

Aus der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Nachweis von HLA-unabhängigen tumorreaktiven T-Zellen in Nabelschnurblut

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Marc Pannenbeckers
aus Kiel

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. U. Förstermann

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. T. Wölfel

2. Gutachterin: PD Dr. rer. nat. C. Paret

Tag der Promotion: 06.12.2022

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	iv
Abbildungsverzeichnis	v
Abkürzungsverzeichnis	vi
1 Einleitung	1
1.1 Immunsystem	1
1.1.1 Angeborenes Immunsystem	2
1.1.2 Adaptives Immunsystem	2
1.1.3 Tumorabwehr	3
1.2 Immunoediting	3
1.2.1 Elimination	3
1.2.2 Equilibrium	4
1.2.3 Escape	4
1.3 MHC	4
1.3.1 MHC-Ia	4
1.3.2 MHC-Ib	5
1.3.3 MHC-I-ähnliche	5
1.3.4 Klassische MHC-II	5
1.3.5 Nicht klassische MHC-II	6
1.4 T-Zellen	6
1.4.1 T-Zell-Rezeptor	6
1.4.2 Entwicklung	6
1.4.3 α : β -T-Zellen	7
1.4.4 γ : δ -T-Zellen	8
1.4.5 HLA-unabhängige T-Zellen	8
1.5 Immuntherapie	9
1.5.1 Zelluläre Immuntherapie	9
1.5.2 Antikörper Therapie	10
1.5.3 Zytokintherapie	10
1.6 Ziele der Arbeit	11
2 Materialien	12
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	12
2.1.1 Geräte	12
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	13
2.2 Chemikalien, Medien, Lösungen und Puffer	14
2.2.1 Chemikalien und Medien	14
2.2.2 Lösungen und Puffer	16
2.3 Molekularbiologische Kits	17
2.4 Antikörper	17
2.5 Enzyme	18
2.6 Oligonukleotide	18
2.7 Vektoren	19
2.8 Antibiotika	20
2.9 Nährmedien	20
2.10 Bakterienstämme	21

2.11	Zelllinien	21
2.11.1	Ma-Mel-86	21
2.11.2	K562	22
2.11.3	Phoenix-Ampho	22
2.11.4	HEK293T	23
2.11.5	PBMC	23
2.11.6	UCBMC	23
2.12	Software, Internetseiten und Datenbanken	23
3	Methoden	24
3.1	Molekularbiologie	24
3.1.1	Bakterienkultur	24
3.1.2	Kryokonservierung von Bakterienkulturen	24
3.1.3	Transformation	24
3.1.4	Isolation von Plasmid-DNA	25
3.1.5	Aufreinigung von Nukleinsäuren	25
3.1.6	PCR	25
3.1.7	RT-PCR	26
3.1.8	Ortsspezifische Mutagenese	27
3.1.9	Restriktionsverdau	27
3.1.10	Blunt-End-Ligation	27
3.1.11	Gateway-Technologie	27
3.1.12	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels Photometer	28
3.1.13	Gelelektrophorese	28
3.1.14	Sequenzanalyse	29
3.2	Zellbiologie	29
3.2.1	Zellkultur	29
3.2.2	Zellzahlbestimmung	30
3.2.3	Kryokonservierung eukaryotischer Zellen	30
3.2.4	Transfektion mittels Lipofectamine	31
3.2.5	Transfektion mittels FuGENE6	31
3.2.6	Retrovirale Transduktion	31
3.2.7	Klonierung von Zellen mittels Grenzverdünnungsverfahren	32
3.2.8	Durchflusszytometrie	32
3.2.9	Gewinnung von Nabelschnurblut	33
3.2.10	Isolierung humaner peripherer Leukozyten	33
3.2.11	Magnetische Zellseparation	33
3.2.12	T-Zell Stimulation	33
3.2.13	IFN- γ -ELISpot-Assay	34
4	Ergebnisse	35
4.1	Herstellung der Stimulatorzelle aus einer HLA-negativen Melanomzelllinie	35
4.1.1	Konstruktion eines bicistronischen Konstrukts für CD80 und CD83	35
4.1.2	Retrovirale Transduktion von Ma-Mel-86B_KO ^{CIITA} mit <i>CD80</i> und <i>CD83</i>	41
4.1.3	Zusammenfassung	42
4.2	Untersuchung von CD3 ⁺ UCB-Lymphozyten auf HLA-unabhängige T-Zell-Erkennung	42
4.2.1	Isolation von CD3 ⁺ UCB-Lymphozyten	43
4.2.2	Stimulation von CD3 ⁺ UCB-Lymphozyten mit HLA-negativen Melanomzellen	43
4.2.3	Erster ELISpot mit der Stimulatorzelle als Zielzelle	44
4.2.4	Zweiter ELISpot mit verschiedene Zielzellen	45

4.2.5	Dritter ELISpot mit allogenen Tumorzelllinien als Ziel	49
4.2.6	Zusammenfassung	50
5	Diskussion	52
5.1	Herstellung der Stimulatorzelle aus einer HLA-negativen Melanomzelllinie	52
5.2	Untersuchung von CD3 ⁺ UCB-Lymphozyten auf HLA-unabhängige T-Zell-Erkennung . .	53
5.2.1	Durchführung der Stimulation	53
5.2.2	Ergebnisse des ersten ELISpot mit der Stimulatorzelle als Ziel	55
5.2.3	Ergebnisse des zweiten ELISpot mit verschiedenen Zielzellen	55
5.2.4	Ergebnisse des dritten ELISpot mit allogenen Tumorzelllinien als Ziel	58
5.3	Ausblick	59
6	Zusammenfassung	60
7	Appendix	61
7.1	Vektorkarten	61
7.2	ELISpot Messungen	65
8	Literaturverzeichnis	71
9	Danksagung	80
10	Lebenslauf	81

Tabellenverzeichnis

1	Geräte	12
2	Verbrauchsmaterialien	13
3	Chemikalien und Zusätze	14
4	Lösung und deren Herstellung	16
5	Molekularbiologische Kits	17
6	Antikörper	17
7	Restriktionsendonukleasen	18
8	Weitere Enzyme	18
10	Vektoren	19
11	Antibiotika	20
12	Nährmedien	20
13	Bakterienstämme	21
14	HLA und Antigenübersicht von Ma-Mel-86	22
15	Software	23
16	Internetseiten und Datenbanken	24
17	Reagenzien der PCR	26
18	Einstellungen der PCR	26
19	Verwendete Zelllinien, deren Adhärenz und Medien	30
21	Im zweiten ELIspot eingesetzte Zielzellmengen	45

Abbildungsverzeichnis

1	Krankheits- und Behandlungsverlauf von Ma-Mel-86	21
2	Herstellung cDNA für <i>CD80</i>	36
3	Herstellung cDNA für <i>CD83</i>	36
4	BP-Clonase-Reaktion für <i>CD80</i>	37
5	SDM des Eintritts-Klons	38
6	BP-Clonase Reaktion für <i>CD83</i>	38
7	LR-Clonase-Reaktion zum Ziel-Vektor	39
8	BP-Clonase-Reaktion zum Eintritts-Klon	40
9	Smal Restriktion zur attB5 Entfernung	40
10	LR-Clonase-Reaktion zum Expressions-Klon	41
11	Durchflusszytometrie von Ma-Mel-86B_KO ^{CIITA} _CD80 ^{hi} _CD83 ^{hi}	42
12	Zeitlicher Ablauf der Stimulation	44
13	Erster ELIspot mit Ma-Mel-86B_KO ^{CIITA} _CD80 ^{hi} _CD83 ^{hi} als Ziel	45
14	Zweiter ELIspot mit verschiedenen Zielzellen ohne K562	47
15	Zweiter ELIspot mit verschiedenen Zielzellen und K562	48
16	Ergebnisübersicht des zweiten ELIspot	49
17	Dritter ELIspot mit verschiedene Tumorzelllinien als Ziel	51
18	Vektorkarte von pDONR221_attP1_ccdb_attP2	61
19	Vektorkarte von pDONR221_P1_ccdb_P5r	62
20	Vektorkarte von pDONR221_P5_ccdb_P2	62
21	Vektorkarte von pMX_DEST Gateway #3	63
22	Vektorkarte von pMX_DEST_attB1_CD80 ^{744C>T} _P2A_CD83_STOP_attB2	64
23	Vektorkarten von pCOLT-GALV und pHIT60	64
24	Messungen des ersten ELIspot	65
25	Messungen des zweiten ELIspot	69
26	Messungen des dritten ELIspot	70

Abkürzungsverzeichnis

ad	zu
AK	Antikörper
BSA	Bovines Serumalbumin
ALL	akuten lymphatischen Leukämie
AML	akuten myeloische Leukämie
AmpR	Ampicillin-Resistenzgen
APC	<i>antigen-presenting cell</i> engl. für antigenpräsentierende Zelle
att	Rekombinationssequenz
b	Base
B2M	β 2-Mikroglobulin
BA _C	HLA-unabhängige Erkennung des bekannten Antigen CSF2RA
BA _T	HLA-unabhängige Erkennung des bekannten Antigen TRP2
bp	Basenpaar
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i> engl. für chimärer Antigen Rezeptor
ccdB	<i>control of cell death</i> engl. für Toxigen B des ccd-Systems
CD	<i>cluster of differentiation</i> engl. für Unterscheidungsgruppen
cDNA	<i>complementary DNA</i> engl. für komplementäre DNA
CDR	<i>complementarity determining regions</i> engl. für Bindungs-entscheidende Regionen
CIITA	<i>class II complex transactivator</i> engl. für Klasse II Komplex Transaktivator
CIK	<i>cytokin induced killer cell</i> engl. für Zytokin induzierte Killerzelle
CML	chronische myeloische Leukämie
CmR	Chloramphenicol-Resistenzgen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSF2RA	<i>colony stimulating factor 2 receptor subunit alpha</i> engl. für Rezeptor für den koloniestimulierenden Faktor 2 Untereinheit alpha
CTLA4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i> engl. für zytotoxischer T-Lymphozyt assoziiertes Protein 4
DC	<i>Dendritic Cells</i> engl. für dendritische Zellen
DCT	Dopachrom-Tautomerase
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DLBCL	<i>diffuse large B-cell lymphoma</i> engl. für diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> engl. für Desoxyribonukleinsäure
DR4	<i>Death receptor 4</i> engl. für Todesrezeptor 4
DV	Donor-Vektor
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamin-Tetraazetat
EiK	Eintritts-Klon
engl.	englisch
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et alii</i> lat. für und andere
ExK	Expressions-Klon
FA _{C/T}	fragliche HLA-unabhängige Erkennung bei gleichzeitiger Reaktivität gegen die Antigene CSF2RA und TRP2
FA _H	fragliche HLA-unabhängige Erkennung bei einer zusätzlichen Reaktivität gegen HEK293T_KO ^{B2M/CIITA}

FA _{H/K}	fragliche HLA-unabhängige Erkennung bei einer zusätzlichen Reaktivität gegen HEK293T_KO ^{B2M/CIITA} und K562
FA _K	fragliche HLA-unabhängige Erkennung bei einer zusätzlichen Reaktivität gegen K562
Fab-Fragment	<i>antigen-binding fragment</i> engl. für Antigen bindendes Fragment
Fc-Fragment	<i>crystallisable fragment</i> engl. für kristallisierbares Fragment
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> engl. für Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor
gy	Gray
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HLA	humanes Leukozytenantigen
HLA-I	humanes Leukozytenantigen Klasse I
HLA-II	humanes Leukozytenantigen Klasse II
HPV	humanes Papilloma-Virus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
Il	Interleukin
kb	Kilobase
lat.	lateinisch
LTR	lange terminale Wiederholung
MACS	<i>magnetically activated cell sorting</i> engl. für magnetisch aktivierte Zellseparation
MCL	Mantelzell-Lymphom
Mel	Melanom
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> engl. für Haupthistokompatibilitätskomplexe
MICA	<i>MHC class I polypeptide-related sequence A</i> engl. für MHC Klasse I Polypeptid verwandte Sequenz A
MICB	<i>MHC class I polypeptide-related sequence B</i> engl. für MHC Klasse I Polypeptid verwandte Sequenz B
MLTC	<i>mixed lymphocyte-tumor cell culture</i> engl. für gemischten Lymphozyten-Tumorzellkulturen
MLV	<i>murine leukemia viruses</i> engl. für murines Leukämievirus
MPS	Mononukleär-phagozytäres System
mRNA	<i>Messenger RNA</i> engl. für Boten-RNA
N	nicht getestet
NC	<i>not countable</i> engl. für nicht zählbar
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NR	nicht reaktiv
OD	optische Dichte
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i> engl. für Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PAP	<i>prostatic acid phosphatase</i> engl. für prostataspezifische saure Phosphatase
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i> engl. für mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	<i>pancreatic carcinoma</i> engl. für Pankreaskarzinom
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> engl. für Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i> engl. für programmierter Zelltod Protein 1
PD-L1	<i>programmed cell death 1 ligand 1</i> engl. für programmierter Zelltod Ligand 1

PE	Phycoerythrin
pH	<i>pondushydrogenii</i> , lat. für negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> engl. für Mustererkennungsrezeptor
psi	psi packaging signal
R	<i>ratio</i> engl. für Verhältnis
rDNA	<i>recombinant DNA</i> engl. für rekombinante DNA
RNA	<i>ribonucleic acid</i> engl. für Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	reverse Transkriptase
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> engl. für reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDM	<i>Site-directed mutagenesis</i> engl. für ortsspezifische Mutagenese
solTRAIL	<i>Soluble Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand</i> engl. für löslicher Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand
SV40-Virus	engl. für <i>simian virus 40</i>
TALEN	<i>Transcription Activator-like Effector Nuclease</i> engl. für transkriptionsaktivatorartige Effektornuklease
TAP	<i>Transporter associated with antigen processing</i> engl. für Antigenpeptid-Transporter
TBE	TRIS-Borat-EDTA
T _{CM}	<i>central memory T cells</i> engl. für zentrale Gedächtnis-T-Zellen
TCR	<i>T-Cell Receptor</i> engl. für T-Zell-Rezeptor
TCR-C	<i>T-Cell Receptor Complex</i> engl. für T-Zell-Rezeptor-Komplex
T _{EM}	<i>effector memory T cells</i> engl. für Effektor-Gedächtnis-T-Zellen
TGF-β	<i>transforming growth factor beta</i> engl. für transformierender Wachstumsfaktor β
T _h	<i>T helper cell</i> engl. für T-Helferzelle
TIL	<i>tumor infiltrating lymphocytes</i> engl. für tumorinfiltrierende Lymphozyten
TRP2	<i>tyrosinase related protein 2</i> engl. für Tyrosinase verwandtes Protein 2
UA	HLA-unabhängige Erkennung eines unbekanntes Antigenes auf Ma-Mel-86B_KO ^{CIITA} _CD80 ^{hi} _CD83 ^{hi}
UCB	<i>umbilical cord blood</i> engl. für Nabelschnurblut
UCBMC	<i>umbilical cord blood mononuclear cells</i> engl. für mononukleäre Zellen des Nabelschnurblutes
T _c	<i>cytotoxic T cell</i> engl. für zytotoxische T-Zelle
ZV	Ziel-Vektor

1 Einleitung

Die Therapie von Tumorerkrankungen bleibt weltweit eine der größten Herausforderungen der modernen Medizin. Laut Daten des statistischen Bundesamtes waren Tumorerkrankungen im Jahr 2020 in Deutschland für 23,5% der Todesfälle ursächlich und damit die zweithäufigste Todesursache (1). Neben der chirurgischen Entfernung, der Bestrahlung und der Chemotherapie wird auch der Immuntherapie eine immer größere Bedeutung zugeschrieben.

Schon Paul Ehrlich formulierte Anfang des 20. Jahrhunderts die Vermutung einer Kontrolle des Immunsystems (vgl. Abschn. 1.1) über Tumorerkrankungen. Es dauerte jedoch fast noch ein halbes Jahrhundert bis diese mit experimentellen Daten untermauert wurde (2). Jüngere Untersuchungen zeigen, dass Patienten, deren Immunsystem supprimiert ist, ein erhöhtes Risiko haben Tumore zu entwickeln (3,4). Hingegen geht die Infiltration des Tumors durch spezifische Immunzellen, mit einer verbesserten Prognose einher (5). Und auch bei Spontanremissionen ließ sich eine parallele, klonale Expansionen spezifischer zytotoxischer Zellen zeigen (6,7).

Hierbei kommen den HLA (vgl. Abschn. 1.3) abhängigen CD8⁺ (8) und CD4⁺ (9) T-Zellen (vgl. Abschn. 1.4) eine entscheidende Bedeutung zu. Der so ausgeübte Selektionsdruck kann jedoch dazu führen, dass Tumorzellen ihre immunologischen Eigenschaften verändern und nur noch schlecht vom Immunsystem erkannt werden (vgl. Abschn. 1.2). Ein wesentlicher Mechanismus hierbei ist die Suppression oder der Verlust von HLA und damit die Repression der von T-Zellen getragenen Immunantwort (10).

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von immuntherapeutischen Verfahren entwickelt, welche das Immunsystem wieder in die Lage versetzen sollen, die Tumorerkrankung zu bekämpfen (vgl. Abschn. 1.5). Eine Form ist der adoptive T-Zelltransfer bei dem T-Zellen des Patienten *ex vivo* vermehrt werden und nach anschließender Modifikation retransfundiert werden (10).

Wären wir zukünftig in der Lage HLA-unabhängige, tumorreaktive T-Zellen zu generieren, könnte das Spektrum von Tumorerkrankungen, die durch eine solche Therapie behandelbar wären, erweitert werden. Es gibt einige Beispiele dafür, dass es auch Vertreter der T-Zellen gibt, deren TCR in der Lage ist Antigene ohne die Präsentation über HLA zu erkennen. So wurde gezeigt, dass das T-Zell-Repertoire der Melanompatientin Ma-Mel-86B T-Zellen mit einem HLA-unabhängigen Erkennungsmuster enthält (11). Dabei wurden die beiden HLA-unabhängig erkannten Antigen CSF2RA und TRP2 identifiziert.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob auch in dem Nabelschnurblut von gesunden Neugeborenen solche HLA-unabhängigen tumorreaktiven T-Zellen vorkommen. Zudem wurde geprüft, ob sich hierunter auch T-Zellen finden lassen, deren Reaktivität gegen CSF2RA oder TRP2 gerichtet ist.

1.1 Immunsystem

Die Gesamtheit der verschiedenen Bestandteile unseres Immunsystems bilden die Abwehr unseres Körpers gegen äußere und innere, zelluläre oder azelluläre Pathogene. Das angeborene Immunsystem stellt dabei den phylogenetisch älteren Teil unseres Immunsystems dar (vgl. Abschn. 1.1.1) während das adaptive Immunsystem nur bei Vertebraten vorkommt (vgl. Abschn. 1.1.2). Sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Tumoren (vgl. Abschn. 1.1.3).

1.1.1 Angeborenes Immunsystem

Die zum angeborenen Immunsystem gehörenden Abwehrmechanismen gegen Pathogene sind fest in der Erbinformation gespeichert. Zu ihnen zählen neben den statischen, anatomischen Barrieren, wie beispielsweise Epithelien, auch mobile, zelluläre und humorale Bestandteile.

Zu dem mobilen zellulären Anteil gehören aus der myeloischen Reihe die Zellen des MPS (Mononukleärphagozytäres System) und die Granulozyten. Aus der lymphoiden Zellreihe werden zu dieser Fraktion die NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) gezählt. Zur Erkennung dienen genetisch festgelegte Rezeptoren, die sogenannten PRR (*Pattern Recognition Receptor*, engl. für Mustererkennungsrezeptor). Solche PRRs erkennen hoch konservierte Strukturen verschiedener Pathogene, sogenannte PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*, engl. für Pathogen-assoziierte molekulare Muster). Diese PAMP sind meist essentielle Bestandteile der Pathogene und unspezifisch auf vielen verschiedenen Vertretern zu finden. Die Zellen des MPS sind neben der Phagozytose auch zur anschließenden Antigenpräsentation befähigt. Dieses geschieht über MHC-II (vgl. Abschn. 1.3.4) und schlägt eine Brücke zum adaptiven Immunsystem.

Zusätzlich können jedoch auch körpereigene Zellen eine Reaktion des angeborenen Immunsystems induzieren. So können sie durch Stress, wie beispielsweise nach einer malignen Transformation oder nach einer Infektion, zur Expression bestimmter körpereigener Proteine führen, die eine Aktivierung der Bestandteile des angeborenen Immunsystems nach sich ziehen (12).

Der humorale Anteil wird vor allem durch das Komplementsystem und durch die von den zellulären Bestandteilen sezernierten Zytokinen gebildet.

1.1.2 Adaptives Immunsystem

Das adaptive Immunsystem wird ebenfalls in zelluläre und humorale Faktoren unterteilt. Zu den zellulären Anteilen werden die aus der lymphoiden Zellreihe entstehenden T-Zellen und B-Zellen gezählt. Bezüglich der Erkennung von Antigenen unterscheiden sich die beiden Gruppen grundlegend. Während B-Zellen ihr Antigen auch in löslicher Form erkennen, ist für T-Zellen in der Regel eine Präsentation durch MHC (vgl. Abschn. 1.3) erforderlich. Der Entwicklungsvorgang beginnt für beide im Knochenmark und wird für die B-Zellen dort und für die T-Zellen nach einer Migration in den Thymus beendet. Während ihrer Bildung kommt es zu einer Rekombination einiger genetischer Abschnitte der Rezeptoren, die für die Antigen-Erkennung zuständig sind. Dadurch sind die in der Bildung befindlichen Zellen in der Lage Rezeptoren zu generieren, die eine Vielzahl an potenziell immunogenen Strukturen erkennen können. Der zugrundeliegende Mechanismus ist die somatischen Rekombination (13). Durch eine anschließende Selektion werden in der Regel alle nicht reaktiven oder autoreaktiven Zellen der Apoptose zugeführt. Erst danach werden die überlebenden Zellen aus dem Knochenmark, beziehungsweise dem Thymus, in die Peripherie entlassen. Die humoralen Anteile machen vor allem die von den B-Zellen produzierten AK (Antikörper) aus. Sie bestehen aus zwei Anteilen. Dem Fab-Fragment (*antigen-binding fragment*, engl. für Antigen bindendes Fragment) und dem Fc-Fragment (*crystallisable fragment*, engl. für kristallisierbares Fragment) welches der Erkennung durch andere Bestandteile des Immunsystems dient.

1.1.3 Tumorabwehr

Der erste Mechanismus für den Schutz vor Tumoren sind die Tumorsuppressorgene, deren Produkte eine unkontrollierte Teilung der Zelle verhindern können (14). Schlagen diese fehl, obliegt es dem Immunsystem eine weitere Ausbreitung zu verhindern. Ursächlich für die Immunogenität der Tumorzellen ist dabei eine Überexpression oder Veränderung der von ihr präsentierten Proteine, welche sich von einer gesunden Zelle unterscheiden (8). Diese Veränderungen können durch das angeborene oder erworbene Immunsystem erkannt werden und damit zu einer Bekämpfung der Tumorzelle führen. So führen Verluste von HLA (vgl. Abschn. 1.3) zu einer Aktivierung von NK-Zellen (15). Veränderungen durch onkogene Viren (16) oder Mutationen in körpereigenen Proteinen (17) führen zu einer Präsentation von dem Immunsystem unbekanntem Antigenen über MHC-I oder MHC-II (vgl. Abschn. 1.3). Diese können durch $CD8^+$ beziehungsweise $CD4^+$ T-Zellen erkannt werden und ebenfalls zu einer Aktivierung des Immunsystems führen (18). Unter diesem Selektionsdruck kommt es jedoch zu Veränderungen der Immunogenität der Tumorzellen, welche zu einer Immunevasion führen können (vgl. Abschn. 1.2).

Die Relevanz des Immunsystems für die Kontrolle von Tumorzellen wird dadurch deutlich, dass Patienten, deren Immunsystem supprimiert ist, ein erhöhtes Risiko haben, Tumore zu entwickeln (3,4). Hingegen geht die Infiltration des Tumors durch spezifische Immunzellen mit einer verbesserten Prognose einher (5). Ebenso ließ sich bei Spontanremissionen eine parallele, klonale Expansionen spezifischer $CD8^+$ T-Zellen zeigen (6,7).

1.2 Immunoediting

Der Begriff des Immunodediting beschreibt die Veränderung der Immunogenität eines Tumors, welche durch den Selektionsdruck des Immunsystems ausgelöst wird. Dieser Prozess wird in die drei Phasen Elimination, Equilibrium und Escape eingeteilt (19).

1.2.1 Elimination

In der Phase der Elimination führen die verschiedenen Mechanismen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems zu einer Bekämpfung der Tumorzellen. Dabei kommen den $CD8^+$ T-Zellen (8) und auch den $CD4^+$ T-Zellen (9) eine wesentliche Bedeutung zu. Sie können Epitope auf über MHC präsentierten Antigenen erkennen (vgl. Abschn. 1.3, Abschn. 1.4) und dadurch zu einer Aktivierung des Immunsystems führen. Solche Antigene finden sich auf der Tumorzelle oder werden nach Phagozytose und Antigenprozessierung präsentiert (20). Häufig sind zwischen verschiedenen Tumoren ähnliche Veränderungen zu finden. Diese können beispielsweise durch onkogene Viren wie HPV (humanes Papilloma-Virus) (21) oder Mutationen in Tumorsuppressorgenen wie p53 (22) ausgelöst werden. Es kann jedoch auch tumorindividuell zu einer Änderung der über MHC präsentierten Proteine kommen. So können durch Mutationen ausgelöste Änderungen in der Struktur oder Änderungen in der Expressionsfrequenz zu einer Erkennung durch das Immunsystem führen (23). Insgesamt kommt es hierdurch zu einer Reduktion der Tumormasse. Übersteigt diese Tumorsuppression die des Tumorwachstums kann es im Verlauf zur Ausheilung der Erkrankung kommen.

1.2.2 Equilibrium

Tumore, welche die Phase des Equilibrium erreichen, haben ein solch schnelles Wachstum, dass dieses mit der Elimination des Immunsystems im Gleichgewicht liegt. In dieser Phase kommt es durch die genetische Instabilität der Tumore zu Mutationen, die zu einer Vielzahl von neuen Tumorzellklonen führen können (24). Dieser Vorgang kann Jahre dauern, bis sich die Tumorzellen in einer solchen Art weiterentwickeln, dass es zur letzten Phase, dem sogenannten Escape kommt (19).

1.2.3 Escape

Beim Escape haben Tumorzellen Mechanismen entwickelt, um den destruktiven Eigenschaften des Immunsystems zu entkommen. Hierdurch übersteigt das Tumorstadium die Tumorsuppression. Solche Mechanismen können das Mikromilieu des Tumors oder die Oberfläche der Tumorzelle betreffen (25). Im Sinne einer Mikromilieuänderung kann es beispielsweise zum Verlust von zur Migration der Lymphozyten notwendigen Rezeptoren im anliegendem Endothel (26) oder auch zur direkten Ausschüttung immunsuppressiver Zytokine kommen (27). Änderungen in den Oberflächenproteinen können die Erkennung der Tumorzellen durch das Immunsystem beeinflussen. Beispiele hierfür sind Störungen in der Präsentation von HLA (28,29) oder der NKG2D-Liganden (30). Andererseits kann auch die Effektivität der antitumoralen Maßnahmen reduziert werden. Diese kann unter anderem durch die Reduktion der Interferon-Rezeptoren (31) oder Mutationen der Fas-Rezeptoren geschehen. Im Ergebnis kommt es hierdurch zu einer Immunevasion mit einem rapiden Tumorstadium und einem Ausbruch der Erkrankung.

1.3 MHC

Die MHC (*Major Histocompatibility Complex*, engl. für Haupthistokompatibilitätskomplexe) sind Glykoproteine mit der Funktion, Peptide an der Zelloberfläche zu präsentieren, welche dann als Antigene für die Immunantwort fungieren. Beim Menschen werden sie als HLA (humanes Leukozytenantigen) bezeichnet. Es werden dabei die Klassen MHC-Ia, MHC-Ib, MHC-I-ähnliche (32) sowie klassische und nicht klassische MHC-II unterschieden.

1.3.1 MHC-Ia

MHC-Ia, auch als klassisches MHC-I bezeichnet, wird prinzipiell von allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Es besteht aus vier Domänen. Drei davon werden von einer polymorphen α -Kette und eine von dem kleineren, konservierten B2M (β 2-Mikroglobulin) gebildet. Die Bildung der α -Kette erfolgt beim Menschen an den drei Genorten für HLA-A, HLA-B und HLA-C. Zwei Domänen der α -Kette bilden dabei die Mulde, in welcher die Peptide präsentiert werden (33). Diese Fragmente stammen aus dem zelleigenen Stoffwechsel und werden aus alternden ubiquitinierten Proteinen durch Proteasomen degradiert. Nach der Degradation werden die Fragmente über einen TAP (*Transporter associated with antigen processing*, engl. für Antigenpeptid-Transporter) in das ER (endoplasmatisches Retikulum) gebracht. Dort kommt es zur Bildung eines trimolekularen Komplexes aus α -Kette, Peptid und B2M, welcher dann an der Zelloberfläche präsentiert wird. Biallelische Inaktivierung der B2M-Gene, wie sie spontan bei Tumoren vorkommen (34,35) führt dazu, dass HLA-I-Moleküle nicht auf der Zelloberfläche erscheinen und somit keine Erkennung durch HLA-restringierte T-Zellen mehr möglich ist. Beim Menschen werden MHC-I als

HLA-I bezeichnet.

1.3.2 MHC-Ib

Die MHC-Ib werden auch als nicht klassische MHC-I bezeichnet. Sie werden aus einer, im Vergleich zu MHC-Ia wenig polymorphen, α -Kette sowie aus B2M gebildet. Sie scheinen in der Regel inhibitorische Funktionen auf Zellen mit einem NK-Zell-ähnlichen Erkennungsmuster auszuüben.

HLA-E präsentiert Fragmente der Signalsequenz von MHC Molekülen, die bei deren Produktion anfallen (36). HLA-E ist ein Ziel des CD94/NKG2-Rezeptors, welcher auf CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen vorkommt und in der Lage ist diese zu inhibieren (37).

HLA-G wird unter anderem von Trophoblasten des Fetus exprimiert und scheint dazu beizutragen das mütterliche Immunsystem zu supprimieren (38). Außerdem wird HLA-G von verschiedenen Tumorentitäten exprimiert und könnte einen Faktor für den Escape (vgl. Abschn. 1.2.3) darstellen (39).

HLA-F wird ebenfalls von Trophoblasten des Fetus exprimiert (40) und geht bei einigen Tumorerkrankungen mit einer schlechteren Prognose einher (41,42). Das Binden eines Peptids scheint für die Expression von HLA-F nicht relevant zu sein, dafür jedoch eine Interaktion mit der α -Kette von MHC-Ia (43).

MR1 (*MHC class I-related gene protein*, engl. für MHC Klasse I verwandte Gen Protein) präsentiert zum einen Metabolite der Riboflavinsynthese des bakteriellen Stoffwechsels (44). Zum anderen wurde für gegen MR1 gerichtete T-Zellen eine HLA-unabhängige und Tumorentität übergreifende Reaktivität gezeigt (45).

1.3.3 MHC-I-ähnliche

MICA (*MHC class I polypeptide-related sequence A*, engl. für MHC Klasse I Polypeptid verwandte Sequenz A) sowie **MICB** (*MHC class I polypeptide-related sequence B*, engl. für MHC Klasse I Polypeptid verwandte Sequenz B) sind B2M-unabhängige Liganden, welche keine Peptide binden, jedoch auf der Oberfläche präsentiert werden können (12). Sie bilden ein Ziel für den NKG2D-Rezeptor und können damit unter anderem NK-Zellen und T-Zellen aktivieren. Sie können durch Stress, wie beispielsweise durch eine virale Infektion oder eine Tumorerkrankung, induziert werden (12).

CD1D ist ein B2M abhängiges MHC-I-ähnliches Glykoprotein welches die Erkennung von Lipidantigenen durch NK-Zellen, NKT-Zellen (vgl. Abschn. 1.4.3.5) und anderen T-Zellen (46) ermöglicht. Dieses spielt vor allem bei der bakteriellen Immunabwehr (47,48) und bei der Präsentation von Selbstantigenen eine Rolle (49).

1.3.4 Klassische MHC-II

MHC-II wird von spezialisierten APC (*antigen-presenting cell*, engl. für antigenpräsentierende Zelle) exprimiert. Er besteht aus vier Domänen, wobei jeweils zwei von einer α -Kette und einer β -Kette gebildet werden. Durch klassische MHC-II Rezeptoren präsentierte Peptide stammen von Proteinen, welche Zellen des APC durch Endozytose aufgenommen und intrazellulär prozessiert haben. Die aufgenommenen Peptide werden dabei in den Endosomen durch Proteasen in Fragmente aufgespalten. Diese Endosomen fusionieren dann mit MHC-II-Rezeptor-beladenen Vesikeln aus dem ER. Nach der Fusion wird MHC-II mit dem Peptid beladen und an der Oberfläche präsentiert. Dabei bildet je eine polymorphe Domäne der beiden Ketten gemeinsam die Mulde, in der das Peptid präsentiert wird (33). Einer der Regulatoren ist CIITA

(*class II complex transactivator*, engl. für Klasse II Komplex Transaktivator), ohne dessen Anwesenheit es zu keiner Expression von MHC-II kommen kann (50). Beim Menschen werden MHC-II als HLA-II bezeichnet.

1.3.5 Nicht klassische MHC-II

Von den klassischen können zudem nicht klassische MHC-II Rezeptoren abgegrenzt werden. Diese MHC-II Rezeptoren kommen vor allem in Zellen des APC vor, wo sie an der Vorbereitung und Beladung der klassischen MHC-II Rezeptoren beteiligt sind (51,52).

1.4 T-Zellen

Die zu den Lymphozyten zählenden T-Zellen nehmen eine wichtige Position im adaptiven Immunsystem ein. Hier übernehmen sie sowohl Aufgaben als zelluläre Effektorzellen als auch als Stimulatoren der angeborenen und der humoralen Immunabwehr. Sie unterscheiden sich von anderen Lymphozyten vor allem durch die Expression von CD3 und dem TCR (*T-Cell Receptor*, engl. für T-Zell-Rezeptor). Der TCR erkennt klassischerweise Epitope auf Antigenen, die ihm über MHC (vgl. Abschn. 1.3) präsentiert werden. Die T-Zellen können weiter in $\alpha:\beta$ -T-Zellen (vgl. Abschn. 1.4.3) und in $\gamma:\delta$ -T-Zellen (vgl. Abschn. 1.4.4) eingeteilt werden.

1.4.1 T-Zell-Rezeptor

Der TCR (*T-Cell Receptor*, engl. für T-Zell-Rezeptor) ist ein Heterodimer, bestehend aus zwei verschiedenen Proteinketten. In den meisten Fällen sind dies die α - und β -Ketten. Seltener kommen auch TCRs mit einer γ -Kette und einer δ -Kette vor. Auf den Ketten kommen jeweils drei hypervariable CDR (*complementarity determining regions*, engl. für Bindungs-entscheidende Regionen) vor, welche entscheidend für die Diversität der TCRs sind. Der TCR wiederum wird in Verbindung mit CD3 und CD247 als TCR-C (*T-Cell Receptor Complex*, engl. für T-Zell-Rezeptor-Komplex) bezeichnet und bildet eine funktionelle Einheit, über welche MHC-präsentierte Antigene erkannt werden.

1.4.2 Entwicklung

T-Zellen entwickeln sich aus hämatopoetischen Vorläuferzellen, die über das Blut in den namensgebenden Thymus migrieren (53). Dort kommt es über mehrere Zwischenschritte zu einer Rekombination der Ketten, welche den TCR aufbauen. Das Vorhandensein von Reaktivität des so gebildeten Rezeptors wird anschließend über eine Positivselektion getestet. In einem zweiten Schritt wird durch das Präsentieren von an MHC gebundenen Autoantigenen eine Negativselektion durchgeführt und autoreaktive T-Zellen aussortiert. Nicht selektierte T-Zellen werden der Apoptose zugeführt (54). Die überlebenden naiven T-Zellen migrieren nun in die Peripherie und werden nach der Aktivierung durch ein passendes Antigen zu Effektorzellen (55).

1.4.3 α : β -T-Zellen

Der größte Teil der humanen T-Zellen gehören der α : β -T-Zell-Fraktion an. Ihr TCR wird aus einem Heterodimer, bestehend aus jeweils einer α -Kette und β -Kette, aufgebaut. Eine weitere Unterteilung erfolgt nach den Funktionen sowie den weiteren Oberflächenproteinen der Zellen.

1.4.3.1 CD8⁺ T-Zellen

CD8⁺ T-Zellen, auch als T_c (*cytotoxic T cell*, engl. für zytotoxische T-Zelle) bezeichnet, exprimieren CD8, welches in Kombination mit ihrem TCR die Interaktion mit über MHC-I präsentierten Antigenen ermöglicht. Passt ein solches Antigen zu dem TCR, kommt es im Zusammenspiel mit weiteren Kofaktoren zur Aktivierung und in der Folge zur Lyse der Zielzelle. Veränderungen in den präsentierten Fragmenten können beispielsweise durch virale Infektionen oder Entartung der Zielzellen ausgelöst werden (56).

1.4.3.2 CD4⁺ T-Zellen

CD4⁺ T-Zellen, auch als T_h (*T helper cell*, engl. für T-Helferzelle) bezeichnet, exprimieren CD4, welches in Kombination mit ihrem TCR die Interaktion mit über MHC-II präsentierten Antigenen ermöglicht (57). Passt ein solches Antigen zu dem TCR, kommt es im Zusammenspiel mit weiteren Kofaktoren zur Aktivierung der T_h. Diese ist damit in der Lage Zytokine auszuschütten um unter anderem T_c zu aktivieren sowie selbst mit Proliferation zu reagieren (55).

1.4.3.3 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen exprimieren neben CD3, CD4 auch FOXP3, und CD25 und zeichnen sich durch eine Inhibition von zytotoxischen T-Zellen aus (58). Funktionell fördern sie die Toleranz gegen körpereigene Antigene (59) und tragen damit zur Reduzierung von Autoimmunreaktionen bei (60). Sie sammeln sich jedoch auch in der Umgebung von Neoplasien und können dort, durch Inhibition der Immunantwort, die Prognose verschlechtern (61).

1.4.3.4 T-Gedächtniszellen

T-Gedächtniszellen können sowohl CD3⁺, als auch CD4⁺ oder CD8⁺ sein. Ein Teil der T-Zellen bildet sich zu dieser Fraktion, nachdem sie Kontakt mit einem aktivierenden Antigen gehabt haben und können über Jahre im Körper verbleiben (62). Sie werden klassischerweise in T_{EM} (*effector memory T cells*, engl. für Effektor-Gedächtnis-T-Zellen) und T_{CM} (*central memory T cells*, engl. für zentrale Gedächtnis-T-Zellen) unterschieden. T_{EM} treten im Blut und peripheren Geweben auf und können, nach Aktivierung durch ein passendes Antigen, schnell zu einer zytotoxischen Reaktion führen (63). T_{CM} finden sich vor allem in Lymphknoten. Ein Kontakt mit einem passenden Antigen führt zu einer starken Proliferation und Differenzierung (63). T_{CM} könnten sich besonders gut für eine adoptiven T-Zell-Therapie (vgl. Abschn. 1.5.1) eignen, da sie im Vergleich zu anderen T-Zellen länger im Körper aktiv bleiben (63).

1.4.3.5 NKT-Zellen

NKT-Zellen (natürliche Killer T-Zellen) stellen eine heterogene Gruppe dar. Sie exprimieren neben dem $\alpha:\beta$ -TCR typische NK-Zellmarker wie NKT1 (64) und können auch $CD3^+$ (65), $CD4^+$ (66) und/oder $CD8^+$ (67) sein. Man unterscheidet verschiedene Gruppen, wobei ihre α - und β -Ketten sowohl konserviert als auch divers sein können (65). Sie können über das MHC-verwandte CD1D fremde Lipide und Glykolipide erfassen und nach Aktivierung T_h ähnliche Zytokine freisetzen (68).

1.4.4 $\gamma:\delta$ -T-Zellen

Die Fraktion der $\gamma:\delta$ -T-Zellen machen mit 4% aller $CD3^+$ Zellen einen wesentlich kleineren Anteil aus (69). Ihr TCR wird aus einem Heterodimer, bestehend aus jeweils einer γ -Kette und δ -Kette aufgebaut. Sie exprimieren zusätzlich CD3 und können auch $CD4^+$ oder $CD8^+$ sein, wobei die Mehrzahl der $\gamma:\delta$ -T-Zellen weder CD4 noch CD8 exprimiert (70). Von der Funktionalität werden sie zwischen angeborenen (71) und erworbenen Immunsystem (72) eingeordnet. Hierbei werden sowohl MHC-unabhängig Peptide, MICA, NKG2D sowie Lipidantigene über CD1D als auch bakteriell infizierte Zellen erkannt. Das Repertoire der erkannten Antigene wird dabei als kleiner eingeschätzt als bei $\alpha:\beta$ -TCR (73).

Außerdem scheinen sie in der Lage zu sein, ähnlich wie dendritische Zellen (DC), als antige-präsentierende Zellen (APC) zu fungieren und so Immunantworten anzustoßen (74). Bei Aktivierung schütten sie unter anderem IFN- γ aus (75).


1.4.5 HLA-unabhängige T-Zellen

Es gibt einige Beispiele dafür, dass es auch T-Zellen gibt, deren TCR in der Lage ist Antigene ohne die Präsentation über HLA zu erkennen.

So wurde gezeigt, dass sich mit einer Pankreastumorlinie $CD3^+$ $CD8^+$ $\alpha:\beta$ -T-Zellen stimulieren ließen, welche unabhängig von HLA aktiviert wurden. Hierbei wurden Mucine der Tumoren als stimulierendes Antigen identifiziert. Die Aktivität der T-Zellen war durch Antikörper, die gegen MHC gerichtet sind nicht blockierbar, mit gegen CD3 gerichteten Antikörpern jedoch gut blockierbar (76).

Zudem wurde bei Nierenzellkarzinomen gezeigt, dass sich HLA-unabhängige, tumorreaktive $CD3^+$ $CD4^+$ $CD161^-$ $CD16^-$ $NKG2D^-$ $\alpha:\beta$ -T-Zellen stimulieren ließen. Die Aktivität der T-Zellen war dabei durch gegen HLA gerichtete Antikörper nicht und mit gegen $\alpha:\beta$ -TCR gerichtete Antikörper deutlich blockierbar. Außerdem war die Erkennung unabhängig vom Vorhandensein von B2M in der Zielzelle (77). In späteren Versuchen wurde gezeigt, dass die Aktivierung des TCRs durch DR4 (*Death receptor 4*, engl. für Todesrezeptor 4), welcher selbst an solTRAIL (*Soluble Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand*, engl. für löslicher Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand) gebunden hatte, erfolgte. TRAIL wurde dabei zuvor von einer an der Oberfläche des Tumors vorhandenen Metalloprotease von den T-Zellen gelöst. Anschließend band solTRAIL an die ebenfalls an der Oberfläche des Tumors vorhandenen DR4 (78).

Außerdem wurde bei Mäusen mit einer Keimbahndeletion von B2M, MHC-II, CD4 und CD8 gezeigt, dass auch diese Tiere MHC-unabhängige T-Zellen bildeten (79). Murines CD155 (mCD155) wurde dabei exemplarisch als ein MHC-unabhängiger Aktivator identifiziert (80).

 zeigte 2011 in unserer Arbeitsgruppe ebenfalls eine HLA-unabhängige Reaktivität an der

Melanomzelllinie Ma-Mel-86. Hier wurde mittels Expressionsscreening von cDNA-Banken der Zelllinien Ma-Mel-86A und Ma-Mel-86C mit autologen tumorreaktiven T-Zell-Klonen verschiedene Tumorantigene identifiziert. Hierbei wurden diverse Klone von $\alpha:\beta$ -T-Zellen identifiziert, die neben HLA tragenden Ma-Mel-86A und Ma-Mel-86C auch die HLA-negativen Ma-Mel-86B und Ma-Mel-86F erkannten. Alle so reagierenden T-Zell-Klone trugen dabei einen $\alpha:\beta$ -TCR, waren negativ für die NK-Zellmarker CD16 und CD56 und trugen keinen $\gamma:\delta$ -TCR. Die Reaktivität war dabei nur durch einen gegen CD3 gerichteten Antikörper blockierbar. Gegen HLA-I oder HLA-II gerichtete AK führten zu keiner Änderung der Reaktivität. Als Ziel einiger der HLA-unabhängig reagierenden T-Zellen wurde der CSF2RA (*colony stimulating factor 2 receptor subunit alpha*, engl. für Rezeptor für den koloniestimulierenden Faktor 2 Untereinheit alpha) und TRP2 (*tyrosinase related protein 2*, engl. für Tyrosinase verwandtes Protein 2), auch als DCT (Dopachrom-Tautomerase) bezeichnet, identifiziert. Diese Zellklone exprimierten auf ihrer Oberfläche weder CD4, NK-Zellmarker noch einen $\gamma:\delta$ -TCR (11). Aus TRP2-reaktiven $\alpha:\beta$ -T-Zellen wurden zudem funktionale und für TRP2 spezifische TCR kloniert (11,81,82).

1.5 Immuntherapie

Bei der Immuntherapie von Tumorzellen wird eine künstliche Stimulation des körpereigenen Immunsystems vorgenommen, um die Erkennung und damit Bekämpfung zu unterstützen. Hierbei können sowohl zelluläre als auch humorale Bestandteile des Immunsystems in Form von Antikörpern oder Zytokinen genutzt werden.

1.5.1 Zelluläre Immuntherapie

Da die zellulären Bestandteile des Immunsystems eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle von Tumorzellen spielen, sind sie ein möglicher Mechanismus die Therapie von Tumorerkrankungen zu verbessern. Eine Möglichkeit stellt die adoptive T-Zell-Therapie dar. Bei dieser werden dem an einem Tumor erkrankten Patienten T-Zellen entnommen, expandiert und anschließend retransfundiert. Hierbei wurde zum Beispiel gezeigt, dass es nach *in vitro* Expansion und Retransfusion von TIL (*tumor infiltrating lymphocytes*, engl. für tumorinfiltrierende Lymphozyten) zu einem klinischen Ansprechen bei anti-PD-1/CTLA-4-resistenten Melanomen gekommen ist (83).

Expandierte T-Zellen können zudem vor der Retransfusion modifiziert werden. So werden bei der CAR (*chimeric antigen receptor*, engl. für chimärer Antigen Rezeptor) Therapie für CAR kodierende Gene in T-Zellen eingebracht. Die nach Proteinbiosynthese resultierenden TCR sind so konzipiert, dass sie bestimmte Tumorantigene besonders gut erkennen (84). Beim Verfassen dieser Arbeit in der EU für therapierefraktäre oder rezidivierende Erkrankungen zugelassene Präparate waren Tisagenlecleucel, Axicabtagen-ciloleucel und Brexucabtagen-autoleucel. Diese wurden retroviral mit den für CAR kodierenden Genen ausgestattet. Die resultierenden TCR sind gegen das auf B-Zellen vorkommende CD19 gerichtet und leiten die Erkennung über die Signaldomäne CD3 ζ weiter. Tisagenlecleucel trägt zusätzlich die kostimulatorische Domäne CD137 und wird in der Therapie der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) und des großzelligen B-Zell-Lymphoms (DLBCL) eingesetzt (85). Axicabtagen-ciloleucel trägt zusätzlich die kostimulatorische Domäne CD28 und wird in der Therapie des DLBCL eingesetzt (86). Brexucabtagen-autoleucel trägt ebenfalls die kostimulatorische Domäne CD28 und wird in der Therapie des Mantelzell-Lymphoms (MCL) eingesetzt (87).

1.5.2 Antikörper Therapie

Neben den zellulären Bestandteilen des Immunsystems eignen sich auch Antikörpern dazu, eine Immunreaktion gegen Tumorzellen zu vermitteln. Ein möglicher Mechanismus ist dabei, Antikörper zuzuführen, welche mit ihren Fab-Fragmenten gegen die auf den Tumoren vorkommenden Oberflächenproteine gerichtet sind. Nach einer solchen Markierung erlaubt das freiliegende Fc-Fragment eine Erkennung der Tumorzellen durch zelluläre und humorale Komponenten des Immunsystems. Dadurch kann es zu einer Erkennung und Bekämpfung der so markierten Zellen durch das Immunsystem kommen. Ein Beispiel hierfür ist der gegen das auf B-Zellen vorkommende CD20 gerichtete, monoklonale Antikörper Rituximab, welcher unter anderem in der Therapie maligner Lymphome eingesetzt wird.

Ein anderer Mechanismus, über den therapeutische Antikörper wirken, ist die Hemmung von sogenannten immunologischen Kontrollpunkten (engl. *checkpoints*) (88). Hierbei wird ein Protein blockiert, welches normalerweise die Immunreaktion hemmt, wodurch die Reaktivität der präformierten Immunantwort verstärkt wird. Eines dieser Therapeutika ist der monoklonale Antikörper Ipilimumab. Es ist gegen das Protein CTLA4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*, engl. für zytotoxischer T-Lymphozyt assoziiertes Protein 4) gerichtet, welches bei der Aktivierung von T-Zellen an CD80 oder CD86 bindet und damit die kostimulatorische Wirkung auf T-Zellen hemmt. Ipilimumab verhindert diese Bindung und steigert somit die Immunreaktivität. Er wird beispielsweise für die Therapie des malignen Melanoms eingesetzt (89). Ein weiteres Beispiel für die Hemmung eines immunologischen Kontrollpunktes ist das gegen PD-L1 (*programmed cell death 1 ligand 1*, engl. für programmierter Zelltod Ligand 1) gerichtete Atezolizumab. PD-L1 wird auf der Zelloberfläche exprimiert und dort von dem auf T-Zellen vorhandenen PD-1 (*programmed cell death protein 1*, engl. für programmierter Zelltod Protein 1) gebunden. Dieses führt zu einer Inhibition von antigenspezifischen T-Zellen und damit zu einer Hemmung der Immunreaktion. Für Patienten mit Nierenzellkarzinom wurde beispielweise gezeigt, dass eine hohe Expression von PD-L1 mit einer erhöhten Mortalität verbunden war (90). PD-L1-Inhibitoren werden erfolgreich für das nicht kleinzellige Lungenkarzinom, das maligne Melanom und das Nierenzellkarzinom eingesetzt (91). Durchaus denkbar wäre auch, dass eine solche Hemmung von immunologischen Kontrollpunkten eine Aktivierung einer HLA-unabhängigen Reaktivität von T-Zellen nach sich zieht.

1.5.3 Zytokintherapie

Zytokine sind Proteine, welche in der Lage sind die Immunantwort zu regulieren. Diese Proteine können vom Tumor produziert werden, um der Immunantwort zu entgehen. Ein Beispiel ist TGF- β (*transforming growth factor beta*, engl. für transformierender Wachstumsfaktor β), dessen immunsuppressiven Eigenschaften einen Beitrag zur Pathogenität von Tumoren haben können (92). Sie können aber auch therapeutisch verabreicht werden, um die Immunantwort zu steigern. Ein Beispiel ist IFN- α , welches derzeit noch in der Therapie der Haarzelleukämie (93) und der Polycythaemia vera (94) angewendet wird.

1.6 Ziele der Arbeit

Die Immuntherapie von Tumorerkrankungen wird durch ähnliche Mechanismen erschwert, wie sie auch im Rahmen des Immunoeditings (vgl. Abschn. 1.2) *in vivo* vorkommen. Ein wesentlicher Mechanismus ist der Verlust von HLA, welcher die T-Zell-getragene Immunantwort und damit auch die Möglichkeiten einer T-Zell-Therapie einschränkt. Da in dem T-Zell-Repertoire der Patientin Ma-Mel-86 eine HLA-unabhängige Tumorreaktivität gezeigt wurde, stellte sich die Frage, ob sich auch bei gesunden Individuen T-Zellen mit einem solchem Erkennungsmuster finden lassen. Als Quelle für diesen Stimulationsversuch wurde das Nabelschnurblut Neugeborener verwendet. Dieses zeichnet sich durch einen erhöhten Anteil von naiven T-Zellen aus (95). Deshalb vermuteten wir, dass die Wahrscheinlichkeit, eine gegen unsere Stimulatorzelle reaktive Zelle zu finden, gegenüber dem Blut gesunder Erwachsener, erhöht ist. Ein solcher Nachweis von HLA-unabhängigen tumorreaktiven T-Zellen hätte gezeigt, dass auch Nabelschnurblut als Quelle für diese und deren Rezeptoren dienen kann. Zudem würde ein Nachweis in Nabelschnurblut dafür sprechen, dass der Mechanismus einer HLA-unabhängigen, durch T-Zellen vermittelten Reaktivität, auch unabhängig von einer vorherigen Tumorerkrankung auftreten kann. Da bereits CSF2RA und TRP2 als Ziele solcher HLA-unabhängigen T-Zellen identifiziert wurden, sollte auch nach einer Reaktivität gegen diese Antigene gesucht werden.

2 Materialien

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklaven	
Autoklav VX150	Systemec <i>Wettenberg, DE</i>
Durchreichautoklav	Holzner <i>Nußloch, DE</i>
Cycler	
Thermocycler T1, Tgradient	Biometra <i>Göttingen, DE</i>
Elektrophorese	
Digital Graphic Printer UPD890	Biometra, Sony <i>Göttingen, DE</i>
Gelelektrophoresammern	PEQLAB <i>Erlangen, DE</i>
GenePower Supply GPS200/400	Pharmacia <i>Uppsala, SWE</i>
UVsolo TS Imaging System	Biometra <i>Göttingen, DE</i>
UVsolo TS Imaging System	Biometra <i>Göttingen, DE</i>
Inkubatoren	
Bakterienbrutschrank	Heraeus <i>Hanau, DE</i>
CERTOMAT H Schüttelinkubator	Sartorius <i>Göttingen, DE</i>
CERTOMAT SII Schüttelinkubator	Sartorius <i>Göttingen, DE</i>
CO2Inkubator BBD6220	Heraeus <i>Hanau, DE</i>
Heizblock Thermomixer comfort, 5436	Eppendorf <i>Hamburg, DE</i>
Kühlgeräte	
Chronos & Biosafe KRYOMATC	Messer Griesheim <i>Bad Soden, DE</i>
MVE1400 Series	CryoTech <i>Flemington, US</i>
Stickstoffvorratsstank XL180	TaylorWharton <i>Husum, DE</i>
Tiefkühlagerschrank HERA freeze 80°C	Thermo Fisher Scientific <i>Schwerte, DE</i>
Zellseparation	
Magnetständer MACS Multi Stand™	Miltenyi Biotec <i>Bergisch Gladbach, DE</i>
Magnetständer MiniMACS™	Miltenyi Biotec <i>Bergisch Gladbach, DE</i>
OctoMACS™ Separator	Miltenyi Biotec <i>Bergisch Gladbach, DE</i>
Zentrifugen	
Centrifuge 5415 R	Eppendorf <i>Hamburg, DE</i>
Centrifuge 5424 R	Eppendorf <i>Hamburg, DE</i>

Gerät	Hersteller
HERAEUS Megafuge 3.0R	Thermo Fisher Scientific <i>Schwerte, DE</i>
Multifuge Rotina 420	Hettich <i>Tuttlingen, DE</i>
Tischzentrifuge	Thermo Fisher Scientific <i>Schwerte, DE</i>
Sonstiges	
CTLImmunoSpot S6 Micro Analyzer	C.T.L. Europe GmbH <i>Bonn, DE</i>
Chemikalienwaage	Sartorius <i>Göttingen, DE</i>
Durchflusszytometer BD FACS Canto™II	BD Biosciences <i>Heidelberg, DE</i>
Gammacell 2000 137Cäsiumquelle	Molsgaarg Medical <i>Gansloe, DNK</i>
HERA safe, HERA Funtion Line	Heraeus <i>Hanau, DE</i>
Mikroskop Eclipse TS100, TMS	Nikon <i>Alzenau, DE</i>
Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrophotometer	Pharmacia Biotech <i>Uppsala, SWE</i>
Wasserdeionisierungsanlag Purelab Classic ELGA	Elga Labwater <i>Celle, DE</i>

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Behälter	
Cryo-Röhrchen Cellstar Cryo-S (2 ml)	Greiner Bio-One GmbH <i>Frickenhausen, DE</i>
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,2/0,5/1,5/2 ml)	Eppendorf <i>Wesseling, DE</i>
FACS-Röhrchen (5ml)	Greiner Bio-One <i>Nürtingen, DE</i>
MultiScreen Filterplates, S2EM004M99	Merck Millipore <i>Carrigtwohill, IRL</i>
Röhrchen CELLSTAR (15 / 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH <i>Frickenhausen, DE</i>
Zellkultur Multiwellplatte CELLSTAR (6-/24-/48-/96-Well)	Greiner Bio-One GmbH <i>Frickenhausen, DE</i>
Zellkulturflaschen CELLSTAR (25/75/175 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH <i>Frickenhausen, DE</i>
Einfrierbehälter	
Nalgene Cryo "Mr. Frosty" Freezing Container	Thermo Fisher Scientific <i>Schwerte, DE</i>
Qualifreeze Cryo Einfriergerät	Qualilab <i>Bruchsal, DE</i>
Filter	
Filtereinheiten (0,22 µm / 0,45 µm)	Whatman GmbH <i>Dassel, DE</i>
Stericup (500 ml; 0,22 µm / 0,45 µm)	Merck Millipore GmbH <i>Schwalbach, DE</i>
Steritop™ (0,22 / 0,45 µm)	Merck Millipore GmbH <i>Schwalbach, DE</i>
Petrischalen	
Petri Dish (ø 30/90 mm)	Greiner Bio-One GmbH <i>Kremsmünster, AT</i>

Material	Hersteller
Zellkulturschale mit Nocken (ø 100 mm)	Greiner Bio-One GmbH <i>Frickenhausen, DE</i>
Pipetten	
Pipette mit Spitze CELLSTAR (2/5/10/25/50 ml)	Greiner Bio-One GmbH <i>Frickenhausen, DE</i>
Pipettenspitzen TipOne (10/200/1000 µl)	Starlab GmbH <i>Hamburg, DE</i>
Zellseparation	
MS-Säulen (25 MS)	Miltenyi Biotec GmbH <i>Bergisch Gladbach, DE</i>
Nylonzell-Separationsfilter (30 µm)	Miltenyi Biotec GmbH <i>Bergisch Gladbach, DE</i>
Sonstiges	
Präzisionsküvetten aus Quarzglas SUPRASIL	Hellma GmbH & Co. KG <i>Müllheim, DE</i>
Zählkammer Fuchs-Rosenthal (0,2mm Tiefe, 0,0625 cm ²)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG <i>Lauda-Königshofen, DE</i>

2.2 Chemikalien, Medien, Lösungen und Puffer

2.2.1 Chemikalien und Medien

Tabelle 3: Chemikalien und Zusätze

Name	Hersteller
Durchflusszytometrie	
FACSClean™	BD Biosciences <i>Heidelberg, DE</i>
FACSFlow™	BD Biosciences <i>Heidelberg, DE</i>
FACSRinse™	BD Biosciences <i>Heidelberg, DE</i>
Elektrophorese	
1 kb DNA Ladder	NEB <i>Frankfurt am Main, DE</i>
100 bp DNA Ladder	NEB <i>Frankfurt am Main, DE</i>
Gel Loading Dye Blue (6x)	NEB <i>Frankfurt am Main, DE</i>
Gel Loading Dye Purple (6x)	NEB <i>Frankfurt am Main, DE</i>
GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10.000x	BIOTIUM <i>Hayward, US</i>
peqGREEN, 20.000x	PEQLAB <i>Erlangen, DE</i>
Feststoffe	
AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol)-Tabletten	Sigma-Aldrich Chemie GmbH <i>Steinheim, DE</i>
Bacto™ Agar	BD Biosciences <i>Heidelberg, DE</i>
Bacto™ Tryptane	BD Biosciences <i>Heidelberg, DE</i>
Bacto™-Yeast Extract	BD Biosciences <i>Heidelberg, DE</i>
Natriumacetat	Merck KGaA <i>Darmstadt, DE</i>

Name	Hersteller
Natriumchlorid	Carl Roth AG <i>Karlsruhe, DE</i>
Natriumhydroxid	Merck KGaA <i>Darmstadt, DE</i>
PBS-Pulver	Merck KGaA <i>Darmstadt, DE</i>
STAR PURE AGAROSE Low Eco Standard	Starlab <i>Hamburg, DE</i>
Flüssigkeiten	
Aqua / Aqua ad injectabilia	B. Braun Melsungen AG <i>Melsungen, DE</i>
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH <i>Steinheim</i>
Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix (10 mM)	Carl Roth AG <i>Karlsruhe, DE</i>
Dimethylsulfoxid	Merck KGaA <i>Darmstadt, DE</i>
Essigsäure	Carl Roth AG <i>Karlsruhe, DE</i>
Ethanol, absolut	AppliChem GmbH <i>Darmstadt, DE</i>
Ethylendiamin-Tetraazetat	Merck KGaA <i>Darmstadt, DE</i>
Formaldehyd 37%	Merck KGaA <i>Darmstadt, DE</i>
FuGENE6 Transfection Reagent	Promega <i>Mannheim, DE</i>
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH <i>Steinheim, DE</i>
Hepes Buffer 1M (in 0,85% NaCl)	Lonza <i>Köln, DE</i>
Hexadimethrine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH <i>Steinheim, DE</i>
Histopaque-1077	Sigma-Aldrich Chemie GmbH <i>Steinheim, DE</i>
Humanserum	Transfusionszentrale Universitätsmedizin <i>Mainz, DE</i>
Isoprpanol	Thermo Fisher Scientific <i>Schwerte, DE</i>
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher Scientific <i>Schwerte, DE</i>
N,N-Dimethylformamid	NEB <i>Frankfurt am Main, DE</i>
TBE Buffer (10x)	Serva Electrophoresis GmbH <i>Berlin, DE</i>
Trypanblau	Merck KGaA <i>Darmstadt, DE</i>
Trypsin-EDTA	Life Technologies <i>Darmstadt, DE</i>
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH <i>Steinheim, DE</i>
fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH <i>Steinheim, DE</i>
Medien	
AIM V Medium (1x)	Life Technologies <i>Darmstadt, DE</i>
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium	Lonza <i>Köln, DE</i>
RPMI 1640	Sigma-Aldrich Chemie GmbH <i>Steinheim, DE</i>
SOC Outgrowth Medium	Life Technologies <i>Darmstadt, DE</i>
Medikamente	
Heparin-Natrium 25.000 IE / 5ml	B. Braun SE <i>Melsungen, DE</i>

Name	Hersteller
Zytokine	
Interleukin-12	Miltenyi Biotec <i>Bergisch Gladbach, DE</i>
Interleukin-15	Miltenyi Biotec <i>Bergisch Gladbach, DE</i>
Interleukin-2 (Proleukin S)	Novartis, Sandoz Pharmaceuticals GmbH <i>Holzkirchen, DE</i>
Interleukin-7	Miltenyi Biotec <i>Bergisch Gladbach, DE</i>

2.2.2 Lösungen und Puffer

Tabelle 4: Lösung und deren Herstellung

Lösung	Herstellung
Acetatpuffer	4,6 ml 0,2 N Essigsäure; 11 ml 0,2 N Natriumacetat; 46,9 ml d.H ₂ O
Avidin-Peroxidase-Lösung	10 ml Ansatz: 10 ml PBS; 0,1 % Tween 20; 1 Tropfen A und 1 Tropfen B (Vectastain ABC Kit)
ELISpot Wasch-Lösung	PBS (1x); 0,05 % Tween 20
Essigsäure (0,2 N)	11,3 g Essigsäure (96 %) ad 1 l mit d.H ₂ O auffüllen (0,2 N)
Ethanol _{35%}	10 ml Ansatz: 6,5ml Ethanol ad 10 ml mit d.H ₂ O auffüllen
FACS Fixierungs-Lösung	1,35 ml 37%iges Formaldehyd ad 50 ml mit PBS (1x) auffüllen
FACS Puffer	5 g BSA ad 500 ml mit PBS (1x) auffüllen
Gel-Puffer (0,5 x TBE)	50 ml TBE (10x) ad 1 l mit d.H ₂ O auffüllen
Glycerol (60 %)	30 ml Glycerol ad 50 ml mit LB Medium auffüllen
MACS-Puffer	2 mM EDTA; 0,5 % BSA auffüllen ad 0,5 l mit PBS Steril filtrieren (0,22 µm)
Natriumacetat (0,2 N)	16,4 g Natriumacetat auffüllen ad 1 l mit d.H ₂ O
PBS (1x)	95,5 g Instamed PBS-Pulver ad 10 l mit d.H ₂ O auffüllen
PBS _{BSA}	PBS (1x); 0,5 % BSA
Peroxidase-Substrat-Lösung	10 ml Ansatz: 1 Tablette AEC in 2,5 ml Dimethylformamid lösen ad 50 ml mit Acetatpuffer Vortexen und Filtrieren (0,45 µm) vor Benutzung 25 µl 30 %iges H ₂ O ₂ hinzufügen
Polybrene (5 mg/ml)	50 mg Hexadimethrine in 10 ml 0,9% ige NaCl-Lösung lösen
Trypanblau	A: 0,2 % Tb-Lsg. (1 g Tb ad 500 ml d.H ₂ O) B: 4,5 % NaCl-Lsg. (22,5 g NaCl ad 500 ml d.H ₂ O) 3 Teile A + 1 Teil B; Steril filtrieren mit Stericup (0,22 µm)

2.3 Molekularbiologische Kits

Tabelle 5: Molekularbiologische Kits

Name	Hersteller
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen <i>Hilden, DE</i>
MACS MicroBead Separation	Miltenyi Biotec <i>Bergisch Gladbach, DE</i>
MultiSite Gateway Pro	Invitrogen <i>Carlsbad, US</i>
Q5 Site-Directed Mutagenesis	NEB <i>Frankfurt am Main, DE</i>
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen <i>Hilden, DE</i>
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen <i>Hilden, DE</i>
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen <i>Hilden, DE</i>
Superscript III Reverse Transcriptase	Life Technologies <i>Darmstadt, Deutschland</i>
VECTASTAIN Elite ABC	Vektor Laboratories <i>Burlingame, US</i>

2.4 Antikörper

Tabelle 6: Antikörper

Antikörper	Herkunft	Spezifität	Hersteller
Durchflusszytometrie			
CD3	Maus-IgG1	CD3, human	Beckman Coulter <i>Krefeld, DE</i>
CD4	Maus-IgG1	CD4, human	Beckman Coulter <i>Krefeld, DE</i>
CD8	Maus-IgG1	CD8, human	Beckman Coulter <i>Krefeld, DE</i>
CD80	Maus-IgG1	CD80, human	Beckman Coulter <i>Krefeld, DE</i>
CD83	Maus-IgG1	CD83, human	Beckman Coulter <i>Krefeld, DE</i>
Mouse IgG1 Isotype Control	Maus-IgG1	unspezifisch	Beckman Coulter <i>Krefeld, DE</i>
ELISpot			
Detektionsantikörper mAb	7-B6-1 (Maus-IgG1, biotinyliert)	IFN- γ , human	Mabtech AB <i>Nacka, SWE</i>
OKT-3		CD3, human	Hybridomüberstand
Primärantikörper	mAb 1-D1K (Maus-IgG1)	IFN- γ , human	Mabtech AB <i>Nacka, SWE</i>
MACS			
CD3 MicroBeads	Maus-IgG2a	CD3, human	Miltenyi Biotec <i>Bergisch Gladbach, DE</i>

2.5 Enzyme

Tabelle 7: Restriktionsendonukleasen

Bezeichnung	Sequenz	Puffer	Hersteller
BsrGI	5' T GTACA 3' 3' ACATG T 5'	Buffer 2.1	NEB <i>Frankfurt am Main, DE</i>
SmaI	5' CCC GGG 3' 3' GGG CCC 5'	Buffer J	Promega <i>Mannheim, DE</i>

Tabelle 8: Weitere Enzyme

Bezeichnung	Puffer	Hersteller
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	Q5 Reaction Buffer	NEB <i>Frankfurt am Main, DE</i>
T4 DNA Ligase	T4 DNA Ligase Buffer	NEB <i>Frankfurt am Main, DE</i>

2.6 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
BgH.rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG
M13.rev	CAGGAAACAGCTATGACC
M13.se	TGTAAAACGACGGCCAGT
SDM_CD80.rev	AGGTTATCAGGAAAATGCTCTTGC
SDM_CD80.se	GCTCCCATCCTGGGCCATTAC
SE206.se	TTACACAGTCCTGCTGACCACC
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
attB1_CD80.se	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGC AGGCTTCGAAGCCATGGGCCACAC ACGGAGG
attB2_CD83_STOP.rev	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTACCTGCTCATAACAGTTCT GTCTTGTGAG
attB5_SmaI_CD83.se	GGGACAACCTTTGTATACAAAAGT TGCTCCCGGCCTATGTCGCGCGG C

Bezeichnung	Sequenz
attB5r_SmaI_CD80.rev	GGGGACAACCTTTTGTATACAAAGT TGTAGGCCCGGGGTTCTCCTCCAC GTCTCCAGCCTGCTTCAGCAGGCT GAAGTTAGTAGCTCCGCTTCCCGG ACACTGTTGTACAGGGCGTACACT TTCCC

Die verwendeten Oligonukleotide wurden durch die Firma Eurofins MWG Operon (*Ebersberg, DE) oder durch Integrated DNA Technologies (*Leuven, BEL*) synthetisiert. Lyophilisierte Oligonukleotide wurden zunächst mit ddH₂O auf eine Stockkonzentration von 100 pmol/ μ l eingestellt und für die durchgeführten Reaktionen mit ddH₂O auf 10 pmol/ μ l verdünnt.

2.7 Vektoren

Tabelle 10: Vektoren

Vektor	Herkunft
pCOLT-GALV	Prof. Dr. M. Theobald, Universitätsmedizin Mainz, DE
pDONR221 P1-P2	Invitrogen Carlsbad, US
pDONR221 P1-P5r	Invitrogen Carlsbad, US
pDONR221 P5-P2	Invitrogen Carlsbad, US
pHIT60	Prof. Dr. M. Theobald, Universitätsmedizin Mainz, DE
pMX_DEST	L. Mayer, AG Wölfel, Universitätsmedizin Mainz, DE
pMX_DEST_attB1_CD80 ^{744C>T} _P2A_CD83_STOP_attB2	Innerhalb dieser Arbeit erstellt
pcDNA3.1_DEST	Life Technologies Darmstadt; modifiziert durch C. Wölfel

Detaillierte Vektorkarten sind unter Abschn. 7.1 zu finden.

2.8 Antibiotika

Tabelle 11: Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH <i>Steinheim, DE</i>
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH <i>Steinheim, DE</i>
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies <i>Darmstadt, DE</i>

2.9 Nährmedien

Tabelle 12: Nährmedien

Medium	Herstellung
Bakterien	
LB-Agar	500ml LB-Medium; 7,5 g Bacto Agar; autoklavieren (121 °C); Verflüssigung in Mikrowelle; in Petrischalen gießen
LB-Agar _{Ampicillin}	LB-Agar; vor gießen in Petrischalen; abkühlen und 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin hinzufügen; in Petrischalen gießen
LB-Agar _{Kanamycin}	LB-Agar; vor gießen in Petrischalen; abkühlen und 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin hinzufügen; in Petrischalen gießen
LB-Medium	10g Bacto Tryptan; 5 g Hefe-Extrakt; 10 g NaCl; add 1l ddH ₂ O; mit NaOH auf pH 7,0 einstellen; autoklavieren (121 °C)
LB-Medium _{Ampicillin}	LB-Medium; 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin
LB-Medium _{Glycerol}	30ml Glycerol; add 50ml% LB-Medium
LB-Medium _{Kanamycin}	LB-Medium; 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin
Zellkultur	
AIM V _{HS}	AIM V; 10% HS (hitzeinaktiviert bei 56°C für 45 min)
DMEM _{Phoenix-Ampho}	DMEM; 10% FCS (hitzeinaktiviert bei 56°C für 45 min); 1% L-Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin; 25 mM HEPES
DMEM _{Trans}	DMEM; 1% L-Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin; 25 mM HEPES
FCS _{DMSO}	FCS (hitzeinaktiviert bei 56°C für 45 min); 10% DMSO
HS _{DMSO}	HS (hitzeinaktiviert bei 56°C für 45 min); 10% DMSO
RPMI _{FCS}	RPMI; 10 % FCS (hitzeinaktiviert bei 56°C für 45 min)
RPMI _{PS}	RPMI; 10 % FCS (hitzeinaktiviert bei 56°C für 45 min); 1 % Penicillin/Streptomycin

2.10 Bakterienstämme

Tabelle 13: Bakterienstämme

Name	Genotyp	Hersteller
NEB 10-beta competent E.coli	$\Delta(ara - leu)$ 7697 <i>araD139 fhuA</i> $\Delta lacX74$ <i>galK16 galE15 e14 - \phi80dlacZ $\Delta M15$ <i>recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 $\Delta(mrr - hsdRMS - mcrBC)$</i></i>	NEB Frankfurt am Main, DE
One Shot™ Survival™ 2 T1 ^R	<i>F- mcrA</i> $\Delta(mrr - hsdRMS - mcrBC)$ <i>f80lacZDM15</i> $\Delta lacX74$ <i>recA1 araD139</i> $\Delta(ara - leu)$ 7697 <i>galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG fhuA :: IS2</i>	Invitrogen Carlsbad, US

2.11 Zelllinien

2.11.1 Ma-Mel-86

Die Ma-Mel-86-Zelllinien stammen aus der Melanompatientin Ma-Mel-86. Die Patientin wurde im Verlauf der Erkrankung sowohl bestrahlt als auch mit Peptiden und tumorlysatbeladenen dendritischen Zellen vakziniert. Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Zelllinien aus den Lymphknotenmetastasen der Patientin gewonnen (vgl. Abb. 1). Die Zelllinien wurden freundlicherweise von [REDACTED] zur Verfügung gestellt.

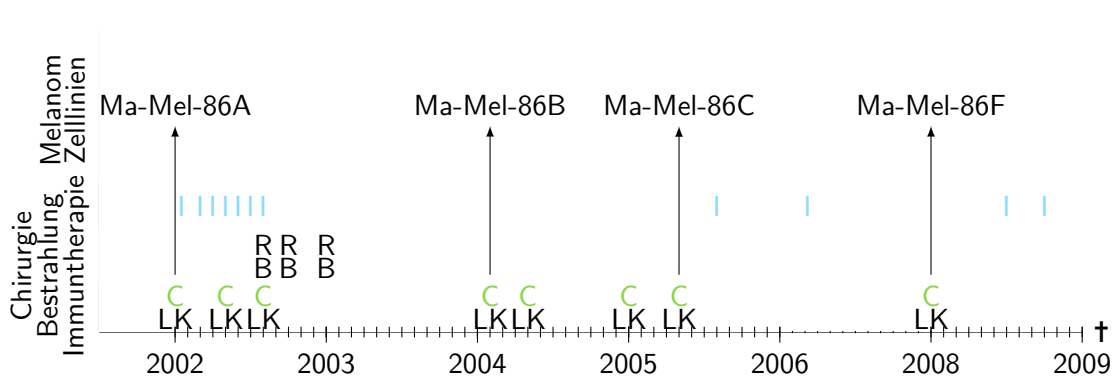


Abbildung 1: Krankheits- und Behandlungsverlauf der Melanompatientin Ma-Mel-86 von Resektion des Primärtumors bis zum Ableben der Patientin. In der Abbildung sind Zeitpunkte von Lymphknotenmetastasen (LK), deren chirurgische Entfernung (C), Bestrahlungstherapie (R) von Hirnmetastasen (B) und Immuntherapien (I) dargestellt. Zudem wird dargestellt, zu welchen Zeitpunkten die Ma-Mel-86 Melanomzelllinien aus den entnommenen Lymphknoten generiert wurden.

Durch [REDACTED] wurde 2011 in unserer Arbeitsgruppe eine HLA-unabhängige Reaktivität an der Melanomzelllinie Ma-Mel-86 nachgewiesen. Dabei wurden die Oberflächenproteine CSF2RA und TRP2 identi-

fiziert, welche in einer HLA-unabhängigen Weise durch $\alpha:\beta$ -T-Zellen erkannt wurden (vgl. Abschn. 1.4.5). Die verschiedenen Ma-Mel-86-Zelllinien unterschieden sich bezüglich ihrer Expression von HLA-I sowie der Expression von CSF2RA und TRP2 (vgl. Tab. 14).

Tabelle 14: Darstellung der verschiedenen Tumorzelllinien aus Ma-Mel-86 mit Angabe der Expression von HLA-I, HLA-II, CSF2RA und TRP2.

Zelllinie	HLA-I	HLA-II	CSF2RA	TRP2
Ma-Mel-86A	X	X	-	-
Ma-Mel-86B	-	X	X	X
Ma-Mel-86C	X	X	X	X
Ma-Mel-86F	-	X	X	-

Die hier verwendete Ma-Mel-86B-Zelllinie exprimiert beide Proteine. Zudem exprimiert sie durch eine biallelische *in vivo* Mutation im *B2M*-Gen kein HLA-I (11).

In unserer Arbeitsgruppe wurde durch [REDACTED] im Rahmen der Dissertation mittels TALEN (*Transcription Activator-like Effector Nuclease*, engl. für transkriptionsaktivatorartige Effektor nuklease) in Ma-Mel-86B eine zusätzliche biallelische *Frame-Shift*-Mutation im *CIITA*-Gen etabliert. Hierdurch wird kein HLA-II mehr exprimiert (96). In dieser Arbeit wurde diese Zelllinie Ma-Mel-86B_KO^{CIITA} zusätzlich mit den kostimulatorischen Proteinen CD80 und CD83 ausgestattet und Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi}#2 gebildet.

2.11.2 K562


K562-Zellen wurden aus einem Patienten mit CML (chronische myeloische Leukämie) isoliert (97). In ursprünglichen Untersuchungen konnte auf der Oberfläche von K562 weder HLA-I noch HLA-II nachgewiesen werden. Deswegen wird K562 als ein klassisches Ziel für NK-Zellen genutzt (98). In späteren Studien wurde jedoch gezeigt, dass es unter bestimmten Umständen, wie beispielweise einer Behandlung mit humanen IFN- γ , zu einer Präsentation von MHC-I und dadurch zu einem stärkeren Schutz vor einer Lyse durch NK-Zellen kommen kann (99).

2.11.3 Phoenix-Ampho

Die hier verwendete Phoenix-Ampho-Zelllinie ist eine amphotrope Verpackungszelllinie und dient der Produktion von Retroviren. Sie wurde von Nolan lab (*Stanford, USA*) mittels stabiler Transfektion eines Maus-Leukämievirus-Systems aus der HEK293T-Zelllinie entwickelt. Benötigte virale Gene sind auf voneinander getrennten Hilfskonstrukten aufgeteilt (vgl. Abschn. 3.2.6), wodurch die Wahrscheinlichkeit der versehentlichen Herstellung eines replikationskompetenten Retrovirus deutlich reduziert wird. Dieses Risiko wird durch die Verwendung von nicht-MLV-Promotoren weiter minimiert.

Die Phoenix-Ampho wurden freundlicherweise von Dr. H. Echchannaoui (AG Theobald, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität, *Mainz, DE*) zur Verfügung gestellt.

2.11.4 HEK293T

Die HEK293T-Zelllinie stammt aus humanen embryonalen Nierenzellen und wurde durch das transformierte Gen des Adenovirus-Typ5 immortalisiert. Zusätzlich wurde sie mit dem großen T-Antigen des SV40-Virus (engl. für *simian virus 40*) stabil transfiziert. Dieses erlaubt der Zelllinie Vektoren mit dem SV40-Virus-Replikationsursprung zu replizieren, wodurch hohe Expressionsraten erreicht werden können. Zusätzlich wurde in unserer Arbeitsgruppe durch  im Rahmen der Dissertation mittels TALEN eine biallelische *Frame-Shift*-Mutation im *B2M*- und im *CIITA*-Gen etabliert (96). Diese wurden während der in dieser Arbeit durchgeführten ELISpot Analysen mittels Lipofectamine (vgl. Abschn. 3.2.4) einmal transient mit TRP2 und einmal mit CSF2RA ausgestattet. Diese HEK293T_KO^{B2M/CIITA} und deren transiente Transfektanten HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+CSF2RA und HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+TRP2 wurden in dieser Arbeit als Zielzellen für die durchgeführten ELISpots genutzt. Die ursprüngliche HEK293T-Zelllinie wurde freundlicherweise von N. Shastri (The University of California, Berkeley, USA) zur Verfügung gestellt.

2.11.5 PBMC

PBMC (*peripheral blood mononuclear cell*, engl. für mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) wurden aus dem Blut gesunder Blutspender isoliert (vgl. Abschn. 3.2.10), welches freundlicherweise von der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, DE zur Verfügung gestellt wurde.

2.11.6 UCBMC

UCBMC (*umbilical cord blood mononuclear cells*, engl. für mononukleäre Zellen des Nabelschnurblutes) wurden aus dem Nabelschnurblut gesunder Lebendgeborener isoliert (vgl. Abschn. 3.2.10), welches freundlicherweise von Dr. A. Fruth (Geburtsmedizin, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, DE) zur Verfügung gestellt wurde.

2.12 Software, Internetseiten und Datenbanken

Tabelle 15: Software

Name	Hersteller
BD FACS Diva	BD Biosciences Heidelberg, DE
Biopython	open source
FlowJo Vers 7.6.5	Tree Star Inc. Ashland, US
ImmunoSpot	C.T.L.-Europe GmbH Bonn, DE
UGENE	Unipro Novosibirsk, RU

Tabelle 16: Internetseiten und Datenbanken

Name	Webadresse
Blast NCBI	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
NEBaseChanger	https://nebasechanger.neb.com
OligoAnalyzer3.1	https://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer

3 Methoden

3.1 Molekularbiologie

3.1.1 Bakterienkultur

Bakterien wurden in LB-Medium oder auf LB-Agar kultiviert. Die Medien wurden zur Selektion mit entsprechenden Antibiotika versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 16h . Wurde LB-Medium verwendet, erfolgte die Inkubation bei kontinuierlichem Schütteln bei 220rpm in einem Schüttelinkubator.

3.1.2 Kryokonservierung von Bakterienkulturen

Für die Kryokonservierung wurden $750\mu\text{l}$ Bakterienkultur in LB-Medium mit $250\mu\text{l}$ LB-Medium_{Glycerol} versetzt und so mit einer Endkonzentration von 15% Glycerol bei -80°C gelagert.

3.1.3 Transformation

Die Transformation beschreibt die nicht-virale Aufnahme von Fremd-DNA durch Bakterien. Dazu wurden Bakterien nach einer Kühlung auf Eis einem plötzlichen Hitzeschock ausgesetzt. Im Nährmedium vorhandene Ionen stören dabei die Integrität der Zellmembran, welche dadurch durchlässig für Fremd-DNA wird. Aufgenommene Plasmide können dann mittels des bakteriellen Zellzyklus vervielfältigt werden.

Es wurden $50\mu\text{l}$ der zu transformierenden Bakterien in LB-Medium mit $2 - 4\mu\text{l}$ DNA für 25min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 30s im Wasserbad einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 1min wurden $250\mu\text{l}$ auf 37°C erwärmtes SOC-Medium hinzugefügt. In diesem wurden die Bakterien für 1h bei 220rpm bei 37°C in einem Schüttelinkubator aufbewahrt. Anschließend erfolgte die Verteilung auf mit Antibiotikum versetzten LB-Agar, wo diese weiter bei 37°C inkubiert wurden. Nach 16h erfolgte die Auswahl der Kolonien von der LB-Agar und die weitere Vermehrung in LB-Medium.

3.1.4 Isolation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde durch Transformation in Bakterien (vgl. Abschn. 3.1.3) eingebracht. Diese wurden anschließend in einer Bakterienkultur (vgl. Abschn. 3.1.1) vervielfältigt. Um eine ausreichende Ausbeute zu erreichen, wurden Bakterienkulturen in LB-Medium vor der Isolation auf ihre OD (optische Dichte) mittels Spektrometer geprüft. Danach wurden die Bakterien durch einen alkalischen Puffer lysiert. Im Anschluss wurde mittels Säulenzentrifugation (vgl. Prinzip Abschn. 3.1.5) die Plasmid-DNA isoliert. Für die Isolation wurde je nach benötigter Menge des Plasmids die Kits QIAprep Spin Miniprep Kit oder HiSpeed Plasmid Maxi Kit verwendet. Die OD wurde mittels Spektrometer (Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrophotometer) gemessen. Zur Vervielfältigung wurde LB-Medium mit den jeweiligen Bakterienklonen angeimpft. Durch Inkubation wurden diese Bakterienkulturen bis zu einer OD von circa 1.8 vervielfältigt. Anschließend erfolgte die Isolation nach den Angaben des Herstellers des jeweiligen Kits.

3.1.5 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden mittels Zentrifugationssäulen aufgereinigt. Dabei binden die Nukleinsäuren unter Anwesenheit ethanolhaltigen Puffers an eine Membran aus Silizium. Andere Bestandteile werden danach ausgewaschen. Schließlich werden die aufgereinigten Nukleinsäuren durch das Hinzufügen eines weiteren Puffers von der Membran gelöst. Es wurde das Kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen *Hilden*) verwendet. Die Aufreinigung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.1.6 PCR

Die PCR (*Polymerase chain reaction*, engl. für Polymerase-Kettenreaktion) wurde zur Amplifikation von spezifischen DNA (*deoxyribonucleic acid*, engl. für Desoxyribonukleinsäure) verwendet. Hierzu wird als Grundlage ein DNA-Template benötigt, welches den zu amplifizierenden Abschnitt enthält. Die Amplifikation wird durch eine DNA-Polymerase durchgeführt. Diese DNA-Polymerase beginnt mit der Amplifikation an kurzen Oligonukleotiden, den sogenannten Primern. Solche Primer setzen komplementär jeweils am 3'-Ende des Plus- und des Minusstranges der DNA an. Dabei flankieren sie den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt. Als Bausteine dieser Reaktion verwendet die DNA-Polymerase dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphat). Als Enzym wurde die Q5 High-Fidelity DNA Polymerase verwendet. Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler durchgeführt. Für die Durchführung der PCR wurde die Reaktion zuerst nach Tab. 17 angesetzt. Der Ansatz wurde dann nach den in Tab. 18 beschriebenen Zeitintervallen und Temperaturen amplifiziert.

Tabelle 17: Angabe des verwendeten Reagenz und der verwendeten Menge für die Durchführung der PCR.

Reagenz	Menge
Q5 Reaction Buffer (5x)	6ng
GC Enhancer (5x)	40 μ l
Primer sense	0.5pmol/ μ l
Primer reverse	0.5pmol/ μ l
dNTPs [10mM]	4 μ l
Q5 High Fidelity Polymerase [2000U/ml]	2 μ l
ddH ₂ O	Add auf 200 μ l

Tabelle 18: Angabe der für die Durchführung der PCR gemachten Einstellung an dem verwendeten Thermocycler.

n	Schritt	Temperatur	Zeit
	Denaturierung	98°C	3 min
35 x	Denaturierung	98°C	30 s
...	Primerhybridisierung	63 – 72°C	45 s
...	Elongation	72°C	≈ 30kb/s
	Elongation	72°C	3 min
	Kühlung	4°C	∞

3.1.7 RT-PCR

Die RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*, engl. für reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) wurde zur Umschreiben von RNA (*ribonucleic acid*, engl. für Ribonukleinsäure) in cDNA (*complementary DNA*, engl. für komplementäre DNA) verwendet. Als RNA-Template kann z.B. das Transkriptom und damit die Gesamtheit der mRNA (*Messenger RNA*, engl. für Boten-RNA) von Zellen verwendet werden. Die eigentliche Transkription wird durch eine RT (reverse Transkriptase) durchgeführt. Diese RT beginnt mit der Amplifikation an spezifischen Primern. Im Falle von mRNA werden zu dem Poly(A)-Schwanz komplementäre Oligo-d(T)-Primer eingesetzt. Diese setzen am 3'-Ende an und erlauben eine Transkription des kompletten mRNA-Stranges. Für die Reaktionen wurde das Kit Superscript III Reverse Transcriptase verwendet. Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler durchgeführt. Die RT-PCR wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.1.8 Ortsspezifische Mutagenese

Die SDM (*Site-directed mutagenesis*, engl. für ortsspezifische Mutagenese) ist eine Methode zur Einführung kleinerer, spezifischer Veränderungen in einer DNA-Sequenz. Für die SDM werden zwei komplementäre Primer gebildet, welche spezifische Veränderungen in dem entstehenden PCR-Produkt einführen. Wird als Template ein Plasmid genutzt, ist dieses anschließend in linearer Form und muss vor einer weiteren Verwendung durch Ligation wieder in seine zirkuläre Form gebracht werden (vgl. Abschn. 3.1.10). Es wurde das Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit verwendet. Primerdesign und die SDM wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.1.9 Restriktionsverdau

Bei einem Restriktionsverdau von DNA-Molekülen werden meist aus Bakterien stammende Restriktionsenzyme verwendet. Diese unterscheiden sich anhand der von ihnen spezifisch erkannten Basensequenzen, den sogenannten Restriktionstellen. Das Enzym bindet in der Nähe dieser Stellen und dessen Endonukleaseaktivität führt zu einer hydrolytischen Spaltung des DNA-Moleküls. Die Restriktion mit BsrG1 wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Bei der SmaI Restriktion wurde abweichend vom Herstellerprotokoll der Enzymeinsatz erhöht sowie die Reaktion länger durchgeführt. Es wurden zuerst für 1h bei 25°C 30U Enzym eingesetzt. Danach wurden erneut 20U Enzym hinzugeben und die Reaktion für weitere 2h bei 25°C durchgeführt.

3.1.10 Blunt-End-Ligation

Bei einer Blunt-End (*engl.* für glattes Ende) Ligation katalysiert eine Ligase die Bildung eines Phosphodiesters zwischen 5'-Phosphat und dem 3'-Hydroxyl-Ende von doppelsträngiger DNA. Als Enzym wurde die T4 DNA Ligase verwendet. Die Ligation wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.1.11 Gateway-Technologie

Die Gateway-Klonierung basiert auf dem Rekombinationssystem des Phagen λ , welches die Klonierung von DNA Fragmenten erlaubt. Zu rekombinierende Abschnitte sind dabei mit spezifischen Rekombinationssequenzen (*att*, engl. für *attachment site*) markiert (100).

In einem ersten Schritt muss dafür das zu klonierende DNA-Fragment mit diesen spezifischen Sequenzen markiert werden. Hierzu werden spezielle Primer hergestellt, die die DNA mit attB enthaltenden Sequenzen überlappen. Nach einer PCR flankieren diese attB-Sequenzen dann in der resultierenden rDNA (*recombinant DNA*, engl. für rekombinante DNA) das zu klonierende DNA-Fragment.

In einem zweiten Schritt wird durch den Enzymmix BP-Clonase aus der rDNA und einem Donor-Vektor ein Eintritts-Klon hergestellt. Der Donor-Vektor, in den das DNA-Fragment eingebracht werden soll, trägt dabei, flankiert von attP-Sequenzen, das Gen *ccdB* (*control of cell death*, engl. für Toxingen B des *ccd*-Systems). Die *ccdB*-Sequenz ist ein Selbstmord-Gen welches einen Gyrase-Hemmer kodiert, wodurch mit dem Donor-Vektor transformierte Bakterien am Wachstum gehindert werden. Die BP-Clonase rekombiniert nun spezifisch das mit attB flankierte DNA-Fragment mit der mit attP flankierten *ccdB*-Sequenz. Zusätzlich enthalten die Vektoren eine CmR (Chloramphenicol-Resistenzgen). Durch die BP-Clonase ist so ein Eintritts-Klon entstanden, in welchem das DNA-Fragment von attL flankiert wird.

In einem dritten Schritt erfolgt durch den Enzymmix LR-Clonase die Rekombination des Eintritts-Klons mit einem Ziel-Vektor, wodurch ein sogenannter Expressions-Klon entsteht. Die LR-Clonase rekombiniert dabei wiederum das mit attL flankierte DNA-Fragment auf dem Eintritts-Klon mit attR flankiertem ccdB auf dem Ziel-Vektor. Der Expressions-Klon kann anschließend für eine Transfektion genutzt werden.

Eine Erweiterung dieses Systems stellt die MultiSite-Gateway-Klonierung da. Durch diese Technik können in einem Reaktionsschritt mehrere DNA-Fragmente in einen Eintritts-Klon eingefügt werden. Hierbei werden bei der Herstellung der rDNA zusätzliche attB-Sequenzen verwendet. Bei der Klonierung mittels BP-Clonase kommt es zu einer spezifischen Überlappung dieser Sequenzen und somit zu einem geordneten Einbau von mehreren rDNA-Fragmenten. Es wurde das Gateway-Kit von Invitrogen verwendet. Die Produkte wurden in NEB 10-beta competent E.coli transformiert. Die Gateway-Rekombination wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.1.12 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels Photometer

Die Messung der Konzentration an Nukleinsäuren in einer Lösung erfolgte durch Spektrometrie. Nukleinsäuren haben bei $260nm$ ein Absorptionsmaximum. Durch Bestrahlung mit dieser Wellenlänge kann so die OD (optische Dichte) dieser Lösung bestimmt werden. Mittels des Beer-Lambert-Gesetzes lässt sich so mit der OD_{260nm} die Konzentration bestimmen.

Zusätzlich lassen sich mittels Spektrometrie auch Rückschlüsse auf die Reinheit einer Probe ziehen. Eine häufige Verunreinigungsquelle sind Proteine. Proteine haben bei $280nm$ ein Absorptionsmaximum. Mittels der gleichen Technik lässt sich die OD_{280nm} bestimmen. In Relation zur OD_{260nm} ergibt sich so eine R (*ratio*, engl. für Verhältnis). Die $R_{260nm/280nm}$ erlaubt damit einen Hinweis auf eine Verunreinigung der Probe mit Proteinen. Im Allgemeinen wird eine $R_{260nm/280nm}$ von ≈ 1.8 für DNA und ≈ 2.0 für RNA als rein angesehen. Für die Spektrometrie wurde ein Ultraspec 3000 UV/Visible Spectrophotometer (Pharmacia Biotech Uppsala, SWE) verwendet. Vor den Messungen wurde das Spektrometer zuerst mit ddH_2O auf null kalibriert. Die zu messende Lösung wurde vorher um den Faktor 40 verdünnt.

3.1.13 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese können Moleküle anhand ihrer Größe aufgetrennt und differenziert werden. In dieser Arbeit wurde sie zum Nachweis von DNA verwendet. Die zu untersuchenden DNA-Proben werden dabei in Geltaschen eines Agarosegels eingebracht, welches mit DNA-bindendem Farbstoff versetzt ist. Wird nun ein elektrisches Feld angesetzt, wirkt auf die negativ geladene DNA eine Kraft in Richtung der Anode. Die Molekülverbindungen des Agarosegels bilden nun einen Widerstand, welcher größere Moleküle stärker bremst als kleinere. Nach einiger Zeit kommt es dadurch zu einer größenabhängigen Auftrennung der DNA in verschiedene Banden. Durch den DNA-bindenden Farbstoff können diese unter UV-Licht ($312nm$) sichtbar gemacht und fotografiert werden. Anhand einer mit aufgetragenen DNA-Leiter kann die Größe der die Banden widerspiegelnden DNA-Fragmente abgeschätzt werden.

Als DNA-bindender Farbstoff wurde GelRed verwendet. Die Auswertung der Elektrophorese wurde mittels UVsolo TS Imaging System durchgeführt.

Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden durch kurzes Aufkochen 1 – 2% Agarose in TBE-Puffer gelöst. Nach Abkühlen auf $< 70^\circ C$ wurde GelRed hinzugefügt. Das Gel wurde in eine Gelkammer gegossen und durch einen zuvor eingelegten Platzhalter die Geltaschen gebildet. Nach vollständigem

Erstarren wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine Elektrophoresekammer mit 0,5% TBE-Puffer gelegt. Danach wurden die einzelnen DNA-Proben mit dem Ladepuffer in die einzelnen Geltaschen gefüllt. Zur Größenabschätzung wurden auch 0,25 μ g einer DNA-Leiter (100bp und 1kb) in eine Geltasche aufgetragen. Unter dem Ansetzen von einer Spannung von $\approx 0,5V/cm$ der Laufstrecke wurden die DNA-Fragmente aufgetrennt. Schlussendlich erfolgte die Dokumentation mittels UVsolo TS Imaging System.

3.1.14 Sequenzanalyse

Zur Sequenzanalyse wurde eine Abwandlung der Sanger-Sequenzierung verwendet. Der erste Schritt wird dabei durch eine DNA-Polymerase durchgeführt. Diese polymerisiert ab einer durch einen Primer vorgegebenen Sequenz einen komplementären DNA-Strang zum DNA-Template. Neben der für diese Reaktion nötigen dNTPs wird in geringer Konzentration auch fluoreszierendes ddNTP (Didesoxyribonukleosidtriphosphat) hinzugeben. Solche ddNTPs verhindern nach dem Einbau in den neuen komplementären DNA-Strang eine weitere Polymerisation. Da dieser Einbau zufällig geschieht, ergeben sich prinzipiell ab der Primer Sequenz Stränge jeder Länge. Diese werden in einem zweiten Schritt in einer kapillären Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Zuletzt wird mittels eines Lasers das Fluoreszenzmuster der Kapillare Ausgelesen, woraus sich die Sequenz ableiten lässt.

Die Sequenzanalysen wurden mit einem 3730 DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific *Waltham, USA*) durch die Firma StarSEQ (*Mainz, DE*) durchgeführt.

Für die Sequenzierung wurden 600 – 700ng Plasmid-DNA mit 10pmol Primer angesetzt. Danach wurde der Ansatz mit ddH₂O auf 7 μ l aufgefüllt und an die Firma StarSEQ geschickt. Die Analyse der Sequenzdaten wurde mittels der Software UGENE (Unipro *Novosibirsk, RU*) durchgeführt.

3.2 Zellbiologie

3.2.1 Zellkultur

Für die hier verwendeten Zelllinien wurde bei einer Temperatur von 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95% und einer CO₂-Konzentration von 5% in einem Inkubator kultiviert. Zur Sicherung der Sterilität wurden, bis auf die Auszählung und Mikroskopie, sämtliche Arbeiten unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Adhärente Zellen wurden bei 90% Konfluenz passagiert. Es erfolgte hierzu nach einer Inkubation mit Trypsin-EDTA für 5min eine mechanische Lösung der Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen. Anschließend wurden die Zellen in PBS suspendiert und abzentrifugiert (1500rpm für 5min). Nach Resuspendierung im entsprechenden Zellkulturmedium erfolgte die Zählung (vgl. Abschn. 3.2.2) der Zellen und Aussat in einer für die Zelllinie spezifischen Dichte.

Bei Suspensionszellen erfolgte Zählung und Passage zweimal pro Woche.

Tabelle 19: Verwendete Zelllinien, deren Adhärenz und Medien

Zelllinie	Adhärenz	Medium
Ma-Mel-86B_KO ^{CIITA}	ja	RPMI _{PS}
Ma-Mel-86B_KO ^{CIITA} _CD80 ^{hi} _CD83 ^{hi}	ja	RPMI _{PS}
HEK293T_KO ^{B2M/CIITA}	ja	RPMI _{PS}
K562	nein	RPMI _{PS}
Phoenix-Ampho	ja	DMEM _{Phoenix-Ampho}
PBMC	nein	AIM V _{HS}
UCBMC	nein	AIM V _{HS}

3.2.2 Zellzahlbestimmung

In einer Zählkammer, welche mit einem Glasplättchen verschlossen wird, bildet sich ein zu einer Seite geöffneter Raum definierter Höhe. Auf dem Boden der Zählkammer ist ein Gitternetz definierten Ausmaßes markiert. Das Gitternetz auf der Zählkammer teilt diesen in viele virtuelle Räume bekannter Ausmaße. Nach Einfügen einer homogenen Zellsuspension lassen sich die Zellen in den virtuellen Räumen mittels Mikroskop zählen. Entsprechend der Formel in Gl. 1 lässt sich die Konzentration der Ursprungslösung errechnen.

$$\frac{\text{Zellzahl} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 1000}{\text{Kammertiefe}[\text{mm}] \cdot \text{Gitterfläche}[\text{mm}^2]} = \text{Zellzahl}/\text{ml} \quad (1)$$

Zur Vitalitätsbestimmung wurde zusätzlich eine Anfärbung mit Trypanblau durchgeführt. Hierbei werden Zellen ohne intakte Zellmembran blau eingefärbt, wodurch sie bei der Zellzählung leicht identifiziert werden können.

Zur Auszählung wurde die Zählkammer zuerst mit ddH₂O gereinigt und getrocknet sowie eine Deckplatte aufgebracht. Zellen wurden wie in Abschn. 3.2.1 in Suspension gebracht und $\approx 1 : 5$ mit Trypanblau angefärbt. Anschließend wurde die Zellsuspension durch wiederholte Resuspension oder Vortexen gemischt und auf die Kammer aufgetragen. Danach wurde die Kammer in das Mikroskop eingespannt und die Zellen mittels eines Handzählers gezählt. Dabei wurden nicht gefärbte Zellen in der Gitterfläche sowie auf den Grenzlinien oben und links mitgezählt. Schließlich wurde mittels Gl. 1 die Konzentration bestimmt.

3.2.3 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen in ihren Medien abzentrifugiert und die Zellpellets in 1ml FCS_{DMSO} oder im Fall von PBMC und UCBMC in 1ml HS_{DMSO} gelöst und in Cryo-Röhrchen überführt. Diese wurden in flüssigem Stickstoff abgekühlt und dann für mindestens 24h in einem Tiefkühlager-schrank zwischengelagert. Danach erfolgte die Einlagerung in der Stickstoffbank.

Zum Auftauen wurden die Röhrchen zügig aufgewärmt, der Inhalt in einem entsprechenden Kulturmedium verdünnt und anschließend zentrifugiert. Dieses wurde zweimal wiederholt und nach Zählung der überlebenden Zellen (vgl. Abschn. 3.2.2) in Zellkulturflaschen ausgesät.

3.2.4 Transfektion mittels Lipofectamine

Als Transfektion wird das Einbringen von genetischem Material in eukaryontische Zellen bezeichnet. In Lipofectamine sind kationische Lipidmoleküle enthalten, welche Komplexe mit DNA bilden können. Diese Komplexe können mit der Zellmembran fusionieren und somit die enthaltene genetische Information in das Zellinnere freisetzen. Hier kann diese dann durch die zelleigene Proteinbiosynthese prozessiert werden (101). Lipofectamine wurde in dieser Arbeit zur Ausstattung von HEK293T_KO^{B2M/CIITA} mit cDNA von *CSF2RA* und *TRP2* verwendet. Die transiente Transfektion erfolgte dabei in den für den ELISpot verwendeten MultiScreen Filterplatten. Dafür wurden die MultiScreen Filterplatten zunächst dreimal mit PBS gewaschen (vgl. Abschn. 3.2.13). Im Anschluss wurden pro Well $2 \cdot 10^4$ Zellen mit $120\mu\text{l}$ RPMI ausplattiert. Parallel wurde in einer anderen 96-Well-Rundbodenplatte pro Well $0,4\mu\text{l}$ Lipofectamine 2000 in $21\mu\text{l}$ RPMI gemischt und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 300ng der verwendeten cDNA in $12\mu\text{l}$ RPMI pro Well hinzugegeben, gemischt und erneut für 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurden $30\mu\text{l}$ dieser Suspension pro Well zu den vorgelegten HEK293T_KO^{B2M/CIITA} auf die MultiScreen Filterplatten gegeben. Es erfolgte eine erneutes Mischen und eine Inkubation für 24h bei 37°C . Zuletzt wurden $100\mu\text{l}$ des Überstandes verworfen und die jeweiligen Effektorzellen zu den MultiScreen Filterplatten hinzugegeben. Danach konnte mit der ELISpot Analyse fortgefahren werden.

3.2.5 Transfektion mittels FuGENE6

Das prohibitorische FuGENE6 System basiert ähnlich des Lipofectamine aus kationischen Lipiden. Der genaue Mechanismus war jedoch nicht öffentlich zugänglich (102). Es wurden $60\mu\text{l}$ FuGENE6 mit $800\mu\text{l}$ DMEM_{Trans} für 5min inkubiert. Danach wurde die zu übertragene DNA hinzugefügt und es erfolgte eine weitere Inkubation für 15min . Anschließend wurde die Lösung auf die vorbereiteten Zellen aufgetragen und diese für 24h bei 37°C inkubiert. Abschließend erfolgte ein erneuter Wechsel des Mediums zu einem der Zelle entsprechenden Kulturmedium.

3.2.6 Retrovirale Transduktion

Die Transduktion ist eine Form der Transfektion, bei welcher genetisches Material viral in eukaryontische Zellen eingebracht wird. Zur Produktion der Virione wird eine Produktionzelle durch Transfektion mit einem Transferplasmid und den nötigen viralen Bausteinen ausgestattet. Diese bestehen in dem hier verwendeten System aus den zwei Helferplasmiden pHIT60 und pCOLT-GALV sowie einem speziellen Vektor, welcher die zu übertragende Sequenz enthält. pHIT60 kodiert dabei für gag und pol, welche Gene des MLV (*murine leukemia viruses*, engl. für murines Leukämievirus) sind und Polymerase- und Strukturproteine bereitstellen. pCOLT-GALV hingegen kodiert mit dem Gen env das Hüllenprotein des Gibbonaffen-Leukämievirus (GALV). Werden so transduzierte Zellen in Kultur gebracht, kommt es zu einer lysogenen Vermehrung der Virione. Diese finden sich im Verlauf in dem Überstand der Zellkultur und können für die Infektion von Zielzellen verwendet werden (103,104). Die folgenden Schritte erfolgten in einem Gentechniklabor der Sicherheitsstufe 2. Zuerst wurden Phoenix-Ampho-Zellen in frischem DMEM_{Trans} ausgesetzt und nach 4h mittels FuGENE6 transduziert (vgl. Abschn. 3.2.5). Dabei wurden neben $10\mu\text{g}$ des Transferplasmides jeweils $5\mu\text{g}$ der Helferplasmide pHIT60 und pCOLT-GALV in die Zellen eingebracht.

Nach 24h folgte der Mediumwechsel auf RPMI_{PS}. Darauf wurde am Folgetag durch Zentrifugation bei 2000rpm für 10min der Überstand getrennt. Diesem wurde 1 : 1000 Polybrene hinzugefügt und mit den Zielzellen in 24-Well Platten ausgesetzt. Zur Verdichtung erfolgte eine erneute Zentrifugation mit 2500rpm bei 32°C für 90min. Am Folgetag wurde das Medium erneut mit RPMI_{PS} erneuert. Nach zwei weiteren Tagen erfolgte die Klonierung der Zellen (vgl. Abschn. 3.2.7). Zwei Wochen nach Transduktion wurden die transgenen Zellen wieder in ein Gentechniklabor der Sicherheitsstufe 1 überführt. Im Verlauf erfolgte die Auswahl eines erfolgreich transduzierten Klons mittels Durchflusszytometrie (vgl. Abschn. 3.2.8).

3.2.7 Klonierung von Zellen mittels Grenzverdünnungsverfahren

Die Klonierung der Zellen erfolgte mittels Grenzverdünnungsverfahren. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten mit Rundbodenform durchgeführt. Nach Zellzählung wurde die Konzentration durch Verdünnung mit RPMI_{PS} auf 3 Zellen pro Milliliter eingestellt. Von der Lösung wurden jeweils 100µl in die einzelnen Wells der Platten pipettiert, wodurch rechnerisch 0,3 Zellen pro Well ausgesät wurden. Es erfolgte die weitere Kultivierung der Zellen und das Überführen angewachsener Klone in 24-Well-Platten und schließlich in Zellkultur-Platten.

Mit Hilfe der Poisson-Verteilung (vgl. Gl. 2) ließ sich berechnen, ob die proliferierenden Kolonien aus einer Zelle hervorgingen.

$$p(m) = \frac{(u \cdot e^{-u})}{(1 - e^{-u})} \quad (2)$$

3.2.8 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen in einer dünnen Kapillare durch eine Messelektronik geleitet. Diese kann zum Beispiel aus einem Laser und einem Photometer bestehen. Durch den Laser kommt es dabei zu einer spezifischen Anregung einer Fluoreszenz, deren Ausmaß von einem Photometer gemessen wird. Dieses kann durch eine Expression von fluoreszierenden Proteinen oder durch gebundene fluoreszierende Antikörper verursacht sein. Solche fluoreszierenden Antikörper können im Vorfeld an Antigene der zu untersuchenden Zellen gebunden werden, um diese nachzuweisen.

Um hierbei eine unspezifische Bindung von Fc-Fragmenten des über das Fab-Fragment spezifisch bindenden fluoreszierenden Antikörpers auszuschließen, wird eine Isotyp-Kontrolle durchgeführt. Dabei wird ein, mit dem gleichem Fluorochrom und Fc-Fragment-Fragment, aber ohne spezifisches Fab-Fragment ausgestatteter Antikörper eingesetzt, um eine Hintergrundfluoreszenz zu bestimmen.

Als Fluoreszenzmoleküle wurden FITC (Fluorescein isothiocyanate) und PE (Phycoerythrin) verwendet. Zusätzlich zu der Fluoreszenz lassen sich durch bei den Messungen entstehendes Streulicht Rückschlüsse auf Größe und Granularität der Zellen schließen.

Die Untersuchung wurden in einem BD FACS Diva (BD Biosciences Heidelberg, DE) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels FlowJo Vers 7.6.5 (Tree Star Inc. Ashland, US).

Die Zelllösung wurde nach zweimaligem Waschen mit FACS Puffer auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^5$ in 200µl eingestellt. Dann wurden 5µl eines mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpers zugefügt und für 20min bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut einmalig mit FACS

Puffer gewaschen und in 200 μ l FACS Fixierungs-Lösung aufgenommen.

3.2.9 Gewinnung von Nabelschnurblut

Nabelschnurblut wurde *post partem* durch Punktion einer Nabelschnurvene aus Nabelschnur und Plazenta gesunder Lebendgeborener gewonnen. Es wurden 10ml Spritzen mit jeweils 1ml entsprechend 5000 I.E. Heparin steril vorbereitet. Nach erfolgter Trennung der Nabelschnur und Beendigung der Nachgeburt wurde die Nabelschnurvene punktiert und das Blut entnommen. Nach mehrfachen Wenden der Spritze wurde das Blut zügig in das Labor transportiert und dort weiterverarbeitet.

3.2.10 Isolierung humaner peripherer Leukozyten

Zur Gewinnung von PBMC bzw. UCBMC wurden die Leukozyten aus Nabelschnur-Vollblut isoliert. Die Isolierung erfolgte durch eine Ficoll-basierte Dichtegradientenzentrifugation. Dabei bilden die Leukozyten eine Phase zwischen Blutplasma und in Ficoll befindlichen weiteren zellulären Blutbestandteilen. Vollblut wurde dabei zuerst 1 : 2 mit PBS verdünnt und anschließend in 50ml Röhrchen auf 15ml Ficoll aufgeschichtet. Nach Zentrifugation für 15min bei 2500rpm wurde der Stillstand der Zentrifuge ohne zusätzliche Bremsung abgewartet. Danach wurde die weiße Leukozyten-Schicht auf dem Ficoll mittels einer Pipette abgetragen, zweimalig mit PBS gewaschen und danach weiterverwendet.

3.2.11 Magnetische Zellseparation

Bei der MACS (*magnetically activated cell sorting*, engl. für magnetisch aktivierte Zellseparation) werden einer Zelllösung Antikörper hinzugefügt, die mit supraparamagnetischen Nanopartikeln verbunden sind. Relevante Zellen, die ein entsprechendes Antigen tragen, werden so magnetisch markiert. Zur Trennung wird eine im Inneren mit Stahlwolle versehene Auffangssäule zwischen starken Permanentmagneten eingespannt. So bildet sich ein starkes Magnetfeld, welches die markierten Zellen beim Durchspülen der Lösung zurückhält. Durch mehrmaliges Spülen mit einem Puffer wird die Säule weiter von nicht markierten Zellen gereinigt. Der so aufgefangene Durchfluss ist negativ selektioniert, die Zellen enthalten zu einem großen Teil nicht das Antigen. Nach Entfernen aus dem Magneten können die markierten Zellen durch erneutes Spülen von der Säule gelöst werden. Die so aufgefangenen Zellen sind positiv selektioniert und enthalten zu einem wesentlich Teil das Antigen.

Die Sortierung der Zellen wurden mittels des Kits MACS MicroBead Separation (Miltenyi Biotec *Bergisch Gladbach, DE*) durchgeführt. Die MACS wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.12 T-Zell Stimulation

Die Anreicherung von tumorreaktiven T-Zellen erfolgte durch Stimulation von PBMC mit Tumorzellen in MLTC (*mixed lymphocyte-tumor cell culture*, engl. für gemischten Lymphozyten-Tumorzellkulturen). Bei wiederholter Stimulation mit einem Stimulator kommt es zur Selektion und Proliferation von reaktiven T-Zellen.

Dieses wird durch die Zugabe von Interleukinen unterstützt. Die genaue Beschreibung der in dieser Arbeit durchgeführten Stimulation erfolgt in Abschn. 4.2.2.

3.2.13 IFN- γ -ELISpot-Assay

Zur Messung der Reaktivität von T-Zellen wurde ein IFN- γ -ELISpot-Assay verwendet. Bei Aktivierung von T-Zellen wird, neben anderen Zytokinen, IFN- γ freigesetzt. Beim ELISpot wird der IFN- γ -bindende Primärantikörper (anti-human IFN- γ mAb 1-D1K) an eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid-Membran) gebunden. Nach Inkubation werden ungebundene Primärantikörper durch Waschen entfernt. Danach werden T-Zellen zugegeben, die sich als homogene Zellschicht auf der Membran absetzen. Freie Bindungsstellen der Membran werden durch Nutzung serumhaltigen Mediums blockiert. Nach Zugabe des zu testenden Ziels wird die Membran inkubiert, Zellreste abgewaschen sowie ein Detektionsantikörper (anti-human IFN- γ mAb 7-B6-1) zugegeben. Dieser ist wiederum in der Lage IFN- γ an einem zweiten Epitop zu binden und wurde zusätzlich biotinyliert. Nach erneuter Inkubation und Abwaschen von freien Detektionsantikörper wird nun eine Avidin-Peroxidase-Lösung hinzugegeben. Die enthaltene, an Avidin gebundene, Peroxidase bindet an den biotinylierten Detektionsantikörper, der wiederum an die PVDF-Membran gebundenen ist. Nach Zugabe von Peroxidase-Substrat-Lösung setzt die gebundene Peroxidase das Substrat um, welches als nun roter Punkt auf der Membran sichtbar wird und die Reaktivität der dort im Vorfeld lokalisierten T-Zellen nachweist.

Die Reaktionen wurden in MultiScreen Filterplates, S2EM004M99 (Merck Millipore *Carrigtwohill, IRL*) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte in CTLImmunoSpot S6 Micro Analyzer mittels der Software ImmunoSpot (C.T.L.-Europe GmbH *Bonn, DE*).

Die Durchführung erfolgte nach Britten et al. (105). Die Elispotplatten wurden mit $15\mu\text{l}$ Ethanol_{35%} aktiviert und dreimal mit $150\mu\text{l}$ PBS gewaschen. Es wurden 500ng Primärantikörper in $50\mu\text{l}$ PBS hinzugefügt und anschließend bei 4°C für 24h inkubiert. Danach erfolgte ein erneutes dreimaliges Waschen mit $150\mu\text{l}$ PBS sowie das Zufügen der T-Zellen und Zielzellen in RPMI_{FCS}. Es folgte wieder eine Inkubation bei 37°C für 24h sowie sechsmaliges Waschen mit ELISpot Wasch-Lösung. Daraufhin wurde $2\mu\text{g/ml}$ Detektionsantikörper in $60\mu\text{l}$ in PBS_{BSA} zugegeben und erneut bei 37°C für 2h inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit ELISpot Wasch-Lösung wurden $100\mu\text{l}$ Avidin-Peroxidase-Lösung hinzugefügt und es erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 2h im Dunkeln. Es folgte dreimaliges Waschen mit ELISpot Wasch-Lösung und dann Hinzufügen von $100\mu\text{l}$ Peroxidase-Substrat-Lösung mit anschließender Inkubation für 10min . Danach wurde die Reaktion durch Spülen mit fließendem Wasser gestoppt. Nach Trocknung erfolgte eine Digitalisierung der Platten und anschließend die computergestützte Auswertung mit den automatischen Einstellungen der Software.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte Nabelschnurblut auf das Vorkommen von HLA-unabhängigen, tumorreaktiven T-Zellen überprüft werden. Zur Stimulation von solchen HLA-unabhängigen Effektorzellen wurde die Zelllinie Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} generiert (vgl. Abschn. 4.1). Als Effektorzellen wurden CD3⁺ T-Zellen aus Nabelschnurblut isoliert (vgl. Abschn. 4.2.1) und anschließend mit Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} stimuliert (vgl. Abschn. 4.2.2). Schließlich wurden die CD3⁺ T-Zellen in einem ersten ELISpot auf Reaktivität gegen Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} (vgl. Abschn. 4.2.3) und danach in einem zweiten ELISpot zur weiteren Einordnung der Reaktivität gegen verschiedene weitere Zielzellen getestet (vgl. Abschn. 4.2.4).

4.1 Herstellung der Stimulatorzelle aus einer HLA-negativen Melanomzelllinie

Für die Konstruktion der Stimulatorzelle wurde als Grundlage die HLA-I/II-negative Zelllinie Ma-Mel-86B_KO^{CIITA} verwendet. Sie wurde aus Ma-Mel-86B aus dem Ma-Mel-86 Melanommodell hergestellt (vgl. Abschn. 2.11.1). Sie exprimierte somit auch die Oberflächenproteine CSF2RA und TRP2. In vorherigen Arbeiten wurde für die Oberflächenproteine CSF2RA und TRP2 eine HLA-unabhängige Erkennung durch melanomreaktive CD8⁺ T-Zellen aus Blut der Patientin Ma-Mel-86 gezeigt (11). Ma-Mel-86B_KO^{CIITA} wurde in dieser Arbeit zusätzlich mit CD80 und CD83 ausgestattet. Hierfür wurde ein bicistronisches Konstrukt generiert (vgl. Abschn. 4.1.1) und retroviral transduziert (vgl. Abschn. 4.1.2), wodurch die Zelllinie Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} gebildet wurde.

4.1.1 Konstruktion eines bicistronischen Konstrukts für CD80 und CD83

Für die Konstruktion des bicistronischen Konstrukts wurde das Gateway-Verfahren (vgl. Abschn. 3.1.11) verwendet. Es wurden zuerst spezifische Primer für die PCR von *CD80*- und *CD83*-kodierender cDNA generiert. Diese Primer sollten die für die Klonierung und Expression nötigen Sequenzen in die resultierende rDNA einbringen. Die rDNA wurde mit Hilfe der Primer durch PCR aus cDNA von humanen PBMC hergestellt (vgl. Abschn. 4.1.1.1). Anschließend wurde sie zur Konstruktion eines *CD80*- und *CD83*-cDNA enthaltenden Donor-Vektors (vgl. Abschn. 4.1.1.2) verwendet. Dieser wurde schließlich in einen transduzierbaren Expressions-Klon überführt (vgl. Abschn. 4.1.1.3).

4.1.1.1 Herstellen von rDNA für *CD80* und *CD83*

Es wurden zunächst aus Humanblut PBMC isoliert (vgl. Abschn. 3.2.10). Hieraus wurde mittels RT-PCR (vgl. Abschn. 3.1.7) cDNA gewonnen. Um rDNA zu generieren, welche sowohl zum Gateway-Verfahren kompatibel ist als auch cDNA für *CD80* und *CD83* enthält, mussten zunächst entsprechende Primerpaare entworfen werden. Die Primerpaare bestanden, neben Abschnitten von *CD80* und *CD83*, aus den für die Gateway-Klonierung nötigen att-Sequenzen und einer P2A-Sequenz zur kotranslationalen Trennung der flankierenden Proteine. Zusätzlich wurden zwei SmaI-Erkennungssequenzen eingebracht, um nach der Klonierung die att-Sequenz zwischen P2A und *CD83* durch einen Restriktionsverdau mit SmaI entfernen zu können.

Für *CD80* bestand der positiv-strängige Primer attB1_CD80.se somit aus der komplementären Sequenz für attB1 sowie dem Anfang des *CD80*-Gens. Der negativ-strängige Primer attB5r_SmaI_CD80.rev

bestand aus dem Endteil des *CD80*-Gens, P2A, sowie der Erkennungssequenz für *SmaI* und *attB5r* (vgl. Abb. 2).

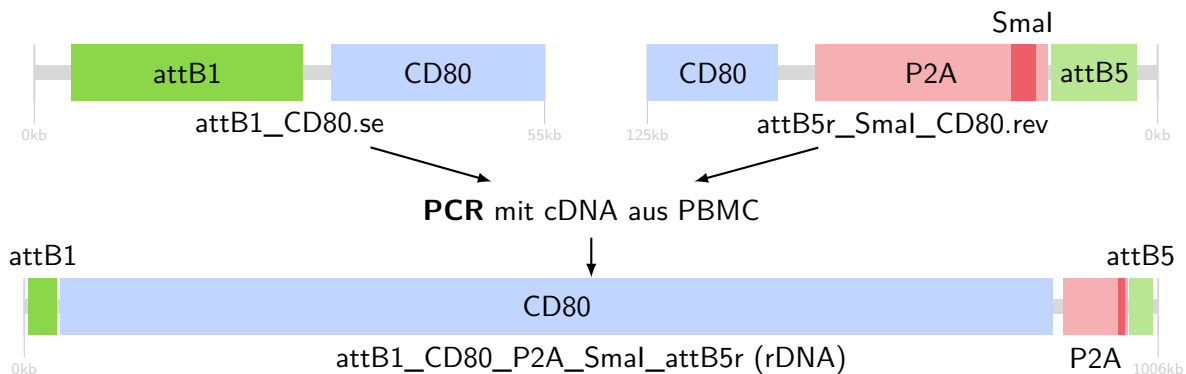


Abbildung 2: Schematische Darstellung der PCR für *CD80* mit cDNA aus PBMC als Template. Als Primer wurden *attB1_CD80.se* und *attB5r_SmaI_CD80.rev* verwendet (Sequenz vgl. Abschn. 2.6). Als Produkt resultiert die rDNA *attB1_CD80_P2A_SmaI_attB5r*.

Für *CD83* bestand der positiv-strängige Primer *attB5_SmaI_CD83.se* entsprechend aus der komplementären Sequenz für *attB5*, *SmaI*-Schnittstelle sowie dem Anfang des *CD83*-Gens. Der negativ-strängige Primer *attB2_CD83_STOP.rev* setzt sich aus dem Endteil des *CD83*-Gens, *attB2* und, zum Abbruch der Translation, einem *STOP*-Codon zusammen (vgl. Abb. 3).

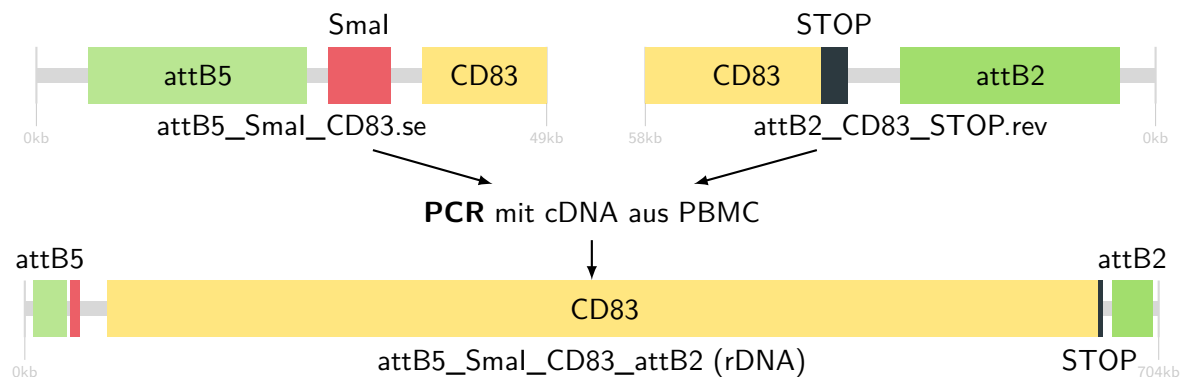


Abbildung 3: Schematische Darstellung der PCR für *CD83* mit cDNA aus PBMC als Template. Als Primer wurden *attB5_SmaI_CD83.se* und *attB2_CD83_STOP.rev* verwendet (Sequenz vgl. Abschn. 2.6). Als Produkt resultiert die rDNA *attB5_SmaI_CD83_attB2*.

Mit beiden Primerpaaren und der cDNA der PBMCs wurde mittels PCR (vgl. Abschn. 3.1.6) die beiden rDNAs *attB1_CD80_P2A_SmaI_attB5r* und *attB5_SmaI_CD83_attB2* hergestellt. Diese wurden anschließend aufgereinigt (vgl. Abschn. 3.1.5) und mittels Gelelektrophorese und der mitgeführten DNA-Leiter (vgl. Abschn. 3.1.13) auf die korrekte Länge kontrolliert.

4.1.1.2 Konstruktion eines Eintritts-Klons mit cDNAs für *CD80* und *CD83*

Zuerst wurde aus der rDNA *attB1_CD80_P2A_SmaI_attB5r* mittels einer BP-Clonase-Reaktion mit *pDONR221_attP1_ccdB_attP5r* der erste Eintritts-Klon (EiK 1) kloniert. Hierbei kommt es zu einem Austausch des Selbstmord-Gens *ccdB* von *pDONR221_attP1_ccdB_attP5r* mit der hergestellten rDNA (vgl. Abb. 4).

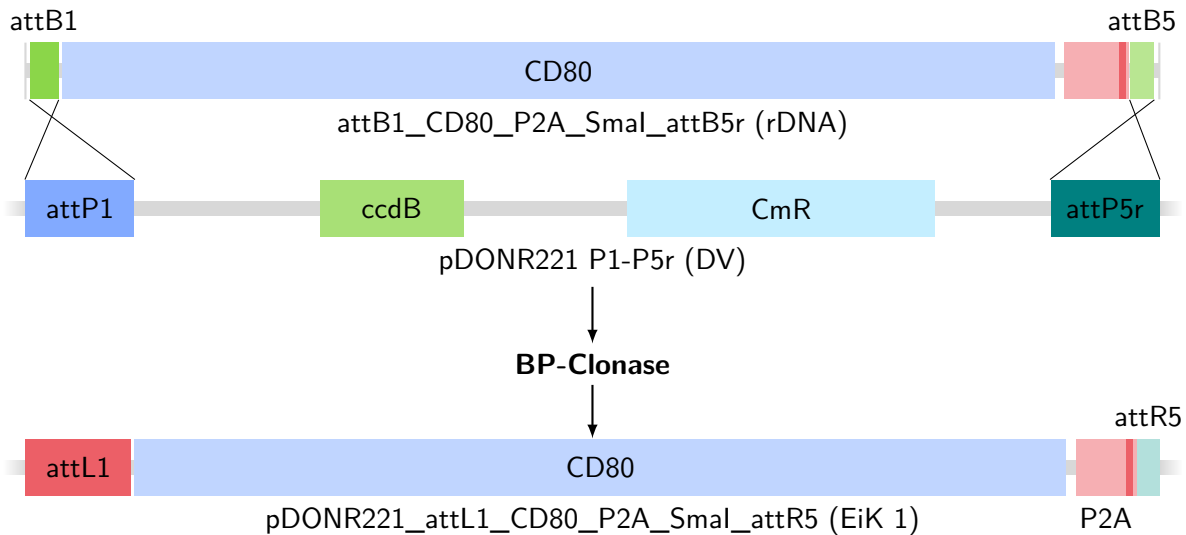


Abbildung 4: Schematische Darstellung der BP-Clonase-Reaktion mit der rDNA *attB1_CD80_P2A_SmaI_attB5r* und dem Donor-Vektor (DV) *pDONR221 P1-P5r* sowie des resultierenden ersten Eintritts-Klons (EiK 1) *pDONR221_attL1_CD80_P2A_SmaI_attR5*.

Bei der Sequenzierung (vgl. Abschn. 3.1.14) des entstanden ersten Eintritts-Klons (EiK 1) zeigte sich jedoch ein Polymorphismus in dem klonierten Gen für *CD80*, welcher eine weitere *SmaI*-Restriktionsstelle generierte. Da jedoch im Verlauf ein Verdau mit *SmaI* geplant war, musste diese im Vorfeld entfernt werden. Hierfür wurde eine SDM (vgl. Abschn. 3.1.8) durchgeführt, welche eine stumme Punktmutation im Bereich der palindromischen Erkennungssequenz von *SmaI* in der Sequenz von *CD80* einführte. Dafür wurden die Primer *SDM_CD80.se* und *SDM_CD80.rev* so generiert, dass nach Durchführung einer PCR die Base 744 des *CD80*-Gens Cytosin zu Thymin ausgetauscht wird (vgl. Abb. 5). Die nach der Durchführung der PCR entstandenen *blunt ends* wurden mittels Ligation (vgl. Abschn. 3.1.10) geschlossen und die Orientierung anschließend mittels Sequenzierung geprüft.

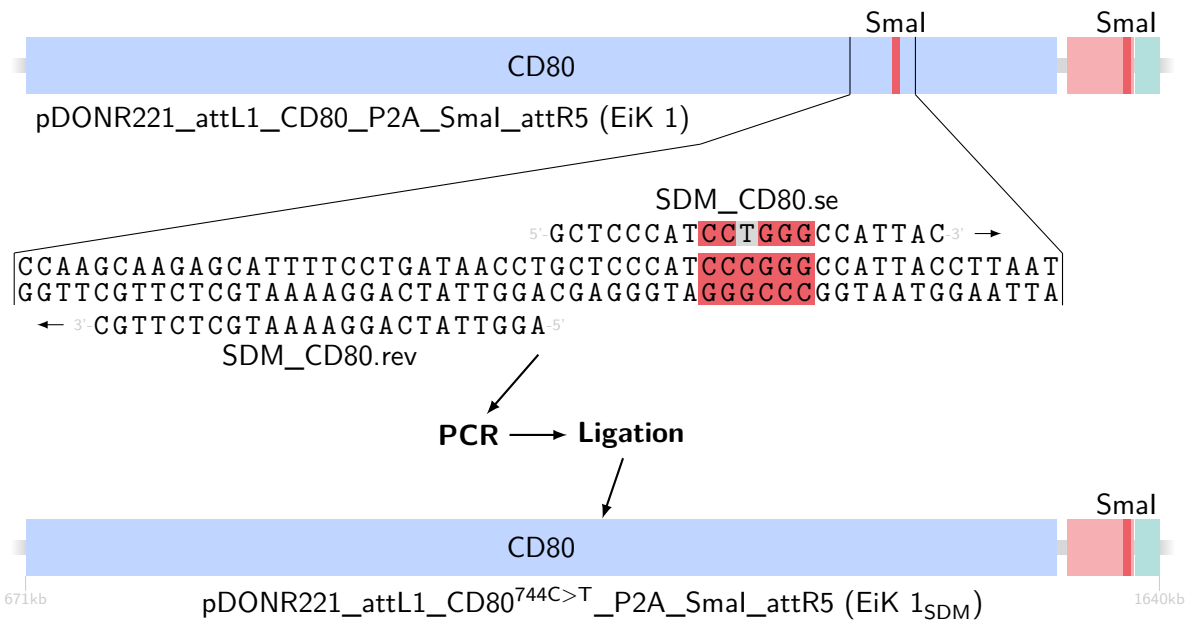


Abbildung 5: Schematische Darstellung der SDM PCR mit dem Eintritts-Klon (EiK 1) pDONR221_attL1_CD80_P2A_Smal_attR5, den Primern SDM_CD80.se und SDM_CD80.rev sowie des nach erneuter Ligation resultierenden modifizierten ersten Eintritts-Klons (EiK 1_{SDM}) pDONR221_attL1_CD80^{744C>T}_P2A_Smal_attR5.

Im Anschluss wurde analog für *CD83* aus der rDNA attB5_Smal_CD83_attB2 mittels einer erneuten BP-Clonase-Reaktionen mit dem Donor-Vektor (DV) pDONR221_attP5_ccdB_attP2 der zweite Eintritts-Klon (EiK 2) pDONR221_attL5_Smal_CD83_STOP_attL2 kloniert (vgl. Abb. 6).

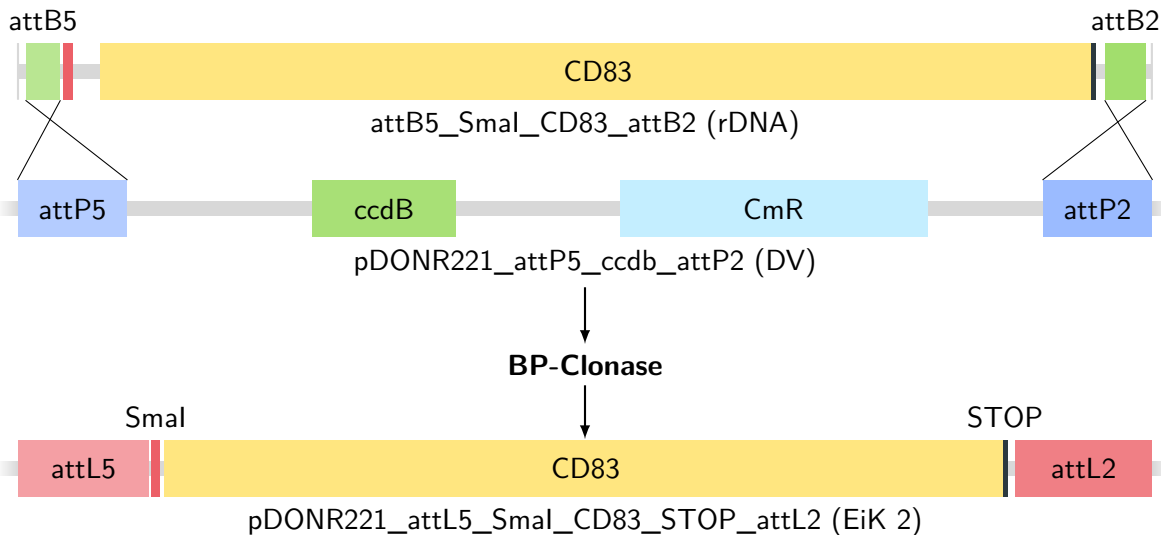


Abbildung 6: Schematische Darstellung der BP-Clonase Reaktion mit der rDNA attB5_Smal_CD83_attB2 und dem Donor-Vektor (DV) pDONR221_attP5_ccdB_attP2 sowie des resultierenden zweiten Eintritts-Klons (EiK 2) pDONR221_attL5_Smal_CD83_STOP_attL2.

Danach wurden die beiden Eintritts-Klone gemeinsam mit dem Ziel-Vektor (ZV) pcDNA3.1_DEST mittels LR-Clonase-Reaktion zu einem bicistronischen Expressions-Klon (ExK) pcDNA3.1_DEST_attB1_CD80^{744C>T}_P2A_SmaI_attB5_SmaI_CD83_STOP_attB2 kloniert (vgl. Abb. 7).

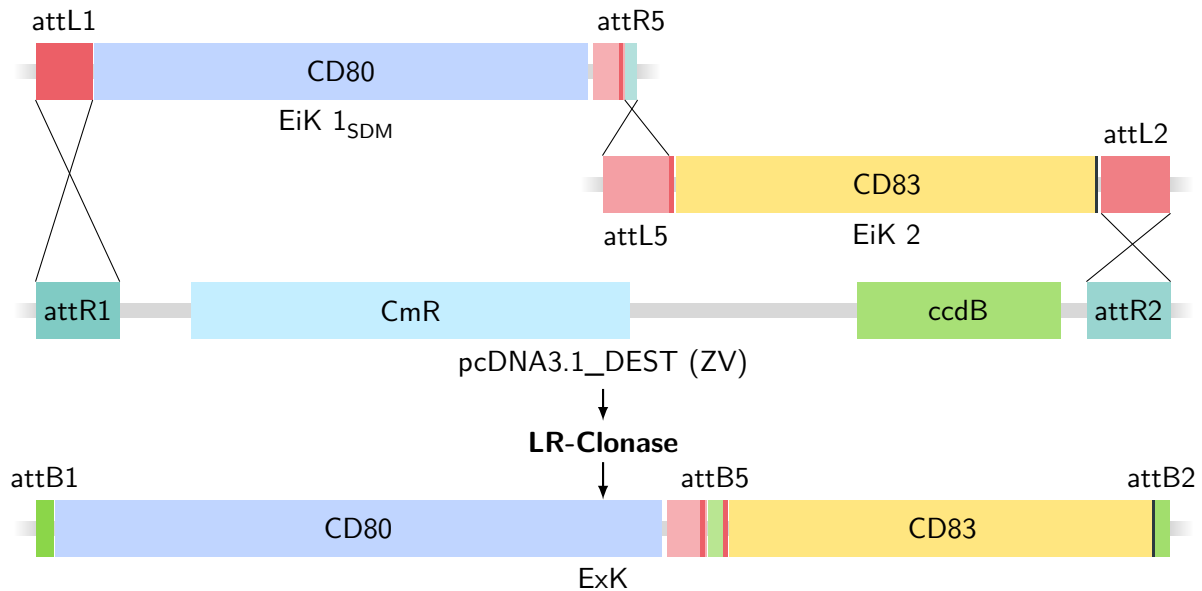


Abbildung 7: Schematische Darstellung der LR-Clonase-Reaktion mit den beiden Eintritts-Klonen (EiK 1_{SDM}) pDONR221_attL1_CD80^{744C>T}_P2A_SmaI_attR5 (EiK 1) und pDONR221_attL5_SmaI_CD83_STOP_attL2 (EiK 2) und dem Ziel-Vektor (ZV) pcDNA3.1_DEST sowie des resultierenden Expressions-Klons (ExK) pcDNA3.1_DEST_attB1_CD80^{744C>T}_P2A_SmaI_attB5_SmaI_CD83_STOP_attB2.

Da der Expressions-Klon pcDNA3.1_DEST zahlreiche SmaI-Erkennungssequenzen besitzt, wurde vor der Restriktion mit SmaI und der damit verbundenen Entfernung der verbleibenden attB5-Sequenz der Vektor erneut gewechselt. Deshalb wurde eine erneute BP-Clonase-Reaktion zurück in den keine SmaI-Erkennungssequenzen enthaltenden Donor-Vektor (DV) pDONR221_attP1_ccdB_attP2 durchgeführt (vgl. Abb. 8).

Der entstandene Donor-Vektor (DV) wurde dann mit SmaI behandelt (vgl. Abschn. 3.1.9) und mittels Gelelektrophorese und mitgeführter DNA-Leiter (vgl. Abschn. 3.1.13) auf die korrekte Länge kontrolliert. Der so entstandene Vektor pDONR221_attL1_CD80^{744C>T}_P2A_CD83_STOP_attL2 wurde danach durch Ligation (vgl. Abschn. 3.1.10) wieder in seine zirkuläre Form gebracht. Die korrekte Orientierung wurde mittels Sequenzierung geprüft.

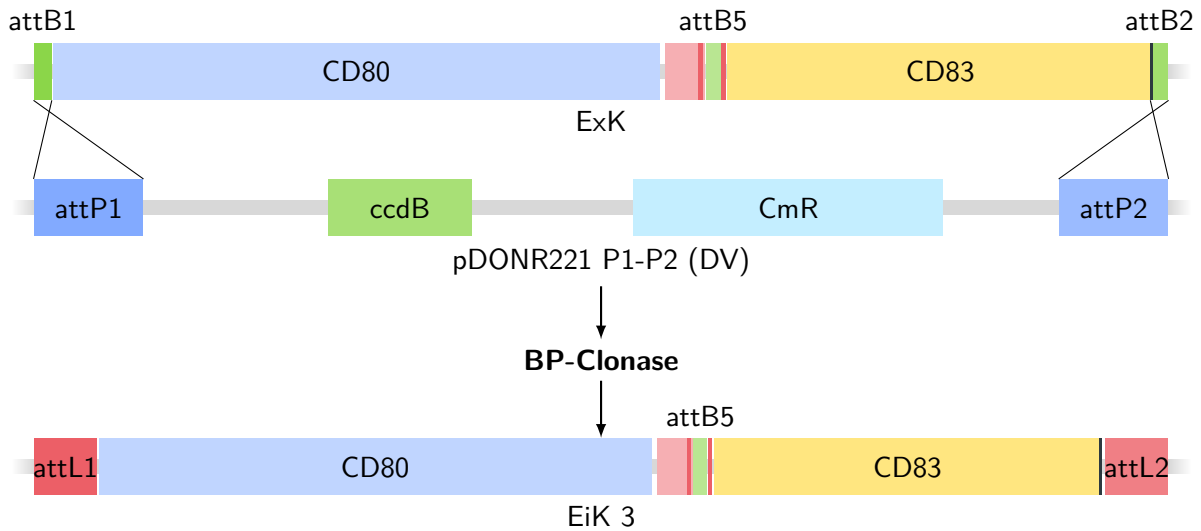


Abbildung 8: Schematische Darstellung der BP-Clonase-Reaktion mit dem Expressions-Klon (ExK) pcDNA3.1_DEST_attB1_CD80^{744C>T}_P2A_Smal_attB5_Smal_CD83_STOP_attB2 und dem Donor-Vektor (DV) pDONR221 P1-P2 sowie des resultierenden dritten Eintritts-Klons (EiK 3) pDONR221_attL1_CD80^{744C>T}_Smal_attB5_Smal_P2A_CD83_STOP_attL2.

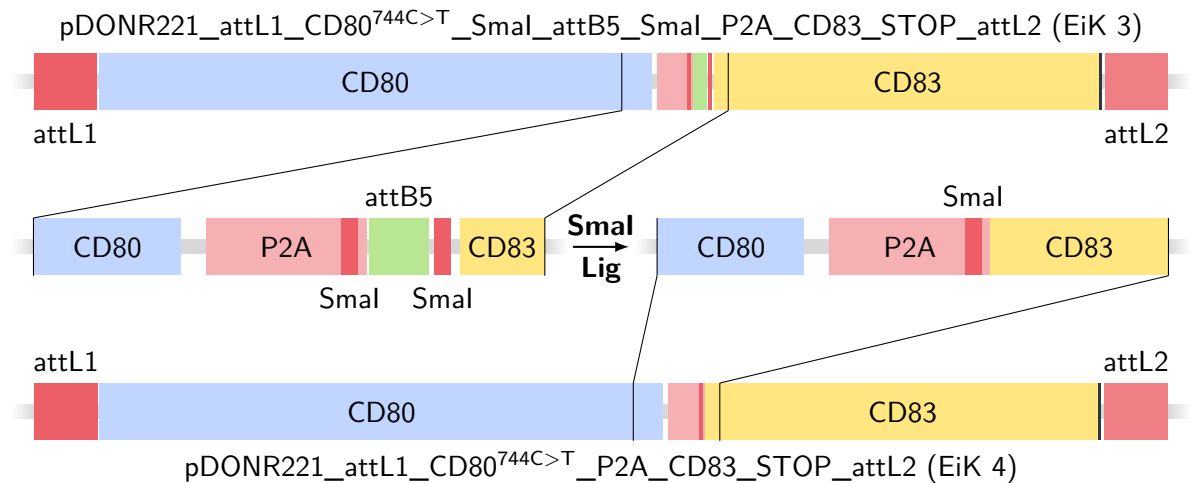


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Smal Restriktion des Eintritts-Klons (EiK 3) pDONR221_attL1_CD80^{744C>T}_Smal_attB5_Smal_P2A_CD83_STOP_attL2 und des nach Ligation (Lig) resultierenden, attB5 defizientem Eintritts-Klons (EiK 4) pDONR221_attL1_CD80^{744C>T}_P2A_CD83_STOP_attL2.

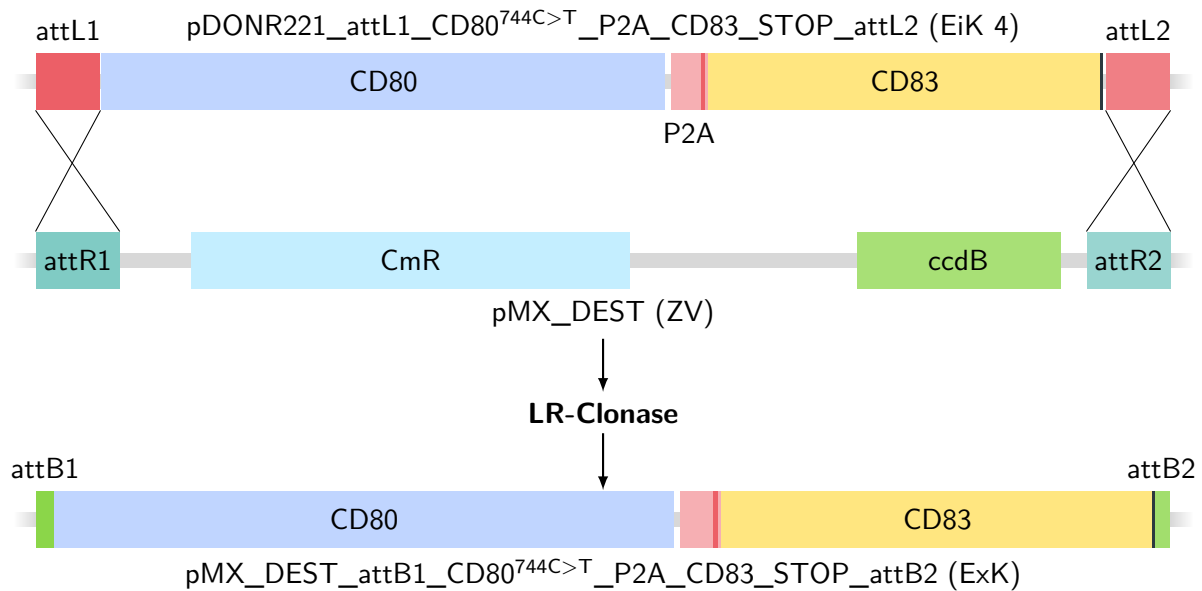


Abbildung 10: Schematische Darstellung der LR-Clonase-Reaktion mit dem Eintritts-Klon (EiK 4) pDONR221_attL1_CD80^{744C>T}_P2A_CD83_STOP_attL2 und dem Ziel-Vektor (ZV) pMX_DEST sowie des resultierenden Expressions-Klons (ExK) pMX_DEST_attB1_CD80^{744C>T}_P2A_CD83_STOP_attB2 (3).

4.1.1.3 Konstruktion des Expressions-Klons

Aus pDONR221_attL1_CD80^{744C>T}_P2A_CD83_STOP_attL2 und dem Ziel-Vektor (ZV) pMX_DEST wurde mittels LR-Clonase-Reaktion der Expressions-Klon (ExK) pMX_DEST_attB1_CD80^{744C>T}_P2A_CD83_STOP_attB2 kloniert (vgl. Abb. 10).

4.1.2 Retrovirale Transduktion von Ma-Mel-86B_KO^{CIITA} mit CD80 und CD83

Die Transduktion von Ma-Mel-86B_KO^{CIITA} wurde retroviral durchgeführt. Hierfür wurden mittels FUGENE6 (vgl. Abschn. 3.2.5) pMX_DEST_attB1_CD80^{744C>T}_P2A_CD83_STOP_attB2 mit den Helferplasmiden pCOLT-GALV und pHIT60 in Phoenix-Ampho-Zellen transduziert. Nach Kultivierung der transduzierten Zellen wurde der Überstand abzentrifugiert und zusammen mit Polybrene zu Ma-Mel-86B_KO^{CIITA} gegeben (vgl. Abschn. 3.2.6). Anschließend erfolgte eine Klonierung mittels Grenzverdünnungsverfahren (vgl. Abschn. 3.2.7). Schließlich wurde die erfolgreiche Expression von CD80 und CD83 der entstandenen Zellklone mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen (vgl. Abschn. 3.2.8 und Abb. 11) und Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi}#2 für die weitere Verwendung ausgewählt.

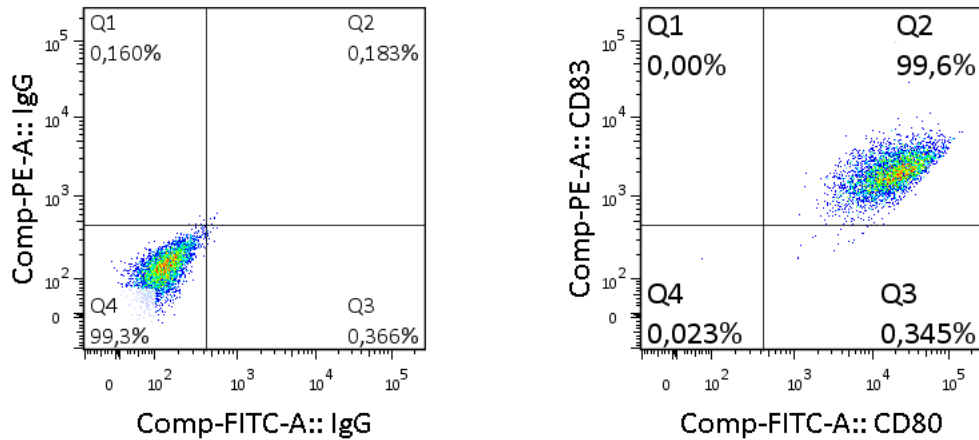


Abbildung 11: Durchflusszytometrie von Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} nach retroviraler Transduktion mit pMX_DEST_attB1_CD80^{744C>T}_P2A_CD83_STOP_attB2. Links Färbung mit Anti IgG1 (FITC/PE). Rechts Färbung mit Anti CD80 (FITC) und Anti CD83 (PE).

4.1.3 Zusammenfassung

Mittels dem Gateway-Verfahren wurden aus den Sequenzen von *CD80* und *CD83* das bicistronische Konstrukt pMX_DEST_attB1_CD80^{744C>T}_P2A_CD83_STOP_attB2 gebildet. Dieses wurde mittels retroviraler Transduktion in die Zelllinie Ma-Mel-86B_KO^{CIITA} eingebracht. Hierdurch wurde die Zelllinie Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} gebildet. Nach erfolgter Klonierung mittels Grenzverdünnungsverfahren wurde die erfolgreiche Transduktion von *CD80* und *CD83* mittels Durchflusszytometrie geprüft. Hierbei zeigte sich eine starke Expression der beiden Proteine in dem weiter verwendeten Klon Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi}#2.

4.2 Untersuchung von CD3⁺ UCB-Lymphozyten auf HLA-unabhängige T-Zell-Erkennung

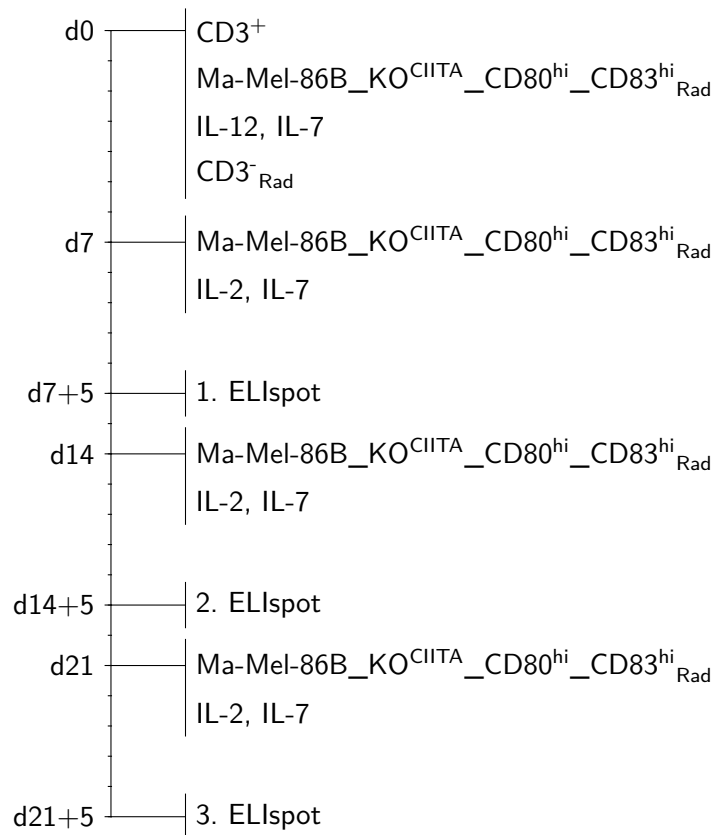
Es wurden zuerst CD3⁺ UCB-Lymphozyten aus Nabelschnurblut isoliert (vgl. Abschn. 4.2.1). Nach Stimulation und erster Restimulation (vgl. Abschn. 4.2.2) wurden die resultierenden T-Zell-Minikulturen zuerst in einem ersten ELISpot auf eine Reaktivität gegen ihre Stimulatorzelle getestet (vgl. Abschn. 4.2.3). Danach erfolgte nach zweiter Restimulation ein zweiter ELISpot mit ausgewählten T-Zell-Minikulturen gegen verschiedene Zielzellen, um die Reaktivität weiter zu untersuchen (vgl. Abschn. 4.2.4). Weiterhin wurden einige der weiter kultivierbaren T-Zell-Minikulturen gegen verschiedene Tumorzelllinien getestet. In dieser Arbeit werden die Ergebnisse von UCB #56 (*umbilical cord blood*, engl. für Nabelschnurblut) präsentiert.

4.2.1 Isolation von CD3⁺ UCB-Lymphozyten

Nach Schnittentbindung eines Neugeborenen wurden steril 30ml Blut aus der Nabelschnur entnommen (vgl. Abschn. 3.2.9). Aus diesem wurden zunächst mittels Ficoll-Zentrifugation die Leukozyten (vgl. Abschn. 3.2.10) und anschließend mittels MACS daraus die CD3⁺ Zellen isoliert (vgl. Abschn. 3.2.11).

4.2.2 Stimulation von CD3⁺ UCB-Lymphozyten mit HLA-negativen Melanomzellen

Die CD3⁺ Zellen aus UCB #56 wurden zu $50 \cdot 10^3$ Zellen pro Well auf insgesamt drei 96-Well Zellkultur-Platten in AIM V_{HS} ausgesät. So wurden 288 T-Zell-Minikulturen angelegt, in denen insgesamt $1,44 \cdot 10^7$ CD3⁺ Zellen enthalten waren. Die so entstandenen T-Zell-Minikulturen wurden dann für die weiteren Stimulationen und Untersuchungen verwendet. Um eine ungewollte Expansion der zusätzlich hinzugegebenen Zellen zu vermeiden, wurden diese im Vorfeld mit 10.000Rad bestrahlt. Zur ersten Stimulation an *d0* wurden je Well $5 \cdot 10^3$ Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi}_{Rad} mit IL-12 (1ng/ml) und IL-7 (5ng/ml) hinzugegeben. Außerdem wurden bei der ersten Stimulation je Well $1 \cdot 10^5$ von der Isolation übriggebliebene CD3⁺_{Rad} als Feederzellen zugegeben. Bei der ersten Restimulation an *d7* wurden erneut je Well $5 \cdot 10^3$ Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi}_{Rad} und IL-7 (5ng/ml) hinzugegeben. Anstelle des bei der ersten Stimulation verwendeten IL-12 wurde nun zusätzlich IL-2 (100U/ml) verwendet. An *d7+5* wurde eine erste Analyse mittels ELISpot durchgeführt. Es wurden je T-Zell-Minikultur ca. $30 \cdot 10^3$ stimulierte Zellen mit Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} als Zielzellen getestet, um Melanom-reaktive T-Zell-Minikulturen zu identifizieren (vgl. Abschn. 4.2.3). Hier wurden anhand der Reaktivität von den ursprünglichen 288 T-Zell-Minikulturen 52 ausgewählt. Diese wurden an *d14* erneut mit $5 \cdot 10^3$ Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi}_{Rad} sowie IL-2 (100U/ml) und IL-7 (5ng/ml) stimuliert. An *d14+5* wurde ein zweiter ELISpot durchgeführt. Dabei wurden je T-Zell-Minikultur ca. $30 \cdot 10^3$ stimulierte Zellen gegen verschiedene Zielzellen getestet (vgl. Abschn. 4.2.4). An *d21* erfolgte die dritte Restimulation erneut durch Zugabe von $5 \cdot 10^3$ Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi}_{Rad} sowie IL-2 (100U/ml) und IL-7 (5ng/ml). An *d21+5* wurde ein dritter ELISpot gegen verschiedene allogene Tumorzelllinien durchgeführt (vgl. Abschn. 4.2.5). Dabei wurden erneut je T-Zell-Minikultur ca. $30 \cdot 10^3$ stimulierte Zellen eingesetzt. Einen Überblick über die Abfolge der Stimulationen bietet Abb. 12.



Zellen	Menge	Interleukin	Konzentration
CD3 ⁺	50 · 10 ³	IL-12	1ng/ml
CD3 ⁻ _{Rad}	100 · 10 ³	IL-2	100U/ml
Ma-Mel-86B_KO ^{CIITA} _CD80 ^{hi} _CD83 ^{hi} _{Rad}	5 · 10 ³	IL-7	5ng/ml

Abbildung 12: Übersicht über den zeitlichen Ablauf der durchgeführten Stimulation der CD3⁺ Zellen aus UCB. Zudem Angabe der eingesetzten Mengen an Zellen (jeweils pro Well) und der Konzentration der verwendeten Interleukine.

4.2.3 Erster ELIspot mit der Stimulatorzelle als Zielzelle

Nach der Restimulation wurde and $d7 + 5$ zwei T-Zell-Minikulturen gezählt und anhand dieser Konzentrationen die der weitere T-Zell-Minikulturen abgeschätzt. Ausgehend hiervon wurde für alle T-Zell-Minikulturen das Entnahmevermögen für $30 \cdot 10^3$ Zellen bestimmt. Diese wurden anschließend auf Reaktivität gegen $50 \cdot 10^3$ Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} Zellen in einem ersten ELIspot getestet. Dabei zeigte sich eine Reaktivität aller T-Zell-Minikulturen. Beispielhaft wird die erste im ELIspot getestete MultiScreen Filterplatte in Abb. 13 gezeigt. Anhand der Reaktivität wurden von den ursprünglichen 288 insgesamt 52 deutlich reaktive T-Zell-Minikulturen für die weitere Testung ausgewählt.

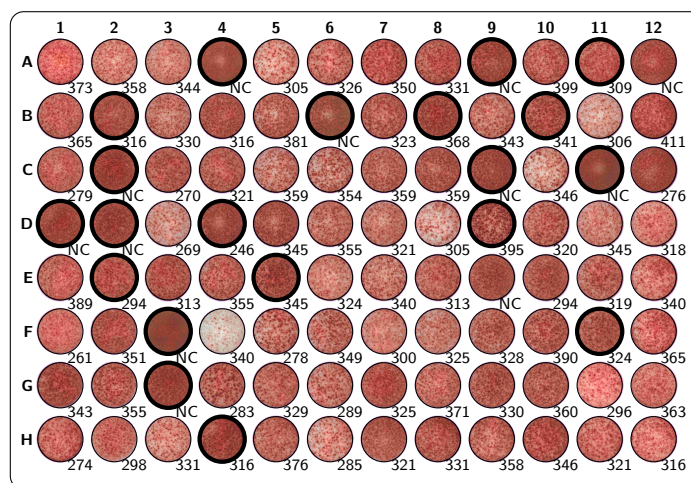


Abbildung 13: Beispielhafte Darstellung einer 96-Well MultiScreen Filterplatte von T-Zell-Minikulturen aus UCB #56 nach Durchführung des ersten ELISpots zur Testung der Reaktivität gegen die Stimulatorzelle Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} an $d7 + 5$. Dick umrandete T-Zell-Minikulturen wurden für die weitere Stimulation und Spezifitätsanalyse ausgewählt. Mit NC (*not countable*, engl. für nicht zählbar) wurden Wells markiert, welche aufgrund der Menge der Spots von der Software nicht analysiert werden konnten.

4.2.4 Zweiter ELISpot mit verschiedene Zielzellen

Nach der zweiten Restimulation der 52 ausgewählten T-Zell-Minikulturen erfolgte an $d14 + 5$ die erneute Testung im ELISpot. Es wurden erneut zwei T-Zell-Minikulturen gezählt um das Entnahmevolumen für $30 \cdot 10^3$ Effektorzellen abzuschätzen. Zur Spezifizierung der Reaktivität wurden, neben der Stimulatorzelle Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi}, auch andere HLA-negative Zellen auf Erkennung durch die oben genannten T-Zell-Minikulturen getestet. HEK293T_KO^{B2M/CIITA} wurde in unserem Labor aus HEK293T mittels TALEN hergestellt und exprimiert weder HLA-I noch HLA-II (vgl. Abschn. 2.11.4). Zur Überprüfung auf eine Reaktivität gegen die bekannten Antigene CSF2RA und TRP2 wurde HEK293T_KO^{B2M/CIITA} mittels Lipofectamine transient mit diesen Antigenen ausgestattet (vgl. Abschn. 3.2.4). Dadurch überexprimierten sie CSF2RA beziehungsweise TRP2 und sollten von T-Zell-Minikulturen, die gegen eines dieser Antigene gerichtet sind, erkannt werden. Eine Übersicht über die Menge der eingesetzten Zielzellen zeigt Tab. 21.

Tabelle 21: Angabe der im zweiten ELISpot an $d14 + 5$ eingesetzten Zielzellen und deren Mengen.

Zielzelle	Menge
Ma-Mel-86B_KO ^{CIITA} _CD80 ^{hi} _CD83 ^{hi}	$50 \cdot 10^3$
K562	$50 \cdot 10^3$
HEK293T_KO ^{B2M/CIITA}	$20 \cdot 10^3$
HEK293T_KO ^{B2M/CIITA} +CSF2RA	$20 \cdot 10^3$
HEK293T_KO ^{B2M/CIITA} +TRP2	$10 \cdot 10^3$

Die T-Zell-Minikulturen wurden als reaktiv gegen Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi}, HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+CSF2RA und HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+TRP2 erkannt.

KO^{B2M/CIITA}+CSF2RA oder HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+TRP2 gewertet, wenn die Anzahl der Spots bei diesen Zielzellen die Anzahl bei der Messung von HEK293T_KO^{B2M/CIITA} oder K562 um das fünffache überstieg. Wurden unter 100 Spots gezählt wurde die T-Zell-Minikultur gegen das jeweilige Ziel als nicht reaktiv gewertet. Je nach Reaktivitätsmuster wurden die T-Zell-Minikulturen in verschiedene Kategorien eingeteilt:

UA: T-Zell-Minikulturen mit HLA-unabhängiger Erkennung eines unbekanntes Antigenes auf Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi}.

BA: T-Zell-Minikulturen mit HLA-unabhängiger Erkennung eines bekannten Antigenes. Es wurde nur eine eindeutige Reaktivität gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+TRP2 gefunden (BA_T). Eine sichere Reaktivität gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+CSF2RA konnte nicht gefunden werden (BA_C).

FA: T-Zell-Minikulturen mit fraglicher HLA-unabhängiger Erkennung. In die Kategorie FA wurden T-Zell-Minikulturen eingeordnet die entweder eine zusätzliche Reaktivität gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA} (FA_H), gegen K562 (FA_K) oder gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA} und K562 zeigten (FA_{H/K}). Zudem wurden T-Zell-Minikulturen in diese Kategorie eingeordnet, wenn sie sowohl HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+CSF2RA als auch HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+TRP2 erkannten (FA_{C/T}).

NR: Nicht reaktive T-Zell-Minikulturen.

Abb. 14 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse der durchgeführten ELSpots mit T-Zell-Minikulturen, die nur gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA} und nicht zusätzlich auch gegen K562 getestet wurden. 10/24 der T-Zell-Minikulturen zeigten sich gegen Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} reaktiv (UA). 1/24 der T-Zell-Minikulturen zeigte sich reaktiv gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+TRP2 und Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} (BA_T). In dieser Untersuchung wurden 4/24 der getesteten T-Zell-Minikulturen als sowohl reaktiv gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+CSF2RA und HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+TRP2 als auch gegen Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} gewertet (FA_{C/T}). 9/24 der T-Zell-Minikulturen zeigten sich neben diesen Zielen auch reaktiv für HEK293T_KO^{B2M/CIITA} (FA_H).

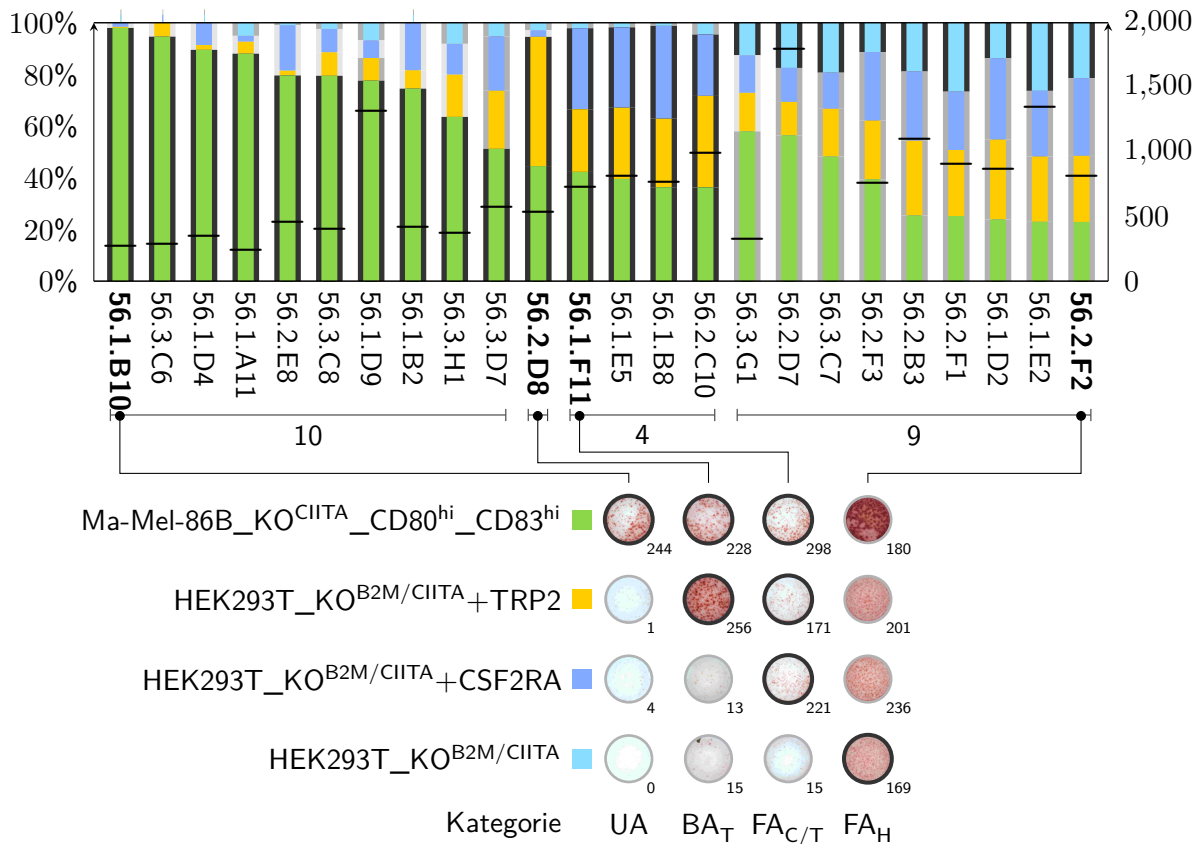


Abbildung 14: Übersicht der ELIspot Ergebnisse der T-Zell-Minikulturen von *d*14 + 5 mit HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+TRP2, HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+CSF2RA, Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} und HEK293T_KO^{B2M/CIITA} als Zielzellen. Der obere Teil der Grafik zeigt ein Säulendiagramm mit dem relativen Anteil der einzelnen Ziele an den insgesamt im ELIspot gezählten Spots (linke Achse) und die absolute aufsummierte Anzahl der gezählten Spots für die betrachteten Zielzellen (rechte Achse) mit schwarzen Querbalken als Markierung. Der untere Teil der Grafik zeigt jeweils ein Beispiel aus der jeweiligen Kategorie des Reaktionsmusters der T-Zell-Minikulturen. Die jeweils für die Kategorie ausschlaggebenden Wells wurden schwarz umrandet. UA: HLA-unabhängige Erkennung eines unbekanntes Antigenes auf Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi}; BA_T: HLA-unabhängige Erkennung des bekannten Antigenes TRP2; FA_{C/T}: fragliche HLA-unabhängige Erkennung bei gleichzeitiger Reaktivität gegen die Antigene CSF2RA und TRP2; FA_H: fragliche HLA-unabhängige Erkennung bei einer zusätzlichen Reaktivität gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA}.

Abb. 15 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse der durchgeführten ELIspots mit T-Zell-Minikulturen, die zusätzlich auch gegen K562 getestet wurden. In dieser Untersuchung wurden 3/28 der T-Zell-Minikulturen reaktiv gegen Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} (UA) getestet. 1/28 der getesteten T-Zell-Minikulturen zeigten sich reaktiv gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+TRP2 und auch gegen Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} (BA_T). 14/28 der T-Zell-Minikulturen zeigten sich neben den anderen Zielen auch reaktiv für HEK293T_KO^{B2M/CIITA} und K562 (FA_{H/K}). 1/28 der T-Zell-Minikulturen zeigten sich gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA} (FA_H) und 8/28 gegen K562 reaktiv (FA_K). 1/28 der T-Zell-Minikulturen wurde als nicht reaktiv gewertet (NR).

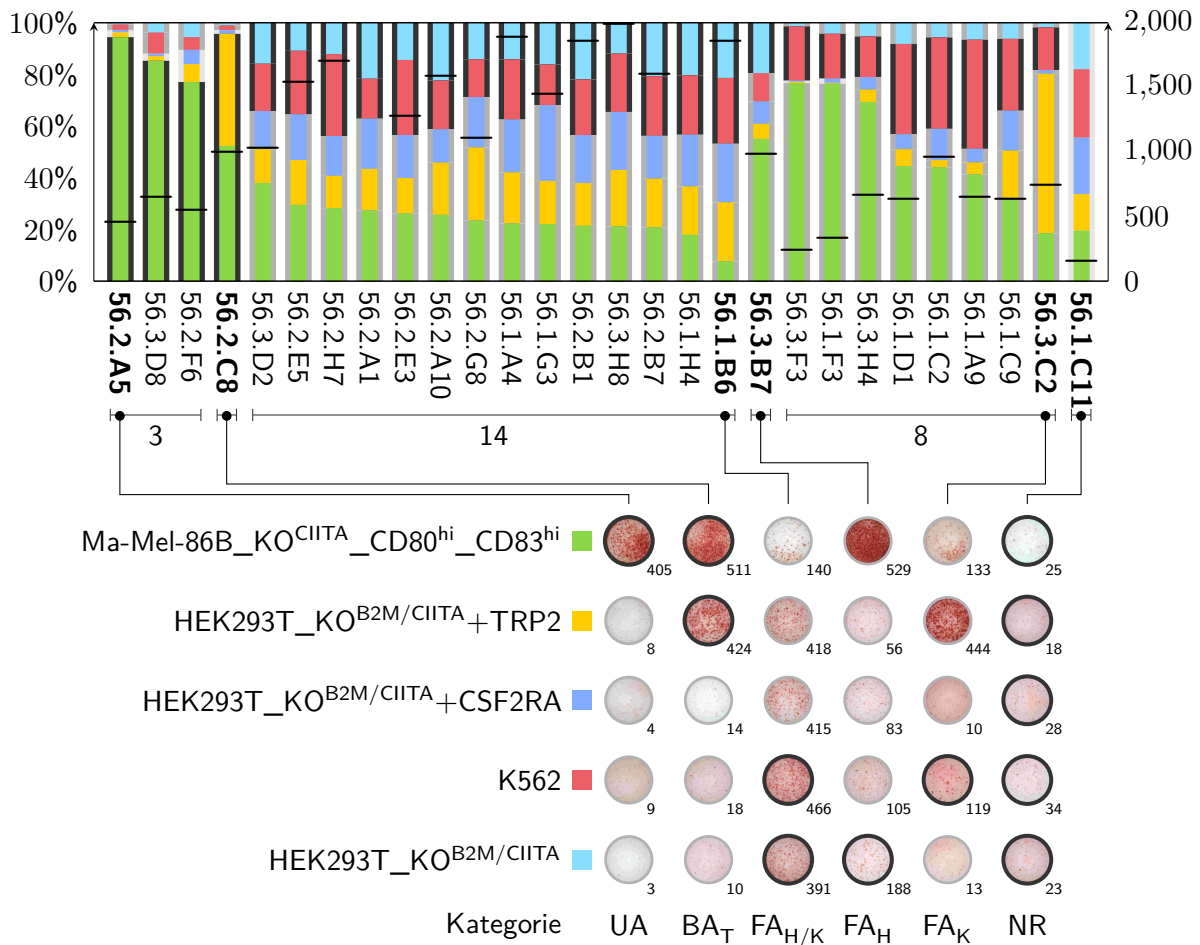


Abbildung 15: Übersicht der ELISpot Ergebnisse der T-Zell-Minikulturen von $d14 + 5$ mit HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+TRP2, HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+CSF2RA, Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi}, HEK293T_KO^{B2M/CIITA} und K562 als Zielzellen. Der obere Teil der Grafik zeigt ein Säulendiagramm mit dem relativem Anteil der einzelnen Ziele an den insgesamt im ELISpot gezählten Spots (linke Achse) und die absolute aufsummierte Anzahl der gezählten Spots für die betrachteten Zielzellen (rechte Achse) mit schwarzen Querbalken als Markierung. Der untere Teil der Grafik zeigt jeweils ein Beispiel aus der jeweiligen Kategorie des Reaktionsmusters T-Zell-Minikulturen. Die jeweils für die Kategorie ausschlaggebenden Wells wurden schwarz umrandet. BA_T: HLA-unabhängige Erkennung des bekannten Antigens TRP2; UA: HLA-unabhängige Erkennung eines unbekannten Antigens auf Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi}; FA_{H/K}: fragliche HLA-unabhängige Erkennung bei einer zusätzlichen Reaktivität gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA} und K562; FA_H: fragliche HLA-unabhängige Erkennung bei einer zusätzlichen Reaktivität gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA}; FA_K: fragliche HLA-unabhängige Erkennung bei einer zusätzlichen Reaktivität gegen K562; NR: nicht reaktiv.

Zusammenfassend zeigten sich in beiden untersuchten Kohorten somit 15/52 der T-Zell-Minikulturen reaktiv gegen Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} und nicht gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA} und, soweit getestet, nicht reaktiv gegen K562. Zudem zeigten sich diese T-Zell-Minikulturen nicht gleichzeitig reaktiv gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+CSF2RA und HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+TRP2 (FA_{C/T}). Zwei dieser 15 T-Zell-Minikulturen zeigten sich eindeutig reaktiv gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+TRP2 ohne zusätzliche Reaktivität gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+CSF2RA (BA_T). Somit wurde bei 13/52 T-Zell-Minikulturen eine Reaktivität gegen ein unbekanntes HLA-unabhängig erkanntes Antigen

Kategorie	UA	BA		FA				NR
	UA	BA _C	BA _T	FA _{C/T}	FA _{H/K}	FA _H	FA _K	NR
Ma-Mel-86B_KO ^{CIITA} _CD80 ^{hi} _CD83 ^{hi}	+	+	+	+	+	+	+	-
HEK293T_KO ^{B2M/CIITA} +CSF2RA	-	+	-	+	+/-	+/-	+/-	-
HEK293T_KO ^{B2M/CIITA} +TRP2	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	-
HEK293T_KO ^{B2M/CIITA}	-	-	-	-	+	+	-	-
K562	-/∅	-/∅	-/∅	-/∅	+	-/∅	+	-/∅
	13	0	2	4	14	10	8	1
Anzahl	13	2			36			1

Abbildung 16: Ergebnisübersicht des zweiten ELISpot an *d*14 + 5. Angegeben sind die Kategorien, in die die T-Zell-Minikulturen eingeteilt wurden, mit dem entsprechenden Reaktionsmuster gegen die eingesetzten Zielzellen. Zudem Angabe der Anzahl der T-Zell-Minikulturen, die der jeweiligen Kategorie zugeordnet wurden. UA: HLA-unabhängige Erkennung eines unbekanntes Antigen auf Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi}; BA_C: HLA-unabhängige Erkennung des bekannten Antigen CSF2RA; BA_T: HLA-unabhängige Erkennung des bekannten Antigen TRP2; FA_{C/T}: fragliche HLA-unabhängige Erkennung bei gleichzeitiger Reaktivität gegen die Antigene CSF2RA und TRP2; FA_{H/K}: fragliche HLA-unabhängige Erkennung bei einer zusätzlichen Reaktivität gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA} und K562; FA_H: fragliche HLA-unabhängige Erkennung bei einer zusätzlichen Reaktivität gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA}; FA_K: fragliche HLA-unabhängige Erkennung bei einer zusätzlichen Reaktivität gegen K562; NR: nicht reaktiv. Eine Einordnung in die Kategorien UA, BA_C und BA_T erfolgte nur wenn die Anzahl der Spots der entsprechenden Ziele die von HEK293T_KO^{B2M/CIITA} und, soweit getestet, K562 um das fünffache überstiegen.

gesehen (UA). Bei 32/52 der T-Zell-Minikulturen zeigte sich neben der Reaktivität gegen Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} und teilweise auch HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+CSF2RA oder HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+TRP2 auch eine Reaktivität gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA} oder K562 (FA). Eine Übersicht über die Ergebnisse bietet Abb. 16.

4.2.5 Dritter ELISpot mit allogenen Tumorzelllinien als Ziel

Nach einer dritten Restimulation mit Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} ließen sich sieben T-Zell-Minikulturen, die eine Reaktivität gegen Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} aber nicht gegen K562 oder HEK293T_KO^{B2M/CIITA} zeigten, erneut vermehren. Sie konnten an *d*21 + 5 gegen verschiedene allogene Tumorzelllinien im ELISpot getestet werden. Zusätzlich zu allogenen Tumorzelllinien wurde auf eine Reaktivität gegen Ma-86-EBV-B getestet. Dieses sind gegen EBV gerichtete B-Zellen der Melanompatientin Ma-Mel-86.

Dabei zeigte 56.1.B2 eine Reaktivität gegen zahlreiche Melanomzelllinien sowie gegen die Glioblastomzelllinie MZ-219-GB. Sie erkannte 7/19 der allogenen Tumorzelllinien sowie Ma-86-EBV-B. 56.1.D4 erkannte neben Ma-Mel-86B nur die TRP2-negative Pankreaskarzinomlinie MZ-PC-2 (11) und somit 2/19 der allogenen Tumorzelllinien. 56.1.E5 erkannte neben Ma-Mel-86B nur die Melanomzelllinie D05-Mel sowie die beiden AML-Zelllinien NB4 und NOMO-1. 56.1.E5 erkannte 5/19 der allogenen Tumorzelllinien und

Ma-86-EBV-B. 56.3.C6 hat ein ähnliches Erkennungsmuster wie 56.1.E5. Sie erkannte jedoch zusätzlich noch Ma-Mel-86C, Ma-Mel-86F sowie die Lungenkarzinomlinie NW-II-BC, die Ovarialkarzinomlinie OV-MZ16 und die Nierenzellkarzinomlinie RCC-1973 und damit 11/19 der allogenen Tumorzelllinien sowie Ma-86-EBV-B. 56.2.A5 erkannte neben Ma-Mel-86C und -86F auch die Melanomzelllinie D41-Mel sowie die TRP2-negative Pankreaskarzinomlinie MZ-PC-2 (11), die TRP2-negative Glioblastomlinie MZ-GB-1 (11) und die Nierenzellkarzinomlinie RCC-1973. Damit erkannte sie 6/19 der allogenen Tumorzelllinien und Ma-86-EBV-B. 56.3.D7 zeigte nur eine Reaktivität gegen NOMO-1 und Ma-86-EBV-B. 56.3.G1 zeigte nach den in dieser Arbeit festgelegten Kriterien keine Reaktivität gegen die getesteten Zelllinien. Insgesamt zeigten sich somit noch 6/7 der T-Zell-Minikulturen reaktiv.

4.2.6 Zusammenfassung

Nach Isolation von CD3⁺ T-Zell-Minikulturen aus Nabelschnurblut erfolgte eine Stimulation an *d*0 und *d*7 mit Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi}. An *d*7 + 5 zeigten sich alle T-Zell-Minikulturen im ersten ELISpot deutlich reaktiv gegen die HLA-negative Stimulatorzelle Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi}. Aus den nach der ersten Restimulation getesteten T-Zell-Minikulturen wurden 52 stark reaktive ausgewählt und an *d*14 erneut restimuliert. Im darauf an *d*14 + 5 durchgeführten zweiten ELISpot ließen sich T-Zell-Minikulturen finden, die mit der Stimulatorzelle reagierten aber keine Reaktivität gegen die anderen HLA-negativen Zielzellen HEK293T_KO^{B2M/CIITA} oder K562 zeigten. Zudem konnten T-Zell-Minikulturen nachgewiesen werden, die sich zusätzlich auch reaktiv gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+TRP2 zeigten. Sieben T-Zell-Minikulturen ließen sich an *d*21 erneut mit Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} restimulieren. Sie wurden an *d*21 + 5 gegen verschiedene allogene Tumorzelllinien in einem dritten ELISpot getestet. Dabei zeigten 6/7 T-Zell-Minikulturen eine Reaktivität gegen verschiedene allogene Tumorzelllinien.

Zielzelle	TZ	56.1.B2	56.1.D4	56.1.E5	56.2.A5	56.3.C6	56.3.D7	56.3.G1
Elispot nach 2. Restimulation (d14 + 5)								
Ma-Mel-86B_KO ^{CIITA} _CD80 ^{hi} _CD83 ^{hi}	A-Mel	295	290	310	405	246	280	175
HEK293T_KO ^{B2M/CIITA} +CSF2RA	-	73	28	244	4	0	115	44
HEK293T_KO ^{B2M/CIITA} +TRP2	-	28	6	216	8	14	123	45
HEK293T_KO ^{B2M/CIITA}	-	0	0	14	3	0	29	38
K562	CML	-	-	-	9	-	-	-
Elispot nach 3. Restimulation (d21 + 5)								
Ma-86-EBV-B	A-B	253	40	264	NC	260	63	110
Ma-86-EBV-B	A-Mel	253	40	264	NC	260	63	110
Ma-Mel-86A	A-Mel	10	0	0	84	4	0	0
Ma-Mel-86B	A-Mel	536	309	196	435	259	61	1
Ma-Mel-86C	A-Mel	445	0	0	470	300	0	0
Ma-Mel-86F	A-Mel	409	0	38	415	324	0	0
D05-Mel	Mel	255	1	174	6	335	81	30
D41-Mel	Mel	416	0	25	510	88	1	3
UKRV-Mel-02	Mel	38	0	0	10	5	15	1
NB4	AML	4	0	461	15	111	1	3
NOMO-1	AML	10	1	505	55	176	38	198
LC-MZ-16	LK	5	1	1	20	5	4	38
NW-II-BC	LK	89	1	0	55	211	14	46
MZ-PC-1	PK	10	4	4	56	18	0	3
MZ-PC-2	PK	9	154	43	101	93	38	1
SK-CO-1	KK	0	0	0	5	0	1	0
MCF-7	MK	11	4	21	9	29	3	14
MZ-GB-1	GBK	315	58	6	289	220	3	0
OV-MZ16	OK	6	3	10	21	219	8	26
MZ-219-GB	GB	0	3	0	5	3	0	1
RCC-1973	NK	3	1	0	340	214	5	8

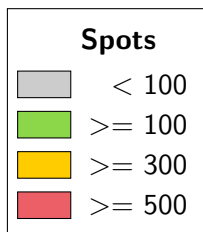


Abbildung 17: Übersicht der ELISpot Ergebnisse an d21 + 5 der T-Zell-Minikulturen mit verschiedenen Tumorzelllinien nach einer dritten Restimulation mit Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi}. Der obere Teil der Grafik zeigt die Ergebnisse der Vorversuche von d15 + 5. In den jeweiligen Feldern ist die absolute Anzahl der gezählten Spots für die betrachteten Zielzellen angegeben. In der Spalte TZ ist die Art der Tumorzelllinie angegeben. A-Mel: Autologe Melanomzelllinie; A-B: Autologe B-Zellen; Mel: Melanomzelllinie; AML: Akute myeloische Leukämie; LK: Lungenkarzinom; PK: Pankreaskarzinom; KK: Kolonkarzinom; GBK: Gallenblasenkarzinom; OK: Ovarialkarzinom; GB: Glioblastom; NK: Nierenzellkarzinom.

5 Diskussion

5.1 Herstellung der Stimulatorzelle aus einer HLA-negativen Melanomzelllinie

In dieser Arbeit sollte das Vorhandensein von HLA-unabhängigen, tumorreaktiven T-Zellen in Nabelschnurblut gesunder Neugeborener geprüft werden. Der HLA-Verlust ist ein wesentlicher Mechanismus der Immunevasion, der bei Tumorzellen unter dem Selektionsdruck des Immunsystems im Rahmen des Immunoeditings (vgl. Abschn. 1.2) vorkommen kann (28,29). Um solche HLA-unabhängigen T-Zellen spezifisch zu stimulieren sollte eine Stimulatorzelle kein HLA exprimieren. Obwohl phänotypisch HLA-negativ, können Zelllinien, unter dem Einfluss von Zytokinen wie beispielweise IFN- γ , dessen Expression erneut hochregulieren (106,107). Um auch eine solche variable Expression zu vermeiden, sollte in der Stimulatorzelle sowohl für HLA-I als auch HLA-II ein Knockout eines jeweils relevanten Gens etabliert werden.

Die als Basis ausgewählte Ma-Mel-86B-Zelllinie ist durch einen *in vivo* erfolgten biallelischen Defekt des Gens *B2M* HLA-I-negativ (108). Um auch die Expression von HLA-II zu unterbinden, wurde in Ma-Mel-86B mittels TALEN (*Transcription Activator-like Effector Nuclease*, engl. für transkriptionsaktivatorartige Effektor-nuklease) eine biallelische Frame-Shift-Mutation im *CIITA*-Gen generiert (96). Der so entstandene Klon Ma-Mel-86B_KO^{CIITA} trägt somit an seiner Oberfläche kein HLA-I/II. Damit war eine Stimulation über diese klassischen HLA-Moleküle ausgeschlossen.

Zudem sollte die Zelle die beiden Oberflächenproteine CSF2RA und TRP2 exprimieren, für die in Vorversuchen ein HLA-unabhängige Erkennung gezeigt wurde (11). Die ausgewählte Ma-Mel-86B-Zelllinie exprimierte von vornherein beide Proteine.

Um die Stimulation von eventuell HLA-unabhängigen, tumorreaktiven T-Zellen zu unterstützen, sollten in dieser Arbeit zusätzliche Kostimulatoren in Ma-Mel-86B_KO^{CIITA} eingebracht werden. Hierfür wurden CD80 und CD83 ausgewählt. Das auf dendritischen Zellen vorkommende CD80 aktiviert über die Bindung von CTLA4 und CD28 T-Zellen (109). Dem vor allem in den interfollikulären T-Zell-Regionen von immunologischen Organen, wie Lymphknoten oder Milz, vorkommende CD83 wird eine wesentliche Rolle bei der Prägung von naiven T-Zellen zugeschrieben. Das Vorhandensein von CD83 bei einer Stimulation verbesserte zudem die Anreicherung von antigenspezifischen T-Zellen (110).

Um nicht wiederholt Transduktionen von Ma-Mel-86B_KO^{CIITA} durchführen zu müssen, sollten beide Oberflächenproteine in einem Konstrukt zusammengefasst werden. Um im Rahmen der Translation eine Trennung von *CD80* und *CD83* zu ermöglichen wurde P2A zwischen die beiden cDNAs eingebracht. P2A ist eine virale Sequenz welche für ein 2A-Peptid kodiert. Diese 2A-Peptide sind eine Klasse von viralen Strukturmotiven, welche an den Ribosomen im Rahmen der Proteinbiosynthese eine kotranslationale Trennung der flankierenden Proteine bewirken. Dadurch wird eine äquimolare Expression der durch sie getrennten Genabschnitte erreicht, ohne dass zusätzliche Promotoren eingeführt werden müssen. Solche Konstrukte werden als polycistronisch bezeichnet (111).

Für die Klonierung wurde, anstatt einer auf Restriktionsenzymen basierenden Klonierung, ein rekombinantes Klonierungssystem, das Gateway-Verfahren, genutzt. Rekombinante Klonierungssysteme sind einer klassischen Restriktion und Ligation sowohl bezüglich der Sicherheit einer korrekten Orientierung der eingebrachten Gensequenz, als auch bei der Selektion korrekt ausgestatteter Klone überlegen. Zudem ist es in Folgeversuchen leichter möglich die hergestellte Gensequenz in andere Expressionsvektoren zu

überführen (112).

Da es in Vorversuchen jedoch zu einer niedrigen Expression von CD83 kam (C. Wölfel, persönliche Mitteilung), wurde eine Störung der Expression durch die zwischen den für P2A und *CD83* kodierenden Sequenzen liegenden att-Sequenz vermutet. Diese wurde im Rahmen der Generierung des Konstrukts mittels Gateway-Verfahren eingeführt. Um diese im Nachhinein aus dem Konstrukt entfernen zu können, wurden flankierend zu der att-Sequenz zwei Smal Erkennungssequenzen in die Primer eingeführt. Smal ist eine Endonuklease, die DNA an einer palindromischen Erkennungssequenz schneidet, wodurch sie ein *blunt end* hinterlässt. Leider zeigte die in die rDNA eingebrachte Sequenz von *CD80* einen Polymorphismus, welcher zu einer weiteren Smal-Restriktionsstelle führte. Um trotzdem den geplanten Smal-Verdau durchzuführen, sollte eine stumme Punktmutation im *CD80*-Gen generiert werden, welche die Restriktionsstelle entfernt. Als Methode wurde hierfür eine SDM (vgl. Abschn. 3.1.8) gewählt. Dabei wurde eine PCR mit dem Konstrukt und spezifischen Primern durchgeführt. Die Sequenz der Primer wurde so gewählt, dass im Amplifikat die gewünschte Punktmutation enthalten ist. Im Anschluss wurde durch einen Smal Verdau die att-Sequenz im Prozess der Konstruktherstellung entfernt, ohne dass es zu einem Restriktionsverdau im *CD80*-Gen kam. Es folgte eine Ligation, um das solchermaßen korrigierte Konstrukt erneut in seine zirkuläre Form zu bringen. Das korrekte Ergebnis dieser Veränderungen wurde mittels Sequenzierung überprüft.

Um eine stabile Expression von CD80 und CD83 in Ma-Mel-86B_KO^{CIITA} zu erreichen, wurde eine retrovirale Transduktion durchgeführt (vgl. Abschn. 3.2.6). Sie bietet gegenüber alternativer Methoden den Vorteil, dass sie mit hoher Effizienz zu einer stabilen Expression der eingebrachten Genabschnitte führt (113). Nach retroviraler Transduktion mit dem so hergestellten bicistronischen Konstrukt pMX_DEST_attB1_CD80^{744C>T}_P2A_CD83_STOP_attB2 von Ma-Mel-86B_KO^{CIITA} wurde Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} hergestellt.

Nach Klonierung der entstanden Zellen mittels Grenzverdünnungsverfahren (vgl. Abschn. 3.2.7) wurde die Expression von CD80 und CD83 und damit die erfolgreiche Transduktion mittels Durchflusszytometrie (vgl. Abschn. 3.2.8) geprüft. Hierbei zeigte sich bei dem weiter verwendeten Klon eine starke Expression von CD80 und CD83 (vgl. Abschn. 4.1.2). Da in dem eingesetzten Durchflusszytometrie-Protokoll kein Schritt zur Permeabilisierung der Zellmembran durchgeführt wurde, war von einer Präsentation der Proteine an der Zelloberfläche auszugehen. In dieser Arbeit wurden jedoch keine vergleichenden Stimulationsversuche mit der Ursprungszelllinie Ma-Mel-86B_KO^{CIITA} durchgeführt. Deshalb konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Ausstattung der Stimulatorzellen mit CD80 und CD83 tatsächlich zu einer Verbesserung der Stimulation von T-Zell-Minikulturen aus Nabelschnurblut geführt hatte.

5.2 Untersuchung von CD3⁺ UCB-Lymphozyten auf HLA-unabhängige T-Zell-Erkennung

5.2.1 Durchführung der Stimulation

Für die Isolation der Effektorzellen wurden T-Zellen aus Nabelschnurblut isoliert (vgl. Abschn. 3.2.9). Nabelschnurblut ist bekanntermaßen eine Quelle für naive, nicht-seneszente, antivirale und gegen tumorassoziierte Antigene gerichtete T-Zellen (114). Der Nachweis HLA-unabhängiger T-Zellen in Nabelschnurblut würde zudem dafür sprechen, dass solche T-Zellantworten auch unabhängig von einer

vorherigen Tumorerkrankung auftreten können.

Um eine Störung durch andere im Nabelschnurblut vorhandenen Zellen zu vermeiden, sollten nur die T-Zellen als Effektorzellen für die weitere Stimulation verwendet werden. Da T-Zellen positiv für das Oberflächenprotein CD3 sind, konnten sie anhand von diesem isoliert werden. Zur Isolation wurde sich für eine magnetische Zellseparation (vgl. Abschn. 3.2.11) entschieden. Um den Anteil von CD3⁻ Zellen möglichst gering zu halten wurde eine Positiv-Selektion auf CD3 durchgeführt (115). Zur Verbesserung des anfänglichen Wachstums durch einen "Helfer"-Effekt, wurde der bei der magnetischen Zellseparation entstandene CD3⁻ Zelldurchsatz bestrahlt und der ersten Stimulation hinzugegeben. Die Bestrahlung erfolgte, um ein ungewolltes Wachstum dieser Fraktion zu vermeiden. Zudem erfolgte bei jeder Stimulation und Restimulation die Zugabe der Zytokine IL-12 oder IL-2 sowie IL-7 (vgl. Abschn. 4.2.2). Das von vielen Bestandteilen des Immunsystems produzierte IL-12 führt sowohl zu einer Verbesserung des Zellwachstums, als auch zu einem Anreiz für naive T-Zellen sich in CD4⁺ T-Zellen zu entwickeln (116). Es steigert allerdings auch die Aktivität von NK-Zellen. Dieser Effekt wird durch die Anwesenheit von IL-2 noch verstärkt, da es zu einer Hochregulierung des IL-12-Rezeptors führt (117). Um dieses zu vermeiden wurde IL-12 nur bei der ersten Stimulation gegeben und in den folgenden Stimulationen durch IL-2 ersetzt. Das *in vivo* von aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen produzierte IL-2 führt im Sinne einer positiven Rückkopplung zu einer Proliferation der beiden Zellreihen (118). IL-7 wird normalerweise von Stromazellen des Knochenmarks und des Thymus produziert. Es führt zu einer Verbesserung des Zellwachstums von T-Zellen, wobei vor allem das Wachstum der naiven T-Zellen gefördert wird (119,120). In Vorversuchen (Daten nicht gezeigt), bei denen die Stimulation mit einer erhöhten IL-2 Konzentration (250U/ml) und zusätzlich mit IL-15 (5ng/ml) durchgeführt wurde, zeigte sich eine deutliche Reaktivität nahezu aller T-Zell-Minikulturen sowohl gegen die Stimulatorzelle Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} als auch gegen K562. Für IL-15 ist neben einer Steigerung der Proliferation der T-Zellen auch eine Stimulation von NK-Zellen beschrieben (121). Eine Kontamination mit CD3⁻ NK-Zellen wäre nicht gänzlich auszuschließen gewesen, da es bei einer Positivselektion mittels MACS zu einer geringfügigen Kontamination mit CD3⁻ Zellen kommen kann (115). Neben den NK-Zellen wäre eine Zellpopulation, die dieses Bild gezeigt haben könnte, CIK-Zellen (*cytokin induced killer cell*, engl. für Zytokin induzierte Killerzelle). Sie exprimieren wie NK-Zellen CD56 aber zusätzlich auch CD3 auf der Zelloberfläche (122). In der Literatur wird für sie, neben einer HLA-abhängigen Erkennung von Zielzellen, auch eine HLA-unabhängige Erkennung beschrieben. Wie NK-Zellen können sie HLA-negative Zielzellen erkennen (123,124). Solche CIK-Zellen werden *ex vivo* durch verschiedenen Stimulationsprotokolle generiert. Hierbei werden T-Zellen beispielsweise mit IFN- γ (1000U/ml), CD3-Antikörper (100ng/ml) sowie IL-1 (100U/ml), IL-2 (500U/ml) und IL-15 (10ng/ml) stimuliert (125).

Die in den Vorversuchen gesehene unspezifische Reaktivität ließ sich schließlich durch eine Anpassung des für die Stimulation verwendeten Protokolls reduzieren. Dieses wurde durch eine Reduktion des eingesetzten IL-2 (100U/ml) und ein Weglassen von IL-15 erreicht. Hierrunter kam es zu den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen mit einer deutlichen Abnahme des Anteils an gegen K562 reaktiven T-Zell-Minikulturen. Dadurch konnte jedoch nur die letzte der insgesamt fünf untersuchten Nabelschnurblutproben ausgewertet werden, wodurch nur die Daten eines Individuums zur Verfügung standen.

5.2.2 Ergebnisse des ersten ELISpot mit der Stimulatorzelle als Ziel

Zur Bestimmung der Reaktivität wurden 288 T-Zell-Minikulturen aus Nabelschnurblut mit der HLA-I/II negativen Melanomzelllinie Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} an *d0* und *d7* stimuliert. Im Anschluss wurde an *d7* + 5 der erste ELISpot durchgeführt (vgl. Abschn. 3.2.13), um eine Reaktivität gegen die Stimulatorzelle nachzuweisen. Bei dem in dieser Arbeit durchgeführten ELISpot wurde IFN- γ nachgewiesen. *In vivo* wird IFN- γ von CD3⁺ T-Zellen aber auch nach Aktivierung von NK-Zellen und NKT-Zellen ausgeschüttet (126). Es erlaubte somit die Darstellung einer Aktivierung der in den T-Zell-Minikulturen enthaltenen Zellen und damit den Nachweis einer Reaktivität gegen die eingesetzten Zielzellen. Eine Expression der klassischen HLA-Moleküle HLA-I/II war durch die biallelische *in vivo* Mutation im *B2M*-Gen (108) und die mittels TALEN eingebrachte biallelische Mutation im *CIITA*-Gen (96) ausgeschlossen. Somit sprach eine Reaktivität gegen Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} für einen HLA-unabhängigen Erkennungsmechanismus.

Hier zeigten im Ergebnis alle T-Zell-Minikulturen eine deutliche Reaktivität gegen Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi}. Es wurden jedoch keine Leerversuche ohne Zielzellen durchgeführt. Somit konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die gesehene Reaktivität durch eine spontane Freisetzung von IFN- γ ausgelöst wurde.

5.2.3 Ergebnisse des zweiten ELISpot mit verschiedenen Zielzellen

Die gesehene Reaktivität sollte in einem nächsten Schritt mit weiteren Zielzellen eingeordnet werden. Idealerweise wäre zur Prüfung, ob die in dieser Arbeit gesehene Reaktivität tatsächlich gegen ein HLA-unabhängig erkanntes Antigen gerichtet war, eine Kontrollzelle nötig gewesen, die kein HLA und keine Antigene enthält, die über einen HLA-unabhängigen Mechanismus erkannt werden. Da dieses Antigen Repertoire nicht definiert war, konnte eine solche Zelle nicht generiert werden. Es wurden stattdessen die beiden Zelllinien K562 und HEK293T_KO^{B2M/CIITA} verwendet. K562-Zellen weisen eine allenfalls geringe Expression von HLA-I/II auf (127) und werden deshalb als "klassische" NK-Zielzellen (98) genutzt (vgl. Abschn. 2.11.2). Für K562 wurde jedoch gezeigt, dass es unter bestimmten Umständen, wie beispielsweise dem Vorhandensein von humanen IFN- γ , zu einer erneuten Präsentation von HLA-I kommen kann (99). Zusätzlich wurde deshalb auch die HEK293T eingesetzt. Für sie wurde ebenfalls eine Erkennung durch NK-Zellen beschrieben (128). In der hier verwendeten Zelllinie HEK293T_KO^{B2M/CIITA} wurde mittels TALEN eine biallelische *Frame-Shift*-Mutation im *B2M*- und im *CIITA*-Gen etabliert (vgl. Abschn. 2.11.4). Hierdurch exprimierte sie weder HLA-I noch HLA-II und sollte damit ein gutes Ziel für Effektorzellen gewesen sein, die ihr Ziel nach einem NK-Zell-ähnlichem Erkennungsmuster erkannten. Eine Erkennung von HLA-I/II negativen HEK293T_KO^{B2M/CIITA}-Zellen oder K562-Zellen zusätzlich zur Stimulatorzelllinie hätte somit bedeutet, dass entweder die betreffende T-Zellpopulation gegen ein gemeinsames Oberflächenantigen von Melanomzellen und HEK293T-Zellen beziehungsweise K562-Zellen gerichtet war oder dass es sich um eine NK-Zell-ähnliche Aktivität handelte. Da T-Zell-Minikulturen verwendet wurden, wären zudem auch Mischkulturen denkbar gewesen, die T-Zellen verschiedener Reaktivitätsmuster enthielten. Da aufgrund des Reaktionsmusters dieser T-Zell-Minikulturen eine NK-Zell-ähnliche Reaktivität nicht auszuschließen war, wurden sie nur als fraglich gegen ein HLA-unabhängig erkanntes Antigen gerichtet (FA) eingeordnet. T-Zell-Minikulturen, die nur Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} erkannten, wurden dementsprechend als gegen ein unbekanntes HLA-unabhängig erkanntes Antigen gerichtet

(UA) gewertet. Um in diese Kategorie eingeordnet zu werden, musste die Anzahl der Spots der betrachteten T-Zell-Minikultur mit Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} als Ziel die von HEK293T_KO^{B2M/CIITA} und, soweit getestet, K562 um das fünffache übersteigen. Zusätzlich zu diesem Nachweis von unbekanntem HLA-unabhängig erkannten Antigenen sollte auch auf eine Reaktivität gegen die beiden bekannten Antigene CSF2RA und TRP2 getestet werden. Da die der Stimulatorzelle zugrundeliegende Zelllinie Ma-Mel-86B natürlicher Weise CSF2RA und TRP2 exprimiert (vgl. Abschn. 2.11.1), war es erforderlich weitere Zielzellen einzusetzen, um eine gegen TRP2 beziehungsweise CSF2RA gerichtete Reaktivität zu erkennen. Hierfür wurden die, aus HEK293T_KO^{B2M/CIITA} mittels Lipofectamine transient transfizierten Zellen HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+TRP2 und HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+CSF2RA verwendet. T-Zell-Minikulturen, die zusätzlich zu Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} eine dieser Zelllinien erkannten, wurden als gegen ein bekanntes HLA-unabhängig erkanntes Antigen gerichtet eingruppiert (BA). Auch für diese Kategorie wurden nur T-Zell-Minikulturen gewertet, deren gemessenen Spots die von HEK293T_KO^{B2M/CIITA} und, soweit getestet, K562 um das fünffache überstiegen.

Zur weiteren Einordnung der Reaktivität wurden somit 52 der, im ersten ELISpot an *d*7 + 5 stark gegen Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} reaktiven, T-Zell-Minikulturen ausgewählt und erneut an *d*14 mit Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} stimuliert. Anschließend erfolgte an *d*14 + 5 ein zweiter ELISpot dieser T-Zell-Minikulturen als Effektorzellen und mit Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi}, HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+CSF2RA, HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+TRP2 sowie mit HEK293T_KO^{B2M/CIITA} und teilweise auch mit K562 als Zielzellen. Dabei wurden 36/52 T-Zell-Minikulturen als nur fraglich gegen ein HLA-unabhängiges Antigen gerichtet gewertet. Von diesen wurden 32 T-Zell-Minikulturen in diese Kategorie einsortiert, da sie entweder gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA} (FA_H), K562 (FA_K) oder gegen beide Zellen (FA_{H/K}) reaktiv waren. Bei diesen T-Zell-Minikulturen war sowohl eine Reaktivität gegen ein unbekanntes HLA-unabhängig erkanntes Antigen, das sich sowohl auf Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} als auch auf HEK293T_KO^{B2M/CIITA} oder K562 befindet, als auch eine unspezifische, NK-Zell-ähnlichen Reaktivität möglich. Weitere vier wurden als fraglich gewertet, da sie zusätzlich zu Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} sowohl gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+CSF2RA und HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+TRP2 reaktiv getestet wurden (FA_{C/T}). Da die Frequenz von einer HLA-unabhängigen Erkennung von CSF2RA oder TRP2 als niedrig eingeschätzt wurde, erschien eine gleichzeitige Reaktivität gegen beide Antigene unwahrscheinlich. Um bei der Auswertung die gegen ein HLA-unabhängig erkanntes Antigen reaktiven T-Zell-Minikulturen nicht zu überschätzen, wurden diese T-Zell-Minikulturen ebenfalls als nicht eindeutig gegen ein HLA-unabhängiges Antigen gerichtet gewertet. Bei 15/52 T-Zell-Minikulturen ließ sich hingegen eine Reaktivität gegen Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} ohne eine Reaktivität gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA} und, soweit getestet, gegen K562 nachweisen. Bei zwei der T-Zell-Minikulturen ließ sich zudem eine zusätzliche Reaktivität ausschließlich gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+TRP2 zeigen. Somit wurde eine HLA-unabhängige Reaktivität gegen das bekannte Antigen TRP2 nachgewiesen (BA_T). Sicher gegen CSF2RA reaktive T-Zell-Minikulturen wurden nicht identifiziert (BA_C). Bei den restlichen 13/52 nur gegen Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} reaktiven T-Zell-Minikulturen war mit hoher Sicherheit von einer Erkennung eines unbekanntem HLA-unabhängig erkannten Antigens auszugehen (UA).

Die Frequenz von HLA-unabhängig reagierenden T-Zellen in UCB #56 kann nur abgeschätzt werden, da von den 288 reaktiven T-Zell-Minikulturen nur 52 für die weitere Testung mitgeführt wurden. Zudem wurden keine klonierten T-Zellen sondern aus $5 \cdot 10^4$ CD3⁺-Zellen gebildete T-Zell-Minikulturen ver-

wendet. Um die Frequenz abzuschätzen wurde davon ausgegangen, dass pro T-Zell-Minikultur nur eine T-Zelle für die Reaktivität verantwortlich war. T-Zell-Minikulturen, die eine Reaktivität gegen K562 oder HEK293T_KO^{B2M/CIITA} zeigten oder sowohl mit HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+CSF2RA und HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+TRP2 reagierten, wurden nicht eingeschlossen. In den 52 im zweiten ELISpot getesteten T-Zell-Minikulturen wurden insgesamt $2,6 \cdot 10^6$ CD3⁺-Zellen eingesetzt. Damit ergab sich bei 13 ausschließlich gegen Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} reaktiven T-Zell-Minikulturen eine geschätzte Frequenz für T-Zellen, die ein unbekanntes Antigen HLA-unabhängig erkannten, von $\approx 5,0 \cdot 10^{-6}$. Für zwei T-Zell-Minikulturen, die sich zusätzlich zu Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} auch gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA}+TRP2 reaktiv zeigten, ergab sich eine geschätzte Frequenz für T-Zellen, die TRP2 HLA-unabhängig erkannten, von $\approx 7,7 \cdot 10^{-7}$ (BA_T).

Im weiteren soll diskutiert werden, ob noch weitere Mechanismen für die gesehene Reaktivität infrage kamen. Eine Stimulation mit Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} über die klassischen HLA-Moleküle HLA-I/II ist durch die biallelische *in vivo* Mutation im B2M-Gen (108) und die mittels TALEN eingebrachte biallelische Mutation im CIITA-Gen (96) ausgeschlossen. Es gibt jedoch noch weitere Moleküle aus der HLA-Familie, welche die gesehene Reaktivität vermitteln könnten. Die HLA-I-Klasse wird weiter in klassische (vgl. Abschn. 1.3.1), nicht klassische (vgl. Abschn. 1.3.2) und HLA-I-ähnliche Moleküle (vgl. Abschn. 1.3.3) unterteilt. Diese Moleküle werden, bis auf die beiden nicht klassischen HLA-I-Moleküle MICA und MICB, nur B2M-abhängig auf der Zelloberfläche präsentiert. Sie konnten somit von Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} nicht exprimiert werden. Auch war nicht von einer durch MICA oder MICB getragenen Reaktivität auszugehen, da sie nicht in der Lage sind spezifische Peptide zu präsentieren. Sie werden im allgemeinen bei Stressreaktionen von Zellen vermehrt exprimiert (12). Die HLA-II-Klasse wird neben den klassischen noch in die nicht klassischen HLA-II unterteilt. Nicht klassische HLA-II-Moleküle (vgl. Abschn. 1.3.5) sind zwar an der Antigenprozessierung beteiligt, werden jedoch nicht an der Oberfläche der Zelle präsentiert (51,52). Somit war nicht davon auszugehen, dass die gesehene Reaktivität durch andere HLA-Moleküle vermittelt wurde.

Neben den im Rahmen dieser Arbeit gesuchten HLA-unabhängigen T-Zellen kamen jedoch auch weitere Zellen in Frage, welche ein ähnliches Reaktionsmuster gezeigt haben könnten. Als erstes war hier die Möglichkeit einer Kontamination der T-Zell-Minikulturen mit NK-Zellen in Betracht zu ziehen. Diese sind im Rahmen der Immunabwehr in der Lage Tumorzellen, die kein HLA mehr tragen, zu erkennen (129). Eine solche Erkennung hätte zu einer Aktivierung von NK-Zellen geführt und damit eine Ausschüttung von IFN- γ nach sich gezogen (126). Dass NK-Zellen einen Anteil an der Reaktivität der T-Zell-Minikulturen hatten, wurde auch dadurch wahrscheinlicher, dass im Nabelschnurblut erhöhte Konzentration an NK-Zellen zu finden sind (95). Zudem wurde gezeigt, dass das in die Stimulatorzelle eingebrachte CD80 ein möglicher zusätzlicher Trigger für die Aktivierung von NK-Zellen ist (130). Da NK-Zellen als CD56⁺ CD3⁻ charakterisiert sind, sollten durch die initial durchgeführte Isolation auf CD3⁺ Zellen unter den zur Stimulation eingesetzten Zellen, keine NK-Zellen mehr zu finden gewesen sein. Es wurde jedoch in anderen Arbeiten gezeigt, dass auch bei einer Positivselektion mittels MACS ein sehr niedriger Anteil an nicht markierten Zellen im Durchfluss gefunden werden kann (115). Zudem hätte das bei der Stimulation eingesetzte IL-2 und IL-12 auch zu einer Expansion der NK-Zellen geführt (118). Somit konnte nicht komplett ausgeschlossen werden, dass in einigen der T-Zell-Minikulturen NK-Zellen proliferierten. In dieser Arbeit wurden jedoch T-Zell-Minikulturen gefunden, welche eine deutliche Reaktivität gegen Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} und nicht gegen die HLA-negative Zielzelle HEK293T_KO^{B2M/CIITA}

sowie gegen K562 zeigten (vgl. Abschn. 4.2.4). Bei diesen T-Zell-Minikulturen war mit hoher Sicherheit nicht von einer NK-Reaktivität auszugehen.

Eine weitere Zellpopulation, die in diesem Zusammenhang betrachtet werden musste, war die der NKT-Zellen (vgl. Abschn. 1.4.3.5). NKT-Zellen exprimieren im Gegensatz zu NK-Zellen neben CD56 auch CD3 (65). Sie sind nach Aktivierung ebenfalls in der Lage IFN- γ auszuschütten (131). In der Literatur wird vorwiegend eine Erkennung von Lipidantigenen beschrieben (132) (vgl. Abschn. 1.4.3.5). Da die durchgeführte Selektion auf CD3⁺ Zellen NKT-Zellen nicht ausgeschlossen hätte, wären sie ein möglicher Bestandteil der T-Zell-Minikulturen gewesen. Allerdings ist für NKT-Zellen vor allem eine Erkennung über das MHC-I-ähnliche CD1D beschrieben (68). Da dieses jedoch nur B2M-abhängig auf der Zelloberfläche exprimiert wird, kann es somit von Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} nicht präsentiert werden. Somit ist auch eine Erkennung der Stimulatorzellen durch NKT-Zellen in den T-Zell-Minikulturen unwahrscheinlich.

Eine weitere Zellpopulation, die beachtet werden musste, waren CIK-Zellen. Sie exprimieren, ähnlich den NKT-Zellen ebenfalls sowohl CD3 als auch CD56 auf der Zelloberfläche. In der Literatur wird neben einer HLA-abhängigen Erkennung von Zielzellen auch eine HLA-unabhängige Erkennung beschrieben. Wie NK-Zellen können sie auch HLA-negative Zellen erkennen (123,124). Die Generierung von solchen CIK-Zellen geschieht dabei *ex vivo* durch verschiedene Stimulationsprotokolle. Wie in Abschn. 5.2.1 beschrieben, führte in Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) eine erhöhte IL-2 Konzentration und die zusätzlich Gabe von IL-15 zur einer breiten Reaktivität aller T-Zell-Minikulturen, auch gegen K562. Es wurde deshalb von einer Expansion von CIK- oder NK-Zellen ausgegangen. Da nach Änderung auf das in dieser Arbeit beschriebene Protokoll, eine differenzierte Reaktivität der T-Zell-Minikulturen gesehen wurde, war nicht mehr von einer breiten Expansion dieser Zellpopulationen auszugehen.

Zuletzt kamen auch noch die CD3⁺ γ : δ -T-Zellen (vgl. Abschn. 1.4.4) als Auslöser der hier beschriebenen Aktivität in Frage. Jedoch machen sie im Nabelschnurblut nur einen Anteil unter einem Prozent aus (133) und scheinen nach Aktivierung nur wenig IFN- γ zu produzieren (134). In Protokollen zur *ex vivo* Vervielfältigung dieser Zellpopulation werden neben dem hier verwendeten IL-2 auch kleine, synthetische Aminophosphate verwendet (133,135), die im Rahmen dieser Arbeit nicht zum Einsatz kamen. Eine Expansion dieses Zelltyps in den hier untersuchten T-Zell-Minikulturen erscheint deswegen unwahrscheinlich. Zudem wurde in vorherigen Arbeiten im Melanommodell Ma-Mel-86 gezeigt, dass die dort beobachtete HLA-unabhängige Tumorzellerkennung ausnahmslos durch α : β -TCR vermittelt wurde (11). Zusammenfassend war deshalb mit hoher Sicherheit davon auszugehen, dass die gesehene Reaktivität auf HLA-unabhängige Weise durch α : β -T-Zellen vermittelt wurde.

5.2.4 Ergebnisse des dritten ELISpot mit allogenen Tumorzelllinien als Ziel

Nach erneuter Restimulation an *d*21 ließen sich noch 7/19 der gegen Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} aber nicht gegen HEK293T_KO^{B2M/CIITA} und K562 reaktiven T-Zell-Minikulturen für einen dritten ELISpot an *d*21 + 5 vermehren. Mit diesen erfolgte eine Testung gegen verschiedene allogene Tumorzelllinien und Ma-86-EBV-B. Die T-Zell-Minikulturen 56.1.B2 und 56.2.A5 zeigten eine Reaktivität gegen zahlreiche der eingesetzten Melanomzelllinien und hätten somit gegen ein Melanom-assoziiertes Antigen gerichtet sein können. 56.1.E5 zeigte sich, neben den Melanomzelllinien Ma-Mel-86B und D05-Mel, reaktiv für die beiden AML-Zelllinien NB4 und NOMO-1. Dabei wurde NOMO-1 aus den Knochenmarkszellen

einer Patientin mit akuter myeloischer Leukämie gewonnen (136). NB4 wurde aus dem Knochenmark einer mit einer Promyelozytenleukämie erkrankten Patientin generiert (137). Somit könnte es sich um ein Antigen gehandelt haben, welches, ähnlich wie CSF2RA, auch auf myeloischen Zellen zu finden ist (138). 56.3.C6 hatte ein ähnliches Erkennungsmuster wie 56.1.E5, erkannte jedoch noch weitere solide Tumore. Auch 56.3.G1 zeigt eine Erkennung von NOMO-1 ohne jedoch die anderen allogenen Tumore zu erkennen. Ursächlich könnte ein anderes myeloisches Antigen sein, das sich nicht auf NB4 findet. 56.1.D4 erkannte neben seiner Stimulatorzelle nur die TRP2-negative Pankreaskarzinomlinie MZ-PC-2 (11). Die Reaktivität der T-Zell-Minikultur 56.3.D7 schien rückläufig gewesen zu sein, da keine Reaktivität über dem in dieser Arbeit festgelegtem Grenzwert gesehen wurde. Insgesamt zeigten sich somit noch 6/7 T-Zell-Minikulturen reaktiv. Hiervon zeigte jedoch keine eine Reaktivität gegen die CSF2RA und TRP2 exprimierende Ma-Mel-86C oder die TRP2 exprimierende Ma-Mel-86F. Auch die ebenfalls HLA-negative und TRP2 exprimierende Melanomzelllinie UKRV-Mel-02 (11) wurde nicht erkannt.

Die Ergebnisse dieser Auswertung mussten jedoch mit deutlicher Vorsicht betrachtet werden, da die meisten Tumorzelllinien nicht HLA-negativ waren, sodass auch eine Reaktivität auf allogenes HLA nicht ausgeschlossen werden konnte. Zudem erfolgte keine Blockade mit CD3, um eine Reaktivität über den TCR nachzuweisen. Außerdem wurden keine Leerversuche ohne Zielzellen zum Ausschluss einer unspezifischen Reaktivität durchgeführt. Allerdings fanden sich keine T-Zell-Minikulturen, die gegen alle in dieser Untersuchung getesteten Zielzellen reaktiv waren.

5.3 Ausblick

Die Immuntherapie von Tumorerkrankungen wird durch ähnliche Mechanismen erschwert, wie sie auch im Rahmen des Immunoeditings *in vivo* vorkommen. Ein wesentlicher Mechanismus dieser Immunevasion ist der Verlust von HLA, welcher die T-Zell-getragene Immunantwort und damit auch die Möglichkeiten einer T-Zell-Therapie einschränkt. Wären wir in der Lage HLA-unabhängige tumorreaktive T-Zellen zu generieren, könnten wir das Feld der einer zellulären Immuntherapie zugänglichen Tumoren deutlich erweitern. Entweder könnten so generierte T-Zellen direkt in der Therapie eingesetzt oder die für die Tumorreaktivität verantwortlichen Rezeptoren isoliert und in einer adoptiven T-Zell-Therapie verwendet werden. Bei einer HLA-unabhängigen Erkennung würde es zudem zu keiner Störung durch seltene HLA-Phänotypen kommen.

Im Rahmen dieser Arbeit ließen sich aus Nabelschnurblut T-Zell-Minikulturen identifizieren, welche eine spezifische Reaktion gegen ihre HLA-negative, aus einer Melanomzelllinie stammende, Stimulatorzelle zeigten. Zudem zeigte ein Teil dieser T-Zell-Minikulturen zusätzlich eine Reaktivität gegen TRP2. Daher kann Nabelschnurblut prinzipiell als Quelle für HLA-unabhängige T-Zellen und deren Rezeptoren dienen. In Zukunft könnte Nabelschnurblut anderer Individuen mit anderen HLA-negativen Tumorzelllinien stimuliert werden, um so reaktive T-Zellen zu isolieren. Aus ihnen könnten dann weitere HLA-unabhängige, tumorreaktive Rezeptoren isoliert werden und nach Prüfung der Sicherheit und Effektivität gegebenenfalls therapeutisch angewandt werden.

6 Zusammenfassung

Im Blut der Melanompatientin Ma-Mel-86 mit HLA Klasse I-negativen Metastasen wurde im Krankheitsverlauf das Auftreten einer HLA-unabhängigen antitumoralen T-Zellreaktion beobachtet, die durch CD8-positive zytotoxische α : β -T-Zellen vermittelt war. Zwei Zielantigene dieser T-Zellen wurden bislang identifiziert, nämlich CSF2RA (engl. für *colony stimulating factor 2 receptor subunit alpha*) und TRP2 (engl. für *tyrosinase related protein 2*). Diese Antigene werden von den jeweiligen T-Zellrezeptoren auf der Zelloberfläche erkannt. In der vorliegenden Arbeit sollte herausgefunden werden, ob sich HLA-unabhängige T-Zellen gegen die oben genannten bekannten und gegen unbekannte Tumor-assoziierte Antigene in Nabelschnurblut (UCB, engl. für *umbilical cord blood*) nachweisen lassen. Dafür sollten UCB-Lymphozyten mit HLA-negativen Tumorzellen stimuliert und expandiert werden. Bereits im Vorfeld war dafür in der Zelllinie Ma-Mel-86B, welche aufgrund einer spontanen biallelischen *B2M*-Geneletion kein HLA Klasse I auf der Oberfläche trägt, durch einen TALEN-vermittelten Knockout des Gens *CIITA* die Expression von HLA Klasse II-Molekülen ausgeschaltet worden. Zur Verbesserung der Stimulationseigenschaften sollten nunmehr diese HLA Klasse I/II-negativen Zellen mit den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD83 ausgestattet werden. Dafür wurde im ersten Schritt ein für *CD80* und *CD83* kodierendes, funktionale bicistronisches Konstrukt im retroviralen Vektor pMX hergestellt, in dem die Gene für die beiden Proteine durch eine für das virale Strukturmotiv P2A kodierende Gensequenz getrennt waren, um eine möglichst äquimolare Expression beider Moleküle zu erreichen. HLA Klasse I/II-negative Ma-Mel-86B-Zellen wurden mit dem Konstrukt retroviral transduziert, die daraufhin beide kostimulatorischen Moleküle hoch und stabil exprimierten und für die Stimulation von UCB-Lymphozyten eingesetzt wurden. Aus Nabelschnurblut wurden CD3-positive T-Zellen isoliert und in Minikulturen zu je $5 \cdot 10^4$ Zellen mit den vorbereiteten HLA-negativen Melanomzellen stimuliert. Die Responderlymphozyten der Minikulturen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten hinsichtlich der Erkennung HLA Klasse I/II-negativer Melanomzellen, HLA Klasse I/II-negativer HEK293T-Zellen, die TRP2 bzw. CSF2RA nach Transfektion überexprimierten, und K562-Zellen getestet. Gefunden wurden Minikulturen, die nur HLA-negative Melanomzellen, aber nicht Antigen-Transfektanten und nicht K562 als Zielzelle natürlicher Killerzellen, sowie Minikulturen, die neben HLA-negativen Melanomzellen auch TRP2-Transfektanten, jedoch nicht K562, erkannten. Erstere wurden als reaktiv gegen unbekannte Antigene auf der Oberfläche von Melanomzellen, letztere als TRP2-spezifisch gewertet. Sicher gegen CSF2RA gerichtete T-Zellen wurden nicht identifiziert. Die geschätzten Frequenzen HLA-unabhängiger T-Zellen in CD3-positiven UCB-Lymphozyten lagen bei $\approx 5,0 \cdot 10^{-6}$ für T-Zellen gegen Melanom-assoziierte Antigene und bei $\approx 7,7 \cdot 10^{-7}$ für T-Zellen gegen TRP2. Somit wurde mit Hilfe HLA Klasse I/II-negativer Tumorzellen das Vorhandensein von HLA-unabhängigen T-Zellen gegen TRP2 und andere Zielantigene in Nabelschnurblut nachgewiesen. Nabelschnurblut kann deshalb als Quelle für HLA-unabhängige, Tumor-reaktive T-Zellen und deren Rezeptoren dienen. Ihre therapeutische Anwendung würde es ermöglichen, den Verlust von HLA als einen wesentlichen Mechanismus der Immunevasion von Tumoren zu umgehen. Zudem würde der Einsatz HLA-unabhängiger T-Zelleffektoren breite Anwendungsoptionen versprechen.

7 Appendix

7.1 Vektorkarten

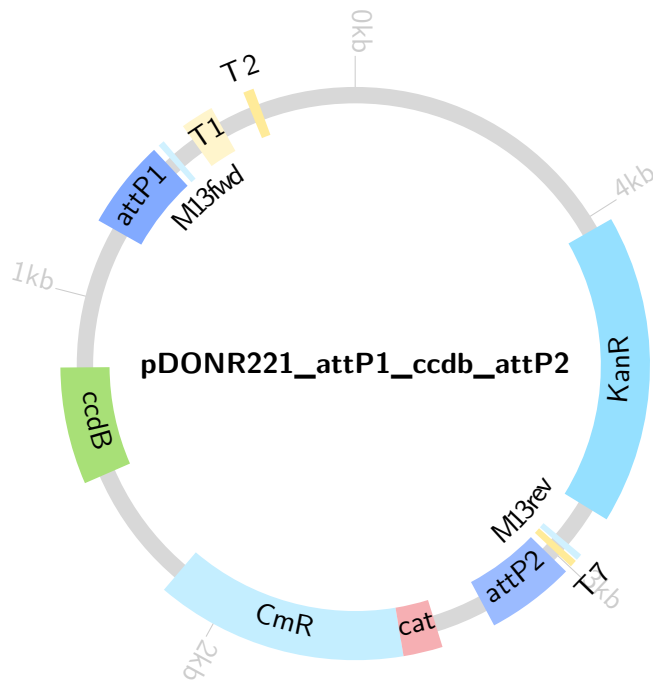


Abbildung 18: Vektorkarte von pDONR221 P1-P2. att: Rekombinationssequenz; ccdB: Toxigen B des ccd-Systems; CmR: Chloramphenicol-Resistenzgen; M13: Sequenzierungsprimersequenz des Bakteriophagen M13; T2/T7: T2 und T7 Transkriptionsterminatoren der ribosomalen Proteinbiosynthese.

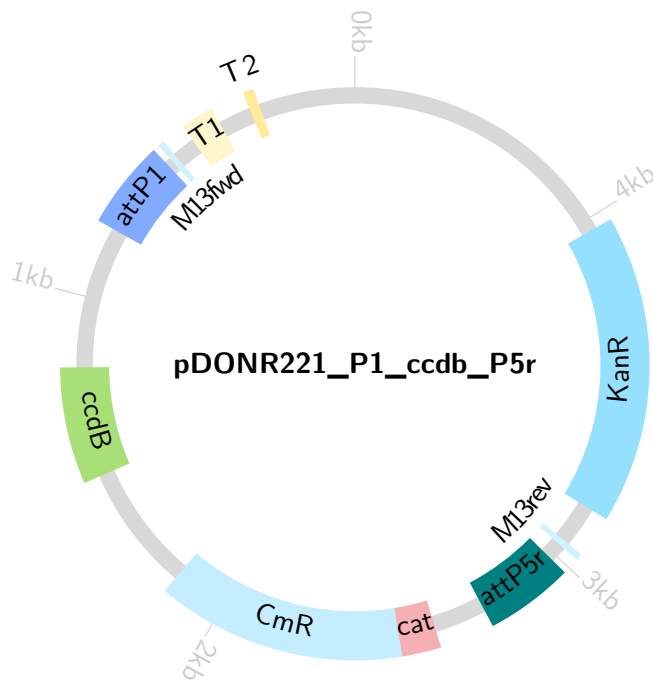


Abbildung 19: Vektorkarte von pDONR221_P1_ccdb_P5r. att: Rekombinationssequenz; ccdB: Toxin B des ccd-Systems; CmR: Chloramphenicol-Resistenzgen; M13: Sequenzierungsprimersequenz des Bakteriophagen M13; T2/T7: T2 und T7 Transkriptionsterminatoren der ribosomalen Proteinbiosynthese.

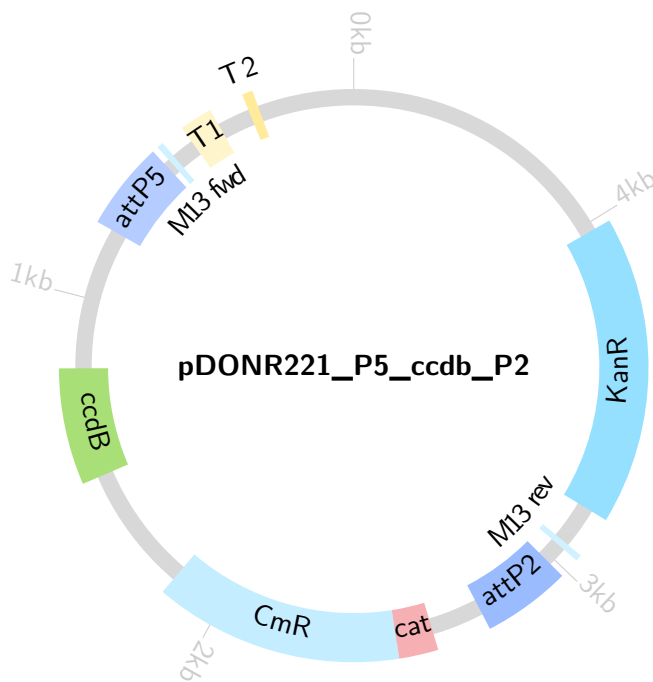


Abbildung 20: Vektorkarte von pDONR221 P5-P2. att: Rekombinationssequenz; ccdB: Toxin B des ccd-Systems; CmR: Chloramphenicol-Resistenzgen; M13: Sequenzierungsprimersequenz des Bakteriophagen M13; T2/T7: T2 und T7 Transkriptionsterminatoren der ribosomalen Proteinbiosynthese.

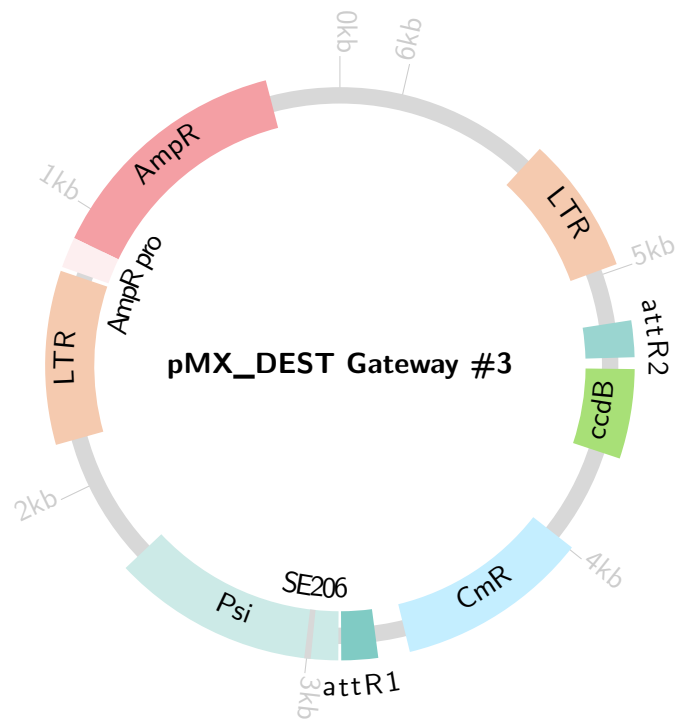


Abbildung 21: Vektorkarte von pMX_DEST Gateway #3. att: Rekombinationssequenz; ccdB: Toxin B des ccd-Systems; CmR: Chloramphenicol-Resistenzgen; LTR: lange terminale Wiederholung, befähigen durch sie flankierte Gene zur Reintegration in das Genom (Transposition); AmpR: Ampicillin-Resistenzgen; Pro: Promotor; psi: psi packaging signal, essentielle Proteine für die Verpackung der Viruserbinformation in das Capsid; SE206: Sequenzierungsprimersequenz.

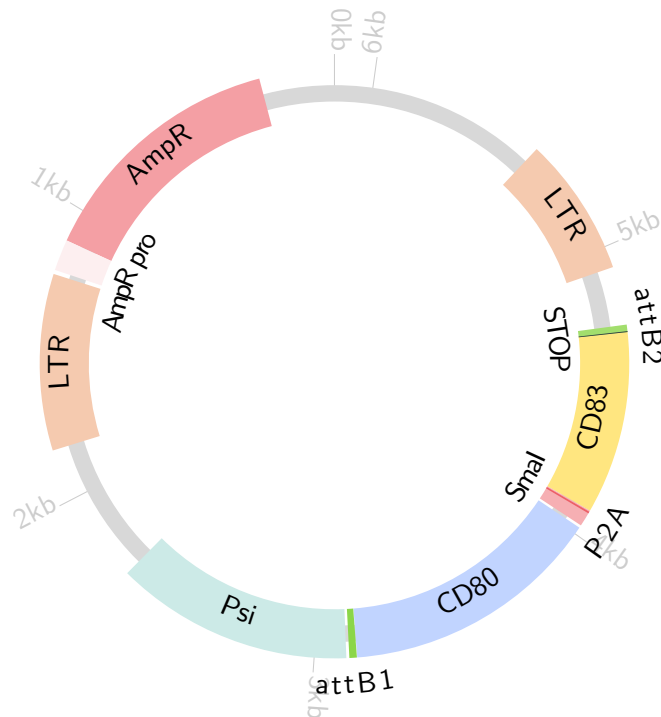


Abbildung 22: Vektorkarte von pMX_DEST_attB1_CD80^{744C>T}_P2A_CD83_STOP_attB2. att: Rekombinationssequenz; +CD80g und +CD83g: kostimulatorische Proteine; P2A: Gensequenz zur kotranslationalen Trennung; SmaI: SmaI-Bindungsstelle; STOP: STOP-Codon; LTR: lange terminale Wiederholung, befähigen durch sie flankierte Gene zur Reintegration in das Genom (Transposition); AmpR: Ampicillin-Resistenzgen; Pro: Promotor; psi: psi packaging signal essentielle Proteine für die Verpackung der Viruserbinformation in das Capsid; SE206: Primersequenz für Sequenzierung.

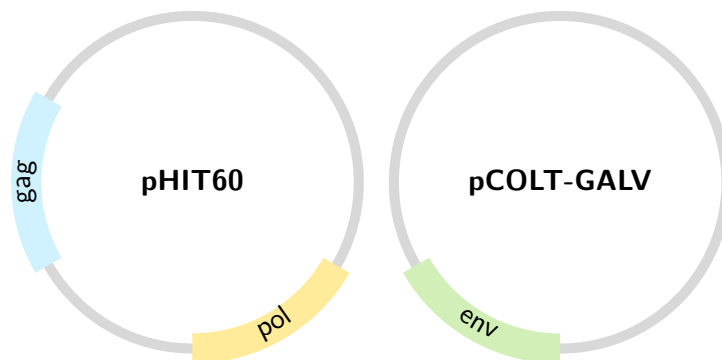


Abbildung 23: Vektorkarte von pCOLT-GALV und pHIT60. gag und pol: Polymerase- und Strukturprotein von MLV (*murine leukemia viruses*, engl. für murines Leukämievirus); env: Hüllprotein des Gibbonaffen-Leukämievirus (GALV). Komplette Sequenz der Vektoren nicht publiziert.

7.2 ELIspot Messungen

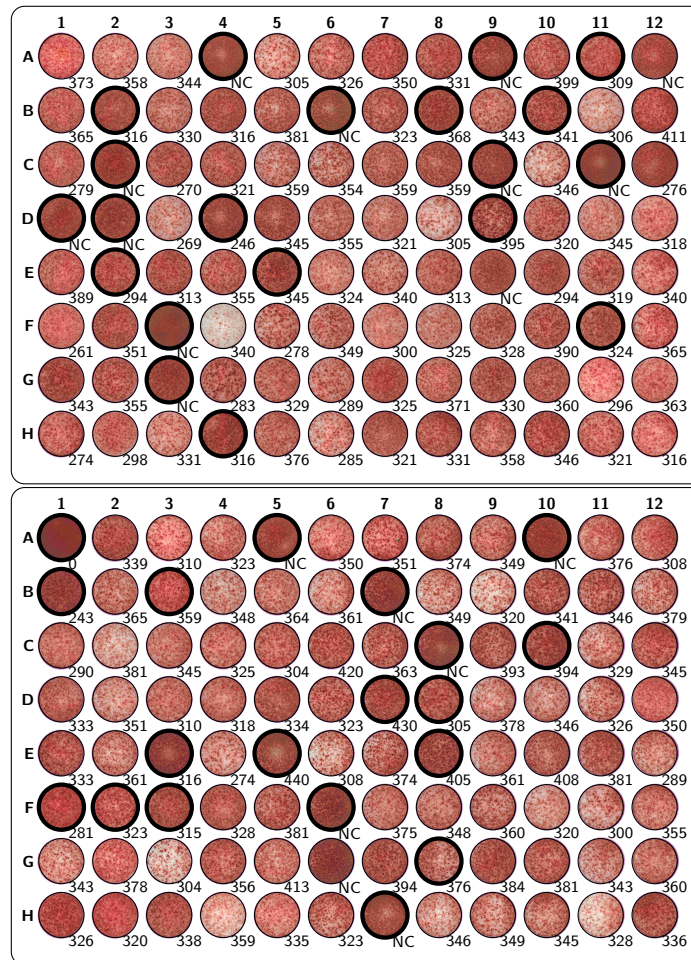
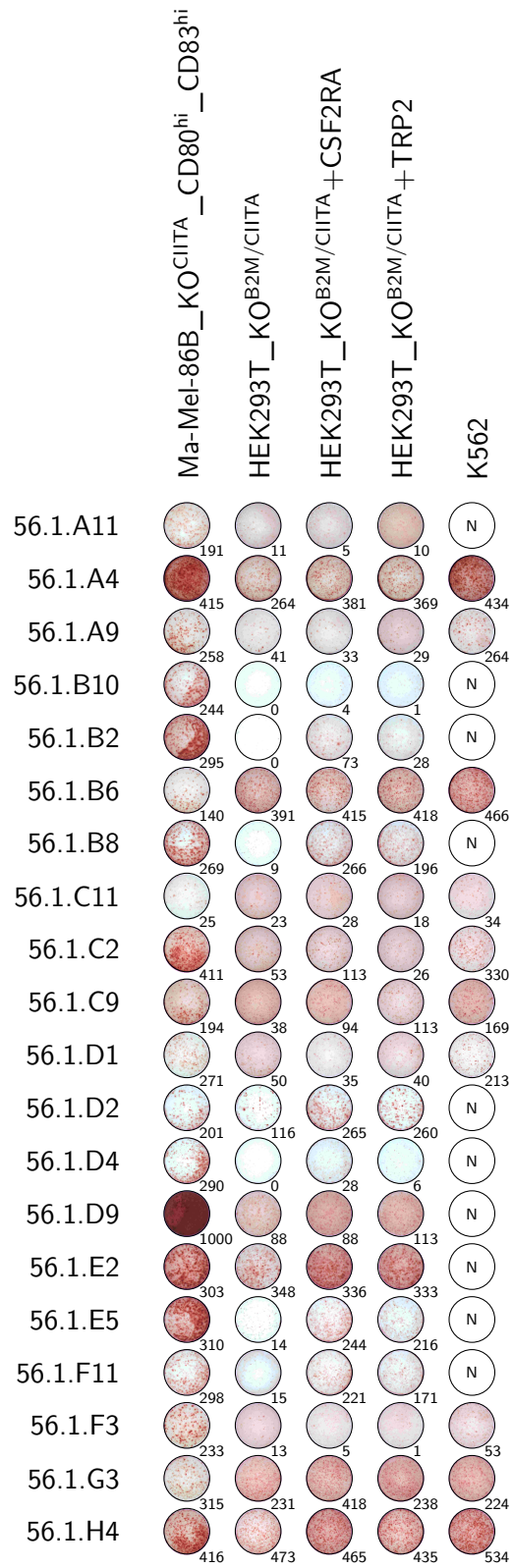
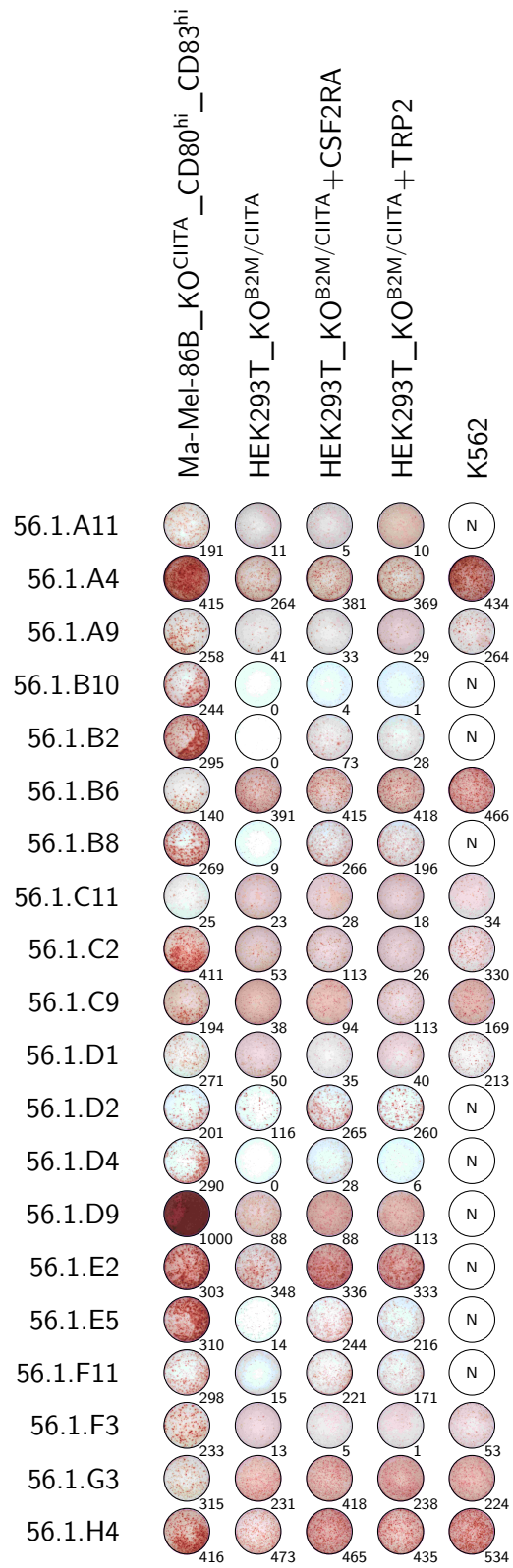
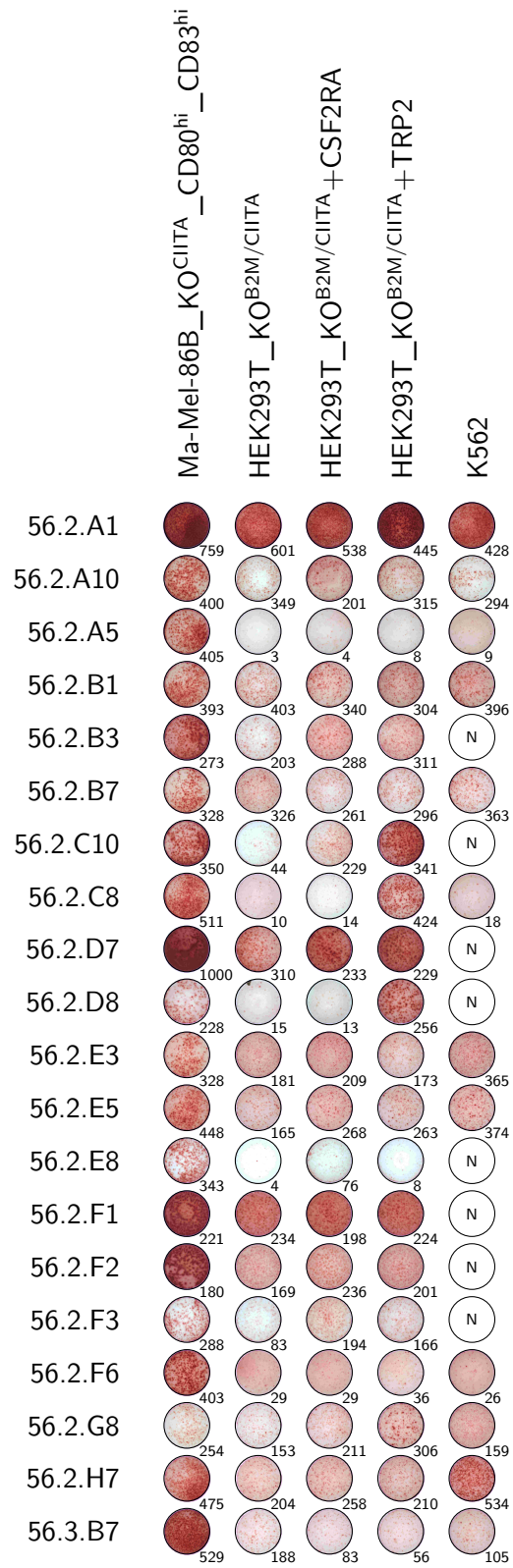


Abbildung 24: Messung der ELIspot Ergebnisse an $d7 + 5$ der T-Zell-Minikulturen nach ersten Restimulation mit Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi} als Stimulatorzelle und als Ziel (Platte 1 und Platte 2; Platte 3 nicht gezeigt). NC (*not countable*, engl. für nicht zählbar).







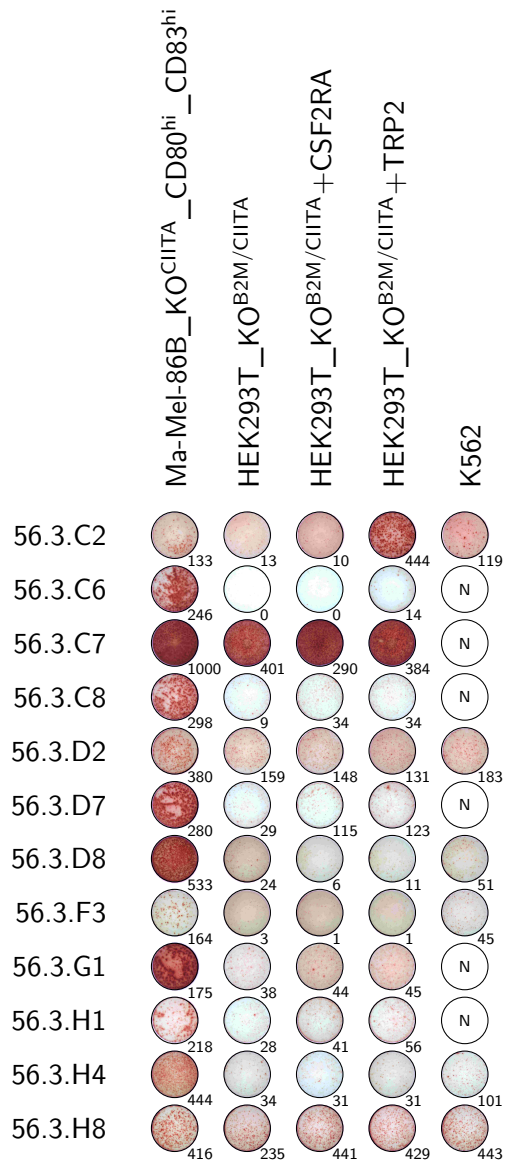


Abbildung 25: Messungen der ELIspot Ergebnisse an $d14 + 5$ der T-Zell-Minikulturen mit verschiedenen Zielzellen nach der zweiten Restimulation mit Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi}. NC (*not countable*, engl. für nicht zählbar), N (nicht getestet).

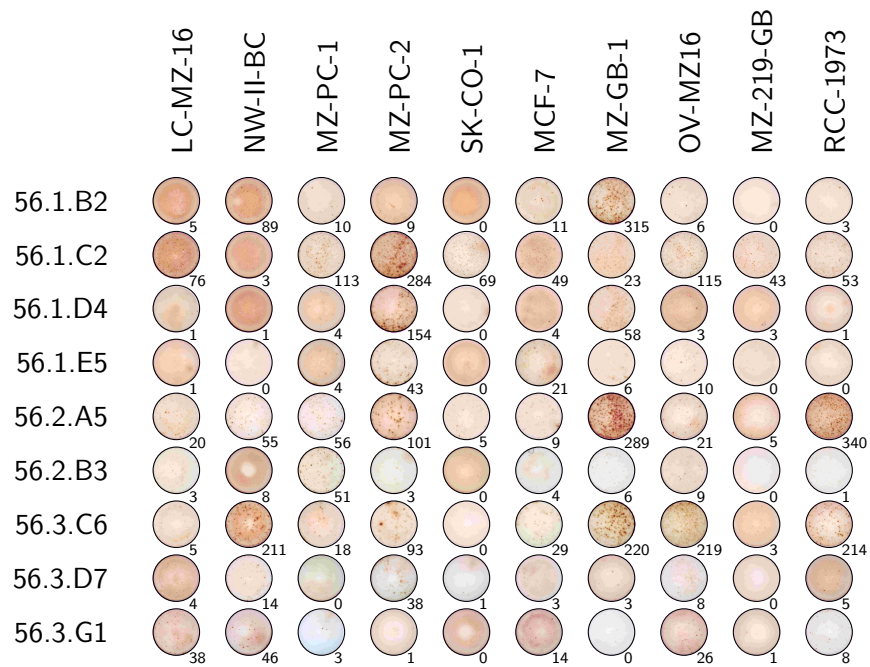
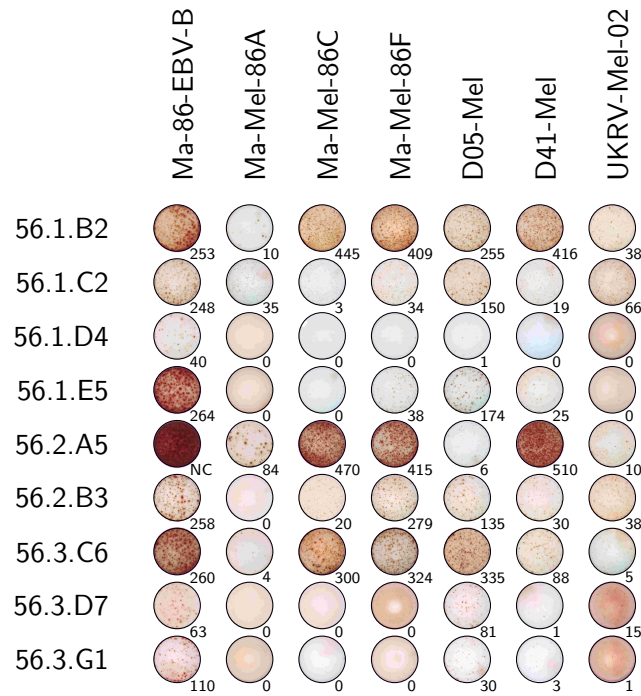


Abbildung 26: Messungen der ELISpot Ergebnisse an *d21 + 5* der T-Zell-Minikulturen mit verschiedenen Tumorzelllinien nach einer dritten Restimulation mit Ma-Mel-86B_KO^{CIITA}_CD80^{hi}_CD83^{hi}. NC (*not countable*, engl. für nicht zählbar).

8 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt. Todesursachen nach Krankheitsarten 2020. [zitiert 11. Februar 2022]; Verfügbar unter: www.destatis.de
2. Prehn RT, Main JM. Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst.* 1. Juni 1957;18:769–78.
3. Birkeland SA, Storm HH, Lamm LU, Barlow L, Blohmé I, Forsberg B, u. a. Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986. *Int J Cancer.* 17. Januar 1995;60:183–9.
4. Serraino D, Piselli P, Busnach G, Burra P, Citterio F, Arbustini E, u. a. Risk of cancer following immunosuppression in organ transplant recipients and in HIV-positive individuals in southern Europe. *Eur J Cancer.* 1. September 2007;43:2117–23.
5. Clemente CG, Mihm MCJr, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer.* 1. April 1996;77:1303–10.
6. Zorn E, Hercend T. A MAGE-6-encoded peptide is recognized by expanded lymphocytes infiltrating a spontaneously regressing human primary melanoma lesion. *Eur J Immunol.* 1. Februar 1999;29:602–7.
7. Ferradini L, Mackensen A, Genevée C, Bosq J, Duvillard P, Avril MF, u. a. Analysis of T cell receptor variability in tumor-infiltrating lymphocytes from a human regressive melanoma. Evidence for in situ T cell clonal expansion. *J Clin Invest.* 1. März 1993;91:1183–90.
8. Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol.* 1. Januar 2006;126:32–41.
9. Gerloni M, Zanetti M. CD4 T cells in tumor immunity. *Springer Semin Immunopathol.* 1. Juni 2005;27:37–48.
10. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Pérez-Villar JJ, López-Botet M, Duggan-Keen M, u. a. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today.* 1. Februar 1997;18:89–95.
11. Lübcke S. Identifizierung und Charakterisierung T-zellerkannter Tumorantigene im Melanommodell Ma-Mel-86. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. 2012;
12. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, u. a. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science.* 30. Juli 1999;285:727–9.
13. Schatz DG, Oettinger MA, Schlissel MS. V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu Rev Immunol.* 1. Januar 1992;10:359–83.
14. Macleod K. Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev.* 1. Februar 2000;10:81–93.
15. Hayakawa Y, Smyth MJ. Innate immune recognition and suppression of tumors. *Adv Cancer Res.* 1. Januar 2006;95:293–322.
16. Boon T, Bruggen P van der. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med.* 1. März 1996;183:725–9.

17. Guevara-Patiño JA, Turk MJ, Wolchok JD, Houghton AN. Immunity to cancer through immune recognition of altered self: studies with melanoma. *Adv Cancer Res.* 1. Januar 2003;90:157–77.
18. Seliger B, Ritz U, Ferrone S. Molecular mechanisms of HLA class I antigen abnormalities following viral infection and transformation. *Int J Cancer.* 1. Januar 2006;118:129–38.
19. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 1. Januar 2004;22:329–60.
20. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature.* 5. März 1998;392:86–9.
21. Feltkamp MC, Smits HL, Vierboom MP, Minnaar RP, Jongh BM de, Drijfhout JW, u. a. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur J Immunol.* 1. September 1993;23:2242–9.
22. Gabrilovich DI, Ciernik IF, Carbone DP. Dendritic cells in antitumor immune responses. I. Defective antigen presentation in tumor-bearing hosts. *Cell Immunol.* 25. Mai 1996;170:101–10.
23. Coulie PG, Van den Eynde BJ, Bruggen P van der, Boon T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 1. Februar 2014;14:135–46.
24. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature.* 17. Dezember 1998;396:643–9.
25. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol.* 1. November 2002;3:999–1005.
26. Onrust SV, Hartl PM, Rosen SD, Hanahan D. Modulation of L-selectin ligand expression during an immune response accompanying tumorigenesis in transgenic mice. *J Clin Invest.* 1. Januar 1996;97:54–64.
27. Oyama T, Ran S, Ishida T, Nadaf S, Kerr L, Carbone DP, u. a. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol.* 1. Februar 1998;160:1224–32.
28. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol.* 1. Januar 2000;74:181–273.
29. Garcia-Lora A, Algarra I, Gaforio JJ, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Immunoselection by T lymphocytes generates repeated MHC class I-deficient metastatic tumor variants. *Int J Cancer.* 1. Januar 2001;91:109–19.
30. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature.* 17. Oktober 2002;419:734–8.
31. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, u. a. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23. Juni 1998;95:7556–61.
32. Adams EJ, Luoma AM. The adaptable major histocompatibility complex (MHC) fold: structure and function of nonclassical and MHC class I-like molecules. *Annu Rev Immunol.* 1. Januar 2013;31:529–61.

33. Bjorkman PJ, Parham P. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem.* 1. Januar 1990;59:253–88.
34. Gattoni-Celli S, Kirsch K, Timpane R, Iselbacher KJ. Beta 2-microglobulin gene is mutated in a human colon cancer cell line (HCT) deficient in the expression of HLA class I antigens on the cell surface. *Cancer Res.* 1. März 1992;52:1201–4.
35. Paschen A, Arens N, Sucker A, Greulich-Bode KM, Fonsatti E, Glohini A, u. a. The coincidence of chromosome 15 aberrations and beta2-microglobulin gene mutations is causative for the total loss of human leukocyte antigen class I expression in melanoma. *Clin Cancer Res.* 1. Juni 2006;12:3297–305.
36. Braud V, Jones EY, McMichael A. The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. *Eur J Immunol.* 1. Mai 1997;27:1164–9.
37. Braud VM, Allan DS, O’Callaghan CA, Söderström K, D’Andrea A, Ogg GS, u. a. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature.* 19. Februar 1998;391:795–9.
38. Rizzo R, Melchiorri L, Stignani M, Baricordi OR. HLA-G expression is a fundamental prerequisite to pregnancy. *Hum Immunol.* 1. April 2007;68:244–50.
39. Rouas-Freiss N, Moreau P, Ferrone S, Carosella ED. HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer Res.* 15. November 2005;65:10139–44.
40. Ishitani A, Sageshima N, Lee N, Dorofeeva N, Hatake K, Marquardt H, u. a. Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. *J Immunol.* 1. August 2003;171:1376–84.
41. Lin A, Zhang X, Ruan YY, Wang Q, Zhou WJ, Yan WH. HLA-F expression is a prognostic factor in patients with non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer.* 1. Dezember 2011;74:504–9.
42. Zhang X, Lin A, Zhang JG, Bao WG, Xu DP, Ruan YY, u. a. Alteration of HLA-F and HLA I antigen expression in the tumor is associated with survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 1. Januar 2013;132:82–9.
43. Goodridge JP, Burian A, Lee N, Geraghty DE. HLA-F complex without peptide binds to MHC class I protein in the open conformer form. *J Immunol.* 1. Juni 2010;184:6199–208.
44. McWilliam HEG, Villadangos JA. How MR1 Presents a Pathogen Metabolic Signature to Mucosal-Associated Invariant T (MAIT) Cells. *Trends Immunol.* 1. September 2017;38:679–89.
45. Crowther MD, Dolton G, Legut M, Caillaud ME, Lloyd A, Attaf M, u. a. Genome-wide CRISPR-Cas9 screening reveals ubiquitous T cell cancer targeting via the monomorphic MHC class I-related protein MR1. *Nat Immunol.* 1. Februar 2020;21:178–85.
46. Porcelli S, Morita CT, Brenner MB. CD1b restricts the response of human CD4-8- T lymphocytes to a microbial antigen. *Nature.* 10. Dezember 1992;360:593–7.
47. Beckman EM, Porcelli SA, Morita CT, Behar SM, Furlong ST, Brenner MB. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted $\alpha\beta$ T cells. *Nature.* 15. Dezember 1994;372:691–4.

48. Moody DB, Ulrichs T, Mühlecker W, Young DC, Gurcha SS, Grant E, u. a. CD1c-mediated T-cell recognition of isoprenoid glycolipids in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Nature*. 20. April 2000;404:884–8.
49. Jahng A, Maricic I, Aguilera C, Cardell S, Halder RC, Kumar V. Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide. *J Exp Med*. 5. April 2004;199:947–57.
50. Steimle V, Siegrist CA, Mottet A, Lisowska-Groszpiette B, Mach B. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science*. 1. Juli 1994;265:106–9.
51. Yin L, Stern LJ. HLA-DM Focuses on Conformational Flexibility Around P1 Pocket to Catalyze Peptide Exchange. *Front Immunol*. 17. Oktober 2013;4:336.
52. Mellins ED, Stern LJ. HLA-DM and HLA-DO, key regulators of MHC-II processing and presentation. *Curr Opin Immunol*. 1. Februar 2014;26:115–22.
53. Schwarz BA, Bhandoola A. Trafficking from the bone marrow to the thymus: a prerequisite for thymopoiesis. *Immunol Rev*. 1. Februar 2006;209:47–57.
54. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol*. 1. Januar 2003;21:139–76.
55. Murphy K, Weaver C. *Janeway's immunobiology*. 9th edition. Taylor & Francis Group; Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC; 2017.
56. Townsend A, Bodmer H. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 1. Januar 1989;7:601–24.
57. Gay D, Maddon P, Sekaly R, Talle MA, Godfrey M, Long E, u. a. Functional interaction between human T-cell protein CD4 and the major histocompatibility complex HLA-DR antigen. *Nature*. 13. August 1987;328:626–9.
58. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1. Januar 2004;22:531–62.
59. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 30. Mai 2008;133:775–87.
60. Miyara M, Gorochov G, Ehrenstein M, Musset L, Sakaguchi S, Amoura Z. Human FoxP3⁺ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 1. Oktober 2011;10:744–55.
61. Petersen RP, Campa MJ, Sperlazza J, Conlon D, Joshi MB, Harpole DH Jr, u. a. Tumor infiltrating Foxp3⁺ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer*. 15. Dezember 2006;107:2866–72.
62. Lalvani A, Brookes R, Hambleton S, Britton WJ, Hill AV, McMichael AJ. Rapid effector function in CD8⁺ memory T cells. *J Exp Med*. 15. September 1997;186:859–65.
63. Wang X, Berger C, Wong CW, Forman SJ, Riddell SR, Jensen MC. Engraftment of human central memory-derived effector CD8⁺ T cells in immunodeficient mice. *Blood*. 10. Februar 2011;117:1888–98.

64. Sykes M. Unusual T cell populations in adult murine bone marrow. Prevalence of CD3+CD4-CD8- and α/β TCR+NK1.1+ cells. *J Immunol.* 15. November 1990;145:3209–15.
65. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol.* 1. März 2004;4:231–7.
66. Arase H, Arase N, Nakagawa K, Good RA, Onoé K. NK1.1+ CD4+ CD8- thymocytes with specific lymphokine secretion. *Eur J Immunol.* 1. Januar 1993;23:307–10.
67. Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, Brenner MB. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med.* 4. März 2002;195:625–36.
68. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, u. a. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of $V\alpha 14$ NKT cells by glycosylceramides. *Science.* 28. November 1997;278:1626–9.
69. Groh V, Porcelli S, Fabbi M, Lanier LL, Picker LJ, Anderson T, u. a. Human lymphocytes bearing T cell receptor γ/δ are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med.* 1. April 1989;169:1277–94.
70. Kalyan S, Kabelitz D. Defining the nature of human $\gamma\delta$ T cells: a biographical sketch of the highly empathetic. *Cell Mol Immunol.* 1. Januar 2013;10:21–9.
71. Born WK, Reardon CL, O'Brien RL. The function of $\gamma\delta$ T cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 1. Februar 2006;18:31–8.
72. Shen Y, Zhou D, Qiu L, Lai X, Simon M, Shen L, u. a. Adaptive immune response of $V\gamma 2V\delta 2^+$ T cells during mycobacterial infections. *Science.* 22. März 2002;295:2255–8.
73. Chien YH, Meyer C, Bonneville M. $\gamma\delta$ T cells: first line of defense and beyond. *Annu Rev Immunol.* 1. Januar 2014;32:121–55.
74. Brandes M, Willmann K, Bioley G, Lévy N, Eberl M, Luo M, u. a. Cross-presenting human $\gamma\delta$ T cells induce robust CD8+ $\alpha\beta$ T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17. Februar 2009;106:2307–12.
75. De Rosa SC, Andrus JP, Perfetto SP, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA, u. a. Ontogeny of $\gamma\delta$ T cells in humans. *J Immunol.* 1. Februar 2004;172:1637–45.
76. Barnd DL, Lan MS, Metzgar RS, Finn OJ. Specific, major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1. September 1989;86:7159–63.
77. Wang QJ, Hanada K, Yang JC. Characterization of a novel nonclassical T cell clone with broad reactivity against human renal cell carcinomas. *J Immunol.* 15. September 2008;181:3769–76.
78. Hanada K, Wang QJ, Inozume T, Yang JC. Molecular identification of an MHC-independent ligand recognized by a human α/β T-cell receptor. *Blood.* 5. Mai 2011;117:4816–25.
79. Van Laethem F, Sarafova SD, Park JH, Tai X, Pobezinsky L, Ginter TI, u. a. Deletion of CD4 and CD8 coreceptors permits generation of $\alpha\beta$ T cells that recognize antigens independently of the MHC. *Immunity.* 1. November 2007;27:735–50.

80. Tikhonova AN, Van Laethem F, Hanada K, Lu J, Pobeziński LA, Hong C, u. a. T cell receptors that do not undergo major histocompatibility complex-specific thymic selection possess antibody-like recognition specificities. *Immunity*. 27. Januar 2012;36:79–91.
81. Meyer L. Optimierung des HLA-unabhängigen Tyrosinase-Related-Protein 2 (TRP-2)-spezifischen T-Zellrezeptors. Fachbereich 04:Universitätsmedizin, Institut für Molekulare Medizin, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. 2013;13(7):23–31.
82. Wölfel M. Konstruktion eines HLA-unabhängigen "single-chain" T-Zellrezeptors (scTCR) gegen TRP2. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. 22. Mai 2020;
83. Andersen R, Borch TH, Draghi A, Gokuldass A, Rana MAH, Pedersen M, u. a. T cells isolated from patients with checkpoint inhibitor-resistant melanoma are functional and can mediate tumor regression. *Ann Oncol*. 1. Juli 2018;29:1575–81.
84. Srivastava S, Riddell SR. Engineering CAR-T cells: Design concepts. *Trends Immunol*. 1. August 2015;36:494–502.
85. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, u. a. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*. 16. Oktober 2014;371:1507–17.
86. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, u. a. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 28. Dezember 2017;377:2531–44.
87. Anderson MK, Torosyan A, Halford Z. Brexucabtagene Autoleucel: A Novel Chimeric Antigen Receptor T-cell Therapy for the Treatment of Mantle Cell Lymphoma. *Ann Pharmacother*. 2. August 2021;None:10600280211026338.
88. Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol*. 1. März 2018;18:153–67.
89. Sondak VK, Smalley KS, Kudchadkar R, Gripon S, Kirkpatrick P. Ipilimumab. *Nat Rev Drug Discov*. 1. Juni 2011;10:411–2.
90. Thompson RH, Dong H, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, u. a. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 15. März 2007;13:1757–61.
91. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, u. a. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 28. Juni 2012;366:2443–54.
92. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med*. 4. Mai 2000;342:1350–8.
93. Assanto GM, Riemma C, Malaspina F, Perrone S, Lucia M, Annechini G, u. a. Long-Term Treatment of Hairy Cell Leukemia Patients with Interferon: Clinical and Molecular Aspects. *Blood*. 1. Mai 2020;136:37.
94. Bewersdorf JP, Giri S, Wang R, Podoltsev N, Williams RT, Tallman MS, u. a. Interferon α therapy in essential thrombocythemia and polycythemia vera—a systematic review and meta-analysis. *Leukemia*. 1. Juni 2021;35:1643–60.

95. Newcomb JD, Sanberg PR, Klasko SK, Willing AE. Umbilical cord blood research: current and future perspectives. *Cell Transplant.* 1. Januar 2007;16:151–8.
96. Derigs P. Erfassung HLA-unabhängiger, antitumoraler T-Zellantworten durch Stimulation mit menschlichen HLA I/II-negativen Tumorzelllinien im Blut von Melanompatienten. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. 2018;
97. Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood.* 1. März 1975;45:321–34.
98. Lozzio BB, Lozzio CB. Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line. *Leuk Res.* 1. Januar 1979;3:363–70.
99. Maziarz RT, Mentzer SJ, Burakoff SJ, Faller DV. Distinct effects of interferon-gamma and MHC class I surface antigen levels on resistance of the K562 tumor cell line to natural killer-mediated lysis. *Cell Immunol.* 15. Oktober 1990;130:329–38.
100. Katzen F. Gateway recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opin Drug Discov.* 1. April 2007;2:571–89.
101. Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, u. a. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods.* 1. Juni 2004;33:95–103.
102. Masotti A, Mossa G, Cametti C, Ortaggi G, Bianco A, Grosso ND, u. a. Comparison of different commercially available cationic liposome-DNA lipoplexes: Parameters influencing toxicity and transfection efficiency. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1. Februar 2009;68:136–44.
103. Soneoka Y, Cannon PM, Ramsdale EE, Griffiths JC, Romano G, Kingsman SM, u. a. A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res.* 25. Februar 1995;23:628–33.
104. Weijtens ME, Willemsen RA, Hart EH, Bolhuis RL. A retroviral vector system 'STITCH' in combination with an optimized single chain antibody chimeric receptor gene structure allows efficient gene transduction and expression in human T lymphocytes. *Gene Ther.* 1. September 1998;5:1195–203.
105. Britten CM, Meyer RG, Kreer T, Drexler I, Wölfel T, Herr W. The use of HLA-A*0201-transfected K562 as standard antigen-presenting cells for CD8(+) T lymphocytes in IFN-gamma ELISPOT assays. *J Immunol Methods.* 1. Januar 2002;259:95–110.
106. Benoist C, Mathis D. Regulation of major histocompatibility complex class-II genes: X, Y and other letters of the alphabet. *Annu Rev Immunol.* 1. Januar 1990;8:681–715.
107. Elsen PJ van den, Stoep N van der. Class II transactivator (CIITA) deficiency in tumor cells: complicated mechanisms or not? *Am J Pathol.* 1. Juli 2003;163:373-5; author reply 375-6.
108. Li L, Dong M, Wang XG. The Implication and Significance of Beta 2 Microglobulin: A Conservative Multifunctional Regulator. *Chin Med J (Engl).* 20. Februar 2016;129:448–55.
109. Peach RJ, Bajorath J, Naemura J, Leytze G, Greene J, Aruffo A, u. a. Both extracellular immunoglobulin-like domains of CD80 contain residues critical for binding T cell surface receptors CTLA-4 and CD28. *J Biol Chem.* 8. September 1995;270:21181–7.

110. Hirano N, Butler MO, Xia Z, Ansén S, Bergwelt-Baildon MS von, Neubergh D, u. a. Engagement of CD83 ligand induces prolonged expansion of CD8+ T cells and preferential enrichment for antigen specificity. *Blood*. 15. Februar 2006;107:1528–36.
111. Szymczak AL, Workman CJ, Wang Y, Vignali KM, Dilioglou S, Vanin EF, u. a. Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nat Biotechnol*. 1. Mai 2004;22:589–94.
112. Celie PH, Parret AH, Perrakis A. Recombinant cloning strategies for protein expression. *Curr Opin Struct Biol*. 1. Juni 2016;38:145–54.
113. Kitamura T, Koshino Y, Shibata F, Oki T, Nakajima H, Nosaka T, u. a. Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Exp Hematol*. 1. November 2003;31:1007–14.
114. Germenis AE, Karanikas V. Cord blood as a source of non-senescent lymphocytes for tumor immunotherapy. *J Reprod Immunol*. 1. Mai 2010;85:47–50.
115. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*. 1. Januar 1990;11:231–8.
116. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*. 23. April 1993;260:547–9.
117. Wang KS, Frank DA, Ritz J. Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. *Blood*. 15. Mai 2000;95:3183–90.
118. Liao W, Lin JX, Leonard WJ. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr Opin Immunol*. 1. Oktober 2011;23:598–604.
119. Hofmeister R, Khaled AR, Benbernou N, Rajnavolgyi E, Muegge K, Durum SK. Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1. März 1999;10:41–60.
120. Rathmell JC, Farkash EA, Gao W, Thompson CB. IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells. *J Immunol*. 15. Dezember 2001;167:6869–76.
121. Waldmann TA, Tagaya Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol*. 1. Januar 1999;17:19–49.
122. Lu PH, Negrin RS. A novel population of expanded human CD3+CD56+ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency. *J Immunol*. 15. August 1994;153:1687–96.
123. Pievani A, Borleri G, Pende D, Moretta L, Rambaldi A, Golay J, u. a. Dual-functional capability of CD3+CD56+ CIK cells, a T-cell subset that acquires NK function and retains TCR-mediated specific cytotoxicity. *Blood*. 22. September 2011;118:3301–10.
124. Schmidt-Wolf IG, Negrin RS, Kiem HP, Blume KG, Weissman IL. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity. *J Exp Med*. 1. Juli 1991;174:139–49.

125. Yang Y, Wang RQ, Zhong YM, Meng MY, Zhao YY, Yang LR, u. a. Efficacy of Enhanced Cytokine-Induced Killer Cells as an Adjuvant Immunotherapy for Renal Cell Carcinoma: Preclinical and Clinical Studies. *J Healthc Eng.* 8. September 2021;2021:5709104.
126. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol.* 1. Januar 2007;96:41–101.
127. Garson D, Dokh elar MC, Wakasugi H, Mishal Z, Tursz T. HLA class-I and class-II antigen expression by human leukemic K562 cells and by Burkitt-K562 hybrids: modulation by differentiation inducers and interferon. *Exp Hematol.* 1. Oktober 1985;13:885–90.
128. Cerboni C, Mousavi-Jazi M, Wakiguchi H, Carbone E, K arre K, S oderstr om K. Synergistic effect of IFN-gamma and human cytomegalovirus protein UL40 in the HLA-E-dependent protection from NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol.* 1. Oktober 2001;31:2926–35.
129. Terunuma H, Deng X, Dewan Z, Fujimoto S, Yamamoto N. Potential role of NK cells in the induction of immune responses: implications for NK cell-based immunotherapy for cancers and viral infections. *Int Rev Immunol.* 1. Januar 2008;27:93–110.
130. Chambers BJ, Salcedo M, Ljunggren HG. Triggering of natural killer cells by the costimulatory molecule CD80 (B7-1). *Immunity.* 1. Oktober 1996;5:311–7.
131. Balato A, Unutmaz D, Gaspari AA. Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions. *J Invest Dermatol.* 1. Juli 2009;129:1628–42.
132. Terabe M, Berzofsky JA. Tissue-Specific Roles of NKT Cells in Tumor Immunity. *Front Immunol.* 15. August 2018;9:1838.
133. Placido R, Auricchio G, Gabriele I, Galli E, Brunetti E, Colizzi V, u. a. Characterization of the immune response of human cord-blood derived $\gamma\delta$ T cells to stimulation with aminobisphosphonate compounds. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 1. Januar 2011;24:101–10.
134. Campos Alberto EJ, Shimojo N, Aoyagi M, Kohno Y. Differential effects of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-12 on isopentenyl pyrophosphate-stimulated interferon-gamma production by cord blood $V\gamma9$ T cells. *Immunology.* 1. Juni 2009;127:171–7.
135. Espinosa E, Belmont C, Pont F, Luciani B, Poupot R, Romagn e F, u. a. Chemical synthesis and biological activity of bromohydrin pyrophosphate, a potent stimulator of human $\gamma\delta$ T cells. *J Biol Chem.* 25. Mai 2001;276:18337–44.
136. Adachi K, Saito H. Induction of junB expression, but not c-jun, by granulocyte colony-stimulating factor or macrophage colony-stimulating factor in the proliferative response of human myeloid leukemia cells. *J Clin Invest.* 1. Mai 1992;89:1657–61.
137. Borrow J, Solomon E. Molecular analysis of the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukaemia. *Baillieres Clin Haematol.* 1. Oktober 1992;5:833–56.
138. Francisco-Cruz A, Aguilar-Santelises M, Ramos-Espinosa O, Mata-Espinosa D, Marquina-Castillo B, Barrios-Payan J, u. a. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: not just another haematopoietic growth factor. *Med Oncol.* 1. Januar 2014;31:774.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Wölfel für die Themenstellung, das entgegengebrachte Vertrauen und die hervorragende Unterstützung. Ich danke ihm dafür, dass er mir während des langen Zeitraums stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mich auf strukturierte, zuverlässige und stets freundliche Art durch den Prozess der Promotion geführt hat. Mein weiterer besonderer Dank gilt Frau Dr. Catherine Wölfel für ihre geduldige Unterweisung und Hilfe im Labor, die vielen wertvolle Hinweise und Ratschläge und auch für die aufmunternden Worte, sollte es mal einen Rückschlag gegeben haben. Zudem möchte ich auch Frau PD Dr. rer. nat. Claudia Paret danken, dass sie sich bereit erklärt hat als Zweitgutachter für meine Arbeit zur Verfügung zu stehen.

Des weiteren möchte ich allen Mitarbeitern im Labor für die freundschaftliche Aufnahme im Team und die Unterstützung während der Arbeit danken. Ich danke auch meiner Mutter für das Korrekturlesen, die viele Geduld und aufbauenden Worte. Ganz besonders möchte ich auch meiner Ehefrau dafür danken, dass sie mir immer liebevoll und aufmunternd den Rücken gestärkt hat und mir mit ihrer Zuversicht und Motivation eine große Hilfe ist – auch abseits des Studiums und der Promotion. Ich danke meinem Sohn, der mir mein größter Lichtblick ist und mich in den Schreibpausen wie kein anderer zum Lachen bringen und mir neue Energie schenken konnte.

10 Lebenslauf

Entfällt in der elektronischen Version.