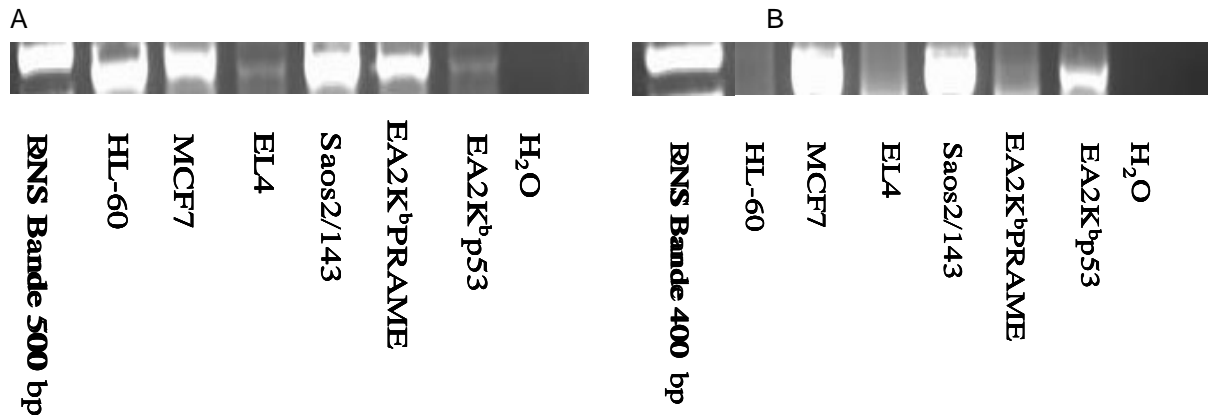


Abb.29: RT-PCR Untersuchung zur Expression des PRAME- (A) bzw. p53-Plasmids (B) in den elektroporierten Zelllinien. Als Kontrolle wurden humane, sowie eine murine Zelllinie mit untersucht.

Untersuchungen der mit p53 elektroporierten Zellen zeigten im FACS eine deutliche p53-Expression auf der Zelloberfläche im Gegensatz zu der parentalen Maus Zelllinie EL4. Wie in Abb. 30 zu erkennen ist, lag die Expression des p53-Proteins auf der Oberfläche der transfizierten Zellen über dem Niveau von p53-positiven Zelllinien sowie einer mitgeführten humanen AML-Patientenprobe.

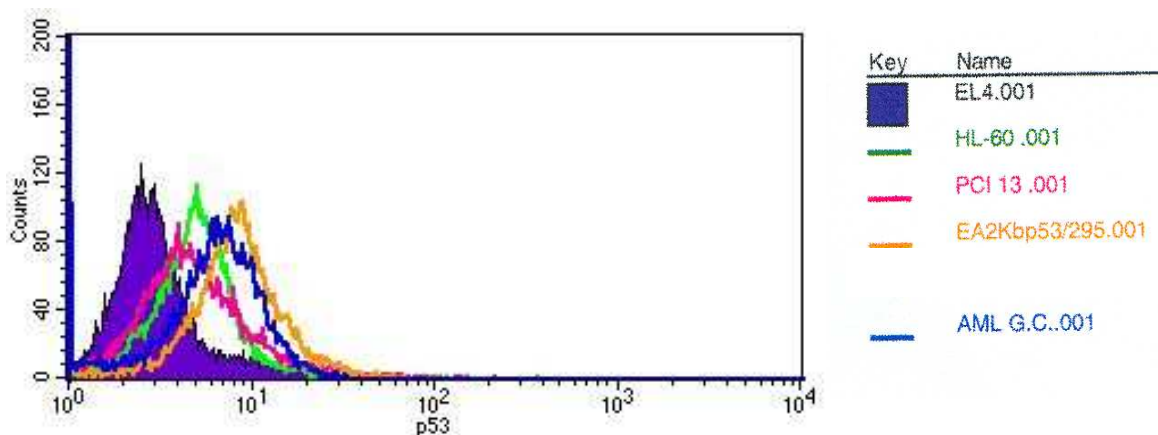


Abb.30: FACS-Analyse von Zelllinien, AML-Material und der p53-Transfektante auf p53-Oberflächen-Expression (BD Pharmingen p53 antibody reagent set)

Die Erkennung der Transfektanten (EA2K^bp53 bzw. EA2K^bPRAME) wurde funktionell durch CFSE-Untersuchungen bestätigt. Dafür wurden die Transfektanten und die Ausgangszelllinie EL4 in einem CFSE-Test hinsichtlich ihrer Erkennung durch PRAME- bzw. p53-T-Zellen untersucht. Die Ergebnisse dieser Tests bestätigten eine deutliche Erkennung der beiden Transfektanten durch die jeweiligen spezifischen T-Zellen. Bei einer E/T von 1/1 und einer Inkubationszeit von 6 Stunden überlebten nur etwa 5 % der eingesetzten EA2K^bp53-Zellen. Bei der EA2K^bPRAME-Zelllinie waren nur noch 6,7 % der eingesetzten Population detektierbar.

Die Erkennung der PRAME-Zellen durch PRA100-spezifische T-Zellen zeigte bei einer Inkubation von 4 Stunden eine Rest-Zielzell-Population von 50%. Diese konnte durch die Erhöhung der E/T auf 3/1 bis auf 30 % gesenkt werden (Abb. 32). Versuche zur E/T-abhängigen-Lyse der Zielzellen bestätigten sich auch in den weiteren Inkubationszeiten und konnte durch den Vergleich verschiedener E/T Verhältnisse bekräftigt werden.

Die Lysen der EA2K^bp53-Zellen durch die p53-spezifischen T-Zellen verhielten sich annähernd ähnlich, wie die der EA2K^bPRAME-Zellen. Es fand eine maximale Erkennung der EL4-Zellen von 20 % statt. Die ZTL-vermittelte Lyse konnte nach 24 Stunden nochmals gesenkt werden, was für die hohe Affinität und Spezifität der ZTL spricht. Im Gegensatz dazu blieb die Lyse der PRAME-Transfektanten während aller Inkubationszeiten stets stabil. Auch konnte bei der Kombination von längeren Inkubationszeiten (min. 24h) und erhöhten E/T Verhältnissen eine unspezifische Lyse festgestellt werden. Im Vergleich zwischen den p53-Experimente und den PRAME-Experimenten wurden die EL4-Zellen durch die PRAME-spezifischen ZTL in einem höheren Maße erkannt.

Zusammenfassend konnten die p53- sowie die PRAME-Transfektanten durch p53- bzw. PRAME-spezifische T-Zellen erkannt und lysiert werden.

Somit konnten Tumor-Zelllinien für die Untersuchung der GVT-Reaktivität in vivo generiert werden.

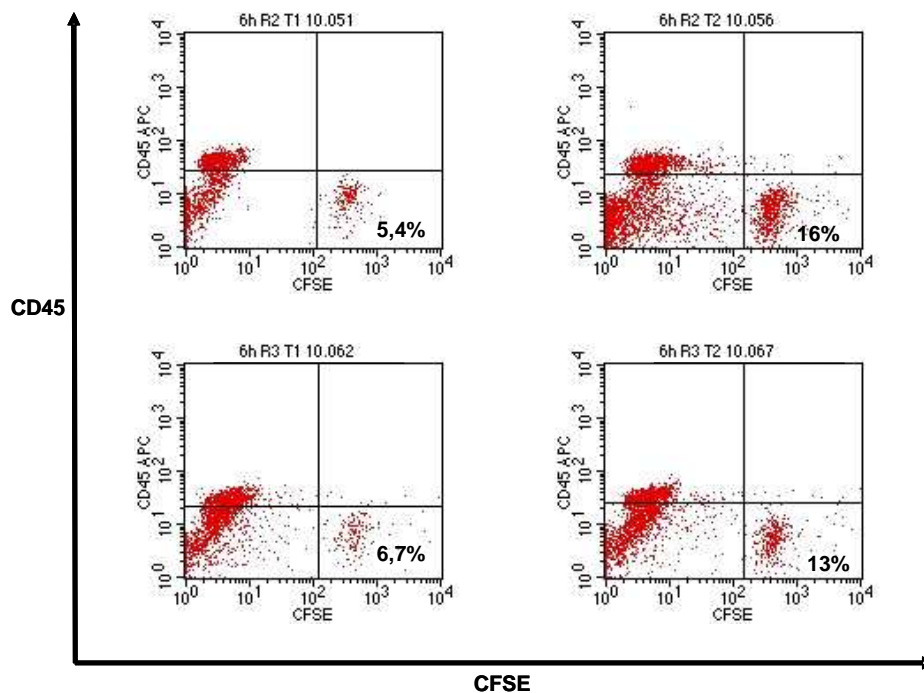


Abb.31: CFSE-Untersuchung zur Erkennung der p53- (links oben) und PRAME- (links unten) Transfektanten durch die jeweiligen spezifischen ZTL Populationen. Gezeigt ist ein CFSE Test nach 6 Stunden Inkubation mit einer E/T von 10/1.

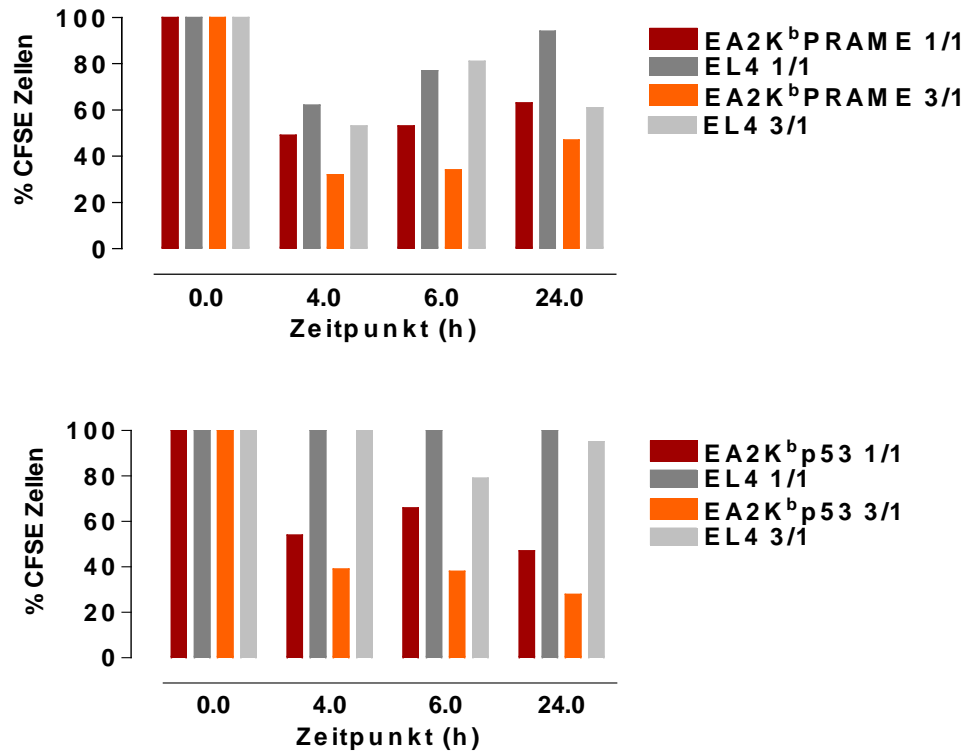


Abb.32: Grafische Aufarbeitung des CFSE-Tests zur Erkennung der EA2K^bp53 und EA2K^bPRAME Zellen durch PRAME- oder p53-spezifische T-Zellen. Gezeigt werden 3 verschiedene Inkubationszeiten und 2 verschiedene E/T Einstellungen (dunklen Balken E/T Verhältnis von 1/1, hellere E/T Verhältnis von 3/1).

3.6. Etablierung eines Tumor-Maus-Modells

Nach der erfolgreichen Generierung humaner PRAME- bzw. p53-spezifischer, muriner Tumorzelllinien, wurden diese für ein *in vivo* Modell in NOD/SCID/IL2 γ ^{null} Mäusen verwendet, um das GVT Potenzial der p53- bzw. PRAME-spezifischen T-Zellen charakterisieren zu können.

Die Tiere wurden in zwei verschiedenen Versuchsansätzen mit Tumorzellen und/oder T-Zellen inokuliert. Der protektive Ansatz des Tumor-Modells beinhaltete in den ersten Untersuchungen die vorherige Kokultur der Tumorzellen mit den spezifischen T-Zellen. Zur Etablierung dieses Ansatzes dienen EA2K^b-Zellen und HLA-A2-spezifische T-Zellen.

Die Zellen wurden vor Applikation 24h in einem Verhältnis (E/T) von 5/1 *in vitro* kokultiviert. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Applikation der Suspension s.c. an den Schwanzansatz von NOD/SCID γ ^{null} Mäusen. Die Beendigung und somit Auswertung der Tumor-*in-vivo*-Versuche erfolgte an Tag 23, an welchem die Tumorgröße mittels einer Schiebleere gemessen wurde. Milz, Blut und Tumor der Versuchstiere wurden entnommen und zu Zellsuspensionen verarbeitet, oder für immunhistologische Untersuchungen in Formalin gebettet und bei 4°C gelagert.

In Abb. 33 sind die Etablierungsversuche dieses Modells mit HLA-A2-spezifischen T-Zellen und EA2K^b-Zellen als Zielzellen gezeigt.

Das Tumorwachstum kann durch die einmalige Gabe einer Suspension aus T-Zellen und Tumorzellen um etwa 90% reduziert werden, im direkten Vergleich zur Applikation von reinen Tumorzellen.

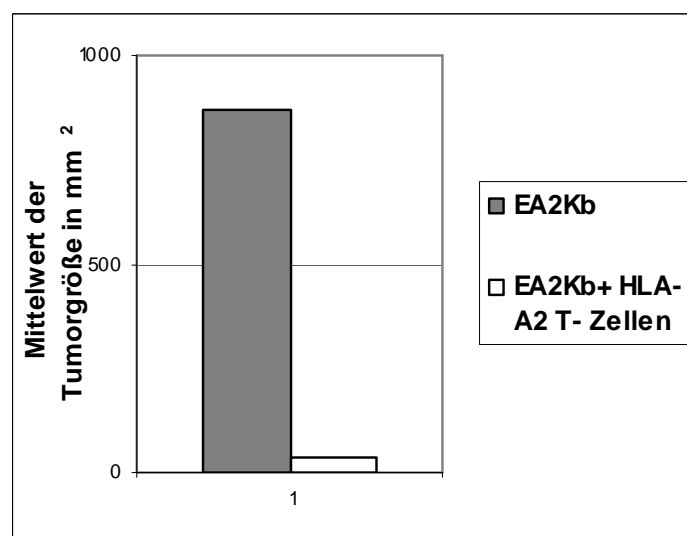


Abb.33: Tumorwachstum in NOD/SCID γ ^{null} Mäusen. Tumorzellen und T-Zellen wurden vor der Applikation 24 Stunden *in vitro* kokultiviert.

Um die Fragestellung der Vitalität der Tumorzellen nach Kokultur zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem Farbstoff 7-AAD gefärbt und durchflußzytometrisch auf ihre Vitalität analysiert.

Der Anteil an vitalen Zellen nahm um etwa 50 % ab (Reduktion von 44 % auf 10 bis 20 %) im Vergleich zwischen einer zum Zeitpunkt 0h, d.h. zu Beginn der T-Zell/Tumor-Zell-Kultur (0h) gemessenen Probe und nach 24h kokultivierter Zellsuspension (Abb.34). Die höchste Abnahme der Vitalität der Tumorzellen konnte bei EA2K^b- und EA2K^bPRAME-Zellen detektiert werden. Hier überlebten nach 24h Kokultur etwa 12 % bis 13 % der Tumorzellen. Die Vitalität der EA2K^bp53-Zellen mit über 20 % vitaler Zellen, nach 24h Kokultur, war um 50 % gegenüber den EA2K^b und EA2K^bPRAME erhöht.

Es konnte somit gezeigt werden, dass trotz der in vitro Kokultivierung noch Tumorzellen überlebten, welche in der Lage waren, in vivo ein Tumorwachstum zu induzieren.

Auf der Basis der Vitalitätsuntersuchungen konnte die effektive Zellzahl an vitalen Zellen, die in die Mäuse appliziert worden war, wie folgt berechnet werden (Tab.4).

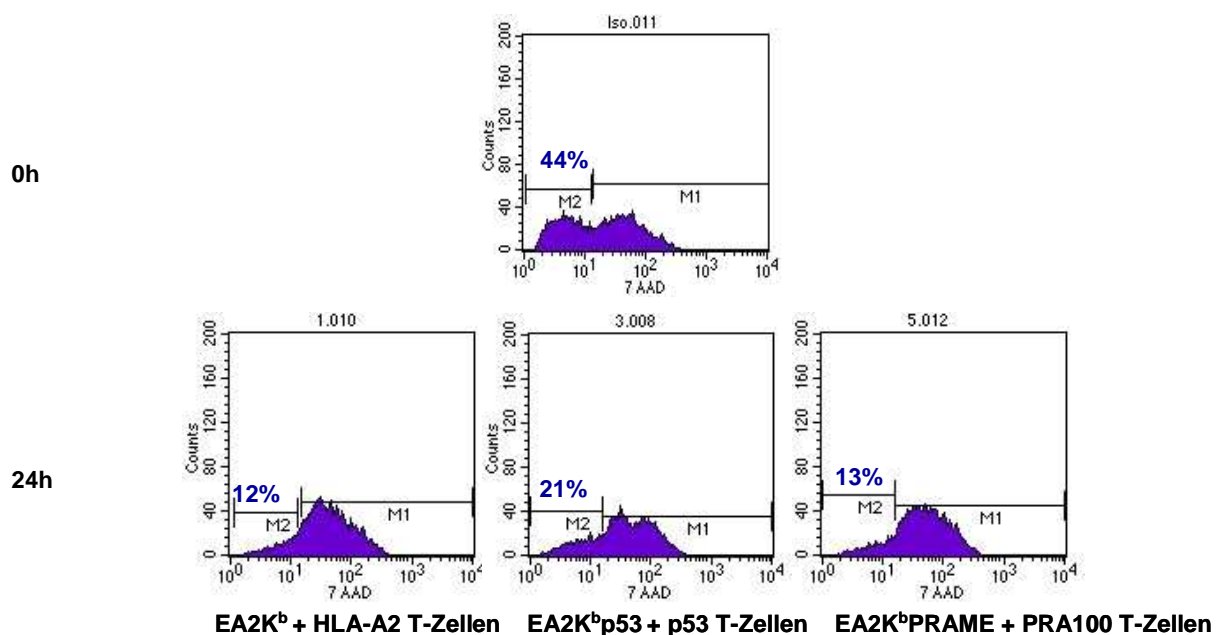


Abb.34: FACS-Analysen zeigten den prozentualen Anteil der überlebenden Tumorzellen nach 24 Stunden Kokultivierung mit T-Zellen. Als Kontrolle wurde eine repräsentative Tumor-Zell/T-Zell Kultur zum Zeitpunkt 0h mitgeführt. Hierbei handelte es sich um eine Kombination aller sechs Zellfraktionen.

Tumor-Zell Transfektante	Absolute applizierte Zellzahl
EA2K ^b	6x10 ⁴
EA2K ^b p53	1,05x10 ⁵
EA2K ^b PRAME	9x10 ⁴

Tab.4: Neuberechnung der applizierten vitalen Tumorzellen für in-vivo-Untersuchungen. Zu Grunde gelegt wurden 1x10⁶ eingesetzte Zellen und Vitalitätsuntersuchungen (Abb. 34).

In nachfolgenden Untersuchungen sollte die GVT-Reaktivität der PRAME- bzw. p53-spezifischen T-Zellen mit ihren entsprechenden Transfektanten weiteruntersucht werden. Um dabei sowohl die Reduktion der Tumorzellen durch Kokultivierung mit ZTL zu verhindern als auch die zytolytische Affinität der ZTL in einer reinen in-vivo-Situation zu untersuchen, wurden Tumorzellen und T-Zellen zum gleichen Zeitpunkt (t₀) über verschiedene Applikationsrouten in die Mäuse injiziert. Dieses Modell sollte veranschaulichen, inwiefern PRAME- und p53-T-Zellen in der Lage sind in einem in vivo Modell einen GVT-Effekt zu erzielen.

Der Transfer der Zellen erfolgte für Tumorzellen subkutan und für T-Zellen intravenös in PBS mit 0,1 % FCS und einer E/T von 10/1. Da das Überleben der T-Zellen in den NOD/SCIDyc^{null} Tieren wegen dem ineffizienten endogenen Zytokinpiegel verkürzt ist, wurde eine Erhöhung der E/T gegenüber Kokultur-Untersuchungen gewählt. Nach einer 23-tägigen Inkubation wurde das Experiment beendet und das Tumorstadium gemessen.

Wie in Abb. 35 zu sehen ist, waren sowohl die PRAME T-Zellen als auch die p53 T-Zellen in der Lage, das Tumorstadium zu reduzieren bzw. zeitlich zu verzögern.

p53 T-Zellen reduzierten dabei das Wachstum um den Faktor 1,75, was einer Reduktion der Tumorstadium um 100mm² entsprach.

Bei Untersuchungen mit EA2K^bPRAME-Zellen und PRAME-spezifischen T-Zellen konnte eine fast vollständige Abnahme der Tumorstadium an Tag 23 festgestellt werden. Allerdings konnten im Rahmen dieser Arbeit bisher nur erste Ergebnisse in Vorversuchen mit wenigen Tieren durchgeführt werden.

Zusammenfassend zeigen diese ersten Ergebnisse jedoch, dass die Induktion einer GVT-Reaktivität in vivo durch p53- und PRAME-spezifische T-Zellen möglich ist (Abb. 35).

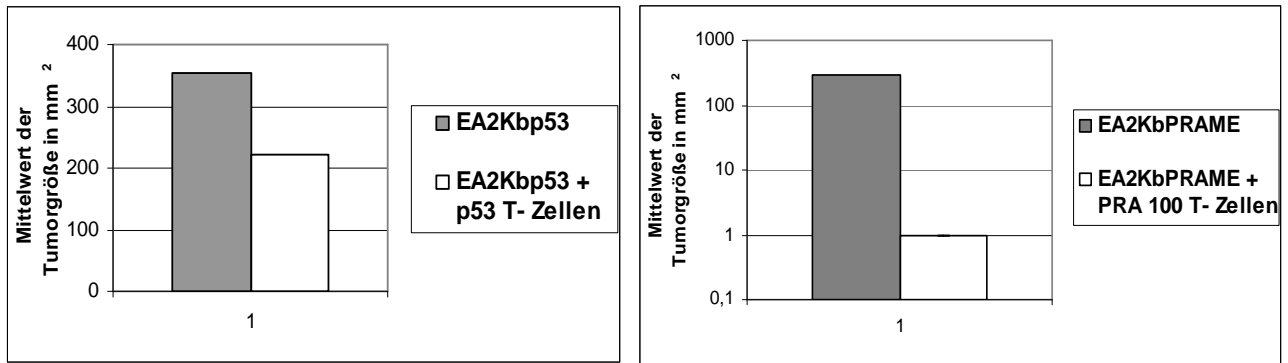


Abb.35: Ergebnisse des Tumorwachstums an Tag 23 nach einmaliger Applikation von 1×10^6 Tumorzellen (s.c.) bzw. 1×10^6 Tumorzellen und 12×10^6 T-Zellen (s.c. & i.v.). Auf der linken Seite sind p53 T-Zellen und EA2K^bp53 Tumore dargestellt (n=5), auf der rechten Seite PRAME T-Zellen gegen EA2K^bPRAME Tumore (n=2).

Es folgten weitere Experimente zur Induktion einer GVT-Reaktivität durch spezifische T-Zellen.

In verschiedenen Ansätzen wurden hierfür EA2K^b-Zellen in vivo untersucht. Die alleinige Injektion von EA2K^b-Zellen als Positivkontrolle wurde sowohl mit der Gabe von 24h in Kokultur mit HLA-A2 ZTL befindlichen EA2K^b-Zellen verglichen als auch mit der Kokultivierung von EA2K^b-Zellen mit irrelevanten T-Zellen (PRA100) und der gleichzeitigen Applikation von T-Zellen und Tumorzellen.

Wie in der Abb. 36 dargestellt, konnte dabei die Spezifität der Induktion der GVT-Reaktivität durch diese Experimente gezeigt werden.

Während die Tumorgroße des Versuchsansatzes mit den unspezifischen T-Zellen nur marginal reduziert war, im Vergleich zu reiner Tumorzellapplikation, zeigte der Ansatz mit den spezifischen T-Zellen keinerlei messbares Tumorwachstum nach Kokultur. Eine Reduktion der Tumormasse um den Faktor 12,5 (entsprach ca. 70 % weniger Tumormasse) konnte bei der Applikation der T-Zellen gleichzeitig mit der Inokulation der Tumorzellen detektiert werden.

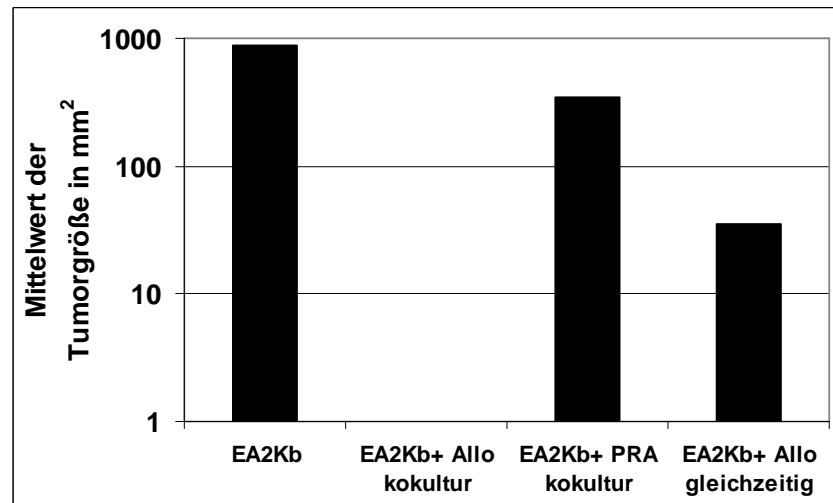


Abb.36: Vergleich der zwei verschiedenen in vivo Ansätze. Gezeigt HLA-A2 spezifische T-Zellen (Allo) gegen EA2K^b-Zellen, sowie EA2K^bPRAME-Zellen bei gleichzeitiger Applikation (gleichzeitig) in NOD/SCID γ ^{null} Mäuse und nach 24h Kokultur (kokultur).

Zur Bestätigung der GVT-Reaktivität wurden nach Beendigung des Experimentes Milz, Blut und Tumormaterial aus den Versuchstieren gewonnen und reanalysiert.

Zum ersten zeigten exemplarische FACS-Untersuchungen des Blutes der p53-Experimente, dass bis zum Tag 5 des Versuchs die T-Zellen detektiert werden konnten. Hierfür wurde eine FACS-Färbung mit einem V-beta-3-Antikörper, welcher spezifisch den p53-TZR erkennt, und einem CD8 Antikörper angesetzt, welcher ausschließlich das murine CD8 Molekül erkennt. In Abb. 37 im oberen Teil ist die Färbung der p53 in vitro T-Zell Population (positiv Kontrolle) und die Isotyp Färbung (negativ Kontrolle) gezeigt. Nach Applikation in NOD/SCID γ ^{null} Mäuse konnten bereits an Tag 2 nur 17 % p53-spezifische, CD8 positive Zellen detektiert werden. An Tag 5 nahm der Prozentsatz der doppelt-positiven Zellen (CD8⁺/vBeta3⁺) auf 4,8 % doppelt positiver Zellen ab.

Nach Tag 5 konnten keine CD8 positiven Zellen im Blut der NOD/SCID γ ^{null} Versuchstiere mehr gefunden werden. Sowohl aus den Blutanalysen, als auch aus den Analysen der Tumoren der Tiere konnten keine weiteren Erkenntnisse über das GVT-Potential der Tumor-spezifischen T-Zellen gewonnen werden.

Zweitens wurden isolierte Milzzellen ex vivo passagiert. Aus diesen Zellen, der in den Experimenten verwendeten NOD/SCID γ ^{null} Mäuse, konnten nach drei bis vier Restimulationen mit Feederzellen (Milzzellen aus B6/J) sowie mit Peptid-beladenen JA2-Zellen nach Zugabe von IL-2 und IL-7Fc, eine ausreichende Menge T-Zellen expandiert (Abb. 38) werden, um diese in einem Chromfreisetzungstest auf ihre Spezifität hin einzusetzen.

Die T-Zellen wurden jeweils gegen die Parentalzellen (EL4) als Negativkontrolle und die Zelllinie Saos2/143 getestet. Diese wurde auf Grund ihrer PRAME- und p53-Expression ausgewählt (Abschnitt 3.5.; Abb. 30) um die endogene Prozessierung der Antigene zu untersuchen. In den Chromfreisetzungsuntersuchungen von p53 und HLA-A2 wurden zusätzlich noch die spezifischen Transfektanten (EA2K^b bzw. EA2K^bp53) eingesetzt.

Die Ergebnisse der Spezifitäts-Untersuchungen der ex vivo expandierten T-Zellen zeigten, dass es sich bei den aus der Milzzellsuspension expandierten T-Zellpopulationen um p53-, PRA100-, bzw. HLA-A2-spezifische T-Zellen handelte. Die parental Zelllinie EL4 wurde von keiner der eingesetzten ex vivo expandierten T-Zellen erkannt, jedoch wurde die Tumorzelllinie Saos2/143 sowohl von PRAME-, als auch p53-spezifischen T-Zellen mit Lysen zwischen 80 bis 100 % erkannt. Somit konnten die in vitro Untersuchungen bestätigt werden. Die Erkennung der EA2K^bp53-Transfektante durch p53-ZTL lag bei Lysen um 40 % und entsprach somit vorhergegangenen Ergebnissen der in vitro Kulturen (Daten nicht gezeigt).

Es konnte bestätigt werden, dass die Verzögerung des Tumorwachstums in dem in vivo Tumor Modell auf die zytolytische Aktivität der applizierten Antigen spezifischen T-Zellen zurückzuführen ist. Die GVT Reaktivität der ZTL ließ sich damit in einem in vivo System demonstrieren.

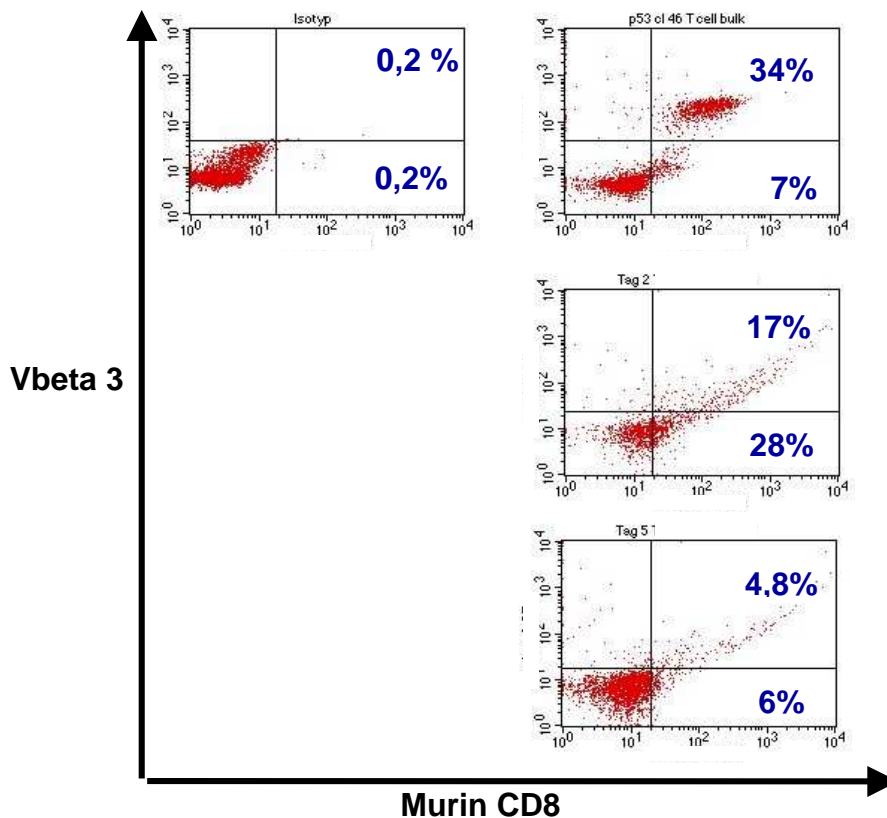


Abb.37: Untersuchung des peripheren Bluts von NOD/SCID γ c^{null} Mäusen nach T-Zell Applikation p53-spezifischer T-Zellen gegen EA2K^bp53 Tumorzellen.

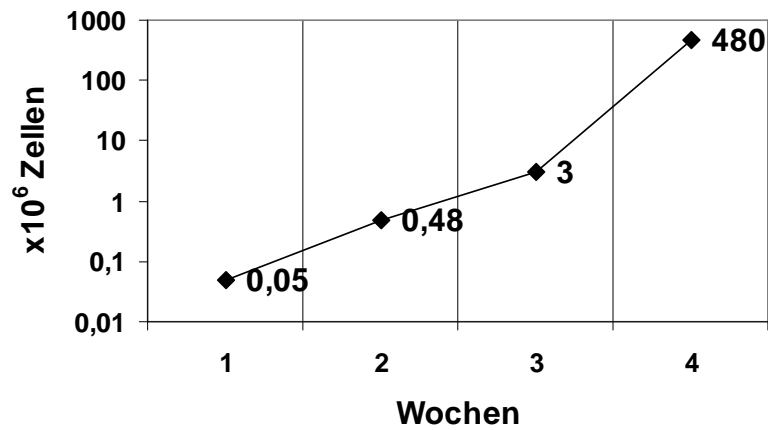


Abb.38: Beispiel einer Proliferationskurve der ex vivo expandierten Milzzellen aus dem Tumor in vivo Modell.

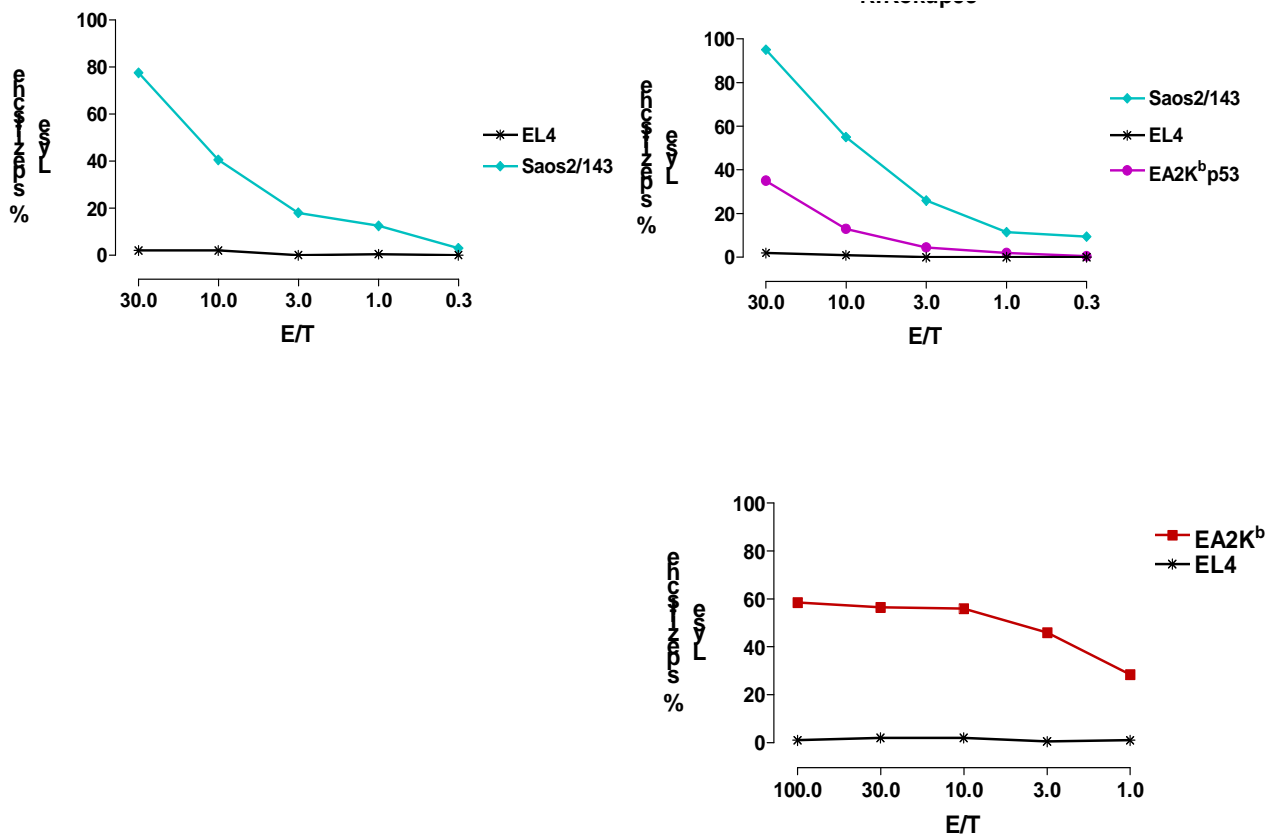


Abb.39: Ex vivo Expandierte T- Zellen aus Kokultur Experimenten. Eingesetzt waren p53-, PRA100- und HLA-A2 T-Zellen gegen Saos2/143 und EL4-Zellen, oder EA2K^b bzw. EA2K^bp53. Oben links sind PRA100-spezifische T-Zellen dargestellt, oben rechts p53-spezifischen T-Zellen und unten rechts HLA-A2-spezifische T-Zellen. Die Analyse der T-Zellen erfolgte 3 Wochen nach Isolation und Restimulation der Zellen in einem Chromfreisetzungstest.

3.7. Etablierung eines AML-Modells in NOD/SCID γ ^{null}-Mäusen

Um in Mäusen eine humane AML anwachsen zu lassen, wurde folgendes Protokoll etabliert (Abb. 40):

Die Tiere wurden am Tag -1 mit 200 cGy bestrahlt. 1×10^6 - 5×10^6 AML-Zellen wurden am Tag 0 i.v. in die Schwanzvene der Tiere inokuliert. Die hierzu verwendeten humanen Leukämiezellen wurden zuvor über MACS Separation in drei verschiedene Zellpopulationen aufgeteilt, welche jeweils separat in die Mäuse transferiert wurden. Dies sollte ermöglichen, das Wachstumspotenzial der einzelnen Populationen innerhalb der leukämischen Proben in vivo zu untersuchen.

Die verwendeten Proben waren zum einen reine CD34⁺ Zellen der AML-Proben (CD34⁺), oder AML-Proben, die mittels Depletion frei von NK-Zellen waren (CD56⁻), sowie Zellen von unbehandelten AML-Proben. Nach einer Inkubationszeit von fünf bis sieben Wochen wurde den Versuchstieren Blut entnommen und mittels PCR auf humane Marker untersucht. Dabei wurde exemplarisch humane Chromosom 17_1 Minisateliten DNS mit speziellen Primern detektiert [98, 99]. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 3 bis 6 Wochen wurde den Tieren Blut, Milz und Knochenmark entnommen und durchflußzytometrisch der Gehalt an humanen Zellen bestimmt.

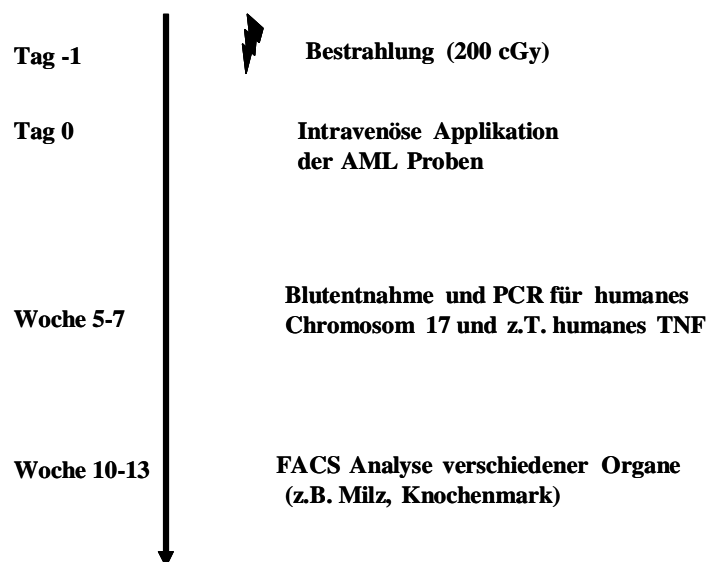


Abb.40: Schematische Darstellung des Etablierungsmodells einer AML in NOD/SCID γ ^{null} Mäusen

Die PCR ermöglichte die Detektion einer kleinen Anzahl humaner Zellen (im Bereich von 1×10^5 zu 10^6 Zellen) in rekonstituierten NOD/SCID γ ^{null} Mäusen. Die Detektion humaner Zellen im Blut der Versuchstiere ist in Abb. 41 dargestellt. Als Positivkontrolle

dienten DNS-Proben aus leukämischem Material, die schon in Abschnitt 3.1. zur quantitativen RT-PCR verwendet worden sind.

Die detektierten Banden der PCR stimmten mit denen der Positiv-Kontrolle überein und zeigten somit eine positive Rekonstitution von humanem AML-Material in NOD/SCIDyc^{null} Mäusen (Abb. 41).

Wir konnten in unseren Versuchen zeigen, dass selektierte AML-Proben, insbesondere CD34 positive- (CD34⁺) und CD56 negative- (CD56⁻) Zellproben, besser in NOD/SCIDyc^{null} Mäusen anwachsen können als unselektierte Zellen nach therapeutischer Leukapherese von AML-Patienten.

Diese Resultate konnten in 12 von 15 Experimenten bestätigt werden. Für die Untersuchungen wurden 2 unterschiedliche AML-Patientenproben verwendet, die jeweils in 3 Untergruppen separiert worden sind.

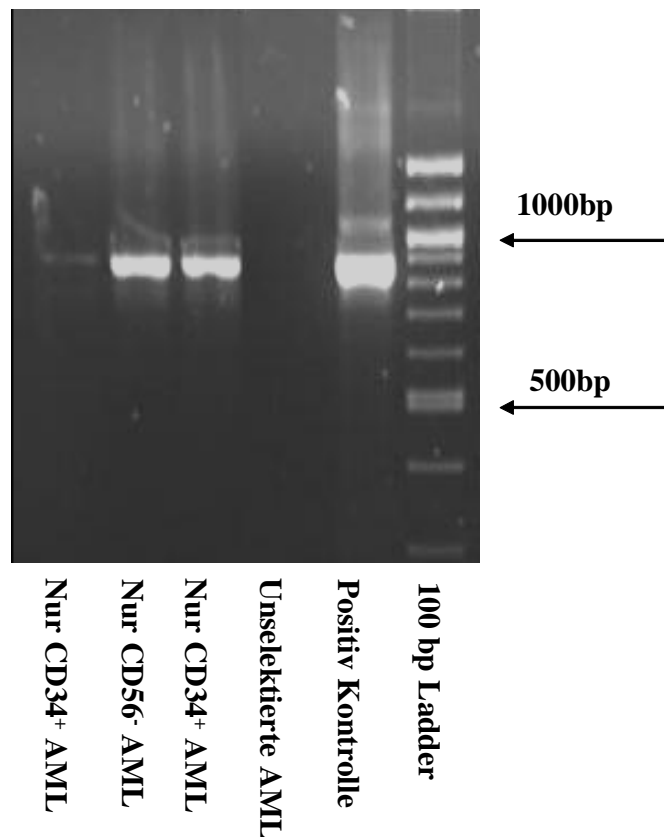


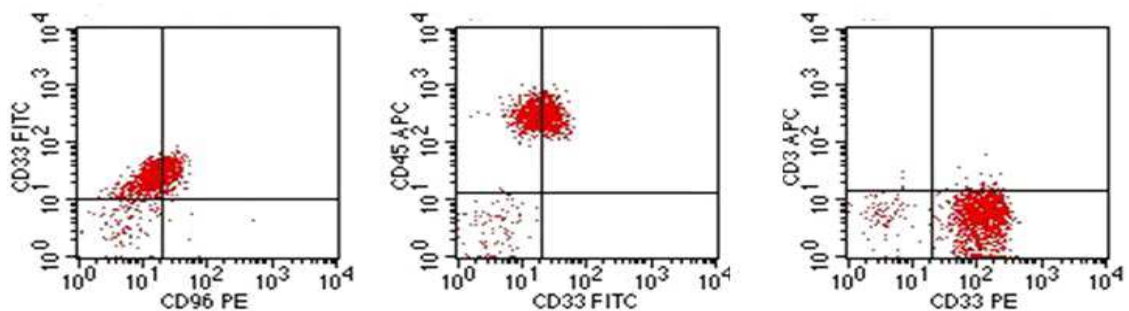
Abb.41: Detektion von humanen Zellen im Blut von NOD/SCIDyc^{null} Mäusen. Gezeigt werden PCR Banden in einem Ethidiumbromid-Gel von 4 verschiedenen Tieren.

Die Rekonstitution der Versuchstiere wurde weitere zwei Wochen später durch FACS-Analysen wiederum untersucht und durchflußzytometrisch bestätigt. Verschiedene CD-Marker wurden verwendet, um unterschiedliche Zellpopulationen und somit den Grad der Rekonstitution zu detektieren. Besonders wichtig war in diesem Zusammenhang der

Marker CD45 der, als Pan-Leukozyten-Marker, auf allen humanen Zellen lymphatischen Ursprungs exprimiert wird. Des Weiteren wurden die Stammzellmarker CD33 und CD34 verwendet. Für die Analyse der T-Zellpopulationen, B-Zellen und leukämischen Stammzellen folgten Untersuchungen über CD3, CD19 und CD96 [100]. Ausgangsmaterialien für diese Untersuchungen waren Milz, Knochenmark und peripheres Blut der AML-positiven NOD/SCID γ ^{null} Mäuse.

Die FACS-Ergebnisse (Abb. 42) zeigten in über 90 % CD45 positive Zellen im Knochenmark der Tiere, darunter war mit 25 % CD45 positiven Zellen der Anteil humaner Zellen in der Milz nicht ganz so hoch wie im Knochenmark. Diese Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass ein erfolgreiches Anwachsen humaner, hämatopoetischer Leukämiezellen stattgefunden hatte. Auch typische Stammzell-Marker wie CD33 oder CD34 waren in Präparationen aus Milz und Knochenmark zu erkennen. Der prozentuale Anteil der CD45-, CD33-, CD34- und CD96-Zellen lag im Knochenmark im Allgemeinen höher, als in allen anderen untersuchten Geweben.

Knochenmark



Milz

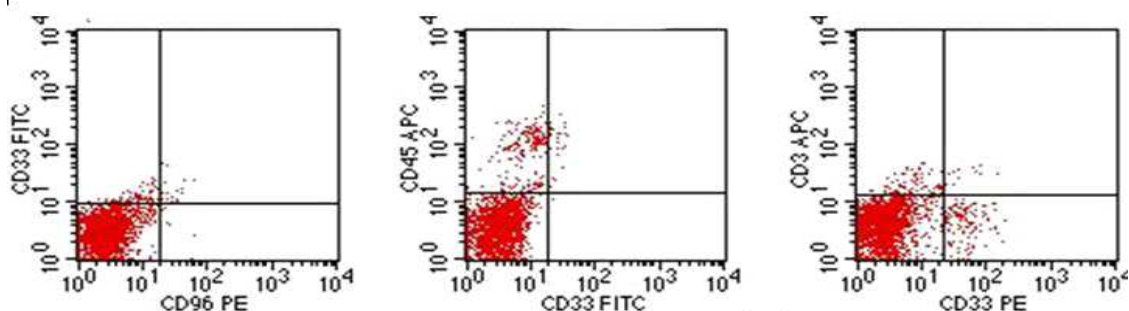


Abb.42: FACS-Daten des AML-Etablierungsmodells (CD34⁺) am Tag 70 des Versuchs. Verwendet wurde eine AML mit einer FAB MO/M1 Klassifizierung.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein Unterschied zwischen der Applikation von selektierten CD34⁺ Zellen, oder über CD56⁻ Zellen bestand.

In beiden Untersuchungsgruppen konnten positive Rekonstitutions-Resultate bei der Etablierung der AML in Mäusen beobachtet werden (Abb.42, 43). Nach Applikation von

CD56⁻ AML-Zellen zeigten Versuchstiere allerdings eine schnellere und stärkere Rekonstitution mit humanen Zellen, was für ein besseres Anwachsen dieser Testgruppe im Vergleich zu der Applikation von selektierten CD34⁺-Zellen spricht (Abb.42, 43).

Die in Abb.43 dargestellten FACS-Analysen verdeutlichten eine erfolgreiche Rekonstitution einer CD56⁻ AML in NOD/SCID γ c^{null} Mäusen. Zu erkennen ist ein sehr großer Anteil CD45 positiver Zellen in allen Geweben, insbesondere auch im peripheren Blut, was vergleichend in den mit CD34⁺ rekonstituierten Tieren nicht mit diesem Prozentsatz gezeigt werden konnte (Abb. 42 & 43).

Die Applikation unselektierter AML-Zellen erbrachte keine Ergebnisse. Es konnte keine Rekonstitution in diesen Versuchsansätzen gezeigt werden.

Schlussendlich demonstrierten diese Ergebnisse, dass es prinzipiell möglich ist, eine akute myeloische Leukämie humanen Ursprungs durch unser Etablierungs-Protokoll in NOD/SCID γ c^{null} Empfängertieren zu generieren.

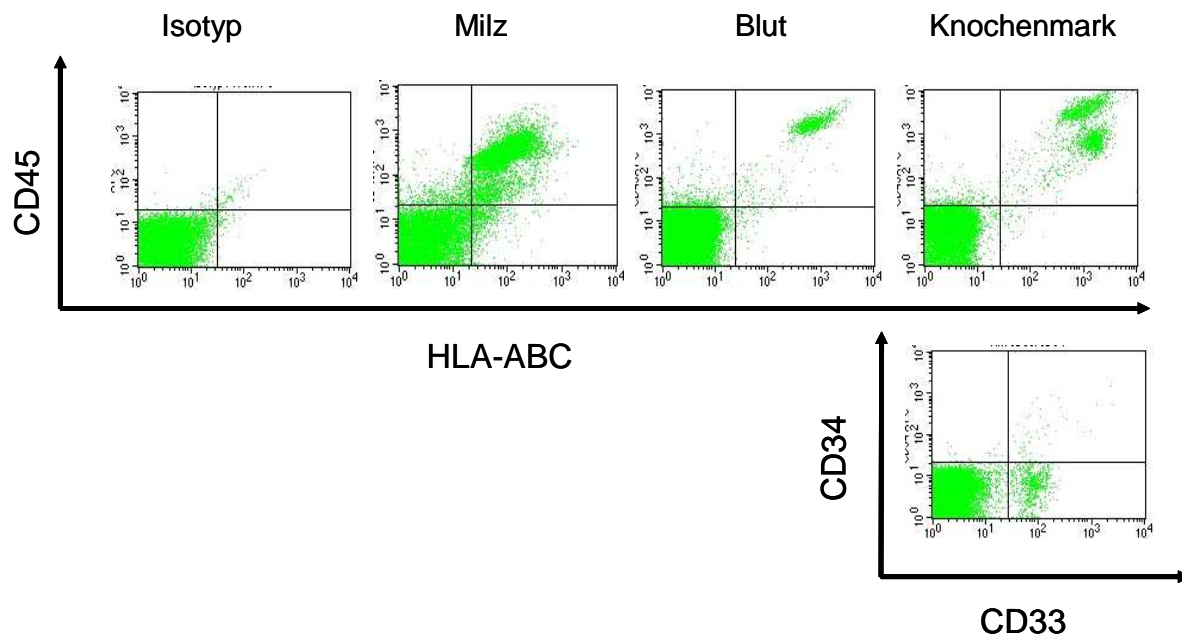


Abb.43: FACS-Analysen vom Tag 63 einer CD56 depletierten (CD56⁻) AML in NOD/SCID γ c^{null}. Zu sehen sind drei verschiedene Gewebe der Maus sowie der dazugehörige Isotyp.

3.7.1. Zytolytische in vivo Aktivität von p53- und PRAME-T-Zellen im AML-Modell

Die in dieser Arbeit generierten und bereits in vitro und in einem GVT-Modell getesteten PRAME-spezifischen T-Zellen wurden in einem weiteren in vivo Modell eingesetzt, um ihr GVL-Potenzial untersuchen zu können.

Hierbei wurden nach erfolgreicher Rekonstitution der NOD/SCID γ ^{null} Mäuse mit humaner AML, bestätigt durch PCR auf humanes Chromosom 17, peptidspezifische PRAME- oder p53-T-Zellen adoptiv transferiert. In einem repetitiven Versuchsprotokoll wurden wöchentlich 1×10^6 T-Zellen intravenös in mit AML rekonstituierte Mäuse appliziert. Diese Applikation der T-Zellen wurde dreimal wiederholt. Endpunkt der Untersuchungen war Tag 28 nach erster T-Zellgabe.

Die Analyse von Blut-, Knochenmark- und Milz-Zellen zeigte eine Reduktion der leukämischen Last in allen drei Geweben im Vergleich zu Kontrollmäusen, die rekonstituiert waren aber keine T-Zellen erhalten hatten. Insbesondere im Blut und in der Milz war es durch die adoptive Gabe der spezifischen T-Zellen möglich, den Anteil humaner Zellen auf unter 1 % herabzusetzen (Tab.5, 6).

Die Entwicklung eines lymphatischen Systems konnte an Hand der gestiegenen CD3 und CD19 Expression in den rekonstituierten Tieren festgestellt werden. Der Anteil an humanen CD33⁺ & CD34⁺ Stammzellen konnte reduziert werden. Allerdings waren in den Zellen des Knochenmarks der Tiere noch erhöhte Anteile an humanen Zellen im Vergleich zu Milz und Blut zu finden. Dies deutete darauf hin, dass die Erkennung und Lyse von AML-Zielzellen in Milz und Blut effektiver abläuft als im Knochenmark der rekonstituierten Tiere.

Im Detail wurden in vergleichenden FACS-Analysen 9 % weniger CD45⁺ Zellen nach erfolgreichem Transfer von T-Zellen gefunden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CD96, als leukämischer Stammzellmarker, in den rekonstituierten Tieren deutlich erhöht exprimiert war im Vergleich zu dem Expressionslevel der AML-Zellen in vitro. Diese Erhöhung von CD96 könnte als Zeichen der Aktivierung und Proliferation leukämischer Stammzellen gewertet werden [100].

FACS-Untersuchungen des peripheren Blutes vor und nach adoptivem Transfer der T-Zellen zeigten eine deutliche Reduktion aller untersuchten humanen CD-Markern, insbesondere CD96, in den Tieren. Insgesamt konnten alle humanen Zellen auf ein Detektionslevel von unter 1 % reduziert werden. Insbesondere die Reduktion von 9 % CD45⁺ Zellen auf <0,1 % als auch die Abnahme von 40 % CD96-Zellen vor Applikation auf <0,1 % war auf den adoptiven Transfer von PRA100-spezifischen T-Zellen zurückzuführen.

ren. Die Erkennung und Lyse von CD96 sprach für eine spezifische, lytische Aktivität gegenüber leukämischen Stammzellen.

p53-spezifische T-Zellen zeigten im Vergleich zu PRAME-spezifischen T-Zellen in diesem in vivo Modell eine leicht schwächere zytolytische Aktivität gegenüber AML-Blasten, entsprechend den Ergebnissen der in vitro Untersuchungen (Abschnitt 3.4.). Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass p53 nur in akuten myeloischen Leukämien mit einem aberranten Karyotyp stark überexprimiert wird, so dass keine ausreichende Expression für eine in vivo Erkennung vorlag [101-104].

Somit konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass die generierten T-Zellen auch in vivo in einem therapeutischen Ansatz in der Lage sind, AML-Blasten zu erkennen und zu lysieren.

	prä TX	post Tx			post T-Zell Applikation		
	in vitro	Milz	Knochenmark	Blut	Milz	Knochenmark	Blut
CD45	70%	40%	11,75%	9%	0,6%	8,5%	< 0,1%
CD33	27%	2,96%	5,7%	6%	0,5%	6,8%	0,1%
CD34	21%	1,75%	0,59%	2%	0,2%	< 0,5%	< 0,1%
CD96	14%	5-10%	4-25%	40%	0,6%	7,4%	< 0,1%
CD19	0,3%	<0,5%	<0,5%		0,4%	0,1%	< 0,1%
CD3	<0,1%	<0,5%	<0,5%	4%	0,7%	0,8%	0,7%

Tab.5: FACS-Analysen an Hand von Oberflächenfärbungen nach Rekonstitution von NOD/SCID^{null} mit CD34⁺ AML-Blasten und dreimaligem adoptivem Transfer von PRAME-spezifischen T- Zellen. Post TX Werte sind aus 4 verschiedenen Versuchen gemittelt.

	prä TX	post Tx			post T-Zell Applikation		
	in vitro	Milz	Knochenmark	Blut	Milz	Knochenmark	Blut
CD45	70%	40%	11,75%	9%	2,2%	12,7%	n.t.
CD33	27%	2,96%	5,7%	6%	1%	11,6%	n.t.
CD34	21%	1,75%	0,59%	2%	0,9%	0,4%	n.t.
CD96	14%	5-10%	4-25%	40%	0,2%	4,4%	n.t.
CD19	0,3%	<0,5%	<0,5%		0,7%	<0,1%	n.t.
CD3	<0,1%	<0,5%	<0,5%	4%	1%	0,4%	n.t.

Tab.6: FACS-Analysen nach Rekonstitution von NOD/SCID^{null} mit CD56⁻ AML-Blasten und dreimaligem adoptivem Transfer von p53-spezifischen T- Zellen. (N.t. = nicht getestet.). Werte wurden aus 3 verschiedenen Versuchstieren gemittelt.

4. Diskussion

4.1. Generierung und funktionelle Analysen ausgewählter PRAME- und MPP11-Peptide

Die Möglichkeit PRAME und/oder MPP11 als Antigene für eine T-Zell-vermittelte Immuntherapie zu verwenden, wurde bereits durch frühere Arbeiten belegt [26-29, 34-37, 40-41, 94].

Innerhalb dieser Arbeit wurden weiterführende Untersuchungen zur quantitativen Bestimmung der Expression von PRAME und MPP11 auf verschiedenen Geweben unternommen. Hierbei wurde das Augenmerk auf die Expression von PRAME gelegt.

Quantitative Expressionsanalysen in Geweben, Zelllinien und leukämischen Materialien bestätigten die Eignung von PRAME als Antigen für eine ZTL-vermittelte Immuntherapie.

In eigenen exemplarischen Untersuchungen zur Expression von MPP11 in Geweben und leukämischen Proben konnten, die bereits in der Literatur beschriebenen, Ergebnisse bestätigt werden [40, 41].

Sowohl die Überexpression von PRAME- mit 30 %- als auch von MPP11- mit 60 %- konnten durch quantitative RT-PCR Analysen in frisch isoliertem AML-Material bestätigt werden. Die Expression in Normalgeweben war bei beiden Antigenen reduziert, oder nicht vorhanden.

PRAME- und MPP11-Proteine stellen daher aufgrund ihrer quantitativen Assoziation mit verschiedenen hämatologischen Erkrankungen sowie verschiedenen soliden Tumoren und der Tatsache, dass ihre Expression bei gesunden Patienten relativ niedrig ist, attraktive Zielstrukturen für eine ZTL-vermittelte Immuntherapie dar.

Nach der Charakterisierung der Expressionen, folgten Untersuchungen zur genaueren Identifizierung von tumor- und leukämieassoziierten Peptidantigenen aus dem PRAME- und MPP11-Protein. Es wurden nur solche Peptide selektiert, die über HLA-A2 präsentiert werden. Die Bindung der Peptide an HLA-A2, ihre Immunogenität und ihre Schnittstellen innerhalb des proteosomalen Verdau, was letztendlich die Länge des Peptides bestimmt, wurden mit theoretischen Vorhersage-Programmen berechnet. Hierbei war zu beachten, dass innerhalb des MHC-Moleküls befindliche Ankerpositionen von entscheidender Bedeutung für die Bindung von Peptiden in der MHC-Bindungstasche [89, 90] sind. Für HLA-A2.1-präsentierte Peptide befinden sich die primären Ankerpositionen an Position 2 und am C-Terminus des Epitops [90, 91]. Am C-Terminus gelten V, L und

I als klassische Ankeraminosäuren. Außerdem können auch die restlichen Aminosäuren an den übrigen Positionen Auswirkungen auf die Gesamtbindungsstärke des Peptides haben [89].

Die Ankeraminosäuren, welche ein bestimmtes MHC-Molekül binden, müssen nicht identisch sein, aber stets verwandt. So stellen zum Beispiel Phenylalanin (F) und Tyrosin (Y), aromatische Aminosäuren dar, während Valin (V), Leucin (L) und Isoleucin (I) als große hydrophobe Aminosäuren, eine weitere Gruppe darstellen. Des Weiteren binden Peptide mittels ihrer Amino- und Carboxyl-Termini an das MHC-Klasse I Molekül.

Insgesamt konnten 20 mögliche ZTL-Epitope innerhalb des PRAME- und des MPP11-Peptides anhand dieser Vorhersagen identifiziert werden.

Unter Berücksichtigung aller Faktoren und der Vorhersage-Programme bimas und SYFPEITHI wurden 13 Peptide ausgewählt, synthetisiert und auf ihre funktionelle Bindung an HLA-A2 in einem Konkurrenz-Test getestet.

Die Bindungsaffinität der getesteten Peptide war umso größer, je größer die Verdrängung des konkurrierenden p53₂₆₄₋₂₇₂ Peptides, und somit die Inhibition der p53-spezifischen Lyse war.

Durch die Bindungsstudien war es möglich die Zahl der Peptide auf 4 zu reduzieren. Diese Peptide (MPP₆₈₋₇₆, PRAME₁₀₀₋₁₀₈, ₁₄₂₋₁₅₁, ₄₂₅₋₄₃₃) zeigten in den Bindungsstudien die größte HLA-A2-Affinität.

Trotz der Auswahl der HLA-A2-Affinität wurden alle 13 theoretisch berechneten Peptide nachfolgend auf ihre Immunogenität und Induktion peptidspezifischer ZTL in transgenen Mäusen untersucht. Trotz der theoretischen und funktionellen Voruntersuchungen konnten nur 3 primäre ZTL-Kulturen etabliert werden, wobei die Generierung der peptidspezifischen ZTL nur bei einem Peptid (PRA100) mit den theoretischen und funktionellen Ergebnissen korrelierte.

Die in dieser Arbeit verwendete Methode der subkutanen Immunisierung mit Peptid-Antigenen löst in der Regel eine starke T-Zell-vermittelte Immunität in den transgenen Mäusen aus und ermöglicht dadurch eine hohe Anzahl Antigen-spezifischer T-Zellen. Nachteil der Methode ist, dass reaktive ZTL nach subkutaner Immunisierung mit einer Peptid-Dosis von 10µg Peptid/Maus auch in der Peripherie deletiert werden können, was zu einem Verlust spezifischer ZTL innerhalb des T-Zellrepertoires führt. Alternativ kann die systemische Verteilung des applizierten Peptides auch zu einer massiven Aktivierung und der resultierenden „Erschöpfung“ der ZTL führen [105].

Weitere Generierungen von PRAME- oder MPP11-ZTL blieben in der vorgestellten Arbeit aus. Dabei ist zu vermuten, dass die zur Maus-Sequenz homologen Peptide in der Maus negativ selektioniert wurden, um die Bildung potenziell autoreaktiver T-Zellen zu verhindern. Hinweise für eine entsprechende Toleranz auf der Ebene hoch-avider ZTL

existieren für homologe Peptide aus dem p53-Protein in HLA-A2-transgenen Mäusen [114]. Dort konnte bewiesen werden, dass die Abwesenheit hoch-avider ZTL auf die negative Selektion zurückzuführen ist. Zudem zeigten die Beobachtungen, dass niedrig-avide ZTL der intrathymischen Toleranzinduktion entkommen können.

Nach mehrmaligem Passagieren der ZTL-Kulturen und Peptid-Titrationsexperimenten im Chromfreisetzungstest konnten hoch-avide PRAME₁₀₀₋₁₀₈-ZTL (PRA100) in CD8xCyA2K^b Mäusen generiert werden.

Der EC₅₀ Wert der PRA100-spezifischen T-Zellen lag mit 0,1nM in etwa in der Größenordnung der als Vergleich herangezogenen p53₂₆₄₋₂₇₂ T-Zellen.

Die p53-spezifischen T-Zellen sind bereits gut charakterisiert und dienen in allen weiteren Untersuchungen als Vergleich.

Die T-Zellen erkannten selektiv diverse Tumor-Zelllinien, die PRAME bzw. p53 überexprimieren. Die lytische Reaktivität der ZTL war in allen Fällen HLA-A2-restringiert. Untersuchungen zur Erkennung von natürlich prozessiertem PRAME-Peptid auf leukämischen Zelllinien und/oder primärem leukämischem Patienten-Material (akute myeloische Leukämie-Blasten, AML-Blasten) wurden durch CFSE-Untersuchungen verifiziert. Die spezifische Erkennung von PRAME auf leukämischem Zell-Material lieferte erste funktionelle Ergebnisse.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass PRAME auf AML-Blasten exprimiert wird und somit die Erkennung durch ZTL ermöglicht werden kann. Weiterhin sind die generierten PRA100 T-Zellen in der Lage AML-Blasten zu erkennen und zu lysieren. Im Vergleich zwischen PRA100- und p53-spezifischen ZTL zeigten die PRA100-ZTL eine um den Faktor 10 erhöhte lytische Reaktivität gegenüber primärem Leukämie-Material und darüber hinaus um den Faktor 40 bessere Erkennung von AML-Blasten als HLA-A2-spezifische T-Zellen.

Somit konnten die in der Literatur beschriebenen Daten der Erkennung von verschiedenen Tumor-Zelllinien und der Erkennung von chronischem myeloiden Leukämie-Material nicht nur bestätigt, sondern um die Erkennung primären akuten myeloischen Leukämie-Materials erweitert werden [94, 106].

Diese Ergebnisse demonstrieren auch, dass HLA-A2-transgene Mäuse sich als nützliches Tool zur Generierung spezifischer ZTL gegen Tumorantigene eignen, da sie für nicht-homologe humane Peptide eine Quelle hoch-affiner HLA-A2-restringierter TZR darstellen [85].

4.2. In vivo Modelle zur Charakterisierung der GVT/GVL-Reaktivität von PRAME- und p53-ZTL

Nach erfolgreichen *in vitro* Untersuchungen zur Expression und Erkennung von PRAME in malignen Erkrankungen sollten die Transplantat-gegen-Tumor (GVT) bzw. Transplantat-gegen-Leukämie (GVL) Effekte in *in vivo* Modellen im Detail untersucht werden.

Der Gebrauch von *in vivo* Maus-Modellen kann als präklinische "Brücke" zwischen grundlegenden *in vitro* Untersuchungen und der klinischen Nutzbarkeit der zu testenden Substanzen oder Zell-Typen angesehen werden.

Um erfolgreich, unter anderem immuntherapeutische Strategien *in vivo* untersuchen zu können, wurden in den letzten Jahren Anstrengungen unternommen, immundefiziente-transgene Mäuse zu entwickeln, die in der Lage sind humane Zellen zu akzeptieren und die Entwicklung hämatopoetischer Linien zu unterstützen.

Diese Züchtungen werden humanisierte Mäuse genannt.

Die in dieser Arbeit für die *in vivo* Studien verwendeten NOD/SCID/IL2 γ ^{null} Mäuse zeichnen sich durch die fehlende Expression der Interleukin-2 (IL-2) Rezeptor γ Kette (IL-2R γ -Kette) aus. Die IL-2R γ -Kette ist eine wichtige Komponente von vielen anderen hoch-affinen Rezeptoren, wie z. B. für IL-4, IL-7, IL-15 und IL-21, und spielt eine entscheidende Rolle in der Signalübertragung dieser Rezeptoren [107]. Die Abwesenheit dieser gemeinsamen γ -Kette führt neben Beeinträchtigungen in T-Zell- und B-Zell-Entwicklung und Funktion, zu einer vollständigen Verhinderung der NK-Zell-Entwicklung [108, 109]. Durch den NOD/SCID Hintergrund kommen Defekte innerhalb des angeborenen Immunsystems, wie eine verminderte Makrophagen-Funktionalität und die Abwesenheit von hämatolytischem Komplement hinzu.

Voraussetzung für die Anwendung einer tumorspezifischen Immuntherapie ist neben der Expression des jeweiligen Antigens auch eine funktionierende Antigenprozessierung- und -präsentation durch die vermeintlichen Ziel-Zellen. Die Fähigkeit von Tumoren der Immunantwort zu entgehen, kann unter anderem durch eine verminderte MHC-Klasse I-Expression verursacht sein. Als ein weiterer Schutzmechanismus der Tumorzellen, ist die Expression funktioneller Fas-Liganden auf ihrer Zelloberfläche beschrieben, um der Apoptose durch die Fas-vermittelten Erkennung zu entgehen. Die Folge ist die Apoptose der aktivierten und potenziellen tumorreaktiven ZTL.

Um diesen Problemen innerhalb der Tumor-*in-vivo*-Versuche zu entgehen, wurden stabil transfizierte proteinspezifische Zelllinien (EA2K^bp53 und EA2K^bPRAME) generiert. Alle antigenspezifischen Zellen zeigten über mehrere Monate eine stabile Expression sowohl des Antigens als auch des HLA-A2 Moleküls an ihrer Oberfläche.

Die Inokulation der NOD/SCID/IL2 γ ^{null} Mäuse mit Tumorzellen und gleichzeitiger Gabe von tumorspezifischen T-Zellen konnten das Anwachsen des Tumors in den Versuchstieren verlangsamen. Rückschlüsse auf die Expression der Antigene auf dem Tumor bzw. die Affinität der T-Zellen gegenüber ihrem Antigen konnten durch die unterschiedliche Verlangsamung des Tumor-Wachstums gemacht werden. HLA-A2-spezifische T-Zellen und ihre spezifische Tumor-Variante (EA2K^b) zeigten in Etablierungsversuchen eine Reduktion des Tumorstadiums an Tag 23 um eine Log-Stufe. Versuche mit PRAME-spezifischen T-Zellen und Tumorzellen konnte das Tumorstadium soweit verlangsamen, dass die Tumore mit einem Durchmesser von 1mm² gerade noch messbar waren.

p53-Versuche hingegen zeigten eine deutlich schwächere Reduktion der Tumormasse am Ende des Experimentes.

Um die Ergebnisse eindeutig der GVT-Reaktivität der eingesetzten T-Zellen zu ordnen zu können, wurden nach Beendigung des Experimentes Milzzellen ex vivo restimuliert und expandiert. In folgenden Chromfreisetzung-Untersuchungen konnten die zuvor in die Mäuse transferierten T-Zellen zweifelsfrei wieder identifiziert werden.

Die in den in vivo Untersuchungen erzielten Daten bestätigten, die bereits in in vitro Untersuchungen beschriebene, Tumor-Spezifität von p53- und PRAME-spezifischen ZTL. Trotz fehlender IL-2 Zytokin-Zufuhr, welche für T-Zellen essentiell ist, konnten T-Zellen aus den Milzen der Versuchstiere isoliert werden. Dies spricht für die Affinität der ZTL gegenüber ihrem Antigen und einer parakrinen IL-2 Produktion, da in den NOD/SCID/IL2 γ ^{null} kein endogenes IL-2 zur Verfügung steht. Es ist daher wahrscheinlich, dass in diesem Fall die Aktivierung der T-Zellen durch die Erkennung des spezifischen Antigens mittels Peptid:MHC-Komplex auf den Tumoren zur Aktivierung und somit zur autokrinen Produktion von IL-2 geführt hat.

Neben Untersuchungen zur GVT-Reaktivität der ZTL wurden auch GVL-Experimente durchgeführt. Die Reaktivität der T-Zellen gegenüber Leukämiezellen wurde bereits in in vitro Experimenten gezeigt, und sollte in in vivo Untersuchungen bestätigt werden. Um diese in einem geeigneten in vivo Modell untersuchen zu können, musste ein Protokoll entwickelt werden, welches das reproduzierbare Anwachsen einer AML im Maus-System ermöglicht. Bis zum heutigen Stand der Forschung gelang es verschiedenen Gruppen, eine Leukämie in Mäusen zu etablieren. Allerdings bestehen kontroverse Daten in den Eigenschaften der zu verwendenden Leukämien hinsichtlich FAB-Klassifikation, zu applizierende Zellzahl oder Subpopulation (z. B. CD34⁺ Zellen) [110, 111].

Als weitere Hypothese, die das Wachstum der humanen Leukämiezellen innerhalb des Maus-Modells näher beschreiben sollen, sind die als SL-IC (SCID leukemia-initiating cell) bezeichneten Zellen zu nennen. Hierbei wird von der Meinung ausgegangen, dass innerhalb einer Leukämie Stammzellen existieren, die ähnlich den Stammzellen eines jeden Menschen, für die Progression der Krankheit durch multiple Vermehrungen der Zellen verantwortlich sind. Gestützt wird diese Theorie durch die Rezidiv-Quote der Leukämien. Denn trotz erfolgreicher Bestrahlungs- und Chemotherapie treten nach Jahren oft Rezidive auf. Theoretisch könnte also eine überlebende leukämische Stammzelle zum erneuten Auftreten der Krankheit führen. Den Beweis für die Existenz der leukämischen Zellen konnte in Mausmodellen erbracht werden. Dort wurde eine Zellpopulation identifiziert, welche neben einer Vielzahl weiterer CD-Marker, die typische Expression von $CD34^+$ und $CD38^-$ auf der Oberfläche trägt und die Rekonstitution der AML in Mäusen ermöglicht [110, 112].

Die Theorie der SL-IC wurde auch in den Etablierungen in dieser Arbeit vertreten. Daher wurden zur Generierung humaner AML in NOD/SCID/IL2 γ ^{null} Mäusen drei unterschiedliche Ausgangszellpopulationen verwendet.

Da SL-IC eine sehr kleine Population innerhalb der $CD34^+/CD38^-$ hämatopoetischen Zellen (HSZ) ist, wurden den Mäusen aufgereinigte $CD34^+$ Zellen transferiert. Dies ermöglicht eine komplette Applikation nicht nur von HSZ-Zellen, sondern auch der darin enthaltenen SL-IC-Population. Als Vergleich dazu wurden unseparierte AML-Zellen und CD56-depletierte Zellen inokuliert. Die Population der CD56-depletierten Zellen wurde verwendet, da die Hypothese nach Untersuchungen in NOD/SCID Mäusen aufgestellt wurde, dass Wachstumsfaktoren, die durch das murine Knochenmark produziert werden, Einfluss auf die inhibierende Liganden Expression der transplantierten AML-Blasten haben [113]. Somit kann es zu einer allogenen Erkennung der AML-Zellen durch eigene NK-Zellen kommen und die Rekonstitution der AML kann inhibiert werden. Als weiterer SL-IC Oberflächenmarker wird CD96 gehandelt. In Transferstudien zeigten Zellen mit einer phänotypischen Unterteilung in $CD34^+/CD38^-/CD96^+$ und $CD34^+/CD38^-/CD96^-$, dass nur erstere Population in der Lage ist eine Rekonstitution in humanisierten Mäusen zu generieren [100]. Somit ist zu vermuten, dass die $CD96^+$ -Population die Stammzellen beinhaltet. Die Separation der $CD96^+$ -Zellen zur Applikation in NOD/SCID/IL2 γ ^{null} Mäuse gelang in dieser Arbeit nicht, da die Quantität der erhaltenen Zellen für die Transfer-Experimente nicht ausreichte.

NOD/SCID/IL2 γ ^{null} Mäusen wurden vor Transfer der AML-Zellen mit einer subletalen Strahlendosis behandelt. Durch diese Methode sollte die Hämatopoese der Tiere nicht zerstört, sondern nur kurzzeitig verlangsamt werden, um den applizierten Zellen ein problemloseres Anwachsen zu ermöglichen.

Um das Anwachsen der Zellen untereinander vergleichen zu können, wurden diese Untersuchungen einheitlich mit einer AML-Probe durchgeführt. Die verwendete AML war FAB M0 klassifiziert und besitzt eine schlechte Prognose, was im Allgemeinen als positive Eigenschaften für die Rekonstitution in Mäusen bezeichnet wird. In 95 % der Experimente konnte ein Anwachsen der humanen Zellen im murinen System detektiert werden, allerdings nur bei Applikationen mit CD34⁺-Zellen oder CD56⁻-Zellen. Rekonstitutions-Experimente mit unseparierten AML-Zellen zeigten keinerlei Wachstum in den Versuchstieren.

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass der Transfer von CD34⁺-Zellen oder CD56-depletierten Zellen leukämischen Ursprungs ein deutlich gestiegenes Potenzial zur Rekonstitution von NOD/SCID/IL2 γ ^{null} Mäusen zeigt.

Nach erfolgreicher Etablierung humaner AML in NOD/SCID/IL2 γ ^{null} Mäusen wurden p53- oder PRAME-spezifischen T-Zellen intravenös wiederholt in die Tiere transferiert. Nach dreimaliger Gabe, von ZTL, wurden die Tiere hinsichtlich der Präsenz von humanen Zellen im Blut, Knochenmark und Milz untersucht. Die Ergebnisse wurden mit Analysen der in vitro AML-Kultur verglichen, sowie mit Untersuchungen ohne T-Zell-Gabe. Dabei konnte festgestellt werden, dass die wiederholte Gabe von T-Zellen in leukämie-tragende Mäuse zu einer Reduktion der Leukämiebelastung in allen untersuchten Geweben geführt hat.

Die GVL-Reaktivität der T-Zellen konnte dadurch in einem in vivo Test bestätigt werden. Diese Experimente lieferten daher erste Ergebnisse für die therapeutische Applikation von leukämie-reaktiven ZTL.

4.3. Klinische Relevanz

Die Entwicklung von immuntherapeutischen Strategien zur Behandlung maligner Tumorerkrankungen oder Leukämien macht sich die Kenntnis immunogener Tumor- bzw. Leukämie-assoziiierter Peptidantigene zu nutzen. Diese sollten unter optimalen Voraussetzungen nur in den Tumoren oder den Leukämie-Blasten exprimiert werden. Im Bereich der Tumorantigene konnten bereits zahlreiche Kandidaten benannt und charakterisiert werden. Einige der TAA wurden bereits in klinischen Studien erfolgreich eingesetzt.

Eine effektive T-Zell Immunantwort zu generieren mag bei Fremdanthigenen erfolgreich sein, bei der Nutzung von Selbst-Proteinen als Antigen sowie der Anwendung in immundefizienten Patienten, konnten stets nur suboptimale Ergebnisse erzielt werden.

Studien mit p53-defizienten gegenüber Wildtyp Mäusen konnten Nachteile in der T-Zell vermittelten Antwort zeigen, die in der Selbst-Toleranz begründet liegt [114]. Analog ist im Menschen der Antitumor-Effekt der allogenen Stammzelltransplantation (Allo-SZT) zu nennen, der einen kurativen Ansatz für viele verschiedene hämatologische Malignitäten, wie die chronisch myeloische Leukämie (CML) und akute myeloische Leukämie (AML) darstellt. Dieser Effekt wird durch die im Transplantat verbliebenen T-Lymphozyten vermittelt, welche Antigene auf der Zelloberfläche der Spender-Zellen erkennen und lysieren können.

Neben diesem Transplantat-gegen-Leukämie Effekt (GVL) konnte auch die alleinige Gabe von Spender T-Lymphozyten (Donor lymphocyte infusion, DLI) eindrucksvolle Ergebnisse bei der Therapie hämatologischer Erkrankungen erzielen. Hierbei spielen mHA Antigene die entscheidende Rolle. Sie werden von den Spender-Zellen als fremd erkannt und attackiert. Die Erfahrung, dass ein nicht toleriertes T-Zell-Transplantat zur erfolgreichen GVL-Reaktivität führen kann, lieferte die Grundlage für die Therapie hämatologischer Erkrankungen durch adoptiven T-Zell Transfer.

Nachteile bzw. Schwierigkeiten des adoptiven Transfers von T-Zellen liegen zum einen in der logistischen Planung der Therapie. Hierbei muss eine sehr große Anzahl T-Zellen ex vivo kultiviert und stimuliert werden, bevor die Reinjektion in den Patienten erfolgt. Zum anderen handelt es sich bei Antigenen wie PRAME um Selbst-Proteine, deren Erkennung im Organismus zur Anergie und klonalen Deletion führen kann. Resultat ist eine sehr kleine Anzahl von nieder-affinen, zirkulierenden T-Zellen, welche für die Expansion genutzt werden könnten [115].

Letztendlich hat die intensive Therapie vieler hämatologisch erkrankter Patienten eine Verringerung oder abnorme Antigen-Präsentierung zur Folge, welche eine verringerte Präsentation des Therapie-gerichteten Antigens bedingt. Daraus folgt eine unzurei-

chende Präsentation von Antigenen, insbesondere solcher Antigene mit ohnehin niedriger Expression.

Bei hämatologischen Erkrankungen ist die Anzahl der möglichen ZTL-Epitope stark vermindert. Bereits identifizierte und zum Teil klinisch eingesetzte Antigene sind Epitope von Proteinase 3 (Pr3), Minor-Histokompatibilitäts Antigene (mHA) sowie dem Wilms Transkriptionsfaktor 1 (WT1) [116].

In dieser Arbeit wurden zwei weitere mögliche Kandidaten für die immunologische Therapie untersucht. PRAME als auch MPP11 konnten in einer Vielzahl von soliden Tumoren und hämatologischen Erkrankungen anhand ihrer Überexpression detektiert werden. Beide Proteine könnten somit ein universelles Antigen für die Immuntherapie darstellen.

Die Generierung PRAME- und MPP11-spezifischer ZTL in transgenen Mäusen ermöglichte die Etablierung einer PRAME₁₀₀₋₁₀₈-spezifische ZTL-Population, die in allen in vitro Untersuchungen ihren potenziell therapeutischen Nutzen unter Beweis stellen konnte. In daraus resultierenden in vivo Experimenten konnten PRAME als auch p53 T-Zellen in Tumor-Experimenten die Tumormasse nach einmaliger Applikation der Zellen reduzieren. Dies führte zu einem verlangsamten Wachstum des Tumors.

Weiter konnten p53 und mit größerem Erfolg auch PRAME T-Zellen zeigen, dass der wiederholte Transfer von ZTL in leukämietragende NOD/SCID/IL2 γ ^{null} Mäuse zu einer Reduktion der leukämischen Last in Knochenmark, Milz und Blut führte.

Die Expression des in Transfer-Studien beschriebenen humanen, leukämischen Stammzell-Markers CD96 [100] konnte mittels des Einsatzes der T-Zellen um den Faktor 30 gesenkt werden. Dies spricht für die spezifische Erkennung von AML-Blasten durch p53- bzw. PRAME-spezifische T-Zellen in vivo.

Durch die Immunisierung von transgenen Mäusen konnten keine ZTL mit einer Spezifität gegen die theoretisch berechneten MPP11-ZTL-Epitope generiert werden. MPP11 schien durch die Expressions-Analysen und die Berechnung zahlreicher theoretischer ZTL-Epitope das geeignetere Ziel-Antigen für eine adoptive Immuntherapie bei hämatologischen Erkrankungen zu sein. Periphere Deletion oder die Produktion anergischer T-Zellen, innerhalb der Generierung der ZTL, könnten die Ursachen für die fehlende T-Zell-Antwort innerhalb der transgenen Mäuse sein.

Vor- und Nachteile der Entwicklung neuer Strategien zur effektiven Steigerung der GVL-Effekte fokussierten vor allem Antigene, welche die potenziell höchsten Therapieaussichten haben, wie zum Beispiel die Vakzinierung mit leukämiespezifischen Peptiden (WT1, BCR-ABL). Dies ist eine logistisch anwendbare Methode, die aber ihre Limitationen in der HLA-Restriktion der einzelnen Peptide hat. Aber auch diverse Applikationsmethoden und in vitro Behandlungen werden weiter optimiert. Die Entwicklung und

Testung verschiedenster Therapiestrategien ist allerdings meistens mit einem enorm hohen wirtschaftlichen und personellen Aufwand verbunden und wird daher selten zu einer Behandlungspflicht. Eine weitere Strategie ist die Zellvakzinierung, zum Beispiel mit leukämischen-DZ oder Hitze Schock Proteinen, die als Quelle der malignen Antigene in vivo dienen sollen. Eine alternative Strategie zur Steigerung des GVL-Effekts in Leukämie-Patienten ist der adoptive Transfer von leukämiereaktiven T-Zellen. Die unter diesem Punkt zusammengefassten Methoden umfassen zum einen die in vitro Selektion und Expansion von reaktiven T-Zellen und zum anderen den retroviralen Gentransfer von leukämiespezifischen T-Zell-Rezeptoren (TZR) in das T-Zellrepertoire des Patienten. Trotz der vermeintlichen „Einfachheit“ der Methoden weisen auch diese Limitierungen auf. So ist die selektive in vitro Expansion reaktiver T-Zellen nicht in jedem Spender-Empfänger-Paar erfolgreich. Der retrovirale Transfer von Genen wird zwar in präklinischen Studien bereits eingesetzt, aber die Diskussionen um die Gefährlichkeit der viralen Komponenten in diesem System, und die damit verbundene mögliche Bildung zum Beispiel neuer TZR-Paare mit unbekannter Spezifität, aber auch die latente Viruslast, der der Patient vermutlich ausgesetzt ist, reißen nicht ab.

Um eine optimale Immuntherapie gewährleisten zu können, sollte auch die Progression, die genaue Klassifizierung und die Phase der Krankheit genau beobachtet werden. So konnten zum Beispiel Untersuchungen über die Expression verschiedenster Antigene einer CML innerhalb der verschiedenen Progressionsstufen Ergebnisse über die Verteilung der verschiedenen Antigene in definierten Phasen der Krankheit erbringen und somit zeigen, dass die Therapie mit antigenspezifischen ZTL nur in einem engen Zeitfenster sinnvoll eingesetzt werden kann [117]. Dieses Problem zeigt deutlich die Limitation einer adaptiven Immuntherapie mit antigenspezifischen T-Zellen, sowie anderer möglicher Strategien. Ein weiterer Kritikpunkt des adaptiven Transfers von spezifischen T-Zellen ist, dass die T-Zellen vor Transfer in den Patienten ausreichend differenzierte Effektor-Funktionen haben müssen, diese Zellen aber in vivo nur wenige Tage überleben können [118]. Die stetige Stimulation der eingebrachten, reaktiven T-Zellen soll durch in der Entwicklung befindliche bispezifische ZTL gelöst werden. Hierbei werden T-Zellen nicht nur mit dem leukämiereaktiven TZR ausgestattet, sondern auch mit einem viralen TZR, wie zum Beispiel CMV oder EBV. Durch die persistierende virale Infektion werden die T-Zellen stets aktiviert und zur Proliferation angeregt, was ein Langzeit-Überleben sowie eine Langzeit-GVL-Reaktivität der ZTL zur Folge hat.

Parallel dazu werden universelle Antigene gesucht, welche in einer Krankheit, wie CML, ALL, oder AML, Leukämie-spezifisch exprimiert werden. Dies im Zusammenspiel mit weiteren eingehenden Untersuchungen zur Charakterisierung der leukämischen Stammzellen und in vivo Untersuchungen in humanisierten Mäusen könnte langfristig zu einer Bandbreite an möglichen Kandidaten für die Immuntherapie von hämatologischen Erkrankungen führen.

In dieser Arbeit konnten sowohl zwei Kandidaten für eine adaptive Immuntherapie mit zytotoxischen T-Zellen beschrieben, als auch ihre Nutzbarkeit in in vivo Modellen zur Tumorreduktion bzw. Leukämiebekämpfung gezeigt werden.

5. Zusammenfassung

Der Transplantat-gegen-Leukämie (GVL) Effekt als immuntherapeutisches Mittel bei der allogenen hämatopoetischen Stammzell Transplantation (HSZT) ist hauptsächlich durch Spender Lymphozyten vermittelt, welche hämatopoetische Minor-Histokompatibilitäts Antigene bzw. Leukämie-assoziierte Antigene (z. B.: PRAME, p53) erkennen. Der adoptive Transfer von Leukämie-spezifischen T-Zellen kann den GVL-Effekt, ohne ein Auftreten einer Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung (GVHD), steigern.

Unter Verwendung von HLA-A2 und human CD8 transgenen Mäusen (CD8yCyA2K^b) konnten in dieser Arbeit PRAME spezifische CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen generiert werden. Diese zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen zeigten in Chromfreisetzungsuntersuchungen lytische Aktivität gegen eine Vielzahl von Zelllinien, die PRAME endogen prozessieren sowie gegen das spezifische PRAME-Peptid. Des Weiteren wurden die hier generierten T-Zellen auf ihre zytotoxische Aktivität gegen akute myeloische Leukämie Blasten hin untersucht, und diese Untersuchungen zeigten AML-Reaktivität der PRAME-spezifischen sowie der als Vergleich genutzten p53- und HLA-A2-spezifischen T-Zellen.

Das Potenzial der PRAME-spezifischen ZTL die GVL-Immunität in vivo zu erhöhen ohne das Vorkommen einer GVHD wurde in einem Tumor-Protektions-Modell unter der Nutzung von NOD/SCID γ ^{null} Mäusen untersucht. Die PRA100- bzw. p53-ZTL wurden adoptiv in NOD/SCID γ ^{null} Rezipienten transferiert und gleichzeitig wurden die Tiere mit PRAME-, oder p53-exprimierende Tumorzelllinien inokuliert.

Die Reduktion des Tumorwachstums bestätigte die Spezifität der T-Zellen auch in vivo. In weiteren in vivo Experimenten wurden NOD/SCID γ ^{null} Mäuse mit AML-Blasten rekonstituiert. Durch die Applikation von nur CD34 positiven Zellen aus einer AML-Probe, oder einer CD56 depletierten Probe, konnten Rekonstitutionen in 95 % aller Versuche erfolgreich beendet werden. Wurde eine Rekonstitution mittels PCR- und FACS-Analysen diagnostiziert, so folgten mehrere Applikationen der PRAME- oder p53-spezifischen ZTL.

In diesen Untersuchungen konnten wir in einem therapeutischen AML-in vivo-Modell zeigen, dass die in diesen Untersuchungen generierten/verwandten ZTL in der Lage sind AML-Blasten in vivo zu bekämpfen und so die leukämische Last der Tiere im Blut sowie in der Milz auf unter 1 % zu regulieren. Der prozentuale Anteil humaner AML Zellen im Knochenmark konnte deutlich gesenkt werden (< 10 %).

Zusammenfassend sind die von uns generierten PRAME-spezifischen T-Zellen in der Lage, in vitro und auch in vivo, endogen prozessiertes Protein auf Zelllinien und AML-Blasten zu erkennen und zu lysieren. Auch die p53-ZTL, welche als eine weitere Antigen-spezifische ZTL-Population in vivo getestet wurden, zeigten GVL-Effekte.

Die Kenntnis von Tumor- bzw. Leukämie assoziierten Antigenen und die daraus erwachsene Möglichkeit der Generierung krankheitsspezifischer ZTL bietet die Grundlage für eine spezifische Immuntherapie maligner Erkrankungen.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Watson J. H., NH Roberts, J.W. Steitz, A.M. Weiner, ***Molecular Biology of the Gene, 4th edition Vol. II***
- [2] Abbas A., ***Cellular and Molecular Immunology, Vol. 5th edition***
- [3] Kern W., G. Behre, Ch. v. Schilling, T. Haferlach, D. Adorf et al., *Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Leukämien und myelodysplastische Syndrome, 2. Auflage*, 17 (2003)
- [4] Löwenberg B., J.R. Downing, A. Burnett, *Acute myeloid leukemia, The New England Journal of Medicine*, **341**, 1051 (1999)
- [5] Bennett J. M., D. Catovsky, M. T. Daniel et al., *Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group, Br. J. of Haematol.*, **33**, 451 (1976)
- [6] Bloomfield C. D., R. D. Brunning, *The revised French-American-British classification of acute myeloid leukemia: is new better?*, ***Ann. Intern. Medicine***, **103**, 614 (1985)
- [7] Bitter M. A., M. M. Le Beau, J. D. Rowley, R. A. Larson, H. M. Golomb, J. W. Vardiman, *Associations between morphology, karyotype, and clinical features in myeloid leukemias, Hum. Pathol.*, **18**, 211 (1987)
- [8] Stelljes M., R. Strothotte, H-G. Pauels, J. Kienast et al., *Graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation induces a CD8+ T cell-mediated graft-versus-tumor effect that is independent of the recognition of alloantigenic tumor targets, Blood*, **104**, 1210 (2004)
- [9] Appelbaum F.R. et al., *Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy, Nature*, **411**, 385 (2001)
- [10] Horowitz M.M., R.P. Gale, P.M. Sondel, *Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation, Blood*, **75**, 555 (1990)

- [11] Orsini E., R. Bellucci, E.P. Alyea et al., *Expansion of tumor-specific CD8+ T cell clones in patients with relapsed myeloma after donor lymphocyte infusion*, **Cancer Res.**, **63**, 2561 (2003)
- [12] Bellucci R., E.P. Alyea, S. Chiaretti, J. Ritz et al., *Graft-versus-tumor response in patients with multiple myeloma is associated with antibody response to BCMA, a plasma-cell membrane receptor*, **Blood**, **105**, 3945 (2005)
- [13] Molldrem J.J., P.P. Lee, C. Wang et al., *Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia*, **Nat. Med.**, **6**, 1018 (2000)
- [14] Molldrem J.J., P.P. Lee, C. Wang, R.E. Champlin, M.M. Davis, *A PR1-human leukocyte antigen-A2 tetramer can be used to isolate low-frequency cytotoxic T lymphocytes from healthy donors that selectively lyse chronic myelogenous leukemia*, **Cancer Res.**, **59**, 2675 (1999)
- [15] Hartwig U.F., M. Robbers, C. Wickenhauser, C. Huber, *Murine acute graft-versus-host disease can be prevented by depletion of alloreactive T lymphocytes using activation-induced cell death*, **Blood**, **99**, 3041 (2002)
- [16] Barrett, A.J., *Understanding and harnessing the graft-versus-leukaemia effect*, **British Journal of Haematology, Review**, 1 (2008)
- [17] Morgan R.A., M.E. Dudley, J.R. Wunderlich et al., *Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes*, **Science**, **314**, 126 (2006)
- [18] Rosenberg S.A., N.P. Restifo, J.C. Yang, R.A. Morgan, M.E. Dudley, *Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy*, **Nature Reviews Cancer**, **8**, 299 (2008)
- [19] Kessler J., C.J.M. Melief, *Identification of T-cell epitopes for cancer immunotherapy*, **Leukemia**, **21**, 1859 (2007)
- [20] Rosenberg S.A., *Gene therapy for cancer*, **JAMA**, **268**, 2416 (1992)
- [21] Rosenberg S.A., B.S. Packard, C.A. Seipp et al., *Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma*, **N. Engl. J. Med.**, **319**, 1676 (1988)

- [22] Offringa R., S.H. van der Burg, F. Ossendorp, R.E. Toes, C.J. Melief, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11007362?ordinalpos=6&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum
Design and evaluation of antigen-specific vaccination strategies against cancer, **Curr. Opin. Immunol.**, **12**, 576 (2000)
- [23] Rosenberg S.A., http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10204484?ordinalpos=21&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum
A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens, **Immunity**, **10**, 281 (1999)
- [24] van der Bruggen P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, T. Boon, *A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*, **Science**, **254**, 1643 (1991)
- [25] Coulie P.G., V. Brichard, A. Van Pel, T. Wölfel, J. Schneider, C. Traversari, J.P. Szikora, *A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas*, **J. Exp. Med.**, **180**, 35 (1994)
- [26] van Baren N., H. Chambost, A. Ferrant, L. Michaux, H. Ikeda, I. Millard, D. Olive, T. Boon, P.G. Coulie, *PRAME, a gene encoding an antigen recognized on a human melanoma by cytolytic T cells, is expressed in acute leukaemia cells*, **Br. J. Haematol.**, **102**, 1376 (1998)
- [27] Neumann E., A. Engelsberg, J. Decker, S. Storkel, E. Jaeger, C. Huber, B. Seliger, *Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens RAGE-1, PRAME, and glycoprotein 75 in human renal cell carcinoma: candidates for T-cell-based immunotherapies?*, **Cancer Res.**, **58**, 4090 (1998)
- [28] Pellat-Deceunynck C., M.P. Mellerin, N. Labarriere, G. Jego, A. Moreau-Aubry, J.L. Harousseau, F. Jotereau, R. Bataille, *The cancer germ-line genes MAGE-1, MAGE-3 and PRAME are commonly expressed by human myeloma cells*, **Eur. J. Immunol**, **30**, 803 (2000)

- [29] Ikeda H., B. Lethe, F. Lehmann et al., *Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor*, **Immunity**, **6**, 199 (1997)
- [30] Tajeddine N., J-L. Gala, M. Louis, M. van Schoor, B. Tombal, P. Gailly, *Tumor-associated antigen preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) induces caspase-independent cell death in vitro and reduces tumorigenicity in vivo*, **Cancer Res**, **65**, 7348 (2005)
- [31] Epping M.T., L. Wang, M.J. Edel, L. Carlée, M. Hernandez, R. Bernards, *The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signalling*, **Cell**, **122**, 835 (2005)
- [32] Altucci L., H. Gronemeyer, *The promise of retinoids to fight against cancer*, **Nat. Rev. Cancer**, **1**, 181 (2001)
- [33] Freemantle S.J., M.J. Spinella, E. Dmitovsky, *Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance*, **Oncogene**, **22**, 7305 (2003)
- [34] Beau M., R. Espinosa, E.M. Davis, J.D. Eisenbart, R.A. Larson, E.D. Green, *Cytogenetic and molecular delineation of a region of chromosome 7 commonly deleted in malignant myeloid diseases*, **Blood**, **88**, 1930 (1996)
- [35] Zenklusen J.C., C.J. Conti, *Cytogenetic, molecular and functional evidence for novel tumor suppressor genes on the long arm of human chromosome 7*, **Mol. Carcinog.**, **15**, 167 (1996)
- [36] Güre A.O., E. Stockert, M.J. Scanlan, R.S. Keresztes, D. Jäger, N.K. Altorki, L.J. Old, Y.T. Chen, *Serological identification of embryonic neural proteins as highly immunogenic tumor antigens in small cell lung cancer*, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **97**, 4198 (2000)
- [37] Scanlan M. J., I. Gout, C.M. Gordon, B. Williamson, E. Stockert, A. O. Güre, D. Jäger, Y. T. Chen, A. Mackay, M. J. O'Hare, L. J. Old, *Humoral immunity to human breast cancer: antigen definition and quantitative analysis of mRNA expression*, **Cancer Immun.**, **1**, 4 (2001)
- [38] Shoji W., T. Inoue, T. Yamamoto, M. Obinata, *MIDA1, a protein associated with Id, regulates cell growth*, **J. Biol. Chem.**, **270**, 24818 (1995)

- [39] Yan W., B. Schilke, C. Pfund, W. Walter, S. Kim, E.A. Craig, *Zuotin, a ribosome-associated DnaJ molecular chaperone*, **EMBO J.**, **17**, 4809 (1998)
- [40] Resto V.A., O.L. Caballero, M. Buta, W. Westra, L. Wu, J. Westendorf, J. Jen, P. Hieter, D. Sidransky, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11034098?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum *A putative oncogenic role for MPP11 in head and neck squamous cell cancer*, **Cancer Res.**, **60**, 5529 (2000)
- [41] Greiner J. et al., *mRNA expression of leukemia-associated antigens in patients with acute myeloid leukemia for the development of specific immunotherapies*, **Int. J. Cancer**, **108**, 704 (2004)
- [42] Greiner J., M. Ringhoffer, M. Taniguchi, T. Hauser, A. Schmitt, H. Döhner, M. Schmitt, *Characterization of several leukemia-associated antigens inducing humoral immune responses in acute and chronic myeloid leukemia*, **Int. J. Cancer**, **106**, 224 (2003)
- [43] Abbas A.K., K.M. Murphy, A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*, **Nature**, **383**, 787 (1996)
- [44] Romagnani S., *Lymphokine production by human T cells in disease states*, **Annu. Rev. Immunol.**, **12**, 227 (1994)
- [45] Faria A.M., H.L. Weiner, *Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications*, **Adv. Immunol.**, **73**, 153 (1999)
- [46] Zinkernagel R.M., *Immunology taught by viruses*, **Science**, **271**, 173 (1996)
- [47] Ahmed R., D. Grey, *Immunological memory and protective immunity: understanding their relation*, **Science**, **272**, 54 (1996)
- [48] Zinkernagel R.M. M.F. Bachmann, T.M. Kündig et al., *On immunological memory*, **Annu. Rev. Immunol.**, **14**, 333 (1996)
- [49] Dutton R.W., L.M. Bradley, S.L. Swain, *T cell memory*, **Annu. Rev. Immunol.**, **16**, 201 (1998)

- [50] Lanzavecchia A., F. Sallusto, *Dynamics of T lymphocyte Responses: Intermediates, Effectors, and Memory Cells*, **Science**, **290**, 92 (2000)
- [51] Takeda S., H.R. Rodewald, H. Arakawa, H. Bluethmann et al., *MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4+ T cells, but affect their long-term life span*, **Immunity**, **5**, 217 (1996)
- [52] Brocker T., *Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells*, **J. Exp. Med.**, **186**, 1223 (1997)
- [53] Horgan K.J., G.A. Van Seventer, Y. Shimizu, S. Shaw, *Hyporesponsiveness of "naive" (CD45RA+) human T cells to multiple receptor-mediated stimuli but augmentation of responses by co-stimuli*, **Eur. J. Immunol.**, **20**, 1111 (1990)
- [54] Sagerstrom C., E. Kerr, J. Allison, M. Davis, *Activation and differentiation requirements of primary T cells in vitro*, **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, **90**, 8987 (1993)
- [55] Croft M., L.M. Bradley, S.L. Swain, *Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells*, **J. Immunol.**, **152**, 2675 (1994)
- [56] Pihlgren M., P.M. Dubois, M. Tomkowiakk, T. Sjogren, J. Marvel, *Resting memory CD8+ T cells are hyperreactive to antigenic challenge in vitro*, **J. Exp. Med.**, **184**, 2141 (1996)
- [57] Cai Z. et al., *Requirements for peptide-induced T cell receptor downregulation on naive CD8+ T cells*, **J. Exp. Med.**, **185**, 641 (1997)
- [58] Bachmann M.F. et al., *Developmental regulation of Lck targeting to the CD8 coreceptor controls signaling in naive and memory T cells*, **J. Exp. Med.**, **189**, 1521 (1999)
- [59] Valitutti S., S. Muller, M. Dessing, A. Lanzavecchia, *Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy*, **J. Exp. Med.**, **183**, 1917 (1996)

- [60] Viola A., A. Lanzavecchia, *T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds*, **Science**, **273**, 104 (1996)
- [61] Kuball J., F.W. Schmitz, R.-H. Voss, M. Theobald, *Cooperation of human tumor-reactive CD4+ and CD8+ T cells after redirection of their specificity by a high-affinity p53A2.1-specific TCR*, **Immunity**, **22**, 117 (2005)
- [62] Sherman L.A., S.V. Hesse, D. La Face, P. Peterson, *Selecting T cell receptors with high affinity for self-MHC by decreasing the contribution of CD8*, **Science**, **258**, 815 (1992)
- [63] Dittmer D., S. Pati, G. Zambetti, S. Chu, et al., *Gain of functions mutations in p53*, **Nat. Genet.** **4**, 42 (1993)
- [64] Lozzio C.B., B.B. Lozzio, *Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome*, **Blood**, **45**, 321 (1975)
- [65] Vitiello A., D. Marchesini, L.A. Sherman, R.W. Chesnut, *Analysis of the HLA-restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocyte response in transgenic mice carrying a chimeric human-mouse class I major histocompatibility complex*, **J. Exp. Med.**, **173**, 1007 (1991)
- [66] Shultz L.D., F. Ishikawa, D.L. Greiner, *Humanized mice in translational biomedical research*, **Nature Reviews Immunol.**, **7**, 118 (2007)
- [67] Ito M. et al., *NOD/SCID/ γ_c^{null} mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells*, **Blood**, **100**, 3175 (2002)
- [68] Hengen P.N., *Optimizing multiplex and LA-PCR with betaine*, **Trends Bioch. Sci.**, **22**, 225 (1997)
- [69] Frackman S., G. Kobs, Promega Corporation, **Promega Notes**, **65**, 27 (1998)
- [70] Wong M.L., J.F. Medrano, *Real-time PCR for mRNA quantitation*, **BioTechniques**, **39**, 75 (2005)
- [71] Higuchi R., C. Fockler, G. Dollinger, R. Watson, *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*, **Biotechnology**, **11**, 1026 (1993)

- [72] Morrison T.B., J.J. Weis, C.T. Wittwer, *Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification*, **BioTechniques**, **24**, 954 (1998)
- [73] Palmer S., A.P. Wiegand, F. Maldarelli, et al., *New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma*, **J. Clin. Microbiol.**, **41**, 4531 (2003)
- [74] Vandesompele J., A. De Paepe, F. Speleman, *Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR*, **Anal. Biochem.**, **303**, 95 (2002)
- [75] Janeway C., *Immunobiology*. 2005, **6th edition**
- [76] Lotz C., E.A. Ferreira, S. Drexler, et al., *Partial tyrosinase-specific self tolerance by HLA-A*0201-restricted cytotoxic T lymphocytes in mice and man*, **Int. J. Cancer**, **108**, 571 (2004)
- [77] Irwin M.J., W.R. Heath, L.A. Sherman, *Species-restricted interactions between CD8 and the $\alpha 3$ domain of class I influence the magnitude of the xenogeneic response*, **J. Exp. Med.**, **179**, 1091 (1989)
- [78] <http://www.miltenyibiotech.com>
- [79] Sette A., A. Vitiello, et al., *The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes*, **J. Immunol.**, **153**, 5586 (1994)
- [80] Brunner K.T., J. Mauel, J.C. Cerottini, B. Chapuis, *Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs*, **Immunology**, **14**, 181 (1968)
- [81] Lyons A.B., *Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution*, **J. Immunol. Methods**, **243**, 147 (2000)
- [82] Lyons A.B., C.R. Parish, *Determination of lymphocyte division by flow cytometry*, **J. Immunol Methods**, **171**, 131 (1994)
- [83] Waring P., A. Mulbacher. *Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology*, **Immunol Cell Biol.**, **77**, 312 (1999)

- [84] Jedema I., R.M. Barge, R. Willemze, J.H. Falkenburg, *High susceptibility of human leukemic cells to Fas-induced apoptosis is restricted to G(1) phase of the cell cycle and can be increased by interferon treatment*, **Leukemia**, **17**, 576 (2003)
- [85] Jedema I., R.M. Barge, R. Willemze, J.H. Falkenburg, *New CFSE-based assay to determine susceptibility to lysis by cytotoxic T cells of leukemic precursor cells within a heterogenous target cell population*, **Blood**, **103**, 2677 (2004)
- [86] Theobald M., J. Biggs, et al., *Targeting p53 as a general tumor antigen*, **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **92**, 11993 (1995)
- [87] Van Bleek G., S.G. Nathenson, *Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2Kb molecule*, **Nature**, **348**, 213 (1990)
- [88] Van Baren et al., *PRAME, a gene encoding an antigen recognized on a human melanoma by cytolytic T cells, is expressed in acute leukaemia cells*, **British Journal of Haematology**, **102**, 1376 (1998)
- [89] Ruppert J., J. Sidney, E. Celis et al., *Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules*, **Cell**, **74**, 929 (1993)
- [90] Rammensee H.-G. et al., *Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules*, **Curr. Opin. Immuno.**, **7**, 85 (1995)
- [91] Parker K.C., M.A. Bednarek, J.E. Coligan, *Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side chains*, **J. Immunol.**, **152**, 163 (1994)
- [92] Rammensee H.-G., J. Bachmann, N.P.N. Emmerich, O.A. Bacher S. Stevanovic, *SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs*, **Immunogenetics**, **50**, 213 (1999)
- [93] Kuttler et al., *An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages*, **J. Mol. Biol.**, **298**, 417 (2000)

- [94] Kessler J.H., *Efficient identification of novel HLA-A(*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis*, **J. Exp. Med.**, **193**, 73 (2001)
- [95] Morrison J., J. Elvin, *Identification of the nonamer peptide from influenza A matrix protein and the role of pockets of HLA-A2 in its recognition by cytotoxic T lymphocytes*, **Eur. J. Immunol.**, **22**, 903 (1992)
- [96] Arai K., F. Lee, A. Miyajima, T. Yolata, *Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses*, **Annu. Rev. Biochem.**, **59**, 785 (1990)
- [97] Fisk B., T. Blevins, C.G. Ioannides, *Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines*, **J. Exp. Med.**, **181**, 2109 (1995)
- [98] Warburton P.E., G. M. Greig, T. Haaf, H.F. Willard, *PCR Amplification of Chromosome-Specific Alpha Satellite DNA: Definition of Centromeric STS Markers and Polymorphic Analysis*, **Genomics**, **11**, 324 (1991)
- [99] Pelz O., M. Wu, M. Cross et al., *Duplex Polymerase Chain Reaction Quantification of Human Cells in a Murine Background*, **Stem Cells**, **23**, 828 (2005)
- [100] Hosen N., C.Y. Park, I.L. Weissman et al., *CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia*, **PNAS**, **104**, 11008 (2007)
- [101] Haferlach C., F. Dicker, H. Herholz, S. Schnittgen, W. Kern, T. Haferlach, *Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype*, **Leukemia**, **22**, 1539 (2008)
- [102] Herzog G., J. Lu-Hesselmann et al., *Microsatellite instability and p53 mutations are characteristic of subgroups of acute myeloid leukemia but independent events*, **Hematologica- Letters to the Editor**, **5**, 693 (2005)
- [103] Nahi H., G. Selivanova, S. Lehmann et al., *Mutated and non-mutated TP53 as targets in the treatment of leukaemia*, **British Journal of Haematology**, **141**, 445 (2008)
- [104] Stirewalt D.L., K.J. Kopecky, S. Meshinchi et al., *FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia*, **Blood**, **97**, 3589 (2001)

- [105] Moskophidis D., F. Lechner, H. Pircher, R.M. Zinkernagel, *Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells*, **Nature**, **362**, 758 (1993)
- [106] Quintarelli C., G. Dotti, B. de Angelis, V. Hoyos et al., *Cytotoxic T lymphocytes directed to the Preferentially Expressed Antigen of Melanoma (PRAME) target chronic myeloid leukemia*, **Blood**, **prepublished online**, Juli (2008)
- [107] Sugamura K. et al., *The interleukin-2 receptor γ -chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID*, **Annu. Rev. Immunol.**, **14**, 179 (1996)
- [108] Cao X. et al., *Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor γ -chain*, **Immunity**, **2**, 223 (1995)
- [109] Ohbo K. et al., *Modulation of hematopoiesis in mice with a truncated mutant of the interleukin-2 receptor γ -chain*, **Blood**, **87**, 956 (1996)
- [110] Rombouts W.J.C., A.C.M. Martens, R.E. Ploemacher, *Identification of variables determining the engraftment potential of human acute myeloid leukemia in the immunodeficient NOD/SCID human chimera model*, **Leukemia**, **14**, 889 (2000)
- [111] Pearce D.J., D. Taussig, K. Zibara et al., *AML engraftment in the NOD/SCID assay reflects the outcome of AML: implications for our understanding of the heterogeneity of AML*, **Blood**, **107**, 1166 (2006)
- [112] Hope K.J., L. Jin, J.E. Dick, *Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity*, **Nature Immunology**, **5**, 738 (2004)
- [113] Siegler U., C.P. Kalberer, P. Nowbakht, S. Senelov, S. Meyer-Monard, A. Wodnar-Filipowicz, *Activated natural killer cells from patients with acute myeloid leukemia are cytotoxic against autologous leukemic blasts in NOD/SCID mice*, **Leukemia**, **19**, 2215 (2005)
- [114] Theobald M., J. Biggs, J. Hernandez, J. Lustgarten, C. Labadie, L.A. Sherman, *Tolerance to p53 by A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes*, **J. Exp. Med.**, **185**, 833 (1997)

- [115] Molldrem J.J., P.P. Lee, S. Kant et al., *Chronic myelogenous leukemia shapes host immunity by selective deletion of high-avidity leukemia-specific T cells*, **J. Clin. Invest.**, **111**, 639 (2003)
- [116] Rezvani K., A.S. Yong, S. Mielke et al., *Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies*, **Blood**, **111**, 236 (2008)
- [117] Radich et al., *Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies*, **PNAS**, **103**, 236 (2006)
- [118] Berger C., M.C. Jensen, P.M. Lansdorp, M. Gough, C. Elliot, S.R. Ridell, *Adoptive transfer of effector CD8 T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates*, **J. Clin. Invest.**, **118**, 294 (2008)

7. Abkürzungen

Abkürzungen

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
A2.1	HLA-A2.1
A2K ^b A2.1/K ^b	MHC Klasse I-Molekül aus α_1 - und α_2 -Domäne von HLA-A2 und α_3 -Domäne von K ^b
Abb.	Abbildung
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
C-terminal	Carboxyl-terminal
CD	Differenzierungscluster
CD8	humaner CD8 α / β -Korezeptor
CDR	komplementaritätsbestimmende Region
CFSE	Carboxyfluorescein Diazetat Succinimedy Ester
Ci	Curie
⁵¹ Cr	radioaktives Chrom-Isotop
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphate
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DZ	dendritische Zellen
E/T	Effektor- zu Zielzell-Verhältnis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierer
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
Flu M1	A/PR/8/34 Influenza Virus-Matrixprotein M1
g	Gramm
G-418	Geneticin (Neomycin-Antibiotikum)
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HS	humanes Serum
hu	human

IFA	inkomplettes Freund'sches Adjuvans
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasenpaare
K ^b	H-2K ^b
kDa	kilo Dalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
m	milli (10 ⁻³)
M	molar
μ	mikro (10 ⁻⁶)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
Mio.	Million
mu	murin
NaOH	Natronlauge
n	nano (10 ⁻⁹)
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
N-terminal	Amino-terminal
PBMZ	mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
TAA	tumorassoziierte(s) Antigen(e)
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TIL	Tumorerfiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TZR	T-Zellrezeptor
U	internationale Einheiten (units)
Upm	Umdrehungen pro Minute
VSV-N	Vesikuläres Stomatitis-Virus-Nukleoprotein
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen
ZTL	zytotoxische T-Lymphozyten

Abkürzungen für Aminosäuren:

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

8. Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinen Doktorvätern bedanken, dass sie mich als Doktorandin „übernommen“ haben und zum Abschluss dieser Arbeit geführt haben.

Besonderer Dank gilt den Mitgliedern der Arbeitsgruppen AG Theobald/Voss und AG Hartwig, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen, mir unzählige Denkanstöße gegeben haben, mich mit ihrer Laborerfahrung immer wieder erstaunten und somit diese Arbeit maßgeblich unterstützt haben.

Im speziellen Danke ich meinem Betreuer, der mit großer Diskussionsbereitschaft, diversen Lösungsansätzen, Nerven aus Drahtseilen und vor allem Geduld, stets für mich da war. Danke!!!

Der Unterstützung meiner Eltern, meiner Familie und meiner "Mädels" konnte ich mir immer sicher sein, daher ein ganz großes "Danke Schön" an euch!

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Julia Hoffmann
geb. am	25. September 1979
Geburtsort	Wuppertal
Privatadresse	Albert-Stohr-Str. 45 55128 Mainz
Familienstand	ledig

Schulbildung

1986-1990	Städtische Gemeinschaftsgrundschule Am Dönberg, Wuppertal
1990- 1999	Wilhelm-Dörpfeld-Gymnasium, Wuppertal Allgemeine Hochschulreife 06/1999

Studium

1999- 2002	Grundstudium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
2002- 2004	Hauptstudium an der Eberhard-Karls-Universität mit Diplomprüfungen in: Zellbiologie/Immunologie, Parasitologie, medizinische Mikrobiologie/Hygiene
02/2004- 11/2004	Diplomarbeit am Institut für Immunologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz „Einfluss von TREM-1 auf die funktionellen Eigenschaften der Mastzellen“

Promotion

- 12/2004- bis 2006 Beginn der Doktorarbeit im Bereich der experimentellen Tumorimmunologie/ Leukämieforschung
Die Arbeit ist eingebettet in das Graduiertenkolleg „ Antigen-spezifische Immuntherapie“ des Universitätsklinikums Mainz.
Angefertigt in der III. Med. Klinik Hämatologie und Onkologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Zu dem Thema: „Generierung Leukämie-spezifischer T-Zellen“
- Seit 2006 Übernahme des Projektes durch
III. Med. Klinik Hämatologie und Onkologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- "Evaluation of GVL-immunity to lympho-hematopoietic neoplasia by PRAME-and p53-specific T cells for adoptive immunotherapy"
Fertigstellung Oktober 2008

Präsentationen und Publikationen

- 09/2007 Posterpräsentation
37th Annual Meeting of the German Society of Immunology, Heidelberg
"Analyzing GVL-immune responses of p53-specific CD8⁺ cytotoxic T cells to leukemia cell lines and acute myeloid leukemia in vitro and in vivo in humanized NOD/SCID/IL-2Receptor γ -chain^{null} mice"
Julia Hoffmann, Ralf-Holger Voss, Ruth Frommolt, Matthias Theobald, Udo F. Hartwig
- 05/2008 Nonn M, Herr W, Khan SA, Todorova M, Thies J. Distler E, Kaltwasser M, Hoffmann J, Huber C, Hartwig UF

"Selective depletion of alloreactive T lymphocytes using patient-derived non-hematopoietic stimulator cells in allograft engineering", (*Transplantation* 2008;86:1427-1435)

Drittmittelförderung

2007

MAIFOR-Programm 2007 des Fachbereiches Medizin der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz