

**Die Identifizierung und Charakterisierung von
HLA-Klasse I-restringierten
Minorhistokompatibilitätsantigenen und
Leukämie-assoziierten Antigenen
mittels cDNA-Expressionsklonierung**

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades
“Doktor der
Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Sylvia Köhler, geb. Pesth
geb. in Radebeul (Sachsen)

Mainz, 2008

meinem Vater gewidmet

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1 Immunologische Grundlagen.....	1
1.1.1 Bedeutung und Entwicklung von T-Zellantworten.....	1
1.1.2 Erkennung durch den T-Zellrezeptor (TCR).....	3
1.1.3 Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC).....	4
1.1.4 Peptidprozessierung.....	5
1.1.5 Zentrale und periphere Toleranzmechanismen.....	7
1.2 Leukämie.....	9
1.2.1 Klassifizierung und Diagnostik.....	9
1.2.2 Leukämiegenese - Deregulation der Hämatopoese.....	10
1.3 Konzepte der T-Zell-orientierten Immuntherapie bei bösartigen Erkrankungen.....	12
1.3.1 Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (allo-HSCT).....	13
1.3.2 Adoptiver T-Zelltransfer.....	16
1.3.3 T-Zellrezeptor-Transfer.....	17
1.3.4 Antigen-spezifische Vakzinen.....	17
1.4 Zielstrukturen von T-Zellen gegen maligne Zellen.....	18
1.4.1 T-Zell-erkannte Antigene bei soliden Tumoren (TAA) und bei Leukämie (LAA).....	18
1.4.2 Minorhistokompatibilitätsantigene (mHAg).....	20
1.5 Verfahren zur Identifizierung von Zielstrukturen allo-reaktiver T-Zellen.....	21
1.5.1 SEREX-Methode.....	21
1.5.2 „Biochemischer“ Ansatz.....	22
1.5.3 „Reverse Immunologie“.....	23
1.5.4 cDNA-Expressionsklonierung.....	24
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	28
2. Material und Methoden.....	30
2.1 Materialien.....	30
2.1.1 Laborgeräte.....	30
2.1.2 Plastik- / Glas- und Verbrauchsmaterialien.....	31
2.1.3 Chemikalien mit besonderem Reinheitsgrad.....	32
2.1.4 Lösungen und Puffer.....	33
2.1.5 Substanzen, Zusätze und Reagenzien.....	35
2.1.6 Antibiotika.....	36
2.1.7 Enzyme.....	36
2.1.8 Zytokine.....	36
2.1.9 Antikörper.....	37
2.1.10 Micro Beads.....	38
2.1.11 Oligonukleotide.....	38
2.1.12 Sonden.....	42
2.1.13 Synthetische Peptide.....	43
2.1.14 Plasmide.....	43
2.1.15 Molekularbiologische „Kits“.....	45
2.1.16 Bakteriennährmedien.....	46
2.1.17 Zellkulturmedien.....	47
2.1.18 Bakterienstämme.....	48
2.1.19 Zelllinien.....	49

2.1.20 Patienten- / Spendermaterial.....	50
2.2 Methoden.....	51
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	51
2.2.1.1 Herstellung einer cDNA-Bank aus Leukämiezellen.....	51
2.2.1.2 Klonierung von HLA-Allelen.....	60
2.2.1.3 Generierung von Fragmenten antigenkodierender cDNA.....	60
2.2.1.4 Light Cycler Analysen.....	62
2.2.1.5 <i>In Vitro</i> -Transkription (IVT).....	63
2.2.1.6 Standardtechniken.....	65
2.2.2 Immunologische- / Zellbiologische Methoden.....	71
2.2.2.1 Gamma-Interferon-”ELISPOT- Assay“.....	71
2.2.2.2 cDNA-Expressionsklonierung mit Hilfe des IFN- γ -ELISPOT-Assays.....	73
2.2.2.3 Transfektion von Zellen.....	74
2.2.2.4 Peptiderkennungstest im IFN γ -ELISPOT- und Zytotoxizitäts-Assay.....	75
2.2.2.5 Zell-Kulturen.....	76
2.2.2.6 Durchflusszytometrie.....	81
2.2.3 Computer-gestützte Datenbanksuchen.....	82
3. Ergebnisse.....	83
3.1 Allogenes Leukämie-Modell MZ201-AML.....	83
3.2 Herstellung einer cDNA-Bank aus Leukämiezellen.....	84
3.2.1 Funktionalität des neu konstruierten Vektors pcDNA3.1/RfA/DEST#6.....	84
3.2.2 Konstruktion einer cDNA-Bank aus AML-Zellen der Patientin MZ201 in pcDNA.3.1/RfA/DEST#6.....	85
3.2.3 Funktionalität der MZ201-AML cDNA-Bank.....	87
3.3 Klonierung der HLA-Klasse I-Allele der Patientin MZ201-AML.....	88
3.4 Identifizierung und Charakterisierung des Zielantigens der AML-reaktiven T-Zellpopulation 4D7 im Leukämie-Modell MZ201-AML/Spender 332.....	90
3.4.1 Screening der MZ201-AML cDNA-Bank und Identifizierung antigenkodierender cDNA.....	90
3.4.2 4D7-Lymphozyten erkennen ein polymorphes Allel des Plasminogen Aktivator Urokinase Rezeptors (PLAUR) in Assoziation mit <i>HLA-B*5601</i>	94
3.4.3 Untersuchung der <i>PLAUR</i> -Allelie in Zellen der Patientin MZ201-AML und des Spenders 332.....	94
3.4.4 Eingrenzung der peptidkodierenden Region auf der <i>PLAUR-317P</i> -cDNA.....	95
3.4.5 Identifizierung des <i>HLA-B*5601</i> -restringierten <i>PLAUR-317P</i> -Peptids.....	97
3.4.6 Frequenz des <i>PLAUR-317P</i> -Allels in gesunden Spendern und Patienten.....	100
3.4.7 Quantifizierung der Expression von <i>PLAUR</i> -RNA in Normalgeweben.....	101
3.4.8 Erkennung von PBMC-Subpopulationen des Spenders 650 durch 4D7-Lymphozyten.....	102
3.4.9 Quantifizierung der Expression von <i>PLAUR</i> -RNA in verschiedenen Zellspezies.....	104
3.4.10 Prozessierung des <i>PLAUR-317P</i> -Peptids in dendritischen Zellen.....	106
3.5 Identifizierung und Charakterisierung des Zielantigens der AML-reaktiven T-Zellpopulation 1C6 im Leukämie-Modell MZ201-AML / Spender 332.....	107
3.5.1 Screening der MZ201-AML cDNA-Bank und Identifizierung antigenkodierender cDNA.....	107
3.5.2 Die T-Zellpopulation 1C6 erkennt eine Spleissvariante des <i>Chemokin Ligand 3 (CXCL3)</i> in Assoziation mit <i>HLA-A*0201</i>	109
3.5.3 Eingrenzung der peptidkodierenden Region auf der cDNA der <i>CXCL3</i> -Spleissvariante.....	111
3.5.4 T-Zellerkennung von regulär gespleisstem <i>CXCL3</i>	113

3.5.5	Eingrenzung der peptidkodierenden Region auf der CXCL3#14-cDNA.....	114
3.5.6	T-Zellerkennung von CXCL1 und CXCL2.....	116
3.5.7	Identifizierung des <i>HLA-A*0201</i> -restringierten CXCL3-Peptids.....	118
3.5.8	Prozessierung des immunogenen CXCL3-Peptids in dendritischen Zellen (DCs).....	120
3.5.9	Expressionsanalyse von CXCL3 in verschiedenen Zellspezies.....	120
3.5.10	Expression von CXCL3 in Normalgewebe.....	122
3.6	Erkennung von <i>PLAUR-317P</i> und <i>CXCL3</i> durch weitere T-Zellpopulationen.....	123
3.7	Expression von <i>PLAUR-317P</i> und <i>CXCL3</i> auf B-Zellen nach Behandlung mit 2'-Aza-5'-Deoxycytidin (DAC).....	125
3.8	Sequenzanalyse der hypervariablen CDR3-Region der TCR-V β .17-Ketten der 1C6- und 4D7-Lymphozyten.....	126
4.	Diskussion.....	128
4.1	Identifizierung von MHC Klasse-I-restringierten Antigenen im Leukämie-Modell MZ201-AML / Spender 332.....	128
4.1.1	Charakterisierung des <i>HLA-B*5601</i> -restringierten Antigens <i>PLAUR-317P</i> ...	128
4.1.2	Charakterisierung des <i>HLA-A*0201</i> -restringierten Antigens <i>CXCL3</i>	131
4.2	Bedeutung der identifizierten Antigene für aktuelle Konzepte der Immuntherapie.....	133
4.2.1	Das Minorhistokompatibilitätsantigen (mHA _g) <i>PLAUR-317P</i>	134
4.2.2	Das Leukämie-assoziierte Antigen (LAA) <i>CXCL3</i>	136
4.2.3	TCR-Analyse der 4D7- und 1C6-Lymphozyten.....	137
4.2.4	Sind die Antigene <i>PLAUR-317P</i> und <i>CXCL3</i> immuntherapeutisch nutzbar?.....	137
4.2.5	Weiterführende Untersuchungen im Leukämie-Modell MZ201-AML.....	138
5.	Zusammenfassung.....	140
6.	Literaturverzeichnis.....	141
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	156
8.	Anhang.....	158

1 EINLEITUNG

1.1 Immunologische Grundlagen

1.1.1 Bedeutung und Entwicklung von T-Zellantworten

Die Effizienz und die Spezifität von Immunantworten gegen Pathogene hat die Suche nach Wegen inspiriert, das Immunsystem bei der Bekämpfung von malignen Erkrankungen einzusetzen. Die in den letzten Jahrzehnten zur Immunregulation und Effektor-Zell-Funktion gewonnen Erkenntnisse werden heute genutzt, um das Immunsystem spezifisch für die Erkennung und Zerstörung von Tumorzellen zu manipulieren. Ein bedeutender Erkenntnisgewinn der Immunologie der vergangenen Jahrzehnte war die Entdeckung, dass die Antigenität einer Tumorzelle die Basis ihrer Erkennung und Zerstörung darstellt [VAN DER BRUGGEN *ET AL.*, 1991].

Die Erkennung von Pathogenen und Tumorzellen durch das Immunsystem erfolgt auf der Ebene der zellulären Abwehr durch die so genannten T-Lymphozyten. Sie erkennen infizierte oder entartete Körperzellen in Form von kurzen Peptidfragmenten, die auf ihrer Oberfläche über die Haupthistokompatibilitätsantigene (*major histocompatibility complex antigens* = MHC) präsentiert werden [JANEWAY & TRAVERS, 2005]. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Effektorfunktionen werden T-Lymphozyten in nachfolgend beschriebene Subgruppen eingeteilt: **Zytotoxische T-Zellen** oder $CD8^+$ T-Zellen erkennen Peptidfragmente, die ihnen über MHC-Klasse I-Moleküle dargeboten werden. Zur Eliminierung der infizierten oder entarteten Zellen setzen sie zytotoxische Substanzen, wie z.B. Perforine oder Granzyme frei. Auf Basis der von ihnen sezernierten Zytokine werden zwei Subgruppen zytotoxischer T-Zellen unterschieden: Zum einen die so genannten T_C1 -Zellen, die IL-2 und $IFN-\gamma$ freisetzen, zum anderen T_C2 -Zellen die IL-4, IL-5 und IL-10 sezernieren. Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) gelten als die ultimativen Effektorzellen, da sie, wie Versuche in Tiermodellen zeigten, die Abstoßung von soliden Tumoren vermitteln können [DUDLEY & ROSENBERG, 2003]. Aus diesem Grund wird ihnen ein besonders Potential in adoptiven Immuntherapieverfahren zugeschrieben [KEMP & RONCHESE, 2001; DOBRZANSKI *ET AL.*, 2004].

T-Helferzellen oder CD4⁺ T-Zellen erkennen Antigene, die von speziellen Antigen-präsentierenden Zellen, z.B. dendritischen Zellen, Makrophagen oder B-Lymphozyten auf MHC II-Molekülen präsentiert werden. Abhängig vom Zytokinmilieu wird entweder eine zelluläre oder eine humorale Immunantwort ausgelöst. So genannte T_H1-Zellen aktivieren Makrophagen durch die Ausschüttung von IFN- γ und IL-2 und somit die zelluläre Immunantwort, T_H2-Zellen setzen IL-4 und IL-10 frei, woraus präferentiell eine B-Zellaktivierung und somit eine humorale Immunantwort resultiert. Die erst kürzlich identifizierten so genannten T_H17-Zellen differenzieren sich als Folge einer IL-23-Ausschüttung, setzen IL-17 frei, und scheinen eine zentrale Rolle bei Entzündungsprozessen und Autoimmunreaktionen zu spielen [MANGAN *ET AL.*, 2006; BI *ET AL.*, 2007]. Als dritte Subgruppe sind die sog. **regulatorischen T-Zellen** (T-reg) zu nennen, die eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Balance zwischen Immunität und Toleranz spielen und durch die Oberflächenmarker CD4, CD25, sowie den Transkriptionsfaktor Foxp3 differenziert werden [MOTTET & GOLSHAYAN, 2007].

T-Lymphozyten stammen, wie alle zellulären Komponenten des Immunsystems, von hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab. Nach ihrer Bildung im Knochenmark wandern die T-Vorläuferzellen in den Thymus, wo sie zu naiven, d.h. ungeprägten, T-Zellen heranreifen. Dort werden sie Selektionsmechanismen unterzogen, die ihre immunologische Toleranz gegen das „Selbst“ und „Fremd“ prägen (siehe **Abschnitt 1.1.5**). Naive T-Zellen, die gereift den Thymus verlassen haben, zirkulieren durch das Blut- und Lymphsystem. Sie werden idealerweise erst aktiviert und differenzieren zu Effektor-T-Zellen, wenn ihr T-Zellrezeptor einen körperfremden MHC-Peptid-Komplex auf einer professionellen Antigen-präsentierenden Zelle innerhalb eines Lymphknotens in Anwesenheit von kostimulatorischen Signalen erkennt.

Eine effiziente T-Zell-vermittelte Immunantwort kann nur von professionellen antigen-präsentierenden Zellen (APCs), wie z.B. dendritische Zellen, Makrophagen oder B-Zellen, ausgelöst werden. Sie nehmen die Antigene sowohl über Fc-Rezeptoren oder alternativ über Makro-, Mikropinozytose oder Phagozytose auf und präsentieren auf ihrer Oberfläche über MHC-Moleküle die daraus entstehenden Peptide. Dies aktiviert sowohl CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten als auch CD4⁺ T-Lymphozyten unter Mitwirkung akzessorischer Kostimulationsmoleküle. CD4⁺ T-Lymphozyten oder T-Helferzellen induzieren das immunologische Langzeitgedächtnis der CD8⁺ T-Zellen. Die Antigen-TCR-Bindung für sich selbst bewirkt jedoch keine direkte T-Zell-Aktivierung. Diese wird indirekt über den CD3-Komplex, welcher mit dem T-Zell-Rezeptor nicht-kovalent

assoziiert ist, vermittelt. Die Korezeptoren CD4 und CD8 wirken sich zusätzlich stabilisierend auf die Bindung an das MHC-Molekül aus. Für eine effiziente T-Zell-Aktivierung wird jedoch zusätzlich ein kostimulatorisches Signal benötigt, das nur spezialisierte APC liefern können. Die Aktivierung des kostimulatorischen Rezeptors CD28 auf der Oberfläche der naiven T-Zellen erfolgt durch Bindung an die Moleküle CD40, CD80 oder CD86 auf den APC. Erst dann differenziert sich eine naive T-Zelle zu einer aktivierten T-Effektorzelle. Um eine effiziente T-Zell-Aktivierung auszulösen, müssen beide kostimulatorischen Signale von derselben Zelle vermittelt werden. Nach Erkennung des spezifischen Antigens durch den TCR wird über den CD3-Komplex ein intrazelluläres Signal initiiert, welches zur Aktivierung der T-Zelle führt und in Folge dessen den Prozess der klonalen Expansion einleitet [CHOI & SCHWARZ, 2007].

1.1.2 Erkennung durch den T-Zellrezeptor

T-Zellen erkennen die ihnen über MHC-Moleküle präsentierten Antigene über einen spezifischen T-Zellrezeptor (TCR). Jede T-Zelle exprimiert einen klonalen TCR, der ihr die Spezifität für ein bestimmtes Antigen verleiht. Der TCR ist ein membranständiges, heterodimeres Glykoprotein, welches aus einem konstanten Teil und einem variablen Teil einer α - und β -Kette besteht, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Zwischen 90 und 95% der zirkulierenden T-Zellen beim Menschen tragen den $\alpha\beta$ -TCR und etwa 5-10% den so genannten $\gamma\delta$ -TCR [GOLDRATH & BEVAN, 1999]. Durch die somatische Rekombination von V-, D-, J- und C-Segmenten, die in der frühen Phase der Reifung im Thymus stattfindet, entsteht die enorme Diversität des TCR von bis zu 10^{15} theoretisch möglichen Spezifitäten, wobei lediglich etwa 10^{13} TCR-Spezifitäten den Selektionsmechanismen im Thymus entgehen [DAVIS & BJORKMAN, 1988; MAHAJAN *ET AL.*, 2005]. Bei den $\alpha\beta$ -TCR lassen sich drei variable CDR-Regionen (*complementarity determining region*, CDR) unterscheiden: CDR1, CDR2 und CDR3. Die CDR3-Regionen sind die variabelsten Bereiche des gesamten TCR und interagieren mit dem über das MHC-Molekül präsentierte Peptid. Die weniger diversen CDR1- und CDR2-Regionen interagieren mit den α -Helices des MHC-Moleküls. Die Variabilität in Länge und Aminosäuresequenz der CDR3-Region wird durch „unpräzise“ Rekombinationsmechanismen der V(D)J-Gensegmente bedingt [HUGHES *ET AL.*, 2003]. Die $V\alpha$ - und die $V\beta$ -Gene bilden Subfamilien, deren Mitglieder eine Homologie von mindestens 75% homolog aufweisen.

Beim Menschen sind 54 verschiedene $V\alpha$ -Gene bekannt, die in 41 Subfamilien organisiert sind, 65 $V\beta$ -Gene, die sich zu 30 Subfamilien gruppieren, sowie 61 $J\alpha$ -, 13 $J\beta$ -, 2 $D\beta$ -, 2 $C\beta$ -Gene und 1 $C\alpha$ -Gen [FOLCH & LEFRANC, 2000].

1.1.3 Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)

Die vom MHC-Komplex kodierten Moleküle binden kurze Peptid-Antigene und präsentieren sie auf der Zelloberfläche für die Erkennung durch T-Zellrezeptoren (TCR). Der MHC ist jedoch nicht nur von grundsätzlicher Bedeutung für eine T-Zell-vermittelte Immunantwort gegen Fremd-Antigene, er bedingt auch die Abstoßung fremden Gewebes, die Toleranz des eigenen und die immunologische Selbstdefinition eines Organismus. Beim Menschen wird der MHC-Komplex durch allele Gene repräsentiert, die sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 befinden, und die sich in drei funktionelle Klassen einteilen lassen: die MHC-Klasse I-Allele mit den Loci HLA-A, -B und -C, die MHC-Klasse II-Allele v.a. mit HLA-D, -DR, -DQ und -DP und die Komplementgene C2, C4 und Bf. MHC-Klasse I-Moleküle finden sich in Zellmembranen fast aller kernhaltigen Körperzellen und in höchster Konzentration auf Lymphozyten und Makrophagen. Die hohe Expression der MHC-Moleküle auf Leukozyten verlieh ihnen den Namen Humane Leukozyten-Antigene (HLA). MHC I-Moleküle sind Heterodimere und bestehen aus einer membranständigen α -Kette und dem β_2 -Mikroglobulin, einem nicht-kovalent gebundenem extrazellulären Polypeptid. Jede α -Kette besitzt die drei extrazellulären Domänen α_1 - 3, eine Transmembranregion und eine kurze zytosolische Domäne. Die Variabilität der MHC I-Moleküle betrifft Aminosäuren in den α_1 - und den α_2 -Domänen, die die Peptid-Bindungsfurche bilden und die Spezifität für die Bindung unterschiedlicher Peptide bedingen. Die Peptidbindung wirkt sich stabilisierend auf die heterodimeren MHC-Moleküle aus. Aufgrund der Beschaffenheit der Peptidbindungsgrube binden MHC-Klasse I-Moleküle Peptide einer charakteristischen Länge von neun bis zehn Aminosäuren. Über so genannte Ankeramino-säuren, die am C-Terminus oftmals hydrophobe Eigenschaften besitzen, treten die Peptide mit dem MHC-Molekül in Wechselwirkung. Dabei besitzen Peptide, die von dem gleichen MHC-Allel gebunden werden, gleiche oder zumindest ähnliche Ankeramino-säuren [JANEWAY & TRAVERS, 2005]. Vorhersageanalysen für MHC-Liganden beruhen auf struktur- oder sequenzbasierten bioinformatischen Algorithmen. Das Verfahren der SYFPEITHI-Datenbank beispielsweise basiert auf Vorhersagealgorithmen

von MHC/Peptid-Bindungsmotiven unter Berücksichtigung von HLA-präferierten Ankerpositionen [RAMMENSEE *ET AL.*, 1999]. Die große Variabilität der menschlichen MHC-Gene und ihre natürlichen Polymorphismen erschweren die Suche eines HLA-kompatiblen Spenders für eine allogene HSZT. Bislang sind über 2000 MHC I-Allele beschrieben worden und die Zahl nimmt stetig zu [<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>].

1.1.4 Peptidprozessierung

Durch den Mechanismus der Antigenprozessierung werden Peptide, die aus dem Abbau zelleigener oder viraler Proteine hervorgehen, auf der Zelloberfläche in Verbindung mit MHC-Molekülen präsentiert. Dabei wird die Prozessierung von MHC I- und MHC II-Liganden unterschieden. Die Prozessierung intrazellulärer MHC I-Peptidliganden beinhaltet den Proteinabbau in Peptidfragmente im Zytosol, den Transport der Peptide in das endoplasmatische Retikulum (ER) und die Assoziation von MHC I-Molekülen mit Peptiden und β_2 -Mikrogobulinen. Im Zytosol werden zur Degradation bestimmte Proteine ubiquitinyliert und anschließend durch das Proteasom in Fragmente zwischen 4 und 25 Aminosäuren Länge abgebaut. Diese werden über den Peptidtransporter TAP in das ER überführt, wo die Beladung von MHC I-Molekülen erfolgt. Die beladenen MHC I-Moleküle verlassen das ER und präsentieren nach Transport über den Golgi-Apparat und das Trans-Golgi-Netzwerk die Peptide an der Zelloberfläche. Die Präsentation eines viralen oder körpereigenen Fremdpeptids aktiviert das Immunsystem und führt zur Eliminierung der Antigen-präsentierenden Zelle durch zytotoxische T-Zellen [JANEWAY & TRAVERS, 2005]. Antigenpräsentierende Zellen, wie Makrophagen und dendritische Zellen, können auch extrazelluläre, durch Makropinozytose aufgenommene Proteine in diesen Präsentationsweg einschleusen. Dieser Vorgang wird als Kreuzpräsentation bezeichnet. In **Abbildung 3.1** wird der Mechanismus der Peptidprozessierung schematisch vereinfacht dargestellt.

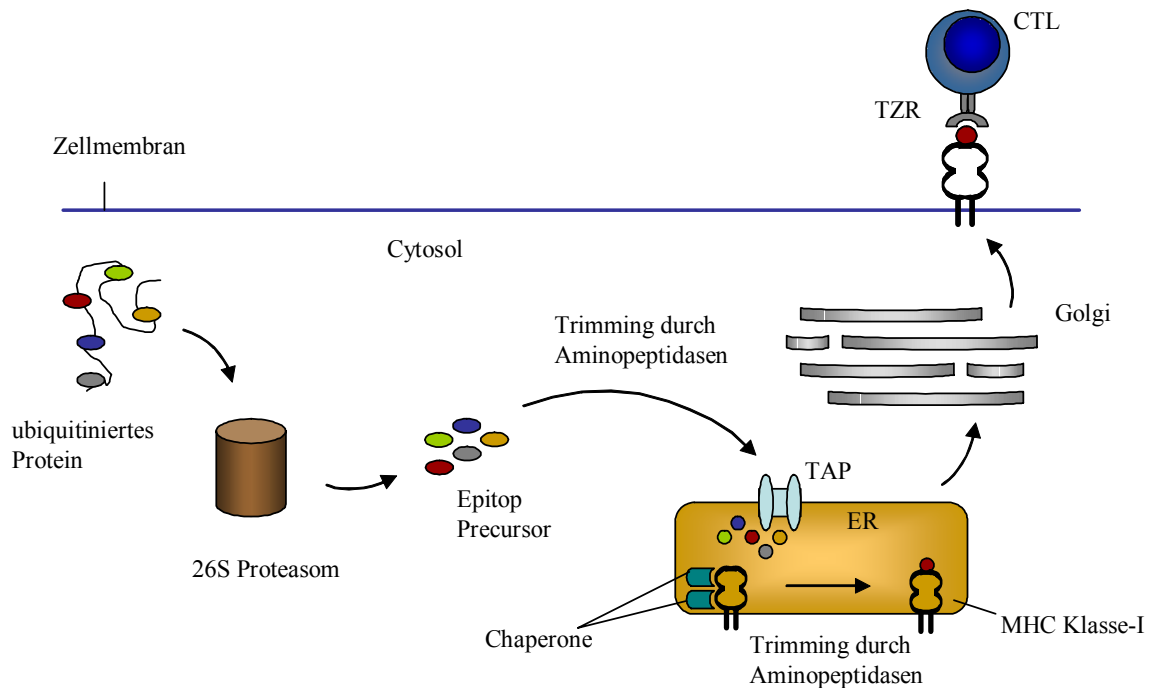


Abb. 3.1: *Peptidprozessierung und MHC-Klasse I-Präsentation.* Ubiquitinierte Proteine werden durch das 26S Proteasom zu Peptiden prozessiert, die durch zytosolische Aminopeptidasen getrimmt oder vollständig abgebaut werden können. TAP transportiert die Peptide in das ER, wo nach eventuell weiterem Trimming die Peptide an MHC-Klasse I-Moleküle gebunden werden. Die beladenen MHC-Klasse I-Moleküle werden über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert, an der sie die Peptide den CTLs präsentieren [Abbildung nach KLOETZEL, 2004].

Die meisten identifizierten MHC-Peptidliganden können aufgrund ihrer zusammenhängenden Sequenz zu ihrem jeweiligen Ursprungprotein zurückverfolgt werden. Dass dies jedoch nicht immer der Fall ist, und dass natürlich prozessierte MHC I-Peptide aus Mechanismen posttranslationaler Modifikation resultieren können, zeigt ein Artikel von VIGNERON *ET AL.*. Ein von $CD8^+$ Lymphozyten erkanntes Nonamer-Peptid auf Melanomzellen setzt sich aus nicht-zusammenhängenden Abschnitten des gp100 Glykoproteins zusammen und wird durch posttranslationale Modifikation generiert. Die Erzeugung des Peptides erfordert das Spleissen von 4 Aminosäuren und das anschließende Zusammenfügen der Fragmente. *In vitro* konnte dieser Vorgang durch Inkubation eines Vorläuferpeptids von 13 Aminosäuren Länge mit aufgereinigten Proteasomen reproduziert werden. Es zeigte sich, dass durch posttranslationale Spleissprozesse im Proteasom antigene Peptide produziert werden können [VIGNERON *ET AL.*, 2004]. Ein weiteres Beispiel von einer posttranslationalen Modifikation, die zur Generierung eines natürlichen MHC I-Peptides führt, wurde von SKIPPER *ET AL.* veröffentlicht. Ein auf Melanomzellen

exprimiertes Tyrosinase-Peptid entsteht aus der posttranslationalen Konversion der Aminosäure Asparagin zu Aspartat. Der Aminosäureaustausch, der durch die Deaminierung von Asparagin entsteht, ist für die Erkennung des Peptides durch Melanom-spezifische T-Zellen von zentraler Bedeutung. [SKIPPER *ET AL.*, 1996]. Die Existenz von MHC-Peptiden, die als Folge von posttranslationalen Modifikationen entstehen, erhöht die Komplexität der Peptididentifikation vor allem hinsichtlich der Vorhersage von potentiellen Peptidkandidaten. Der Beitrag von posttranslationalen Modifikationen zur Entstehung natürlicher Peptide ist derzeit noch nicht klar.

1.1.5 Zentrale und periphere Toleranzmechanismen

Die Akzeptanz des Selbst wird als immunologische Toleranz bezeichnet und ist notwendig für den Schutz vor Autoimmunkrankheiten, Allergien und chronischen Entzündungen. Zentrale Toleranz entsteht im Thymus durch die Eliminierung autoreaktiver T-Zellen. Die Selektion ist abhängig von der Präsentation von Selbst-Peptiden während der Lymphozytenentwicklung. Bindet ein TCR einer unreifen T-Zelle einen Selbst-Antigen/MHC-Komplex mit geringer Affinität, erhält die Zelle ein Signal zur Reifung. Dies ist gleichbedeutend mit der so genannten klonalen Selektion [GOLDRATH *ET AL.*, 1999]. Diese T-Zellen werden, nachdem sie als reife CD8⁺ und CD4⁺ Zellen die Peripherie erreicht haben, Fremd-Antigene über MHC-Moleküle erkennen. Unreife T-Zellen, die Selbst-Antigene mit hoher Affinität erkennen, werden durch einen Stimulus in den programmierten Zelltod geführt. Die Eliminierung autoreaktiver T-Zellen wird als Klonale Deletion oder Negative Selektion bezeichnet. Autoreaktive T-Zellen können jedoch einer Negativselektion entgehen, wenn eine niedrig affine Bindung des Selbst-Peptides zum TCR vorliegt oder wenn das entsprechende Selbst-Peptid im Thymus nicht präsentiert wird. Diese T-Zellen gelangen in die Peripherie und können, durch ein Selbst-Antigen aktiviert, Autoimmunität verursachen, wenn sie nicht durch Suppressionsmechanismen unterdrückt werden. Autoimmunität tritt also ein, wenn das Immunsystem die Toleranz gegen das „Selbst“ nicht aufrechterhalten kann.

Thomas und Burnet haben Anfang der 70er Jahre eine Hypothese formuliert, nach welcher spezifische Immunantworten bereits sehr früh während der Tumorentstehung induziert werden und zu einer Beseitigung der Tumorzellen führen können. Eine

wachsende Tumorerkrankung muss demnach das Resultat erfolgreicher Immun-Escape-Mechanismen sein [DUNN *ET AL.*, 2002].

Eine Voraussetzung für eine immunologische Tumorkontrolle ist die Expression von MHC-Molekülen. Es konnte gezeigt werden, dass metastasierende Erkrankungsstadien häufig durch eine reduzierte oder fehlende Expression von MHC-Klasse I-Molekülen charakterisiert sind [CABRERA *ET AL.*, 2003]. Oftmals sind Mutationen in bestimmten MHC-Klasse I-Genen die Ursache und korrelieren mit einem Verlust von einzelnen HLA-Allelen und -Loci [GARRIDO & ALGARRA, 2001]. Als Immun-Escape-Mechanismus bei soliden Tumoren spielt auch der Expressionsverlust von Antigenen eine große Rolle. Dies zeigte eine klinische Studie nach adoptivem T-Zelltransfer. Melan-A-/MART-1-spezifischen T-Zell-Klone führten zunächst zu einer Remission von Melan-A-/MART-1-exprimierenden Melanommetastasen. Nach erneutem Krankheitsprogress war die Melan-A-/MART-1-Expression nicht mehr nachweisbar [YEE *ET AL.*, 2002]. Der genaue Mechanismus dieser Antigenverlustphänomene ist nicht durchgehend geklärt. Möglicherweise spielen jedoch Selektions- und Wachstumsvorteile von Antigenverlustvarianten eine Rolle [COULIE *ET AL.*, 1999].

Ein Mechanismus der in der Peripherie zu immunologischer Toleranz führt, ist der Mechanismus der T-Zell-Anergie. Sie ist Folge einer fehlenden Kostimulation oder einer negativ regulatorischen CTLA-4/CD80-Wechselwirkung in einer antigenspezifischen Interaktion zwischen T- und antigenpräsentierender Zelle [ABBAS *ET AL.*, 2004]. Anergische T-Zellen können nicht auf einen antigenen Stimulus reagieren, was als Folge die spezifische Toleranz gegenüber der Antigen-präsentierenden Zelle induziert.

Ein weiterer effektiver Mechanismus, durch den sich Tumore der Eliminierung durch das Immunsystem entziehen können, ist die Produktion immunsuppressiver Substanzen. Durch die Überexpression von IL-4 und IL-10 wird beispielsweise eine effektive Antigenpräsentation verhindert. VEGF hingegen fördert die Neubildung von Gefäßen im Tumorbereich und übt gleichfalls eine inhibitorische Funktion auf die Reifung von DCs aus [OHM & CARBONE, 2001]. Regulatorische T-Zellen sorgen für ein immunologisches Gleichgewicht und können durch Sekretion immunsuppressiver Zytokine die Proliferation und die Effektorfunktionen von T-Zellen inhibieren. Sie supprimieren überreaktive Zellen des Immunsystems und verhindern so beispielsweise die Entstehung von Autoimmunerkrankungen [MCHUGH *ET AL.*, 2002]. Dementsprechend können regulatorische CD4⁺ Zellen auch ansonsten effektive Antitumor-Immunantworten supprimieren [GAJEWSKI, 2007; YU *ET AL.*, 2007; BUCKANOVICH *ET AL.*, 2008].

1.2 Leukämie

Leukämie, erstmals 1845 von dem Arzt Rudolf Virchow beschrieben, ist eine Erkrankung des blutbildenden Systems, die durch maligne Transformation hämatopoetischer Zellen entsteht. Dabei kommt es zu einer Proliferation und Akkumulation neoplastischer Zellen im blutbildenden Knochenmark. Im Verlauf kann es zu einer Infiltration extramedullärer Organe, wie z.B. Lymphknoten oder Milz, sowie zu einer Ausschwemmung leukämischer Zellen ins Blut kommen. Jährlich erkranken insgesamt etwas mehr als 10.000 Menschen in Deutschland an Leukämien. Dies sind etwa 3% der jährlichen Krebsneuerkrankungen in Deutschland [RKI, 2006].

1.2.1 Klassifizierung und Diagnostik

Die Klassifizierung der Leukämien erfolgt zum einen nach der Herkunft der malignen Zellen, wobei zunächst zwischen Myeloischen und Lymphatischen Leukämien unterschieden wird. Myeloische Leukämien sind maligne Erkrankungen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen der Myelopoese, d.h. von Vorstufen der Granulozyten bzw. Monozyten. Lymphatische Leukämien hingegen resultieren aus einer klonalen Proliferation von Vorläuferzellen der Lymphozyten. Darüber hinaus werden Leukämien nach klinischen Verlaufsformen unterschieden. Akute Leukämien haben einen schnellen Verlauf, wobei ohne Behandlung innerhalb weniger Wochen ein lebensgefährlicher Zustand eintreten kann. Chronische Leukämien hingegen haben einen schleichenden Verlauf und es kann Monate bis Jahre dauern, bis sich die Erkrankung manifestiert. Folgende Leukämien werden demnach unterschieden:

- Chronisch Myeloische Leukämie (CML)
- Akute Myeloische Leukämie (AML)
- Chronisch Lymphatische Leukämie (CLL)
- Akute Lymphatische Leukämie (ALL)

Die FAB (*French-American-British*)-Klassifizierung teilt die Akute Myeloische Leukämie (AML) aufgrund zytomorphologischer Kriterien in 11 Subtypen ein [KLAUS *ET AL.*, 2004].

Bei der AML vom Subtyp M5a beispielsweise handelt es sich um eine Akute Monoblastenleukämie, die zu 80% aus Monoblasten, Promonozyten oder Monozyten besteht.

Die Diagnostik einer Leukämie erfolgt nach morphologischen, zytochemischen und immunhistochemischen Gesichtspunkten. Durch mikroskopische Untersuchung von Knochenmarkausstrichen lassen sich charakteristische Merkmale, wie z. B. *Auerstäbchen*, nachweisen, die die Zuordnung der Blasten zur myeloischen Reihe ermöglichen. Die Immunphänotypisierung in der Routinediagnostik analysiert die Expression von Hämatopoese-assoziierten Differenzierungs-Antigenen (*cluster of differentiation*, CD-Moleküle). Durch zytogenetische Analysen lassen sich auf molekularer Ebene für bestimmte Leukämieformen typische chromosomalen Aberrationen feststellen, die z.T. prognostisch und therapeutisch bedeutsam sind [FRANKFURT *ET AL.*, 2007].

1.2.2 Leukämiegenese – Deregulation der Hämatopoese

Bei der Hämatopoese entstehen im Knochenmark durch sich nicht erschöpfende Teilung von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen die Blutzellen. Aus Vorläuferzellen der myelopoetischen und lymphopoetischen Reihe reifen unter dem Einfluss von Zytokinen und Interleukinen die Zellen des jeweiligen funktionellen Endstadiums aus [MONTEIRO *ET AL.*, 2005; BROUDY, 1997]. Bei den komplexen Vorgängen der Hämatopoese kommt es zu einer ausgeglichenen Regulation von Differenzierung, Proliferation und programmiertem Zelltod, der so genannten Apoptose [LEARY *ET AL.*, 1992]. Bei Deregulation dieses Gleichgewichts können sich aus klonalen Stammzellen im Sinne einer malignen Hämatopoese Leukämien entwickeln [EAVES *ET AL.*, 1996]. Übereinstimmend mit den Modellen der Karzinogenese ist die Leukämiegenese ein schrittweiser Prozess, der multiple voneinander unabhängige genetische und epigenetische Ereignisse beinhaltet [WARNER *ET AL.*, 2005].

Viele hämatologische Malignome sind mit einer charakteristischen zytogenetischen Abnormalität assoziiert. Chromosomale Aberrationen oder Deletionen können in Folge die Regulation und Funktion von Protoonkogenen und anderen Wachstum fördernden Genen verändern. Nachfolgend werden typische Aberrationen beispielhaft beschrieben. Radioaktive Strahlung und bestimmte chemische Stoffe, wie z.B. Insektizide, Benzol und einzelne Medikamente, spielen bei der Entstehung einer Leukämie eine Rolle.

Bei einer Chronischen Myeloischen Leukämie (CML) liegt bei über 95% der Patienten die reziproke chromosomale Translokation [t(9;22)(q34;q11)] mit dem charakteristischen Philadelphia-Chromosom (22q-) vor. Molekular handelt es sich um die Fusion der Gene BCR und ABL mit der Folge einer konstitutionellen Aktivierung der onkogenen ABL-Tyrosinkinase [GOLDMAN & MELO, 2008]. Die Tyrosinkinase-Aktivität führt durch Deregulation der für Proliferation, Apoptose und Adhäsion verantwortlichen Signalkaskaden zur malignen Transformation der Zellen.

Die t(8;21)-Translokation ist die häufigste mit der AML assoziierte strukturelle Chromosomenaberration. Diese Translokation erzeugt das Fusionsprotein AML1-ETO, welches aus dem Transkriptionsfaktor *AML1* und dem Ko-Repressor *ETO* besteht. *AML1/ETO* unterdrückt in Folge die zelluläre Funktion des *AML1*-Transkriptionsfaktors. *AML1* ist ein Transkriptionsaktivator für verschiedene Hämatopoese-spezifische Gene, wie z.B. den *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF). Tierexperimente deuteten zwar darauf hin, dass die Expression von *AML1-ETO* nicht für eine Leukämogenese ausreicht, jedoch wurde durch die Expression dieses Fusionsproteins eine Immortalisierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen erreicht [NIMER, 2007].

Eine ebenso wichtige Rolle wie chromosomale Aberrationen scheint in der Leukämogenese die Fehlregulation von Zytokinen zu spielen. So ist bereits früh in der Entwicklung einer AML eine veränderte Stammzellendifferenzierung als Folge einer deregulierten GM-CSF-Antwort zu beobachten. Ursächlich und beispielhaft ist damit die t(8;21)-Translokation in Zusammenhang zu bringen [s. oben; FRANK *ET AL.*, 1995]. Eine Benzen-Exposition von Mäusen zeigte eine verstärkte Hämatopoese-induzierende GM-CSF-Antwort und nach dauerhafter Exposition die Induktion einer anhaltenden myeloproliferativen Erkrankung [WILLMAN & WHITTAKER, 1990; YOUNG, 1985]

Übersichtsartikel berichten ebenso von einer Reihe von strukturell und funktionell veränderten Protoonkogenen, die auch bei der in AML in unterschiedlichen Frequenzen vorkommen [WILLMAN & WHITTAKER, 1990; RADICH *ET AL.* 1992; LIU, 1990]. Das humane ***rat sarcoma (ras)-Gen*** kodiert für das Protein p21, welches als *second messenger* der Tyrosinkinase-rezeptor-vermittelten Signaltransduktion eine wichtige Rolle zu spielen scheint [NEEDLEMAN, 1991]. In einer Vielzahl von Studien wurde gezeigt, dass eine *ras*-Protoonkogen-Aktivierung in über 25% der Fälle einer *de novo* AML auftritt [RADICH *ET AL.* 1992; NEEDLEMAN, 1991]. Der ***fibroblast-macrophage stimulating factor receptor (FMS)-like tyrosine kinase receptor 3 (FLT3)*** ist an Prozessen der Proliferation und Differenzierung von frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen beteiligt. Mehr als 90%

akuter myeloischer Leukämien exprimieren FLT3. Zugleich stellt *FLT3* das in AML am häufigsten mutierte Gen dar. Bislang sind zwei Mutationsformen beschrieben worden. Dies sind zum einen interne Tandemduplikationen (*FLT3-ITDs*) innerhalb der Juxtamembrandomäne zum anderen Punktmutationen innerhalb der Kinasedomäne [YOKOTA *ET AL.*, 1997; YAMAMOTO *ET AL.*, 2001; KINDLER *ET AL.*, 2005]. *FLT3-ITDs* treten in 25 - 30% aller AML-Fälle auf und führen zu leukämischer Transformation durch konstitutive Phosphorylierung und unkontrollierter Aktivierung der Thyrosinkinase [KIYOI *ET AL.*, 2002]. Das **Tumorsuppressorgen *p53*** kodiert für einen nukleären Transkriptionsfaktor, der an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist. Die Inaktivierung von *p53* ist ein wichtiges Ereignis in der Transformation von vielen Tumoren. Das *p53*-Gen ist das am häufigsten mutierte Gen bei menschlichen Krebserkrankungen [HOLLSTEIN *ET AL.*, 1991]. Die Inaktivierung von *p53* ist in die Progression der Blastenkrise in 20 - 30% aller Fälle einer Chronisch Myeloischen-Leukämie involviert, wird aber nur in wenigen Fällen einer AML angetroffen. Dabei ist die Inaktivierung von *p53* ein späteres Ereignis und offenbar mit dem Verlust eines differenzierungsfähigen Phänotyps, einem aggressiven Verlauf und mit einer schlechten Prognose assoziiert [SOUSSI & JONVEAUX, 1991].

Die wahrscheinlichsten Ereignisse, die zur Entstehung und Progression einer Leukämie führen, beinhalten die klonale chromosomale Abnormalität gepaart mit veränderter Regulation durch Zytokinantworten. Die Vielfalt beteiligter Gene in späteren Stadien der AML-Progression hingegen ist vereinbar mit Mustern der Multistep-Karzinogenese nach VOGELSTEIN *ET AL.*, in der die Akkumulation molekularer genetischer und epigenetischer Alterationen einer Tumorentstehung vorausgehen [VOGELSTEIN *ET AL.*, 1998].

1.3 Konzepte der T-Zell-orientierten Immuntherapie bei bösartigen Erkrankungen

Erste Versuche, die Kräfte des Immunsystems für die Bekämpfung von Krebs zu nutzen, gab es schon gegen Ende des 19. Jahrhunderts als Paul Ehrlich das Prinzip der Tumorbehandlung mit Antikörpern formulierte [EHRlich, 1900]. Realisierbar wurde diese jedoch erst mit der Entwicklung der Hybridom-Technologie. Sie ermöglichte es, monoklonale Antikörper in beliebiger Menge herzustellen [KÖHLER & MILSTEIN, 1975]. Es gelang, die Immunogenität muriner monoklonaler Antikörper durch Humanisierung drastisch zu reduzieren und damit die längerfristige Applikation beim Menschen zu

ermöglichen [VAN DE PUTTE *ET AL.*, 2004; DEO *ET AL.*, 1997]. Die Entdeckung der Interleukine erlaubte es, antigenspezifische T-Zellen zu expandieren und ihre Erkennungsmechanismen zu studieren. Mit Hilfe der rekombinanten DNA-Technologie wurden Lymphokine und Zytokine, wie Interferone und Interleukine, in definierter Qualität und beliebiger Quantität verfügbar. Die Methoden zur Identifizierung tumorassoziierter Antigene legten die Grundlage sowohl für die Weiterentwicklung der Antikörper- als auch der T-Zell-basierten Therapieverfahren.

1.3.1 Allogene Hämatopoetische Stammzelltransplantation (allo-HSCT)

Ein Therapieverfahren, welches auf dem Effekt von T-Zellen beruht, ist die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (allo-HSCT). Sie ist für Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen, die auf eine alleinige medikamentöse Behandlung nicht ansprechen, die einzige kurative Therapieoption [APPELBAUM, 2003; GRATWOHL *ET AL.*, 2002]. Bei der Erforschung der Wirkungsweise der allo-HSCT wurde erkannt, dass für das Ausheilen einer Leukämie nicht allein die vor Transplantation verabreichte hochdosierte Radiochemotherapie entscheidend ist. Für die längerfristige Leukämiekontrolle ist vielmehr der immunologische Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt (*Graft-versus-Leukemia*-, GvL-Effekt) des transferierten Immunsystems verantwortlich, der durch die im Transplantat enthaltenen Spenderlymphozyten verursacht wird [APPELBAUM, 2003]. Die allo-HSCT eröffnet darüber hinaus neue Möglichkeiten für die Therapie von Erkrankungen, die durch eine Fehlfunktion des patienteneigenen Immunsystems bedingt sind. Neben Autoimmunerkrankheiten gilt dies auch für solide Tumorerkrankungen. So wurde gezeigt, dass Spenderlymphozyten einen dem GvL-Effekt vergleichbaren Graft-versus-Tumor-Effekt (GvT-Effekt) ausüben, der bei Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom Tumorrückbildungen bewirken kann [CHILDS *ET AL.*, 2000].

Trotz der beeindruckenden Behandlungserfolge der allo-HSCT sind wesentliche transplantationsassoziierte Probleme ungelöst. So tritt der gewünschte GvL-Effekt in fast allen Fällen in Assoziation mit der GvHD auf [WEIDEN *ET AL.*, 1981]. In ihrer schweren Form verursacht die GvHD eine erhebliche Morbidität und Mortalität der Patienten. Wesentliche zelluläre Mediatoren der GvHD sind allo-reaktive Spender-T-Zellen, die bei HLA-inkompatibler HSCT gegen differierende HLA-Moleküle des Patienten oder gegen Minorhistokompatibilitätsantigene (mHAgs) reagieren [FALKENBURG *ET AL.*, 2003]. Bei

mHAGs handelt es sich um Oligopeptide, die aus genetisch determinierten Polymorphismen prozessiert und in Assoziation mit HLA-Molekülen präsentiert werden. Daneben reagieren diese T-Zellen auch gegen nicht-polymorphe Leukämieantigene, die exklusiv oder präferentiell auf malignen Zellen exprimiert sind [MOLLDREM *ET AL.*, 2002; GREINER *ET AL.*, 2006; REZVANI, 2008]. Folgende drei Mechanismen tragen wesentlich zum GvL-Effekt bei [MUNKER *ET AL.*, 2004]

- Eine Immunreaktion gegen fremde HLA-Allele durch NK-Zellen oder allo-restringierte T-Zellen
- eine Antwort gegen Minorhistokompatibilitätsantigene (mHAGs)
oder
- eine T-Zellreaktion gegen spezifische Antigene der Leukämieblasten

Studien haben eine Vielzahl von Antigenen identifiziert, gegen die CD8⁺ T-Zellantworten in myeloischen Leukämien vorliegen. Dazu gehören die mHAGs HA-1 und HA-2 [MUTIS *ET AL.*, 1999], überexprimierte Selbst-Proteine wie proteinase-3 [MOLLDREM *ET AL.*, 1999] und WT1 [GAO *ET AL.*, 2000], ebenso wie Neoantigene, die aus chromosomalen Translokationen entstehen, wie z.B BCR-ABL [OSMAN *ET AL.*, 1999]. Diese Antigene wurden nach der allo-HSCT von CML-Patienten mit einem kurativen GvL-Effekt in Verbindung gebracht [CLARK *ET AL.*, 2001; GAO *ET AL.*, 2000; MOLLDREM *ET AL.*, 2000; MUTIS & GOULMY, 2002].

Die Kenntnis beider Antigenkategorien sollte es zukünftig erlauben GvL-Effekte von der GvHD zu trennen. Deren Expressionsverteilung im Gewebe und die MHC-Moleküle, über die sie präsentiert werden, scheinen dabei für den klinischen Erfolg einer allo-HSCT eine signifikante Rolle zu spielen [FALKENBURG *ET AL.*, 2003]. Ein gezielter GvL-Effekt kann ausgelöst werden, wenn sich die Expression von mHAGs auf das hämatopoetische System beschränkt, und sich so die Spender T-Zell vermittelte Immunreaktion ausschließlich gegen die Resthämatopoese des Patienten einschließlich verbliebener Leukämiezellen richtet [AKATSUKA *ET AL.*, 2007]. Eine GvHD manifestiert sich hingegen als Folge einer systemischen Immunreaktion gegen ubiquitär oder in mehreren Geweben exprimierte mHAGs und betrifft präferentiell die Haut, Leber, Lunge und Magen-Darm-Trakt [LINK *ET AL.*, 1997]. **Abbildung 1.2** stellt die nach allo-HSCT auftretenden GvHD-Komplikation dem erwünschten Therapieziel eines GvL-Effektes, in Abhängigkeit ubiquitär oder Hämatopoese-spezifische exprimierter mHAGs, gegenüber.

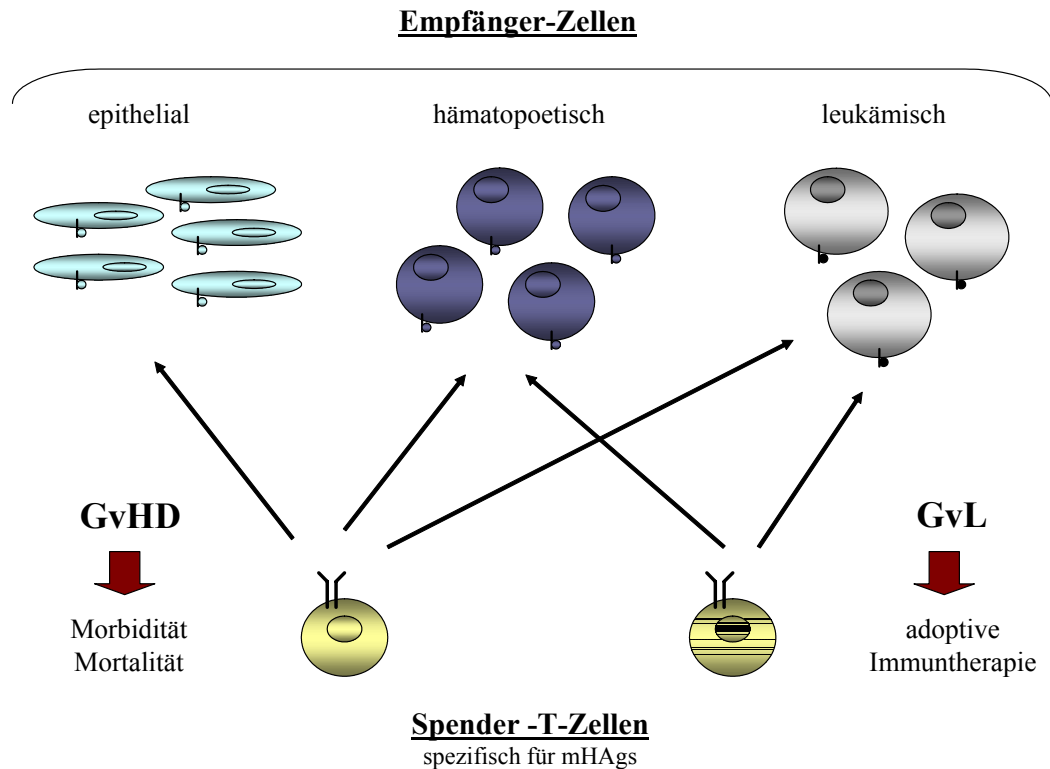


Abb. 1.2: Das therapeutische Dilemma nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation: Graft-versus-Host-Reaktionen (GvHD) als Hauptursache von transplantationsassoziierten Mortalität und Morbidität und Graft-versus-Leukemia-Effekte (GvL) als effektives Prinzip der adoptiven Immuntherapie der Leukämie. Spender-T-Zellen mit Spezifität für ubiquitär exprimierte mHAGs auf hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen verursachen GvHD. Spender-T-Zellen mit Spezifität für mHAGs, die vorzugsweise oder selektiv auf hämatopoetischen Empfängerzellen, einschließlich leukämischen Vorläuferzellen, exprimiert werden, bewirken einen GvL-Effekt ohne das Auftreten einer GvHD [verändert nach <http://www.medscape.com/viewarticle/>].

Die Identifikation von mHAGs ist somit von zweifacher klinischer Bedeutung. Erstens ist die Kenntnis ubiquitär exprimierter mHAGs von GvHD-präventivem Nutzen. Nach einer Typisierung könnte eine gezielte Selektion von Stammzellspendern erfolgen, die einen möglichst identischen Genotyp an ubiquitär exprimierten mHAGs aufweisen. Dies kann dazu beitragen, das Risiko einer GvHD-Erkrankung zu verringern und die damit assoziierte Mortalität- und Morbidität von Patienten zu senken. Zweitens eröffnet die Identifikation Hämatopoese-spezifischer mHAGs neue Therapiemöglichkeiten. Durch die Transplantation von Stammzellen, die sich in möglichst vielen Hämatopoese-spezifischen mHAGs vom Empfänger unterscheiden, könnte ein GvL-Effekt gezielt ausgelöst werden, ohne dass es zu einer Schädigung anderer Gewebe aufgrund einer GvHD-Erkrankung käme. Zudem könnten T-Zellen des Empfängers mit Spezifität für mHAGs gezielt isoliert und zur

Behandlung eines Rezidivs adoptiv in den Patienten transferiert werden. Das Kenntnisspektrum von bekannten Zielantigenen reicht bislang nicht aus, um bei einem nennenswerten Anteil von Patienten GvHD- bzw. GvL-Effekte vorherzusagen oder zu erklären. Ihr immuntherapeutisches Potential erfordert daher eine verstärkte Suche nach neuen geeigneten Zielantigenen [SPIERINGS & GOULMY, 2005].

Die T-Zell-Depletion ist eine besonders wirksame Methode zur Verhinderung der GvHD [HO & SOIFFER, 2001]. Allerdings führt die Entfernung der Spender-T-Zellen aus dem Transplantat zu einer Zunahme von opportunistischen Infektionen und der Rezidivhäufigkeit der Erkrankung. Eine verbesserte Nutzen-Risiko-Relation wurde beobachtet, wenn lediglich CD8⁺ T-Zellen aus dem Transplantat oder aus der Spenderlymphozyteninfusion (DLI) entfernt wurden [BARON *ET AL.*, 2002; JOHNSON *ET AL.*, 1999]. Desweiteren wurden verschiedene Verfahren für die selektive Inaktivierung oder Depletion von allo-reaktiven Spender-T-Zellen entwickelt [HARTWIG *ET AL.*, 2006]

1.3.2 Adoptiver T-Zelltransfer

Vor etwa 40 Jahren wurde von Mitchison erstmals das Konzept der adoptiven zellulären Immuntherapie gegen Tumoren präsentiert. Es verfolgt das Ziel der Eliminierung von malignen Zellen durch den Transfer von reifen T-Zellen und/oder NK-Zellen [MITCHISON, 1970]. Die Bestätigung der prinzipiellen Wirkungsweise liefern die Behandlungserfolge der allo-HSCT. Voraussetzung für den Einsatz des Verfahrens des adoptiven T-Zelltransfers ist jedoch die Generierung und Expansion von tumorreaktiven T-Zellen. Dabei hat die Charakterisierung von tumorassoziierten Antigenen (TAA), die von T-Zellen erkannt werden, die Möglichkeiten stark erweitert. Es wurden verschiedene Methoden entwickelt, die die Isolierung, Expansion und Stimulation von TAA-spezifischen T-Zellen ermöglichen [BLEAKLEY *ET AL.*, 2004; BERGER *ET AL.*, 2008; DISTLER *ET AL.*, 2008]. So ist es möglich, polyklonale T-Zellen mit gewünschter TAA-Spezifität anzureichern und zu expandieren. T-Zellen werden dazu mit Antigen-präsentierenden Zellen stimuliert, die entweder mit antigenen Peptiden beladen oder mit TAA-kodierenden Genen transfiziert wurden [MACKENSEN *ET AL.*, 2006; OELKE *ET AL.*, 2003]. Das maligne Malignom und das Nierenzellkarzinom waren die ersten Tumorentitäten, bei denen der adoptive Transfer von autologen, d. h. vom Patienten selbst stammenden, T-Zellen klinisch getestet wurde und wird [ROSENBERG *ET AL.*, 2008; HEEMSKERK *ET AL.*, 2008].

Im Fall eines AML-Rezidivs nach allo-HSCT kann der GvL-Effekt durch Transfusion von Lymphozyten des Stammzellspenders verstärkt werden. Da das fremde Immunsystem bereits angewachsen und etabliert ist, werden die Lymphozyten des Spenders nach Transfusion nicht abgestoßen. Allerdings ist diese Maßnahme mit der Gefahr der Entwicklung einer GvHD-Erkrankung verbunden, wobei deren Stärke mit dem therapeutischen Erfolg korreliert [MUNKER *ET AL.*, 2004; KOLB *ET AL.*, 2004]. Der überzeugendste klinische Beweis für die Existenz von antileukämischer Immunität liefern die Behandlungserfolge der Donor-Lymphozyten-Infusion (DLI) von CML-Rezidiven nach allo-HSCT [KOLB *ET AL.*, 1995].

1.3.3 T-Zellrezeptor-Transfer

Ein weiteres Konzept der T-Zell-orientierten Krebsimmuntherapie ist der therapeutische Transfer von TCR-Genen in T-Zellen. Das Prinzip ist, das durch Selektionsmechanismen im Thymus gereifte T-Zellrepertoire des Patienten zusätzlich mit TAA-spezifischen TCR auszustatten. Die funktionelle Expression via retroviralem Gentransfer übertragener TCR-Gene konnte sowohl in Maus- als auch in humanen Zellen gezeigt werden [CLAY *ET AL.*, 1999; ORENTAS *ET AL.*, 2001; KESSELS *ET AL.*, 2001; STANISLAWSKI *ET AL.*, 2001]. Die klinische Erprobung des Konzepts erfolgt derzeit beispielsweise mittels TCR, der die Spezifität für das melanomassoziierte Differenzierungsantigen Melan-A/MART-1 aufweist, bei Patienten mit malignem Melanom [MORGAN *ET AL.*, 2006].

1.3.4 Antigen-spezifische Vakzinen

Eine vielversprechende Entwicklung immuntherapeutischer Ansätze bei der AML ist die Nutzung spezifischer Antigene zur Immunisierung. Die „therapeutische“ Vakzinierung beruht auf der in Tiermodellen bestätigten Hypothese, dass die Ignoranz des Immunsystems gegenüber Antigenen auf bestimmten Geweben durch Vakzinierung und damit Induktion einer T-Zellantwort aufgehoben werden kann [HAUSMANN *ET AL.*, 1999]. Das Einbringen des potentiellen Zielantigens in eine professionelle antigenpräsentierende Umgebung soll zu einer systemischen Immunantwort mit protektiver und

tumordestruierender Wirkung führen. Mehrere Kandidaten-Antigene stehen hierfür zur Verfügung, vor allem *WT1* [REZVANI *ET AL.*, 2008], *proteinase-3* [HESLOP *ET AL.*, 2003] und RHAMM (CD168) [GREINER *ET AL.*, 2005].

1.4 Zielstrukturen von T-Zellen gegen maligne Zellen

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt auf der Identifizierung von mHAgS und Leukämie-assoziierten Antigenen, die von CD8⁺ T-Zellen erkannt werden. Da die besondere Bedeutung dieser T-Zellen in der Kontrolle von Tumoren belegt werden konnte [DUDLEY & ROSENBERG, 2003], werden in diesem Kapitel einige Vertreter bisher charakterisierter Tumorantigene und mHAgS vorgestellt. Eine Übersicht über tumorassoziierten Antigene, die von T-Zellen auf menschlichen Tumoren erkannt werden und ihre Einteilung in Kategorien entsprechend ihrer Expressionsverteilung gibt eine Datenbank, die vom Ludwig Institut für Krebsforschung eingerichtet wurde (<http://www.cancerimmunity.org/statics/databases.htm>).

1.4.1 T-Zell-erkannte Antigene bei soliden Tumore (TAA) und bei der Leukämie (LAA)

Aufgrund ihrer Expressionsmuster werden die Tumor-assoziierte Antigene (TAA) folgendermaßen unterschieden:

- Differenzierungsantigene sind Gewebe-spezifisch und leiten sich von Proteinen ab, welche entsprechend dem Typ bzw. Differenzierungsgrad einer Zelle exprimiert werden. Eine Vielzahl von Melanom-assoziierten Antigenen, wie *gp100*, *Tyrosinase* und *Melan A/MART-1* und *Tyrosinase-related protein* gehören zu dieser Gruppe [www.cancerimmunity.org]. Diese Antigene werden auch von normalen Melanozyten exprimiert und sind daher nicht Tumor-spezifisch. Die Induktion dagegen gerichteter Immunantworten kann daher mit ausgeprägten Autoimmunreaktionen einhergehen [KIRKIN *ET AL.*, 1998].
- *Cancer/Germline (CG)*-Antigene werden von Tumorzellen, jedoch nicht von normalen Zellen mit Ausnahme von Testis, Ovarzellen und Plazenta exprimiert. Insbesondere aus den Proteinen der *GAGE*-, *MAGE*-, *BAGE*- und *RAGE*-Familien, *PRAME* und *NY-ESO-1* wurden zahlreiche Tumor-assoziierte T-Zellepitope

identifiziert [www.cancerimmunity.org]. Die CG-Antigene sind deswegen weitgehend Tumor-spezifisch da beispielsweise Testisgewebe als immunprivilegiert gilt, und keine MHC-Klasse I-und II-Moleküle exprimiert [SMITH & CERUNDOLO, 2001].

- Malignome weisen eine Vielzahl von Genmutationen auf, die zumindest teilweise zum malignen Phänotyp beitragen. Für eine Reihe von ihnen wurde gezeigt, dass sie für immunogene Peptide kodieren. Wichtige Vertreter aus dieser Gruppe sind zum Beispiel mutiertes *CDK4* [WOELFEL *ET AL.*, 1995] und mutierte *CASP-8* [MANDRUZZATO *ET AL.*, 1997]. Einige Antigene sind strikt individual-spezifisch, d.h. sie werden nur in dem Tumor exprimiert, in dem sie gefunden wurden, andere strukturalterierte Antigene finden sich häufiger oder gar regelmäßig in bestimmten Malignomen, wie z.B. in Leukämien.

Die Einteilung der Leukämie-assoziierten Antigene (LAA) erfolgt in zwei Gruppen.

- Spezifische Leukämie-Antigene können aus aberranten Fusionsproteinen entstehen [DRIESSCHE *ET AL.*, 2005]. Als bekanntestes Beispiel hierfür ist die t(9;22)-Translokation zu nennen, die bei 95% aller CML-Patienten gefunden wird und das *bcr-abl*-Fusionsprotein generiert [YOTNDA *ET AL.*, 1998 (A); MAJSTEREK *ET AL.*, 2006]. Bei einem Anteil von Patienten mit ALL verursacht die t(12;21)-Translokation das *ETV6-AML*-Fusionsprotein [YOTNDA *ET AL.*, 1998 (B)]. Ebenso einzureihen in diese Gruppe ist *FLT3-ITD*, welches in 30% aller AML-Patienten gefunden wird und aus einer internen Tandemdublikation (*internal tandem duplication*, ITD) innerhalb des Tyrosinkinase-Rezeptor-Gens *FLT3* resultiert [GRAF *ET AL.*, 2007].
- Die Gruppe der überexprimierten Leukämie-assoziierten Antigene beinhaltet nicht polymorphe Proteine, die auf leukämischen Zellen im Vergleich zu normalen Zellen überexprimiert sind und somit potentiellen immuntherapeutischen Zielstrukturen entsprechen [DRIESSCHE *ET AL.*, 2005]. Hier zu nennen sind *preferentially expressed antigen in melanomas (PRAME)* [SCHENK *ET AL.*, 2007], *humane telomerase reverse transkriptase (hTERT)* [ARAI *ET AL.*, 2001], *Wilms' Tumor 1 (WT1)* [OHMINAMI *ET AL.*, 2000] und *Proteinase 3 (Pr3)* [YONG *ET AL.*, 2007]. Ermutigende Ergebnisse zeigten Vakzinierungsstudien sowohl für *WT1* als auch für *Pr3* [REZVANI *ET AL.*, 2008]. *WT1* wird zusätzlich in einer Reihe von soliden Tumoren, wie Brust, -Darm und Lungentumoren überexprimiert. Dies

ermöglicht eine potentielle Verwendung als universelles Zielantigen einer Krebsimmuntherapie [MENSSEN *ET AL.*, 2000; LOEB *ET AL.*, 2001].

1.4.2 Minorhistokompatibilitätsantigene (mHAgs)

Minorhistokompatibilitätsantigene (mHAgs) sind Peptide, die aus genetischen Polymorphismen prozessiert werden und in einem HLA-identen Setting einer allo-HSCT durch Spender T-Lymphozyten erkannt werden. Richten sich allogene T-Zellantworten gegen Hämatopoese-spezifische mHAgs, so vermitteln sie den gewünschten GvL-Effekt. Besonderes Potential besitzen sie jedoch nicht nur in allo-HSCT, sondern ebenso in Verfahren wie dem adoptiven T-Zelltransfer. Bislang sind fünfzehn Hämatopoese-spezifische mHAgs beschrieben worden. Dreizehn mHAgs werden von autosomalen Genen kodiert und zwei vom Y-Chromosom. Die mHAgs HA-1 und HA-2 sind die derzeit interessantesten Zielantigene für die Immuntherapie hämatologischer Erkrankungen. Sie werden nur auf hämatopoetischen Zellen, einschließlich leukämischer Blasten, exprimiert, nicht jedoch auf Geweben wie Haut, Leber oder Niere. Im Zusammenhang mit HA1- und HA2-spezifischen CD8⁺ CTL wurde über ein gemeinsames Auftreten mit DLI-induzierten Leukämie-Remissionen berichtet [MARIJT *ET AL.*, 2003]. Bei B8/H-Y handelt es sich um ein Y-chromosomal kodiertes mHAgs. Nach allo-HSZT eines weiblichen Empfängers kann dieses mHAgs sowohl eine Transplantationsabstoßung, als auch eine GvHD auslösen [WARREN *ET AL.*, 2000]. In **Tabelle 1.1** sind einige Vertreter von T-Zell-erkannten mHAgs gelistet. Einen Überblick über alle bisher identifizierten mHAgs gibt eine von GOULMY im Jahr 2006 veröffentlichte Datenbank. (<http://www.lumc.nl/5033/dbminor.asp>)

Tab 1.1 Minorhistokompatibilitätsantigene (mHAgs)

mHAg	mHAg Frequenz	HLA- Restriktions- element	HLA Frequenz	Prä- valenz	Gen- bezeich- nung	mHAg Gewebeverteilung
HA-1	24%	HLA-A2	43%	10,6%	<i>HA-1</i>	Hematop. Zellen, myeloiden u. lymphoiden leukämischen Zellen
HA-2	4%	HLA-A2	43%	1,7%	<i>Myosin 1G</i>	Hematop. Zellen, myeloiden u. lymphoiden leukämischen Zellen
HB-1 ^{H/Y}	6% / 24%	HLA-B44	12%	0,7% / 2,9%	<i>unbekannt</i>	B-Zell-ALL
ACC-1	17%	HLA-A24	34%	5,8%	<i>BCL2A1</i>	Hematop. Zellen, myeloiden u. lymphoiden leukämischen Zellen
ACC-2	17%	HLA-B44	12%	2,7 %	<i>BCL2A1</i>	Hematop. Zellen, myeloiden u. lymphoiden leukämischen Zellen
UGT2B17	11%	HLA-A29	5%	0,6%	<i>UGT2B17</i>	DC's, B-Zellen
LRH-1	13%	HLA-B7	11%	1,4 %	<i>P2X5</i>	T- und B-Zellen, NK- Zellen, myeloiden Vorläuferzellen
B8/H-Y	25%	HLA-B8	8%	2,9%	<i>UTY</i>	Hämatopoetische Zellen
TRIM22- 442C	1,3%	HLA-A2	43%	<1%	<i>TRIM22</i>	Hämatopoetische Zellen

modifiziert nach [SPIERINGS & GOULMY, 2005], ergänzt durch TRIM22-442C [WOELFEL
ET AL, 2007],

1.5 Verfahren zur Identifizierung von Zielstrukturen allo-reaktiver T-Zellen

1.5.1 SEREX-Methode

Die **SEREX-Methode** (*serological screening of cDNA expression libraries*) beruht auf der Erkennung von Tumorantigenen, die von l-Phagen-Banken exprimiert werden, durch autologe IgG-Antikörper im Serum von Krebspatienten [SAHIN *ET AL.*, 1997; CHEN *ET AL.*, 1997]. Es gibt bereits eine große Anzahl SEREX definierter Antigene, die in einer Datenbank des Ludwig-Institutes für Krebsforschung veröffentlicht sind (<http://www.licr.org/SEREX.htm>). Die Entwicklung einer B-Zellantwort setzt zumindest eine Reaktion von CD4⁺ Zellen voraus. Daher ist davon auszugehen, dass durch SEREX

definierte Antigene auch von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden können. So wurden z.B. für das mittels SEREX identifizierte Antigen NY-ESO-1 bei Krebspatienten gleichzeitig relativ starke T- und B-Zellantworten gefunden [CHEN *ET AL.*, 1997; JÄGER *ET AL.*, 2000; GNJATIC *ET AL.*, 2000].

1.5.2 „Biochemischer“ Ansatz

Der „**biochemische**“ Ansatz zur Identifizierung von CTL-erkannten Tumorantigenen beruht auf der Säureelution von HLA Klasse I-gebundenen Peptiden von Tumorzellen, die nach Fraktionierung durch HPLC (*high performance liquid chromatography*) auf Erkennung durch tumorreaktive T-Zellklone getestet werden [COX *ET AL.*, 1994]. Dazu werden die Peptidfraktionen auf HLA-idente antigenpräsentierende Zellen geladen und diese auf Erkennung durch CTL getestet. Aufgrund geringer Peptidmengen müssen die Peptidfraktionen durch Tandemmassenspektrometrie und MALDI-TOF/TOF MS/MS analysiert werden [KRÜGER *ET AL.*, 2005; HOFMANN *ET AL.*, 2005]. Dadurch erhaltene Teilsequenzen von Peptiden werden anschließend durch Datenbanksuche vervollständigt. Nachfolgend wird das dafür kodierende Antigen ermittelt [COX *ET AL.*, 1994]. Ebenfalls in diese Kategorie einzureihen ist die so genannte Mimotop-Methode, die auf der Testung synthetischer Peptidbibliotheken mit tumorspezifischen T-Zellklonen beruht [LINNEMANN *ET AL.*, 2001; GUNDLACH *ET AL.*, 1996]. Kombinatorische Peptidbibliotheken werden synthetisiert, auf antigen-präsentierende Zellen geladen und mit einem T-Zellklon getestet. Für die Suche nach einem CTL-erkannten Mimotop aus neun Aminosäuren werden 171 (9 x 19, alle proteinogenen Aminosäuren) kombinatorische Peptidbibliotheken synthetisiert und getestet. In jeder Bibliothek steht eine Aminosäure an einer Position fest, alle anderen werden frei kombiniert. Anhand der erkannten Bibliotheken findet man auf diese Weise für jede Position im Nonamer eine oder mehrere Kandidatenamino-säuren. Danach kann durch Datenbankvergleiche nach dem Antigen, aus dem mögliche Peptide stammen können, gesucht werden [GUNDLACH *ET AL.*, 1996; LINNEMANN *ET AL.*, 2001; PINILLA *ET AL.*, 2001; NINO-VASQUEZ *ET AL.*, 2004].

1.5.3 „Reverse Immunologie“

Die Strategie der „**Reversen Immunologie**“ geht für die Antigenidentifizierung nicht von patienteneigenen T-Zellen oder Antikörpern aus, sondern vom Kandidatenantigen selbst. Proteine, die bekanntermaßen in Tumoren überexprimiert werden oder mutiert sind, werden zur Stimulation von T-Zellen benutzt. Kandidaten sind entweder bekannte T-Zell-erkannte Tumorantigene, für die weitere immunogene Peptide, die über dasselbe oder andere HLA-Proteine präsentiert werden, ermittelt werden sollen [KESSLER *ET AL.*, 2001]. Andere Kandidaten ergeben sich aus Hochdurchsatzverfahren, wie z.B. RDA (*representational difference analysis*), *in silico cloning*, DNA Micro Array-Techniken und Proteomanalysen. Durch die kombinierte Anwendung von RDA und *in silico cloning* wurden z.B. einige Antigene der MAGE-Familie identifiziert [LUCAS *ET AL.*, 2000]. Eine Limitierung des Verfahrens liegt darin, dass z.B. punktmutierte Antigene nur dann entdeckt werden können, wenn sie gleichzeitig überexprimiert werden. Für die Stimulation mit den potentiellen Antigenen werden sowohl T-Zellen von Tumorpatienten als auch von gesunden Spendern benutzt. Bei einer Variante der „Reverse Immunologie“ werden zur Stimulation der T-Zellen Peptide benutzt, die mit Hilfe von Epitopvorhersageprogrammen ausgesucht werden weil sie eine hohe Affinität für ein betrachtetes HLA-Molekül aufweisen. Mit Peptiden beladene, autologe antigen-präsentierende Zellen werden für die *in vitro*-Stimulationen der T-Zellen verwendet. Um zu zeigen, dass die Peptide von natürlich prozessierten Tumorantigenen stammen, muss im Nachhinein gezeigt werden, dass die generierten CTL Tumorzellen lysieren, die das putative Antigen und das präsentierende HLA-Allel exprimieren [SMITH & CERUNDOLO, 2001; KESSLER *ET AL.*, 2001; GRAF *ET AL.*, 2007]. Alternativ zu Stimulationen mit peptidbeladenen antigen-präsentierenden Zellen können auch antigen-präsentierende Zellen, die mit einem das Antigen enthaltenen viralen Vektor transduziert wurden, als Stimulatorzellen eingesetzt werden [LOPES *ET AL.*, 2006]. Allerdings muss dafür gesorgt werden, dass keine dominierende Immunität gegen das Virus entsteht. Letzteres kann beispielsweise durch den alternierenden Einsatz verschiedener viraler Vektoren im Verlauf der T-Zellstimulation vermieden werden. Die Peptidspezifität solchermaßen generierter T-Zellen wird abschließend durch die Testung synthetischer Peptide ermittelt.

1.5.4 cDNA-Expressionsklonierung

Eine Methode, mit der bereits viele T-Zell-erkannte Tumor-Antigene gefunden wurden, ist das Verfahren der **cDNA-Expressionsklonierung** [DE PLAEN *ET AL.*, 1988; VAN DER BRUGGEN *ET AL.*, 1991; BRICHARD *ET AL.*, 1993; COULIE *ET AL.*, 1994; WÖLFEL *ET AL.*, 1995; MANDRUZZATO *ET AL.*, 1997]. Die Entdeckung von *MAGE-1*, als erstem menschlichem T-Zell-erkanntem Tumorantigen, erfolgte mit Hilfe eines zytotoxischen T-Zellklones, der sehr spezifisch autologe Tumorzellen erkannte [VAN DER BRUGGEN *ET AL.*, 1991]. Bei dem dabei angewandten Verfahren wurden die zum Screening eingesetzten T-Zellen auf Erkennung von Transfektanten überprüft, die mit genetischem Material aus Tumorzellen transfiziert waren. Für die Identifizierung von *MAGE-1* wurden für die Transfektion von Antigen-Verlustvarianten der Tumorzelllinie verwendet, die mit tumorreaktiven T-Zellen selektiert worden waren. Transfiziert wurde eine Cosmid-Bibliothek der erkannten Tumorzelllinie und die Transfektanten wurden anschließend mit Hilfe des T-Zellklones auf Erkennung getestet. Aus erkannten Transfektanten wurde mit Hilfe der Cosmidsequenz das Gen *MAGE-1* identifiziert [VAN DER BRUGGEN *ET AL.*, 1991]. Weil die Antigenidentifizierung aus Cosmid-Banken auf der stabilen Transfektion von Tumorzellen beruhte, war die Methode schwierig und zeitaufwändig. Die transiente Transfektion von COS-7-Zellen mit cDNA-Banken von Tumorzellen erwies sich demgegenüber als sehr viel vorteilhafter [SEED & ARUFFO, 1987; KARTTUNEN *ET AL.*, 1992; DE PLAEN *ET AL.*, 1997]. Die Herstellung von Tumor-cDNA-Banken erfolgt unter Verwendung eukaryotischer Expressionsvektoren. COS-7-Zellen werden mit HLA-cDNA und gepoolter Tumor-cDNA kotransfiziert und mit T-Zellklonen, die durch das kotransfizierte HLA-Allel restringiert sind, getestet. Die Expressionsvektoren werden in den COS-7-Zellen episomal multipliziert, wodurch zusätzlich zur starken Expression durch die verwendeten Promotoren auf dem Vektor die Bildung großer Protein- und damit Antigenmengen in den COS-7-Zellen erreicht wird [SEED & ARUFFO, 1987]. **Abbildung 1.5** stellt schematisch eine Grundversion dieses Verfahrens dar, das während der vergangenen 10 Jahre schrittweise modifiziert und verbessert wurde [LENNERZ *ET AL.*, 2005]. Dabei wird die Identifizierung eines T-Zell-erkannten cDNA-Klons aus der Tumor-cDNA-Bank dadurch erreicht, dass im ersten Schritt cDNA-Pools aus 100 Bakterienkolonien pro Versuchsansatz transfiziert und getestet werden. Ein von einem T-Zellklon erkannter 100-fach Pool wird in 10-fach Pools subkloniert. Anschließend

werden aus einem erkannten 10-fach Pool einzelne cDNA-Klone präpariert und mit dem T-Zellklon auf Erkennung überprüft. Die peptidkodierende Region der cDNA wird danach durch Transfektion von cDNA-Fragmenten eingegrenzt. Von einem erkannten cDNA-Fragment kodierte Peptide werden abschließend synthetisiert und auf Erkennung durch den T-Zellklon getestet. Limitierend für die Anwendbarkeit dieses Verfahrens sind die Etablierung von Tumorzelllinien und die Generierung von T-Zellklonen, ermöglicht jedoch die Identifizierung von Antigen-Spezies, wie zum Beispiel punktmutierter Antigene, die mittels anderer Verfahren nicht erfassbar sind.

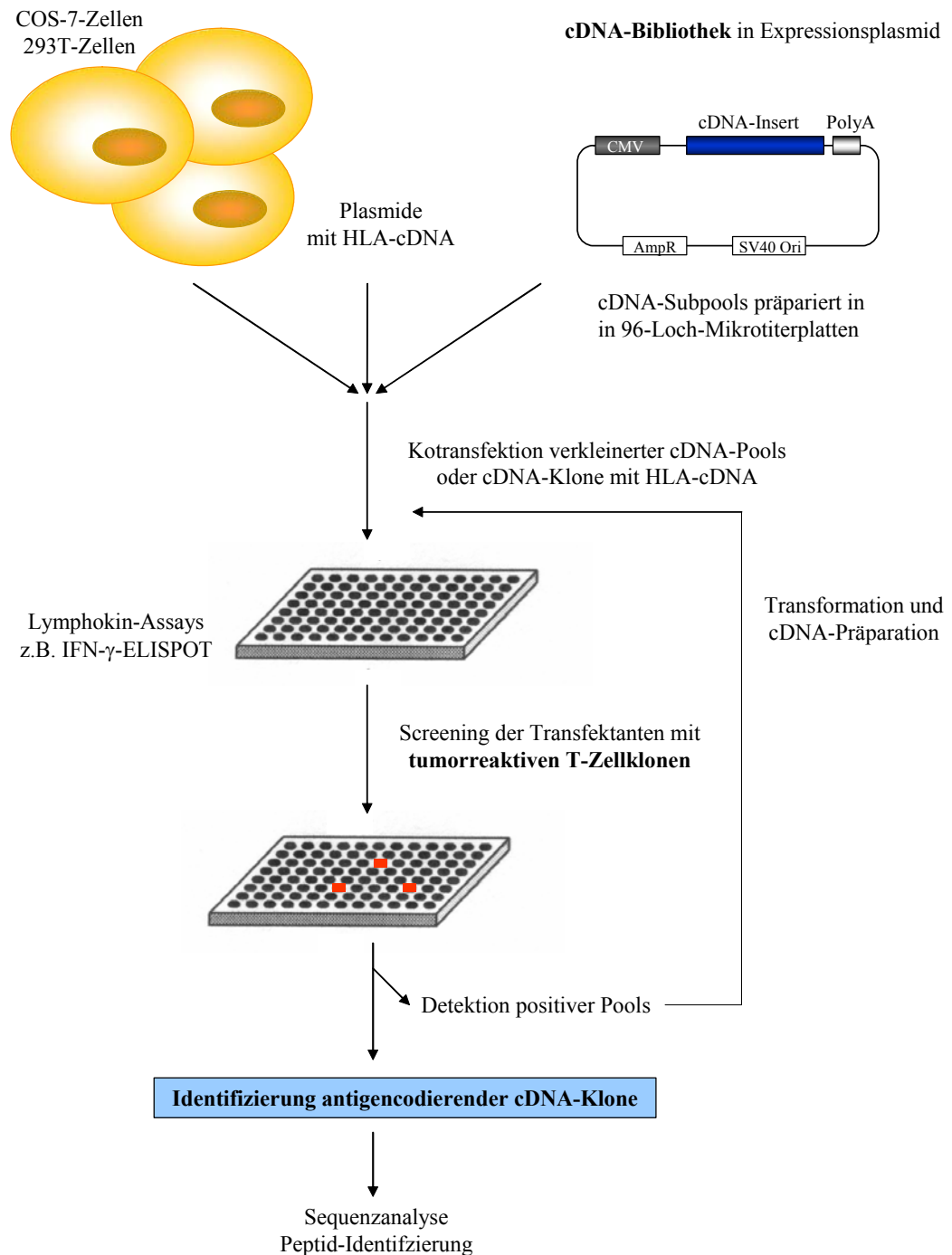


Abb. 1.5: Schematische Übersicht über die T-Zell-basierte cDNA-Expressionsklonierung. Die zu screenende cDNA-Bank aus Tumorzellen wird in einem Vektor konstruiert, der eine hohe transiente Expression in COS- oder 293T-Zellen erlaubt. Aus der cDNA-Bank werden Pools von ca. je 100 cDNA-Klonen (100-fach Pools) gebildet. Diese cDNA-Pools werden zusammen mit Plasmiden, die für restringierende HLA-Moleküle kodieren, in COS- bzw. 293T-Zellen transfiziert. Einzeltransfektionen und Screening der mit unterschiedlichen Pools transfizierten Empfängerzell-Populationen erfolgen auf 96-Loch-Mikrotiterplatten. Die Transfektanten werden nach ca. 2 Tagen in einem Lymphokinassay mit T-Zellen hinsichtlich Antigenexpression überprüft. Je Experiment werden ca. 1000 - 2000 100-fach Pools gescreent. Pools, die nach Transfektion T-Zellen zur Lymphokinproduktion anregen, werden erneut transfiziert. Durch wiederholte Transfektionen wird schrittweise die gesuchte antigencodierende cDNA isoliert und schließlich kloniert. Sequenzvergleiche mit Datenbanken, Expressionsanalysen und Peptididentifizierung sind nachfolgende Schritte im Rahmen der Antigencharakterisierung.

Heutzutage werden die Möglichkeiten der Suche nach neuen Kandidatenantigenen für die Immuntherapie durch die Entwicklung von molekularen und proteinchemischen Hochdurchsatzverfahren, sowie die Verfügbarkeit von Genexpressionsdatenbanken erweitert. Mit der zunehmenden Komplettierung von Genexpressions-Datenbanken wird es darüber hinaus sogar möglich, tumorassoziierte Kandidaten-Antigene sozusagen *in silico* zu finden [MAECKER *ET AL.*, 2001]. Die Attraktivität dieser Ansätze liegt unter anderem darin, dass auf die zeitintensive Etablierung von T-Zellkulturen verzichtet werden kann, und dass sie eine Fülle von Kandidaten-Antigenen liefern. Ihre tatsächliche Immunogenität muss allerdings nachfolgend bewiesen werden. Die SEREX-Technologie [SAHIN *ET AL.*, 1997] nimmt hierbei eine Sonderstellung ein. Mit dieser Methode können *a priori* Antigene identifiziert werden, die beim Menschen humorale Immunantworten auslösen. Da deren Entstehung die Hilfe von T-Zellen benötigt, ist davon auszugehen, dass SEREX-Antigene grundsätzlich auch von T-Zellen erkannt werden.

Die Nachteile von „T-Zell-freien“ Verfahren ist, dass sich damit überwiegend Proteine mit relativ hohem Expressionsniveau als Kandidaten-Antigene identifizieren lassen. Der Vorteil der T-Zell-basierten cDNA-Expressionsklonierung ist seine ausserordentliche Sensitivität [CROTZER *ET AL.*, 2000]. Mit Hilfe dieses Verfahrens können im Gegensatz zu biochemischen Verfahren auch Antigene aus seltenen Transkripten gefunden werden. Zudem werden mit der T-Zell-basierten cDNA-Expressionsklonierung auch auf genetische Alterationen zurückzuführende Antigene erfasst, die den heute verfügbaren Hochdurchsatz-Screeningverfahren entgehen. Dazu gehören Gen-Umlagerungen und Punktmutationen. Antigene dieser Kategorie weisen die höchste Spezifität für Malignomzellen auf und tragen nicht selten zum malignen Phänotyp bei. Darunter sind Moleküle, die in die Zellzykluskontrolle, Zelladhäsion, Apoptose-Regulation und Signalübertragung involviert sind [SENSI & ANICHINI, 2006]. Antigene dieser Art sind deshalb besonders attraktive Zielstrukturen für Immuntherapien, da ihre Expression im Tumorgewebe als stabil anzunehmen ist.

Eine wesentliche Voraussetzung für die Anwendbarkeit der T-Zell-basierten cDNA-Expressionsklonierung ist jedoch die Verfügbarkeit von ausreichend antigentragendem Tumormaterial. Diese wird dann verfügbar, wenn es gelingt aus dem Tumorgewebe permanente Zelllinien zu generieren. Da sich permanente Zelllinien aus Leukämiezellen jedoch nur mit sehr geringer Effizienz generieren lassen [DREXLER *ET AL.*, 2000], war die vorliegende Arbeit vom Vorhandensein ausreichenden Primärmaterials abhängig. Dies stand für die hier untersuchte Leukämie *MZ201-AML* mit circa 2×10^9 Zellen zur

Verfügung. Die primären AML-Zellen wurden portionsweise kryokonserviert und bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Eine weitere Voraussetzung ist das Vorhandensein von Tumor-reaktiven T-Lymphozyten. In vorliegender Arbeit wurden portionsweise kryokonservierte AML-reaktive T-Lymphozyten verwendet [DISTLER *ET AL.*, 2008]. Nach Auftauen und erneuter Restimulation der T-Lymphozyten blieben sowohl die Reaktivität gegen die AML-Zellen als auch die Proliferationsfähigkeit konstant erhalten. Die Verwendung von kryokonservierten T-Lymphozyten erwies sich gegenüber der Verwendung von Langzeitkulturen als vorteilhaft [LENNERZ *ET AL.*, 2005]. Laufende Kulturen zeigen ein inkonstantes Wachstumsverhalten und mit zunehmendem Alter auch einen Verlust ihrer Reaktionsfähigkeit. Eine solche Inkonstanz könnte sich als problematisch für den Erfolg einer Peptididentifizierung erweisen.

In dem Leukämie-Modell MZ51-AML konnte mit Hilfe des Verfahrens der T-Zell-basierten cDNA-Expressionsklonierung auf eben genannte Weise ein neues, von allo-reaktiven T-Zellen erkanntes mHAg identifiziert werden. Es handelte sich um ein *HLA-A*0201*-restringiertes polymorphes Allel des *tripartite motif-containing 22*-Gens (*TRIM22*), bei dem ein Arginin-(R)-zu-Cystein-(C)-Austausch an Position 442 ein immunogenes T-Zellepitop generiert. Als T-Zell-erkannte Peptide wurden das Nonamer AVPPCCIGV bzw. das Dekamer MAVPPCCIGV ermittelt. TRIM22-442C wird hauptsächlich in Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert und weist in der kaukasischen Bevölkerung eine Allel-Frequenz von ca. 1,3% auf [WOELFEL C *ET AL.*, 2007].

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Identifizierung und Charakterisierung neuer Minorhistokompatibilitätsantigene (mHAg) und Leukämie-assoziiertes Antigene, die von allo-reaktiven T-Zellen erkannt werden können. Die Kenntnis eines repräsentativen Spektrums von Antigenen dieser Art würde einerseits eine verbesserte Spenderselektion erlauben. Andererseits würde sie die Weiterentwicklung des adoptiven T-Zelltransfers und die Impfung von Patienten nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation zur Formierung eines protektiven immunologischen Gedächtnisses ermöglichen.

Mittels des Verfahrens der cDNA-Expressionsklonierung sollte in dem allogenen Leukämie-Modell MZ201-AML / Spender 332 nach T-Zell-erkannten Ziel-Antigenen gesucht werden. Als Voraussetzung dafür waren die kryokonservierten AML-reaktiven T-Zell-Populationen 4D7 und 1C6 vorhanden, die durch Frau Dr. Eva Distler in der Promotionsarbeit: „*In vitro generation and characterization of acute myeloid leukemia-reactive CD8+ cytotoxic T lymphocyte clones from healthy donors*“ (Arbeitsgruppe PD Dr. Wolfgang Herr / Universitätsklinikum Mainz) generiert worden waren. Vor dem Einsatz des Verfahrens der cDNA-Expressionsklonierung waren folgende Voraussetzungen zu schaffen:

- Klonierung der HLA-Klasse I-Allele der Patientin MZ201-AML in einen Expressionsvektor und
- Herstellung einer cDNA-Bank aus Leukämiezellen der Patientin MZ201-AML.

Für die Identifizierung und Charakterisierung der Zielantigene der T-Zell-Populationen 4D7 und 1C6 waren folgende Arbeitsschritte vorgesehen:

- Identifizierung von antigenkodierender cDNA mittels T-Zell-basierter cDNA-Expressionsklonierung [Vorgehen analog zu LENNERZ *ET AL.*, 2005],
- Identifizierung der T-Zell-erkannten Peptide durch Eingrenzung der peptidkodierenden Region auf der antigenkodierenden cDNA, die Identifizierung von Peptidkandidaten mit Hilfe prädiktiver Algorithmen und schließlich die Testung synthetischer Peptide auf Erkennung durch die T-Zell-Populationen, die zum Screening eingesetzt wurden,
- Expressionsanalysen in Tumor- und Normalgewebe,
- Ermittlung der Häufigkeit des Auftretens von mHAgS bzw. der Expression von Leukämie-assoziierten Antigenen

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Laborgeräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
Autoklaven	KSG Sterilisatoren / Olching (D) Systec / Wettenberg (D)
Bakterienbrutschrank	Heraeus / Hanau (D)
Brucheis-Automat	Ziegra / Isernhagen (D)
¹³⁷ Cäsiumquelle	Gammacell 2000, Molsgaarg Med./ (DK)
Chemikalienwaage	Sartorius / Göttingen (D)
CO ₂ -Inkubator	Heraeus / Hanau (D)
Durchflusszytometer	FACS Canto, Becton Dickinson / Heidelberg (D)
Elektroporationsgerät	Gene Pulser [®] V, Bio-Rad GmbH / München (D)
ELISPOT-Analyse-System	Carl Zeiss / Jena (D)
Feinwaage	Precisia, PAG Oerlikan AG / Zürich (CH)
Geldokumentationsanlage	BioDocAnalyze, Biometra / Göttingen (D)
Gelelektrophoresekammern	PEQLAB / Erlangen (D)
Heizblock	Thermomixer 5436, Eppendorf / Hamburg (D)
Kolbenhubpipetten	Dunn Labortechnik / Asbach (D)
Kühl- und Gefrierschränke	Heraeus / Hanau (D); Bosch / Stuttgart (D)
LightCycler	LightCycler [®] 2.0, Roche / Mannheim (D)
Magnetrührer mit Heizplatte	IKAMAG RET, Janke & Kunkel / Staufen (D)
MikroTEe	MWS 2819, Bauknecht / Neunkirchen (D)
Multikanalpipetten	Dunn Labortechnik / Asbach (D)
Nunc-Immuno [™] Washer	Nunc / Wiesbaden (D)
Nukleofektionsgerät	Amaxa / Köln (D)
PCR-Cycler	Thermocycler T3, Labotec / Remseck (D)
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss / Jena (D)
pH-Meter	CG 837, Schott / Mainz (D)

Pipettierhilfen	Integra Biosciences / Fernwald (D)
Schüttelinkubator	Certomat, Sartorius / Göttingen (D)
Sequenziersysteme	ABIPrism 377, Appl. Biosys. / Weiterstadt (D)
Spectrophotometer	Ultrospec 3000, Pharmacia / Freiburg (D)
Stickstoffbank	Messer / Sulzbach (D)
Stickstoffvorratstank	Tec-Lab / Königstein TS. (D)
Trockenschrank	UT 6420, Heraeus / Hanau (D)
Vortexer	Janke & Kunkel / Staufen (D)
Wasserbad, beheizbar	GFL / Großburgwedel (D)
Wasserdeionisierungsanlage	Elga Labwater / Celle (D)
Wasserstrahlpumpe	Brand / Wertheim (D)
Zellkultursterilbank	Laminar Flow Box, Spectec / Erding (D)
Zentrifugen	5415D, Eppendorf / Hamburg (D) Biofuge <i>fresco</i> , Heraeus / Hanau (D) Multifuge 3, Heraeus / Hanau (D)

2.1.2 Plastik- / Glas- und Verbrauchsmaterialien

<u>Material</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Bechergläser, Glas	500 ml, 1000 ml, 2000 ml, Jenaer Glas bzw. Schott / Mainz (D)
Bechergläser, Kunststoff	Vitlab / Seeheim-Jugenheim (D)
Duran-Glasflaschen	0,5 l, 1 l, 2 l und 5 l, Schott / Mainz (D)
Einfrierboxen	Nalge Nunc / Wiesbaden (D)
Einfrierröhrchen	2 ml Cryotube PP, Greiner / Nürtingen (D)
Einmalpipetten, steril	2, 5, 10, 25 und 50 ml, Greiner / Nürtingen (D)
Einmalspritzen	10 ml, 20 ml und 50 ml, Braun / Melsungen (D)
Elektroporationsküvetten	0,1 cm / 0,4 cm Bio-Rad GmbH / München (D)
Elispotplatten	Multiscreen _{HTS} -HP- bzw. -IP-Filterplatten, Millipore / Eschborn (D)
Eppendorf-Cups	0,5 ml, 1 ml und 2 ml, Eppendorf / Wesseling (D)
Erlenmeyerkolben	500 ml, 1000 ml, 2000 ml, Jenaer Glas bzw. Schott / Mainz (D)
Falcon-Röhrchen, PP	15 ml, 50 ml, Greiner / Nürtingen (D)

FACS-Röhrchen	5 ml , BD Biosciences / Heidelberg (D)
Gewebekulturflaschen	25cm ² , 75cm ² , 175cm ² , Greiner / Nürtingen (D)
Gewebekulturplatten	24-Loch- / 48-Loch- / 96-Gewebekulturplatten, Greiner / Nürtingen (D) 6-Loch-Gewebekulturplatten, Costar / (US)
Impfösen	Nunc / Roskilde (DK)
Leukosep-Falcons, PP	30 ml, Greiner / Nürtingen (D)
Magnetständer / Magnet	OctoMacs, Miltenyi Biotec / B.- Gladbach (D)
PCR-Reactionsgefäße	Greiner / Nürtingen (D)
Petrischalen	Ø35mm, 60mm, 100 mm, Greiner /Nürtingen (D)
Pipettenspitzen	ART1000, ART20E, ART10reach, MBP / San Diego Biosphere Filter Tips, Sarstedt / Nümbrecht (D)
Quartz-Küvetten	Pharmacia, Freiburg (D)
Rundbodenröhrchen, PP	14 ml, mit Deckel, Becton Dickinson (D)
MS-Säulen (magn. Zellseparation)	Miltenyi Biotec / Bergisch- Gladbach (D)
Skalpelle zur Gelextraktion	Präzisa, Dahlhausen / Köln (D)
Sterilfilter (0,22 µm / 0,45 µm)	Steritop TM , Millipore / Eschborn (D)
Zählkammern	Fuchs-Rosenthal, Schrenk / Hofheim (D)

2.1.3 Chemikalien mit besonderem Reinheitsgrad

<u>Chemikalie</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Agarose	Serva Electrophoresis GmbH / Heidelberg (D)
Agarose, utrapure	Gibco BRL / Karlsruhe (D)
Ammoniumacetat	Merck / Darmstadt (D)
Chloroform	Riedel-de Haen / Seelze (D)
Diethyl-Pyrocarbonat (DEPC)	Sigma / Deisenhofen (D)
Dimethylformamid (DMF)	Merck / Darmstadt (D)
Dimethyl-Desoxysulfat (DMSO)	Merck / Darmstadt (D)
Essigsäure	Carl Roth AG / Karlsruhe (D)
Ethanol _{absolut}	Applichem / Darmstadt (D)
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	Merck / Darmstadt (D)

Ethylenglycol aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure (EGTA)	bis(2-	Sigma / Deisenhofen (D)
Formaldehyd 37%		Merck / Darmstadt (D)
Formamid		Merck / Darmstadt (D)
Glycerol		Sigma / Deisenhofen (D)
Isopropanol		Fisher Scientific / Schwerte (D)
Magnesiumchlorid		Merck / Darmstadt (D)
β-Mercaptoethanol		Sigma / Deisenhofen (D)
Natriumazetat		Merck / Darmstadt (D)
Natrium-Azid		Sigma / Deisenhofen (D)
Natriumchlorid		Carl Roth AG / Karlsruhe (D)
Natriumhydroxid-Plätzchen		Merck / Darmstadt (D)
Natriumlaurylsulfat (SDS)		Merck / Darmstadt (D)
(N-Morpholino)-Propansulfonsäure		Carl Roth AG / Karlsruhe (D)
PBS (phosphate-buffered saline)		Biochrom KG / Berlin (D)
Salzsäure 98%		Merck / Darmstadt (D)
TBE-Puffer (10x)		Serva Electrophoresis GmbH / Heidelberg (D)
Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan		Sigma / Deisenhofen (D)
Wasserstoffperoxid 30%		Carl Roth AG / Karlsruhe (D)
Xylencyanol		Merck / Darmstadt (D)

2.1.4 Lösungen und Puffer

<u>Lösung / Puffer</u>	<u>Stoff / Substanz</u>	<u>Menge</u>
Acetatpuffer für ELISPOT- Assays	Essigsäure 0,2 N	4,6 ml
	Natriumazetat 0,2 N	11,0 ml
	H ₂ O	46,9 ml
Ammoniumacetat 10M / 7,5M	Ammoniumacetat	770,0 g / 577,5 g
	H ₂ O	ad 1,0 l
Ampicillin (50 mg /ml)	Ampicillin, lyophilisiert 50,0 g	50,0 g
	H ₂ O	ad 1,0 l

DEPC-H ₂ O	DEPC		2,0 ml
	H ₂ O	ad	2,0 l
	20 min rühren, nach 24 h autoklavieren und dunkel lagern		
ELISPOT-Puffer	NaHCO ₃		2,9 g
	Na ₂ CO ₃		1,6 g
	Na-Azid		0,2% (w/v)
	H ₂ O	ad	1,0 l
Essigsäure 0,2 N	Essigsäure 96%		11,3 g
	H ₂ O	ad	1,0 l
Ethanol 70%	Ethanol _{absolut}		70,0 ml
	H ₂ O	ad	100,0 ml
FACS-Puffer pH 7	BSA 1%		5,0 g
	PBS	ad	500,0 ml
Ladungspuffer für Agarosegele (Bromphenolblau 6x)	Bromphenolblau		25,0 mg
	Xylencyanol		25,0 mg
	Glycerol		3,0 ml
	H ₂ O	ad	10,0 ml
MOPS-Puffer (10x)	(N-Morpholino)-Propansulfonsäure		41,86 g
	Natriumazetat pH7 (3 M)		16,7 ml
	EDTA pH8 (0,5 M)		10,0 ml
	H ₂ O	ad	1,0 l
Natriumazetat 0,2 N	Natriumazetat		16,4 g
	H ₂ O	ad	1,0 l
PBS (1x)	Instamed PBS-Pulver		95,5 g
	H ₂ O	ad	10,0 l
Puffer zur FACS-Fixierung (1% PFA)	Formaldehyd 37%		1,35 ml
	PBS	ad	50,00 ml
RNA-Ladepuffer	Formamid (deionisiert)		100,0 µl
	Formaldehyd (37%)		70,0 µl
	MOPS (10x)		50,0 µl
	Bromphenolblau (6x)		20,0 µl
	Ethidiumbromid (4µg/ml)		1,0 µl
	H ₂ O DEPC	ad	500,0 µl
SDS 30% (w/v)	SDS		150,0 g
	H ₂ O	ad	500,0 ml
TBE-Puffer (0,5x)	TBE-Puffer (10x)		50,0 ml
	H ₂ O	ad	1,0 l

Trypanblau (Stammlösung)	Trypanblau H ₂ O	ad	2,0 g 1,0 l
Trypanblau (Gebrauchslösung)	Trypanblau (Stammlösung) H ₂ O	ad	37,5 ml 12,5 ml

2.1.5 Substanzen, Zusätze und Reagenzien

<u>Substanz / Zusatz / Reagenz</u>	<u>Bezugsquelle</u>
2'-Aza-5'-Deoxycytidin (DAC)	Sigma / Deisenhofen (D)
AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol)-Tabletten	Sigma / Deisenhofen (D)
Albumin, bovine	Sigma / Deisenhofen (D)
Bacto Agar	Difco / Stuttgart (D)
Bacto Tryptone	Difco / Stuttgart (D)
Cyclosporin A (CSA)	Pharmazeutikum der Uniklinik, Mainz (D)
DNA-Molekulargewichtsmarker	1kb, 100bp Ladder, Biolabs / Ipswich (US)
Ethidiumbromid	Sigma / Deisenhofen (D)
FCS (fötales Kälberserum)	Biochrom KG / Berlin (D)
Ficoll 400	Biochrom KG / Berlin (D)
Hefe-Extrakt	Difco / Stuttgart (D)
HEPES	Gibco BRL / Karlsruhe (D)
Human Albumin Kabi 20%	Octapharma / Langenfeld (D)
Lipofektamin	LF2000, Invitrogen / Karlsruhe (D)
RNA-Molekulargewichtsmarker	0,5-10 kb Ladder, Invitrogen / Karlsruhe (D)
Transmessenger-Reagenz	Qiagen / Hilden (D)
Trypanblau	Merck / Darmstadt (D)
Trypsin-EDTA	Gibco BRL / Karlsruhe (D)
TWEEN20	Sigma / Deisenhofen (D)
Versen (1% EDTA)	Biochrom KG / Berlin (D)

2.1.6 Antibiotika

<u>Antibiotika</u>	<u>Bezugsquelle</u>	<u>Endkonzentration</u>
Ampicillin (Amp)	Sigma / Deisenhofen (D)	100 µg/ml
Chloramphenicol (Cm)	Sigma / Deisenhofen (D)	15 µg/ml
Geneticin (G418)	Gibco BRL / Karlsruhe (D)	1 mg/ml
Penicillin-Streptomycin (PenStrep)	Gibco BRL / Karlsruhe (D)	50 U/ml 50 µg/ml
Kanamycin (Kn)	Sigma / Deisenhofen (D)	50 µg/ml

2.1.7 Enzyme

<u>Enzym</u>	<u>Bezugsquelle</u>	<u>Stockkonzentration</u>
Alkalische Phosphatase	Roche / Mannheim (D)	20 U/µl
Easy-A-Polymerase	Stratagene / Amsterdam (NL)	5 U/µl
Platinum® <i>Taq</i> DNA Polymerase <i>High Fidelity</i>	Invitrogen / Karlsruhe (D)	5 U/µl
Restriktionsendonukleasen	Biolabs / Ipswitch (US) Promega / Mannheim (D)	8-20 U/µl
Taq DNA-Polymerase	Qiagen / Hilden (D) Peqlab / Erlangen (D)	5 U/µl
T4 DNA-Polymerase	Roche / Mannheim (D)	1 U/µl
T4 DNA-Ligase	Biolabs / Ipswitch (US)	5 U/µl

2.1.8 Zytokine

<u>Zytokin</u>	<u>Bezugsquelle</u>	<u>Endkonzentration</u>
Interleukin-2 (IL-2)	R&D Systems / Minneapolis (US)	250 U/ml
Interleukin-7 (IL-7)	R&D Systems / Minneapolis (US)	5 ng/ml
Interleukin-15 (IL-15)	R&D Systems / Minneapolis (US)	5 ng/ml
Interleukin-1β (IL-1β)	Pharmingen / San Diego (US)	10 ng/ml

Interleukin-4 (IL-4)	PBH / Hannover (D)	500 U/ml
Interleukin-6 (IL-6)	Strathman / Hannover (D)	1000 U/ml
Granulocyte-Monocyte-Colony-Stimulating-Factor (GM-CSF)	Sandoz / Ismaning (D)	800 U/ml
Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	Sigma/ Deisenhofen (D)	10 ng/ml
Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)	Sigma / Deisenhofen (D)	1 μ g/ml
gamma-Interferon (IFN- γ)	500 I.E./ml; R&D Systems, Minneapolis (US)	200 U/ml

2.1.9 Antikörper

A) Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

Die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Antikörper waren entweder mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (-FITC) oder Phycoerythrin (-PE) gekoppelt und dienten in durchflusszytometrischen Analysen zum qualitativen Nachweis von Oberflächenantigenen (*cluster of differentiation*, CD). Die Antikörper wurden im Test 1:100 eingesetzt. Da der Antikörper B56/B5/B49⁺ nicht fluoreszenzmarkiert war, erfolgte der Nachweis mit dem Fluorescein-markierten Ziege-anti-Maus-Fab-Fragmente (Beckman-Coulter, Krefeld). Die Antikörper wurden grundsätzlich bei 4°C gelagert.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>	<u>Verwendung</u>
IgG	Immunotech / Marseille (F)	Isotyp-Kontrolle
CD80 / CD83 / CD86 / HLA-DR	Immunotech / Marseille (F)	Differenzierungsgrad von <i>mature Fast-DCs</i>
B56/B5/B49+	One Lambda / CA (US)	Nachweis von HLA-B56

B) Antikörper für IFN- γ -ELISPOT-Assays

<u>Antikörper</u>	<u>Bezugsquelle</u>
MAB-1-DK-1 Anti-hIFN- γ -Antikörper #1-D1K (Maus-IgG1)	Mabtech AB / Nacka (S)
Biotin 7-B6-1 Anti-hIFN- γ -Antikörper #7-B6-1, biotinyliert (Maus-IgG1)	Mabtech AB/ Nacka (S)

2.1.10 Micro Beads

An monoklonale Antikörper gekoppelte *Micro-Beads* (Miltenyi Biotech / Bergisch-Gladbach) wurden für die immunmagnetische Separation von Subpopulationen aus peripheren mononukleären Blutlymphozyten (PBMC) verwendet (siehe 2.2.2.5H). Die Separation erfolgte entweder aus kryokonservierten oder frisch ficollisierten PBMC (siehe 2.2.2.5G).

<u>Bezeichnung der Micro-Beads</u>	<u>separierte PBMC-Subpopulation</u>
CD14	Monozyten
CD19	B-Lymphozyten
CD8	zytotoxischen T-Lymphozyten
CD3	T-Lymphozyten

2.1.11 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Ebersberg) bezogen und für die Amplifikation definierter DNA-Bereiche verwendet. Die in lyophilisierter Form vorliegenden Oligonukleotide wurden in H₂O_{dest} auf eine Konzentration von 100 pmol/ μ l gelöst und für den Gebrauch auf eine Konzentration von 20 pmol/ μ l verdünnt. Sofern nicht anders angegeben wurden pro PCR-Reaktion 5 - 10 pmol Primer eingesetzt (siehe 2.2.1.6A). Die unterstrichenen, kursiv gedruckten Nukleotide kennzeichnen das eingefügte STOP-Kodon (TAG) am 5'-Ende eines Revers-Primers.

A) Primer zur Feststellung der Orientierung von Inserts kloniert im pcDNA3.1- oder pcDNA.3.1/V5-His TOPO- Vektor / Verwendung als Sequenzierungsprimer

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz 5' → 3'</u>	<u>Orientierung</u>
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	sense
BGHrev	TAGAAGGCACAGTCGAGG	revers

B) Primer für die Generierung attB1/B2 flankierender cDNA-Klone (MZ201-AML)

attB1-Adapter	TCGTCGGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGG	sense
attB2-Adapter	-Biotin-GGCGGCCGCACAACCTTTGTACAAGAAAG TTGGGT(T) ₁₉ -	revers

C) Primer für den spezifischen Nachweis von β -Aktin

- PCR-Reaktionen		
actb-852s	TCCTGTGGGATCCACGAACT	sense
actb-1166as	GAAGCATTGCGGTGGACGAT	revers

- Light Cycler Analysen		
β -Aktin forward	GGATTCCTATGTGGG	sense
β -Aktin revers	GGCGTACAGGGATAGC	revers

D) Primer für die Klonierung der HLA-Allele der Patientin MZ201-AML

- Klonierung von HLA-A02, -A01, -B08, -B56 und -Cw01		
5p2-HLA-A/B/C	GGAATCAGAAATCTCCCCAGACGCCGA	sense
3p-HLA-A	GAGGGAGCACAGGTCAGCGTGGGAAG	revers
3p-HLA-B	GGGAGGAAACACAGGTCAGCATGGG	revers
3p-HLA-C	GCGTCGACCTGCATCTCAGTCCCACACAG	revers

- Klonierung von HLA-B56		
HLA.B*56.917.p3	ATGGTGGACTGGGAAGAT	revers
HLA.B*56.354.p5	TGGGCAGACGATGTATGG	sense

E) Primer für den Nachweis von T-Zellrezeptor $V\beta$ -Familien

$V\beta$ -3	ACAGTGTCTCTAGAGAGAAG	sense
$V\beta$ -8	TGTCACCAGACTGGGAACCACCAC	sense

Vß-14	TCTCTCGAAAAGAGAAGAGGAA	sense
Vß-16	GCCTGCAGAACTGGAGGATTCTGG	sense
Vß-17	TCCTCTCACTGTGACATCGGCCCA	sense
Vß-21.3	GATTCACAGTTGCCTAAGGA	sense
CB-antisense	CGGGCTGCTCCTTGAGGGGCTGCG	revers

F) Primer für CXCL-Sequenzen

- Amplifikation der ORFs 1-5 der #250.8.21-Sequenz		
ORF1		
#250.8.21_ExIse	GTCTGCTGAGCCCCATGGCC	sense
#250.8.21_ExII	CAGTGACCACGGACGCTCCTA	revers
ORF2		
#250.8.21.ORF2	AAGAATGGGAAGAAAGCTTGTCTCAACCC	sense
#250.8.21_ExIII	GCCTGTGTATATGGAAATTACAAC TCACT	revers
ORF3		
#250.8.21.ORF3	GCATCCCCCATGGTTCAGAAAATCATCGA	sense
#250.8.21_ExIII	GCCTGTGTATATGGAAATTACAAC TCACT	revers
ORF4		
#250.8.21.ORF4se	CCTGGGAGGGTAAATGTGGGTT	sense
#250.8.21.ORF4re	CAGGCAGGGGGCATTGTTGGCATTG	revers
ORF5		
#250.8.21.ORF5	CAATGCCAAAATGCCCCCTGCCTG	sense
#250.8.21_InIII	CAAAGAGATTAATAATGTTGACA GGG	revers

- Eingrenzung der peptidkodierenden Region auf der #250.8.21-cDNA		
#250.8.21_ExIse	GTCTGCTGAGCCCCATGGCC	sense
#250.8.21.Exon 4	GCTTCTTACTTCTCTCCTGTCAGTTGG	revers
#250.8.21-423bp	<u>CTAGGAATTCCGTGAGACAGGAGGTC</u>	revers
#250.8.21-298bp	<u>CTAGTCCGGGGGACCTTACATTCAC</u>	revers
#250.8.21-255bp	<u>CTAGAATTCCCTGCAGTGTCTGCA</u>	revers
#250.8.21-225bp	<u>CTAAGCGCAGTTCAGTGACCACGG</u>	revers
#250.8.21-153bp	<u>CTAGGCGCCCACCCAGCCGCGT</u>	revers
#250.8.21-68bp	<u>CTAAGGAGCAGCAGCGCCACCCG</u>	revers
#250.8.21-38bp	<u>CTAGGATTGCTGGGGGCGGCGGAGA</u>	revers

- Eingrenzung der peptidkodierenden Region auf der CXCL3-cDNA		
CXCL3.p-46.se	CCTTCCGCTTCTCGCACAGCTTCC	sense
CXCL3.p147.rev	CCAGCTGTCCCTAGAAAGCTGCTGTTCTCTTT	revers
CXCL3.p80.rev	<u>CTACCCATTCTTGAGTGTGGCTATGACTTCGG</u>	revers

CXCL3.p40.rev	<u>CTA</u> AGTGACCACGGACGCTCCTGCTGC	revers
CXCL3.p39.rev	<u>CTA</u> GACCACGGACGCTCCTGCTGCGCG	revers
CXCL3.p38.rev	<u>CTA</u> CACGGACGCTCCTGCTGCGCGCCG	revers
CXCL3.p37.rev	<u>CTA</u> GGACGCTCCTGCTGCGCGCCGGCT	revers
CXCL3.p36.rev	<u>CTA</u> CGCTCCTGCTGCGCGCCGGCTGGC	revers
CXCL3.p35.rev	<u>CTA</u> TCCTGCTGCGCGCCGGCTGGCGGC	revers
CXCL3.p34.rev	<u>CTA</u> TGCTGCCGCCCGGCTGGCGGCCAC	revers
CXCL3.p33.rev	<u>CTA</u> TGCGCGCCGGCTGGCGGCCACCAG	revers
CXCL3.p32.rev	<u>CTA</u> GCGCCGGCTGGCGGCCACCAGGAG	revers
CXCL3.p30.rev	<u>CTA</u> CCGGCTGGCGGCCACCAGGAGCAG	revers
CXCL3.p29.rev	<u>CTA</u> GCTGGCGGCCACCAGGAGCAGGAG	revers
CXCL3.p28.rev	<u>CTA</u> GGCGGCCACCAGGAGCAGGAGCAG	revers
CXCL3.p27.rev	<u>CTA</u> GGCCACCAGGAGCAGGAGCAGCAG	revers
CXCL3.p26.rev	<u>CTA</u> CACCAGGAGCAGGAGCAGCAGCGC	revers
CXCL3.p24.rev	<u>CTA</u> CAGGAGCAGGAGCAGCAGCGCCAC	revers
CXCL3.p23.rev	<u>CTA</u> GAGCAGGAGCAGCAGCGCCACCCG	revers
CXCL3.p22.rev	<u>CTA</u> CAGGAGCAGCAGCGCCACCCGCAG	revers
CXCL3.p21.rev	<u>CTA</u> GAGCAGCAGCGCCACCCGCAGGAG	revers
CXCL3.p20.rev	<u>CTA</u> CAGCAGCGCCACCCGCAGGAGCCG	revers
CXCL3.p19.rev	<u>CTA</u> CAGCGCCACCCGCAGGAGCCGGGG	revers
CXCL3.p18.rev	<u>CTA</u> CGCCACCCGCAGGAGCCGGGGATT	revers
CXCL3.p17.rev	<u>CTA</u> CACCCGCAGGAGCCGGGGATTGCT	revers
CXCL3.p16.rev	<u>CTA</u> CCGCAGGAGCCGGGGATTGCTGGG	revers
CXCL3.p15.rev	<u>CTA</u> CAGGAGCCGGGGATTGCTGGGGGC	revers
CXCL3.p14.rev	<u>CTA</u> GAGCCGGGGATTGCTGGGGGCGGC	revers

- Amplifikation von CXCL1 und CXCL2

CXCL1.p-46.se	CCTCCTCGCCAGCTCTTCCGCTCCTCTCACAG	sense
CXCL2.p-46.se	GCTCCTTGCCAGCTCTCCTCCTCGCACAGCCG	sense
CXCL1-2 p441 rev	CCAGGTGGCCTCTGCAGCTGTGTCTCTTTTC	revers

Die Revers-Primer wurden nach der jeweils letzten Position in der amplifizierten #250.8.21- bzw. CXCL3-Nukleotidsequenz benannt.

G) Primer für *PLAUR*-Sequenzen

Primer zur Eingrenzung der peptidkodierenden Region auf der <i>PLAUR</i> -cDNA		
PLAUR-ORF-p16	GGAGCTGCCCTCGCGACATG	sense
PLAUR-p606	GCTGCAACACCACCAAATGCAACG	sense
PLAUR-STOP-p1050	GATTTTCAGGTTTAGGTCCAGAGGAGAGTG	revers
PLAUR-PTIT	<u>CTAGGCAGTCATTAGCAGGGTGATGGTGGG</u>	revers
PLAUR-SPTI	<u>CTAAGTCATTAGCAGGGTGATGGTGGGGCT</u>	revers
PLAUR-LSPT	<u>CTACATTAGCAGGGTGATGGTGGGGCTGAG</u>	revers
PLAUR-HLSP	<u>CTATAGCAGGGTGATGGTGGGGCTGAGATG</u>	revers
PLAUR-AHLS	<u>CTACAGGGTGATGGTGGGGCTGAGATGGGC</u>	revers
PLAUR-PAHL	<u>CTAGGTGATGGTGGGGCTGAGATGGGCAGG</u>	revers
PLAUR-GPAH	<u>CTAGATGGTGGGGCTGAGATGGGCAGGCC</u>	revers
PLAUR-PGPA	<u>CTAGGTGGGGCTGAGATGGGCAGGGCCAG</u>	revers
PLAUR-QPGP	<u>CTAGGGGCTGAGATGGGCAGGGCCAGGCT</u>	revers

- Primer zum spezifischen Nachweis von <i>PLAUR</i> in Light Cycler Analysen		
cPLAUR F	CCTCATTGACTGCCGAG	sense
gPLAUR F	GCTGTACTAAAAGTGGCTGTAAC	sense
PLAUR A	GGTTTAGGTCCAGAGGAGAGT	revers
PLAUR R	GCAGAGAGGGGGATTTC	revers

2.1.12 Sonden

Die Sonden wurden bei der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) in Auftrag gegeben und dienten in Light Cycler Analysen (siehe 2.2.1.4) dem spezifischen und quantitativen Nachweis von *PLAUR* und β -*Aktin*.

Bezeichnung	Sequenz	T_m
PLAUR-Sensor C	CCATCTCAgCCCCACCATC-FL	59,2°C
PLAUR-Anchor	640-CCCTgCTAATgACTgCCA gACTgTgg p	67,2°C
β -Aktin-Sensor	GGGTGTTGAAGGTCTCAAACATGA-FL	60,0°C
β -Aktin-Anchor	LC-Red705-TGGGTCATCTTCTCGCGGT	60,1°C

2.1.13 Synthetische Peptide

Die in der Arbeit verwendeten Peptide wurden bei Dr. Jan-Wouter Drijfhout (Medizinisches Center der Universität Leiden / NL, Abteilung Immunohämatologie und Bluttransfusion) in Auftrag gegeben und synthetisiert. Die lyophilisierten Peptide wurden in PBS/5% DMSO gelöst und auf eine Konzentration von 2 mg/ml eingestellt. Aliquotiert wurden sie bei -20°C gelagert.

Bezeichnung	Peptidposition im Protein	Sequenz
PLAUR-PTI	253 - 262	PTITLLMTA (9mer)
PLAUR-SPTI	252 - 262	SPTITLLMTA (10mer)
PLAUR-LTI	253 - 262	LTITLLMTA (9mer)
PLAUR-SLTI	252 - 262	SLTITLLMTA (10mer)
CXCL3-RLLRVALLL	14 - 22	RLLRVALLL (9mer)
CXCL3-PRLLRVALLL	13 - 22	PRLLRVALLL (10mer)

2.1.14 Plasmide

pcDNA3

Der Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen / Leek, NL) wurde für die Expression heterologer DNA in eukaryotische Zellen entwickelt. Eine Weiterentwicklung dieses Vektors ist sowohl der pcDNA3.1- als auch der pcDNA3.1/V5-His TOPO-Vektor, der zusammen mit dem *pcDNA3.1/V5-His TOPO TA Cloning Kit*[®] verwendet wurde (siehe 2.2.1.6C). Die wichtigsten Eigenschaften sind:

- Die Vektoren ermöglichen durch die Expression des β -Lactamasegens die Selektion von rekombinanten Bakterien durch Ampicillin.
- Durch die CoIE1 Replikationsinitiationssequenz aus dem pUC19 Plasmid wird eine hohe Kopienzahl pro Bakterienzelle erreicht.

Die wichtigsten Eigenschaften für die Expression in eukaryotischen Zellen sind:

- Der Promotor/Enhancer des humanen Cytomegalievirus kontrolliert die Expression des nach geschalteten Gens. Das erste ATG der Insertsequenz dient als Translationsstart.
- Der „Polylinker“ enthält Erkennungssequenzen für je 11 verschiedene Restriktionsendonukleasen, die jeweils nur einmal in der Sequenz vorkommen und eine Klonierung von cDNA in gewünschter Orientierung erlauben
- Eine Polyadenylierungssequenz aus bovinen Wachstumshormon (BGH) gewährleistet die Polyadenylierung des Transkripts.
- Der SV40 Replikationsursprung ermöglicht die episomale Replikation des Plasmids in Zellen, die das große T-Antigen des jeweiligen Virus stabil exprimieren. Daraus resultiert eine massive Expression des transfizierten Gens, die schließlich nach 72 Stunden zum Absterben der transfizierten Zellen führt.
- Das Neomycingen, das unter der Kontrolle des SV40 Promotors steht, erlaubt die Selektion stabiler Transfektanten mit G418.

Die Klonierung von HLA-Allelen (siehe 2.2.1.2) und kürzeren Fragmenten antigenkodierender cDNA (siehe 2.2.1.3) erfolgten in den Vektor pcDNA3.1/V5-His TOPO aus dem *pcDNA3.1/V5-His[©] TOPO[®] TA Expression Kit*. Die cDNA-Klone wurden anschließend sequenziert (siehe 2.2.1.6B).

pDONR[™] 222

Der pDONR[™] 222 -Vektor ist Bestandteil der Gateway Technologie (*CloneMiner[™] cDNA Library Construction Kit* / Invitrogen) für die Herstellung einer cDNA-Bank und dient als Übergangsvektor der cDNA-Bank (siehe 2.2.1.1A). Der Vektor besitzt neben einem Kanamycin-resistenzgen (K^R), eine Rekombinationskassette, die die flankierenden Rekombinationsstellen *attP1* und *attP2*, sowie zur Selektion das *ccdB*- und Chloramphenicolresistenz-Gen (Cm^R).

pcDNA3.1/RfA/DEST

Bei dem pcDNA3.1/RfA/DEST-Vektor handelt es sich um die modifizierte Form des pcDNA3.1-Vektors, der durch das Einfügen der Rekombinationskassette *RfA* kompatibel für die Verwendung der Gateway Technologie mit Hilfe des *CloneMiner™ cDNA Library Construction Kit* (Invitrogen) gemacht wurde (siehe 2.2.1.1B). Der pcDNA3.1/RfA/DEST-Vektor vermittelt alle oben für pcDNA3.1 genannten Eigenschaften, enthält jedoch die Rekombinationskassette *RfA* flankierenden Rekombinationsstellen *attR1* und *attR2*, sowie das *ccdB*- und Chloramphenicolresistenz-Gen (Cm^R).

2.1.15 Molekularbiologische „Kits“

Soweit nicht anders angegeben wurde bei der Verwendung der „Kits“ nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Kit	Hersteller
<i>CloneMiner™ cDNA Library Construction Kit</i>	Invitrogen, Karlsruhe (D)
<i>Gateway® Vector Conversion System</i>	Invitrogen, Karlsruhe (D)
<i>High Pure® PCR Product Purification Kit</i>	Roche, Mannheim (D)
<i>HiSpeed® Plasmid Maxi Kit</i>	QIAGEN, Hilden (D)
<i>Human Total RNA Master Panel II</i>	BD Biosciences, Heidelberg (D)
<i>Light Cycler® Fast Start Kit</i>	Roche, Mannheim (D)
<i>Oligotex Direct mRNA Mini Kit</i>	QIAGEN, Hilden (D)
<i>pcDNA3.1/V5-His® TOPO® TA Expression Kit</i>	Invitrogen, Karlsruhe (D)
<i>QIAamp DNA Mini Kit</i>	QIAGEN, Hilden (D)
<i>QIAprep® Spin Miniprep Kit</i>	QIAGEN, Hilden (D)
<i>QIAprep® 96 Turbo Miniprep Kit</i>	QIAGEN, Hilden (D)
<i>RiboMAX Large Scale RNA Production System T7</i>	Promega, Mannheim (D)
<i>RNA/cDNA Quality Assay Kit</i>	BD Clontech, Heidelberg (D)
<i>RNeasy Mini Kit</i>	QIAGEN, Hilden (D)
<i>RNase-Free DNase Set</i>	QIAGEN, Hilden (D)

<i>SMART cDNA Synthesis Kit</i>	BD Clontech, Heidelberg (D)
<i>SuperScriptTMIII Reverse Transcriptase</i>	Invitrogen, Karlsruhe (D)
<i>Taq PCR Core Kit</i>	QIAGEN, Hilden (D)
<i>Taq-DNA-Polymerase Kit</i>	Peqlab, Erlangen (D)
<i>Thermo SequenaseTM Cy5TM Dye Terminator Sequencing Kit</i>	Amersham, Buckinghamshire (UK)
<i>TOPO TA Cloning Kit</i>	Invitrogen, Karlsruhe (D)
<i>Vectastain[®] Elite Kit</i>	Vector Laboratories, Peterborough (UK)

2.1.16 Bakteriennährmedien

Zur Kultivierung und Kryokonservierung von *Escherichia coli* (siehe 2.2.1.60) wurden Medien folgender Zusammensetzung verwendet:

Medium	Bestandteile	Menge
LB-Medium (Luria-Bertani)	Trypton	10,0 g
	Hefeextrakt	5,0 g
	NaCl	10,0 g
	H ₂ O	ad 1,0 l
LB-Agar	LB-Medium	1,0 l
	Bacto-Agar	15,0 g
Einfriermedium	Glycerol	30,0 ml (60%)
	LB-Medium	ad 50,0 ml

Sowohl LB-Medien als auch LB-Agar wurden in 1 l Duranglasflaschen angesetzt und für 30 min bei 121°C autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurden den Medien Antibiotika (siehe 2.2.1.6) entsprechender Konzentration zugesetzt. Für die Herstellung von LB-Agarplatten wurde das mit Antibiotikum versetzte LB-Agar Medium in Petrischalen gegossen und unter der Sterilbank bei geöffnetem Deckel erstarren gelassen.

2.1.17 Zellkulturmedien

Die verwendeten Medien wurden bei 4°C gelagert und vor dem Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Medium zur Kultivierung von COS-7-Zellen und EBV-B-Zelllinien

RPMI 1640 _{komplett} + Glutamin (Gibco, Karlsruhe)	10% Fötale Kälberserum (FCS) (hitzeinaktiviert, 1h / 56°C) 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin (PenStrep)
--	---

Medium zur Kultivierung von T- und Leukämie-Zellen

AIM-V + L-Glutamin + Streptomycin (50 µg/ml) + Gentamicin (10 µg/ml) (Gibco, Karlsruhe)	I) 10% Humanserum* II) ohne Zusätze (Waschmedium)
---	--

* Humanserum freiwilliger Spender; Infektionsserologie durch die Transfusionszentrale / Uniklinik Mainz; Laborinternes Poolen, Filtrieren und Hitzeinaktivieren (1h / 56°C) des Serums, Lagerung bei -80°C.

Medium zur Generierung von Fast-DCs aus plastik-adhärenenten Monozyten

X-VIVO 15 (BioWhittaker, Biggs Ford Rd. Walkersville, US)	2% Humanalbumin 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin (PenStrep)
--	---

Medien für Transfektionsexperimente

RPMI 1640 + Glutamin (Gibco, Karlsruhe)	zum Einstellen der Konzentration von Zellen, cDNA und Transfektionsreagenz I) 10% FCS, Ø PenStrep (Zellen) II) ohne Zusätze (cDNA, Lipofektamin)
OPTI-MEM + Glutamax (Gibco, Karlsruhe)	ohne Zusätze (Elektroporationen)

Medium zum Einfrieren eukaryotischer Zellen

Einfriermedium für 250 ml:	150 ml X-VIVO 15 100 ml Humanalbumin (20%) 250 µl Liquemin (5000 U/500µl) dem Medium wurde erst kurz vor Gebrauch 10% DMSO zugesetzt
-----------------------------------	--

2.1.18 BakterienstämmeTOP10

Für Standard-Transformationen von *Escherichia coli* (siehe 2.2.1.60) mit rekombinanter Plasmid-DNA wurde in der vorliegenden Arbeit der Stamm TOP10 (Invitrogen / Leek, NL) [GRANT ET AL., 1990] verwendet. Mit einer Transformationseffizienz von 1×10^9 cfu/µg *supercoiled* DNA ist dieser Stamm ideal für hocheffiziente Klonierungen und Plasmidamplifikationen und erlaubt zudem eine stabile Replikation von Plasmiden hoher Kopienzahl. TOP10-Zellen besitzen unten genannten Genotyp und vermitteln somit folgende Eigenschaften:

F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ80*lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *recA1* *ara*Δ139 Δ(*ara-leu*)
7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*

- ***hsdR*** - für eine effiziente Transformation nichtmethylierter DNA aus PCR-Amplifikationen
- ***mcrA*** - für eine effiziente Transformation unmethylierter DNA aus genomischen Präparationen
- **ZΔM15** für eine Blau/Weiss-Selektion von Rekombinanten
- ***end A1*** – für reine DNA-Präparationen und bessere Resultate in folgenden Anwendungen aufgrund der Eliminierung eines unspezifischen Verdau durch Endonuklease-I
- ***recA1*** - für eine Reduktion unspezifischer Rekombinationen in klonierter DNA [GRANT ET AL., 1990]

Shot® *ccdB Survival*TM-T1R

Für die Transformation von *Escherichia coli* mit dem konstruierten pcDNA3.1/RfA/DEST-Vektor wurde der chemokompetente Stamm One Shot® *ccdB Survival*TM-T1R von Invitrogen verwendet. Dieser Stamm eignet sich für die Vermehrung von Plasmiden, die das *ccdB*-Gen enthalten und besitzt eine Transformationseffizienz von $> 5 \times 10^8$ Transformanden/ μg DNA. Der Stamm weist folgenden Genotyp auf:

F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *ara* Δ 139 D(*ara-leu*)7697
galU galK rpsL (StrR) *endA1 nupG tonA::Ptrc -ccdA*

ElektroMAX DH10B

Für die Transformation von *Escherichia coli* mit der MZ201-AML cDNA-Bank (*Expression library* in pcDNA3.1/RfA/DEST) wurde der elektrokompente Stamm ElektroMAX DH10B von Invitrogen verwendet. Der Stamm weist folgenden Genotyp auf:

F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1 endA1 ara* Δ 139 Δ (*ara, leu*)7697 *galU galK* λ ⁻ *rpsL nupG*

2.1.19 ZelllinienCOS-7

COS (CV-1 origin SV40)-7 ist eine adhärenente, in einem „Monolayer“ wachsende Zelllinie mit fibroblastärer Morphology, die aus gesunden Nierenzellen eines adulten Männchens der Meerkatzenart *Cercopithecus aethiops* (Grüne Meerkatze) generiert wurde. Die Zellen wurden mit dem defekten Genom des SV40-Virus transformiert, in dem der DNA-Replikationsursprung deletiert war. COS-7 Zellen exprimieren konstitutiv das große T-Antigen dieses Polyomavirus und ermöglichen dadurch die episomale Replikation von zirkulären Plasmiden, die einen SV40-DNA-Replikationsursprung tragen [GLUZMAN *ET*

AL., 1981]. Die Expressionsplasmide pcDNA3.1 und pcDNA3.1/V5-His TOPO tragen den SV40-DNA-Replikationsursprung. COS-7-Zellen dienen in der vorliegenden Arbeit der transienten Expression von Genen.

EBV-Zelllinien

EBV-Zelllinien sind mit Epstein-Barr Virus-transformierte (EBV)-B-Zellen, die in vorliegender Arbeit aus Zellen der Patientin bzw. des gesunden Spenders generiert (siehe 2.2.2.5F) und für Gen-Expressions- und T-Zell-Spezifitätsanalysen verwendet wurden.

Malignom-Zelllinien

Malignom-Zelllinien, die hier nicht im Einzelnen aufgelistet wurden, waren Bestandteil von Expressionsanalysen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden und stammten aus der internen Zelllinien-Bank

2.1.20 Patienten-/Spendermaterial

Das Patientenmaterial stammte von der an einer Akuten Myeloischen Leukämie (AML) erkrankten 74-jährigen Patientin MZ201-AML. Nach der FAB-Klassifikation wurde die Leukämie als Differenzierungstyp M5a eingestuft und ein initialer WBC (*White Blood Cell Count*) von 200×10^3 Zellen/ μl (normaler WBC $10 \times 10^3/\mu\text{l}$) bestimmt. Die Patientin verstarb nach einer Chemotherapie und 9 Monate nach der Diagnose an refraktärer, fortschreitender Grunderkrankung. Das Patientenmaterial wurde in Form eines Leukapheresates (Leukozytenkonzentrat) erhalten. Die Aufarbeitung eines Leukapheresates erfolgte nach standardisiertem Protokoll (siehe Promotionsarbeit Dr. Eva Distler). Das Spendermaterial stammte von zunächst serologisch typisierten, HLA-Klasse I-identischen gesunden Spendern und wurde in Form von *Buffy coats* über die Transfusionszentrale des Klinikums der Johannes Gutenberg-Universität Mainz bezogen. Eine hochauflösende HLA-Typisierung von Patienten und Spendern erfolgte durch Dr. D. Thiele (Institut für Immunologie und Genetik, Kaiserslautern).

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung einer cDNA-Bank aus Leukämiezellen

A) Prinzip

Zur Herstellung einer cDNA-Bank der Patientin MZ201-AML wurde die Gateway[®] Technologie aus dem *CloneMiner[™] cDNA Library Construction Kit* (Invitrogen) verwendet. Die Gateway[®]-Technologie bietet **(A)** den Vorteil eines schnellen und hocheffizienten Transfers von DNA-Sequenzen (z.B. cDNA-Klone oder PCR-Produkte) in vielfache Vektorsysteme, gewährleistet **(B)** die Beibehaltung der Orientierung und des Offenen Leserahmens und ermöglicht **(C)** die Adaptierung eines jeden Vektors zu einem Gateway[®] Zielvektor. Für die Expression der cDNA-Bank wurde der pcDNA3.1-Vektor gewählt, der durch die Integration der Rekombinationskassette *RfA* mittels des *Gateway[®] Vector Conversion Systems* zu einem Gateway-Zielvektor modifiziert wurde (siehe 2.2.1.1B). Die Gateway-Klonierungstechnologie benutzt das Rekombinationssystem des Phagen Lambda [LANDY, 1989] um den Transfer heterologer DNA-Sequenzen, die von modifizierten *att*-Stellen flankiert sind, zwischen Vektoren zu ermöglichen [HARTLEY *ET AL.*, 2000]. Zwei Rekombinationsreaktionen bilden dabei die Basis der Gateway-Klonierungstechnologie. In der ersten sog. *BP-Reaktion* erfolgt die Rekombination eines *attB1/B2*-Substrates (hier *attB1/B2*-cDNA-Klon, linearisiert) mit einem *attP1/P2*-Substrat (hier pDONR[™]222) zur Erzeugung eines *attL1/L2*-„Übergangsklons“ (*Entry library* in pDONR[™]222). Diese Reaktion wird durch die BP-Clonase katalysiert. Die anschließende LR-Reaktion ermöglicht die Rekombination eines *attL1/L2*-Substrates („*Entry library*“ in pDONR[™]222) mit einem *attR1/R2*-Substrat (hier pcDNA3.1/RfA/DEST) unter Erzeugung eines *attB1/B2*-„Expressionsklons“ (*Expression library* in pcDNA3.1/RfA/DEST). Diese Reaktion katalysiert die LR-Clonase. Die folgende Abbildung zeigt das Prinzip der Gateway-Klonierungstechnologie.

Gateway™ Klonierungstechnologie

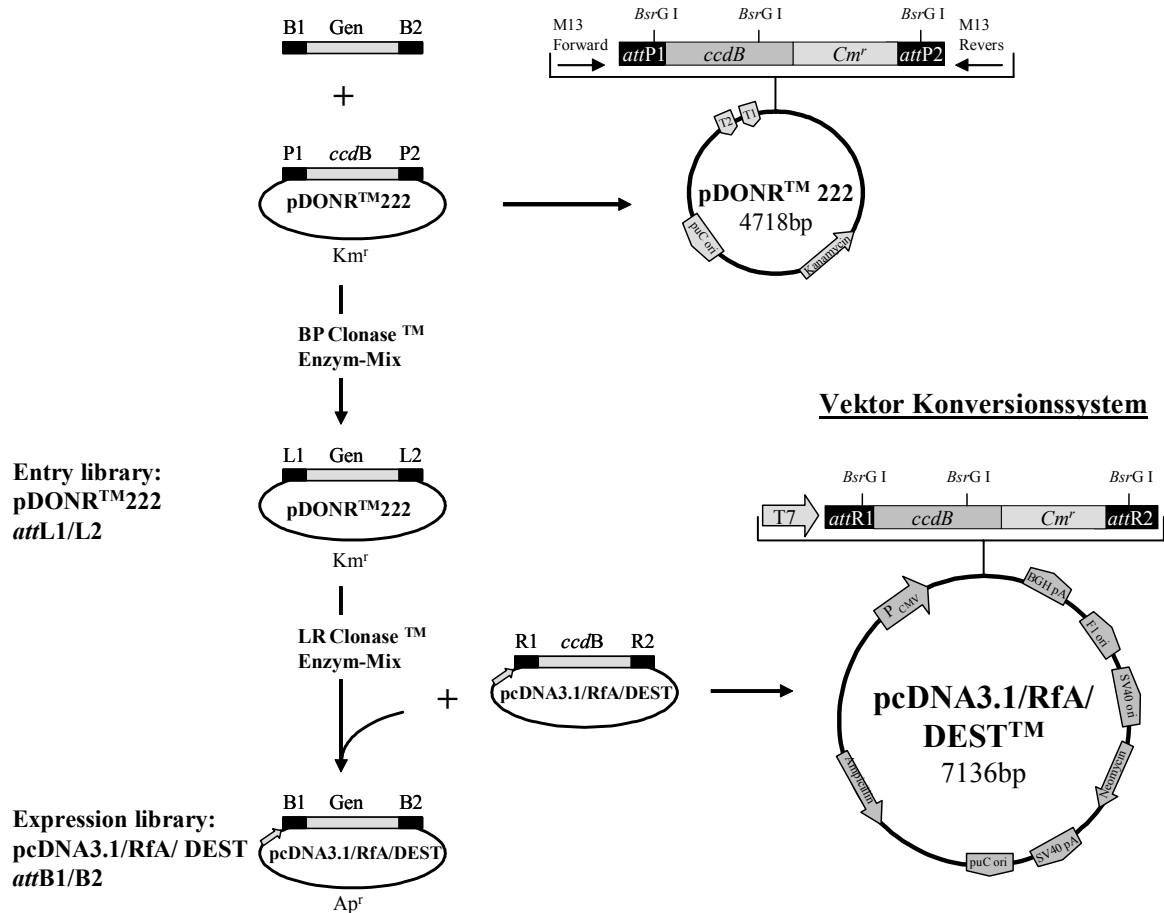


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Prinzips der Gateway-Klonierungstechnologie. Durch zwei Rekombinationsreaktionen erfolgt der Gen-Transfer von einem Übergangsvektor (pDONR™222 → *Entry library* in pDONR™222) in einen Zielvektor (pcDNA3.1/RfA/DEST) unter Erzeugung eines Expressionsklons (*Expression library* in pcDNA3.1/RfA/DEST).

Eine effiziente Selektion von *Entry*-Klonen (pDONR™222, attL1/L2) wird durch das ccdB-Gen zur Negativ- und das Kanamycin-Resistenzgen zur Positivselektion ermöglicht. Bei Erhalt vermittelt das ccdB-Gen eine Wachstumshemmung von *E. coli*. Durch Amplifikation des *Entry library* in pDONR™222 in Kanamycin versetztem LB-Medium erhöht sich nochmals die effiziente Selektion erfolgreich rekombinierter cDNA-Klone. Die Negativselektion von *Expression*-Klonen (pcDNA3.1/RfA/DEST, attB1/B2) erfolgt hier ebenfalls durch das ccdB-Gen. Eine Positivselektion mittels Ampicillin wird durch das entsprechende Resistenzgen ermöglicht. Die BP- bzw. LR-Rekombinationsreaktion ist in der **Abbildung 2.2** im Detail dargestellt. Durch zwei Rekombinationsschritte werden im

Expression library (hier in pcDNA3.1/RfA/DEST) die ursprünglichen *attB1*- und *attB2*-Adaptoren wieder hergestellt. Dies ermöglicht den erneuten Transfer in beliebige Vektorsysteme mittels der Gateway-Technologie.

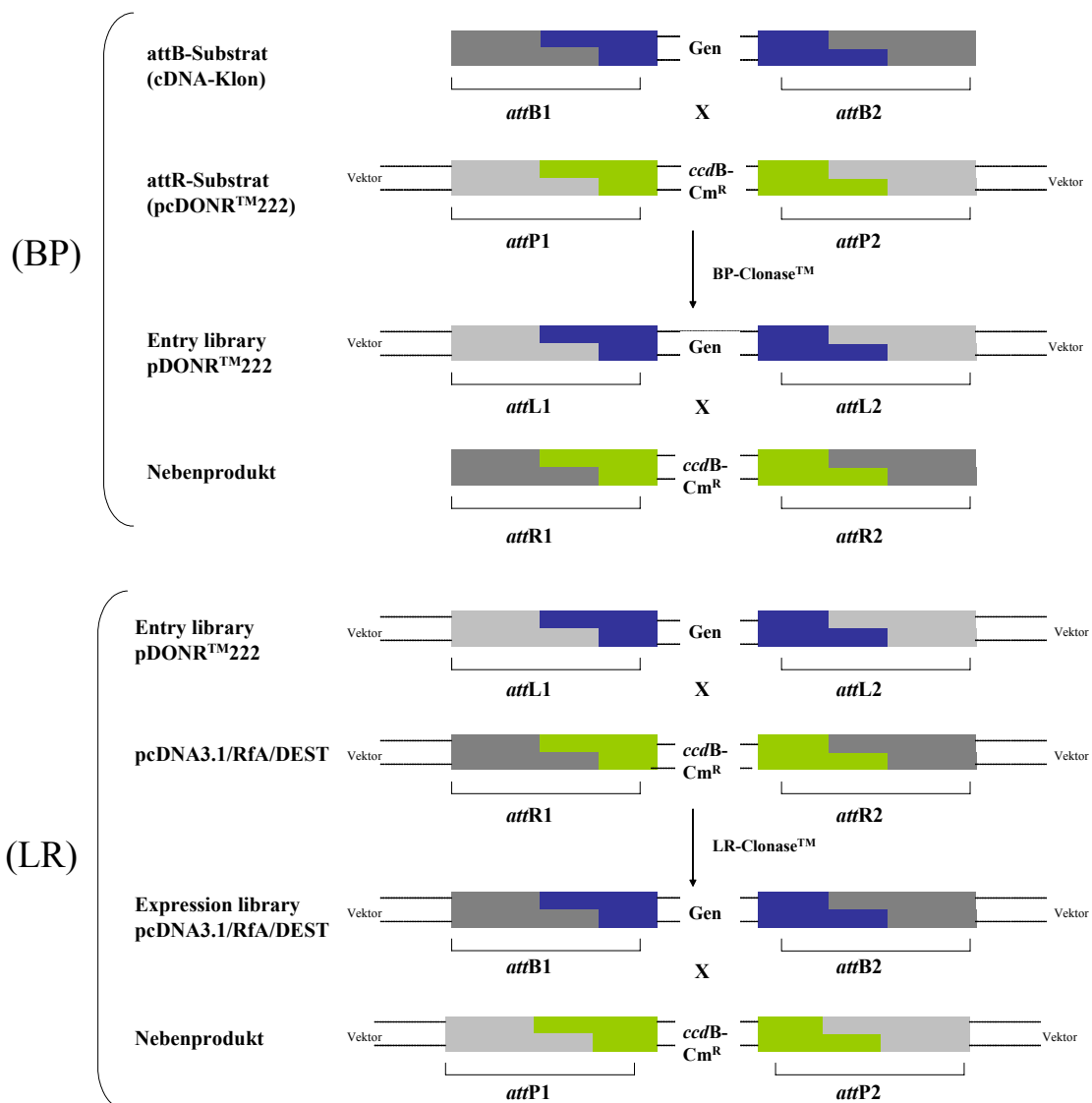


Abb. 2.2: Detaillierte Darstellung der BP- und LR-Rekombinationsreaktion. Die BP-Clonase katalysiert die Rekombinationsreaktion zwischen einem *attB1/B2*-Substrat (cDNA-Klon) und einem *attP1/P2*-Substrat (pDONRTM222) unter Erzeugung eines *Entry library* in pDONRTM222 (*attL1/L2*). Die LR-Clonase katalysiert die Rekombinationsreaktion zwischen einem *attL1/L2*-Substrat (*Entry library* in pDONRTM222) und einem *attR1/R2*-Substrat (pcDNA3.1/RfA/DEST) unter Erzeugung eines *Expression library* in pcDNA3.1/RfA/DEST (*attB1/B2*).

B) Vektor-Konversion - Konstruktion des pcDNA3.1/RfA/DEST aus pcDNA3.1

Das Gateway® Vector Conversion System von Invitrogen bietet die Auswahl aus drei verschiedenen Rekombinationskassetten (*RfA*, *RfB*, *RfC.1*), die die Erzeugung von *attR*-Adaptoren in den drei möglichen Leserahmen A, B und C.1 erlauben. Die drei Rekombinationskassetten unterscheiden sich jeweils durch ein zusätzliches Adenin-Nukleotid in den flankierenden ½ *EcoRV*-Restriktionsstellen, die den Leserahmen der Nukleotidsequenz bestimmen. Die *att1*- und *att2*-Adaptoren enthalten jeweils eine *BsrG I*-Restriktionsstelle. Die folgende Abbildung zeigt die für die Konversion des pcDNA3.1-Vektors verwendete Rekombinationskassette *RfA*.

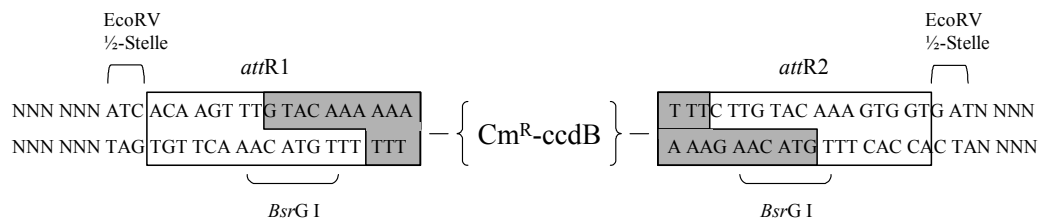


Abb. 2.3: Die Rekombinationskassette *RfA* erzeugt den Leserahmen A. Der Leserahmen wird bestimmt durch die Nukleotidabfolge in der ½ *EcoRV*-Restriktionsstelle. Durch die Integration der Rekombinationskassette *RfA* erfolgte die Konversion des pcDNA3.1-Vektors in den pcDNA3.1/DEST-Vektor, dem Gateway-Zielvektor für die Expression der cDNA-Bank.

Die Vektor-Konversion von pcDNA3.1 zu pcDNA3.1/RfA/DEST wurde wie folgt durchgeführt. Zunächst erfolgte die Linearisierung des pcDNA3.1-Plasmids mittels *EcoRV*-Restriktionsverdau (siehe 2.2.1.6D). Eine Religation des pcDNA3.1-Vektors wurde durch die nachfolgende Zugabe und Inkubation (1h, 37°C) von 1 µl CIP (*caly intestine phosphatase*, 10 U/µl) verhindert. Mittels T4 DNA-Ligase wurde nun die *RfA*-Rekombinationskassette in den linearisierten pcDNA3.1-Vektor ligiert (siehe 2.2.1.6C), worauf im Anschluss die Transformation in den chemokompetenten *E. coli* Stamm One Shot® *ccdB* Survival™-T1R (Invitrogen) folgte. Transformanden wurden auf Ampicillin- und Chloramphenicol-haltigem LB-Agar selektiert. Von 24 Klonen erfolgte die Feststellung der Orientierung der *RfA*-Kassette mittels *PvuII*-Restriktionsverdau, sowie nach Aufkonzentrierung der DNA durch Präzipitation mittels Ammoniumacetat (siehe 2.2.1.6N), die Sequenzanalyse (siehe 2.2.1.6B). Der sequenzierte Klon pcDNA3.1/RfA.DEST#6 wurde im Anschluss für Folgeexperimente verwendet.

C) Funktionalität des konstruierten pcDNA3.1/RfA/DEST-Vektors

Die Funktionalität des konstruierten pcDNA3.1/RfA/DEST-Vektors sollte im Vergleich zu dem klassischen pcDNA3.1-Vektor durch Expressionsanalyse des punktmutierten, *HLA-A*0201*-restringierten *Cyclin-Dependent Kinase 4* (CDK4) (Mutation R24C; T. WOELFEL *ET AL.*, 1995) erfolgen. Der CDK4mut cDNA-Klon lag bereits kloniert im pcDNA3.1-Vektor vor. Für die Umklonierung wurde der Klon mittels *EcoRI*-Verdau aus dem pcDNA3.1-Vektor geschnitten und die überhängenden 5'-Enden anschließend mittels T4 DNA-Polymerase aufgefüllt. Anschließend erfolgte mittels *BsrG I*-Restriktionsverdau (siehe 2.2.1.6D) die Linerarisierung des pcDNA3.1/RfA/DEST-Vektors. Zur Erzeugung von *Blunt ends* wurden die 5'-überhängenden Vektorenden wiederum mittels T4 DNA-Polymerase aufgefüllt (siehe 2.2.1.6E). Eine anschließende Zugabe von 1 µl CIP verhinderte eine Religation des Vektors. Anschließend erfolgte mittels T4 DNA-Ligase die Ligation des Inserts (siehe 2.2.1.6C) und die Transformation von *E. coli* TO10 (siehe 2.2.1.6O). Transformanden wurden auf Ampicillin-haltigem LB-Agar selektiert. Die Funktionsanalyse des pcDNA3.1/RfA/DEST-CDK4mut Vektors im Vergleich zum pcDNA3.1/CDK4mut-Vektor erfolgte durch einen Erkennungstest mittels IFN- γ -ELISPOT-Assay (siehe 2.2.2.1) unter Verwendung des *HLA-A*0201* restringierten CDK4mut reaktiven CTL 14/35.

D) Herstellung der cDNA-Bank der Patientin MZ201-AML in pcDNA.3.1/RfA/DEST

Nach den Angaben des Herstellers (*CloneMiner™ cDNA Library Construction Kit*, Invitrogen) werden zwischen 1 - 5 µg mRNA benötigt, um eine cDNA-Bank bestehend aus 10^6 - 10^7 Klonen (in *E. coli*) zu konstruieren.

- Präparation von mRNA aus Leukämiezellen

Die in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagerten Leukämiezellen der Patientin MZ201-AML wurden rekultiviert (siehe 2.2.2.5B) und Total-RNA aus 200×10^6 Zellen (siehe 2.2.1.6L) präpariert. Für die Isolierung von Poly-A⁺-mRNA aus präparierter Total-RNA wurde der *Oligotex Direct mRNA Mini Kit* (QIAGEN) verwendet. Die Poly-A⁺ mRNA wurde in 100 µl OEB-Puffer eluiert. Für die sich anschließenden Folgereaktionen war eine Aufkonzentrierung der Poly-A⁺-mRNA

erforderlich. Dies erfolgte durch Präzipitation mittels Natriumazetat (ÜN, -20°C , siehe 2.2.1.6N). Nach Zentrifugation (60 min, 4°C) und 2-mal waschen mit 70% Ethanol, wurde die PolyA⁺-mRNA in 10 μl H₂O resuspendiert. Es folgte die photometrische Bestimmung der mRNA-Konzentration (siehe 2.2.1.6K). Im Folgenden wurde die Integrität der mRNA durch Verwendung des *RNA/cDNA Quality Assay Kits* (BD Clontech) überprüft. In die RT-Reaktion wurden dazu 2 μl Poly-A⁺-mRNA aus dem 100 μl Eluat vor der Natriumazetat-Präzipitation und 1 μl Oligo(dT) (20 μM) eingesetzt. Die darauf folgende Amplifikationsreaktion beinhaltete 1 μl der RT-Reaktion sowie jeweils 1 μl 5'- bzw. 3'-Fragment Primer Mix (10 μM). In unterschiedlichen Reaktionsansätzen wurde im angelegten PCR-Programm der Amplifikationszyklus 25-, 28-, 31- bzw. 34-mal wiederholt. Auf einem denaturierenden 2%igen Agarose-Gel (siehe 2.2.1.6I) wurden anschließend jeweils 2,5 μl / Probe analysiert. Handelt es sich um intakte PolyA⁺-mRNA sollte die 28S RNA Untereinheit (UE) jeweils die doppelte Intensität der 18S RNA UE aufweisen.

- Herstellung von *attB1/B2*-flankierenden cDNA-Klonen (MZ201-AML)

Die Herstellung von *attB1/B2*-flankierenden cDNA-Klonen erfolgte mittels des *CloneMiner™ cDNA Library Construction Kits* (Invitrogen). Die Reaktion der Erststrang cDNA-Synthese enthielt 4 μg PolyA⁺-mRNA, 1 μl Biotin-*attB2*-Oligo(dT) Primer (30 pmol/ μl) sowie 4 μl SuperScript™ II RT (200 U/ μl). Nach der Zweitstrang-Synthese folgte die Aufkonzentrierung der cDNA durch Phenol-Chloroform Extraktion und anschließender Ammoniumazetat-Präzipitation (siehe 2.2.1.6N). Das Pellet (*attB2*-cDNA) wurde in 18 μl H₂O resuspendiert. Die anschließende Erzeugung der *attB1*-Flankierung der cDNA-Klone erfolgte über Ligation. Die Reaktion enthielt 18 μl *attB2*-cDNA, 10 μl des *attB1*-Adapters (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und 5 μl T4 DNA-Ligase (1 U/ μl). Die Ligationsreaktion wurde bei 16°C für 24 h inkubiert. Die Biotinylierung des Primers *attB1*-Primers verhinderte eine *blunt-end* Religation der Adapterenden. Im Anschluss folgte die Größenfraktionierung der *attB1/B2*-cDNA.

- Größen-Fraktionierung der MZ201-AML-cDNA

Die cDNA-Fraktionierung ermöglicht die Anreicherung großer cDNA-Fragmente (> 0,5 kb). Die Größen-Fraktionierung der MZ201-AML-cDNA erfolgte mittels

Sephadex-Säulen (Sephacryl® S-500 HR, *CloneMiner™ cDNA Library Construction Kit* / BD Clontech) in 20 Fraktionen. Große cDNA-Fragmente passieren dabei die Matrix weitestgehend ungebremst, kleinere cDNA-Fragmente hingegen werden durch die poröse Matrix am Durchfluss behindert und durchlaufen die Matrix am Schluss. Nach dem Sammeln der Fraktionen 1 - 20 folgte die Bestimmung der jeweiligen DNA-Konzentration. Im Vergleich zu jeweils 1 µl des Konzentrationsstandards pEXp7-tet wurde 1 µl jeder Fraktion auf eine LB-Agarplatte aufgetragen und unter UV-Licht visualisiert und analysiert. Für Folgereaktionen verwendete Fraktionen wurden durch Ammoniumazetat-Präzipitation aufkonzentriert (siehe 2.2.1.6N) und in 4,5 µl TE-Puffer resuspendiert. Für die nachfolgende BP-Rekombinationsreaktion wurden die zu Pool 1 zusammengefassten Fraktionen 5 und 6 verwendet. Pool 1 sollte nach dem Prinzip der Fraktionierung nach ein Gemisch von größeren cDNA-Fragmenten enthalten.

- BP- und LR-Rekombinationsansatz

In der BP-Rekombinationsreaktion (siehe **Abb. 2.2**) erfolgte die Herstellung des MZ201-AML *Entry library* in pDONRTM222 (*attL1/L2*). Dabei katalysierte die BP-Clonase die Rekombinationsreaktion zwischen den flankierenden *attB1/B2*-Adaptoren der cDNA-Klone (MZ201-AML) und den *attP1/P2*-Adaptoren des pDONRTM222-Vektors. Der BP-Rekombinationsansatz enthielt folgende Komponenten:

- | | |
|--|---------------|
| <ul style="list-style-type: none"> - 100 ng <i>attB1/B2</i>-flankierte cDNA (MZ201-AML) (Pool #1) - 250 ng <i>attP1/P2</i>-flankierter pDONRTM222 -Vektor - 2 µl BP-Clonase Puffer (5x) - 3 µl BP-Clonase | } ratio 1:2,5 |
| ad 10 µl TE-Puffer | |

Die LR-Rekombinationsreaktion (siehe **Abb. 2.2**) erzeugt das MZ201-AML *Expression library* in pcDNA3.1/RfA/DEST (*attB1/B2*). Dabei katalysiert die LR-Clonase die Rekombinationsreaktion zwischen den *attL1/L2*-Adaptoren des *Entry library* in pDONRTM222 und den *attR1/R2*-Adaptoren des pcDNA3.1/RfA/DEST-Vektors. Vor der LR-Rekombinationsreaktion wurde, aufgrund empirischer Erkenntnisse des Herstellers, der pcDNA3.1/RfA/DEST-Vektor (5 µg/Reaktion)

mittels *BbvCI*-Restriktionsverdau (1h30min, 80°C) linearisiert (siehe 2.2.1.6D). *BbvCI* schneidet zwischen dem *ccdB*- und dem Cm^{R} -Gen. Der LR-Rekombinationsansatz setzte sich im Anschluss wie folgt zusammen:

- | | | |
|--|---|-----------|
| <ul style="list-style-type: none"> - 250 ng Entry library pDONRTM222 - 250 ng pcDNA3.1/RfA/DEST (lin. <i>BbvCI</i>) - 8 µl LR-Clonase Puffer (5x) - 4 µl LR-Clonase ad 40 µl TE-Puffer | } | ratio 1:1 |
|--|---|-----------|

Sowohl der BP- als auch der LR-Reaktionsansatz wurden für 20 h bei 25°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Clonase wurde im Anschluss jeweils 2 µl Proteinase K (2 µg/µl) zugegeben und inkubiert (37°C, 15 min). Die Termination der Reaktion erfolgte bei 75°C für 10 min. Nach Aufkonzentrierung der BP- bzw. LR-Reaktion durch Präzipitation mittels Ammoniumacetat (siehe 2.2.1.6N), wurden *E. coli* ElektroMax DH10 (Gene Pulser[®] V: 2,0 kV, 200 Ohm, 25 µF) mit jeweils 6 Ansätzen à 1,5 µl der BP- bzw. LR-Rekombinationsreaktion transformiert. Die Transformationsansätze wurden jeweils gepoolt (6 x 1,5 µl), wobei die BP-Reaktion (*Entry library* in pDONRTM222) anschließend in Kanamycin-haltigem LB-Medium für 6h15min bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend erfolgte die Plasmid-Isolierung des *Entry library* in pDONRTM222 nach dem Maxi-Protokoll (siehe 2.2.1.6O) und die Aufkonzentrierung der DNA mittels Ammoniumazetat-Präzipitation. Das Pellet wurde in 10 µl TE-Puffer resuspendiert. Für die DNA-Konzentrationsbestimmung des *Entry library* in pDONRTM222 anhand des Konzentrationsstandard pEX-p7-tet wurde 1 µl entnommen. Die gepoolten Transformationsansätze (6 x 1,5 µl) der LR-Reaktion (*Expression library* in pcDNA3.1/RfA/DEST) wurden nach der Bestimmung der Transformandenanzahl sofort kryokonserviert (siehe 2.2.1.6O).

- Bestimmung der Transformandenanzahl

Jeweils ein Aliquot (0,2 ml) des gepoolten BP- bzw. LR-Transformationsansatzes wurde auf Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten titriert (10^{-2} - 10^{-4}). Für die Berechnung der Transformandenanzahl wurde folgende Formel verwendet.

$$\begin{array}{ccccccc}
 \mathbf{x_1} \text{ Anzahl Kolonien} & & 10^6 \text{ pg} & & \text{Transformations-} & & \mathbf{x_3} \text{ Transformanden} \\
 \hline
 & \times & & \times & \text{volumen}_{\text{gesamt}} & \times 10 = & \\
 & & \mu\text{g} & & \mathbf{x_2} \mu\text{l ausplattiert} & & \mu\text{g Plasmid DNA} \\
 & & \text{transformierte} & & & & \\
 & & \text{DNA} & & & &
 \end{array}$$

- Analyse der Rekombinationsfrequenz

Von jeweils 24 Klonen der BP- und LR-Rekombinationsreaktion wurde nach DNA-Präparation nach dem Mini-Protokoll (siehe 2.2.1.6O) und photometrischen Bestimmung der DNA-Konzentration (siehe 2.2.1.6K) ein *Bsr*GI-Restriktionsverdau durchgeführt (siehe 2.2.1.6D), um den Erfolg der Rekombinationsreaktionen anhand der Anzahl und Größe inserierter cDNA-Klone zu überprüfen.

- Kryokonservierung des MZ201-AML *Expression library* in pcDNA3.1/RfA/DEST

Nach Berechnung der Transformanzahl wurde die MZ201-AML cDNA-Bank (*Expression library* in pcDNA3.1/RfA/DEST) in Aliquots à 10.000 cDNA-Klone in S.O.C.-Medium + 15% DMSO kryokonserviert und bei -80°C aufbewahrt.

*E) DNA-Präparation von 100 x cDNA-Pools aus dem MZ201-AML *Expression library* in pcDNA3.1/RfA/DEST*

Die DNA-Präparation des MZ201-AML *Expression library* in pcDNA3.1/RfA/DEST erfolgte in 100-fach cDNA-Pools im 96-TE-Format und wurde wie folgt durchgeführt. Ein Aliquot bestehend aus 10.000 cDNA-Klonen wurde aufgetaut, in 5 ml LB-Amp-Flüssigmedium überführt und auf einer 25 x 25 cm großen LBamp-Agarplatte gleichmäßig ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Wuchsdichte die durch das Ausstreichen von 10.000 cDNA-Klonen auf diesem Plattenformat erreicht wurde, erwies sich als optimal für das Picken von etwa 100 x 100-fach cDNA-Pools. Am nächsten Tag wurden mit Hilfe einer Impföse 96 x 100-fach cDNA-Pools in jeweils 5 ml LB-Amp-Flüssigmedium in 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt und auf einem Schüttelinkubator angezogen (ÜN, 37°C). Nachdem von jedem cDNA-Pool ein Glycerolstock (siehe 2.2.1.6O) angelegt wurde, erfolgte die DNA-Präparationen mittels des *QIAprep*[®] 96 *Turbo Miniprep* Kits von QIAGEN (siehe 2.2.1.6O). Die cDNA wurde in jeweils 200 µl EB-Puffer

eluiert. Nach photometrischer Bestimmung der DNA-Konzentration (siehe 2.2.1.6K) wurden Vorverdünnungen (300 ng/5µl) der cDNA-Pools angelegt, die so direkt in cDNA-Expressionsanalysen (siehe 2.2.2.2) eingesetzt wurden. Die Lagerung der präparierten cDNA-Bank MZ201-AML *Expression library* in pcDNA3.1/RfA/DEST sowie deren Vorverdünnungen erfolgten bei -20°C.

2.2.1.2 Klonierung von HLA-Allelen

Die Genotypisierung der HLA-A, -B, und Cw-Allele der Patientin und der Spenders erfolgte am Institut für Immunologie und Genetik in Kaiserlautern im Labor von Dr. Thiele. Für die Suche nach Antigenen sollten alle HLA-Allele einbezogen und aus den Leukämiezellen der Patientin kloniert werden. Dazu erfolgte zunächst die Isolierung von Total-RNA (siehe 2.2.1.6L) aus 7×10^6 Leukämiezellen der Patientin. Nach der Synthese von cDNA mittels RT-PCR (siehe 2.2.1.6M) wurden unter Verwendung spezifischer Primer (siehe 2.1.11D) die HLA-A-, B- und Cw-Allele der Patientin MZ201-AML in einer PCR-Reaktion (siehe 2.2.1.6A) amplifiziert. Nach der Ligation der PCR-Produkte in den Vektor *pcDNA3.1/V5-His TOPO* (siehe 2.2.1.6C) wurde von 8 - 30 Klonen pro Ansatz die Orientierung des Inserts mittels PCR oder Restriktionsverdau (siehe 2.2.1.6D) festgestellt. Sequenzierte (siehe 2.2.1.6B) HLA-cDNA-Klone wurden in cDNA-Expressionsexperimenten (siehe 2.2.2.2) verwendet.

2.2.1.3 Generierung von Fragmenten antigenkodierender cDNA

Die Eingrenzung der peptidkodierenden Region auf einem cDNA-Klon erfolgte mittels PCR (siehe 2.2.1.6A) und der Verwendung spezifischer Primer (siehe 2.1.11). Bei der Generierung der *sense*-Primer wurde darauf geachtet, dass diese keinen *frame shift* im Leserahmen des Transkripts verursachen. Zum Teil wurden Revers-Primer am 5'-Ende mit einem STOP-Kodon (TAG) versehen, um ein Einlesen in die Vektorsequenz zu vermeiden. Amplifizierte Fragmente wurden in den Vektor *pcDNA3.1/V5-His TOPO* ligiert (siehe 2.2.1.6C), in *E. coli* TOP10 transformiert (siehe 2.2.1.6O) und die DNA präpariert (siehe 2.2.1.6O). Durch PCR oder Restriktionsverdau (siehe 2.2.1.6A bzw. -D) wurde von 8 - 12 Klonen die Orientierung der Inserts in dem bi-direktionalen Vektor

überprüft. Korrekt orientierte und sequenzierte cDNA-Fragmente wurden anschließend in COS-7-Zellen transfiziert (siehe 2.2.2.3A) und auf Erkennung durch T-Lymphozyten im IFN- γ -ELISPOT-Assay (siehe 2.2.2.1) getestet. Gegebenenfalls erfolgte eine weitere Fragmentierung erkannter cDNA-Klone. War eine Eingrenzung der peptidkodierenden Region auf der antigenkodierenden cDNA gelungen, wurden aus einer erkannten Region, die noch für 40 - 60 Aminosäuren kodierte, synthetische Peptide bestellt. Zuvor wurden mittels einer im Internet frei verfügbaren Datenbank (<http://www.syfpeithi.de/>) Vorhersageanalysen für mögliche nona- und dekameren Peptidkandidaten für ein betrachtetes HLA-Allel durchgeführt. Die synthetisch hergestellten Peptide wurden mittels IFN- γ -ELISPOT-Assay und Zytotoxizitäts-Assay auf Erkennung durch T-Lymphozyten getestet (siehe 2.2.2.4).

A) Fragmentierung der #250.8.21- / CXCL3#6- und CXCL3#14-cDNA

Unter Verwendung der unter 2.1.11F angegebenen Primer wurde zunächst der ORF 1 - 5 der #250.8.21-cDNA amplifiziert. Im Anschluss folgte eine weitere Fragmentierung vom 3'-Ende sowohl der #250.8.21- als auch der CXCL3#6- bzw. CXCL3#14-cDNA. Die Schmelztemperaturen der verwendeten Primer lagen zwischen 62°C und 68°C. Die PCR-Amplifikation der Fragmente erfolgte nach Standardprotokoll (siehe 2.2.1.6A). Sämtlichen PCR-Reaktionen wurde zur Erhöhung der Stringenz 5% DMSO zugesetzt [CHESTER & MARSHAK, 1993].

B) Fragmentierung der PLAUR-cDNA

Zur Eingrenzung der peptidkodierenden Region wurden Fragmente um die polymorphe Region der PLAUR-317P-cDNA generiert. Es wurden 9 Fragmente generiert, die vom 3'-Ende um jeweils 3 Nukleotide verkürzt waren. Die PCR-Amplifikation (siehe 2.2.1.6A) der Fragmente erfolgte mittels der unter 2.1.11G angegebenen Primern. Die Schmelztemperaturen der verwendeten Primer lagen bei 72°C.

2.2.1.4 Light Cycler Analysen

Für die Durchführung von Light Cycler Analysen wurde der *LightCycler Fast Start Kit* (Roche) und für die Auswertung der Rohdaten die *LightCycler Software Version 4.05* (Roche Diagnostics) verwendet.

A) Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR beruht auf dem Prinzip einer klassischen Polymerase-Kettenreaktion, bietet jedoch den Vorteil der „Echtzeit“-Analyse während des Reaktionslaufes. Der spezifische Nachweis von Genen erfolgte mittels den unter 2.1.11G angegebenen Primer und Hybridisierungssonden (siehe 2.1.12). Eine optimale Hybridisierung der Sonden erforderte zunächst die Austestung verschiedener $MgCl_2$ -Konzentrationen. Als ideal wurde eine $MgCl_2$ -Konzentration von 2 mM ausgetestet. Eine 20 μ l Reaktion für die Analyse einer Homo- oder Heterozygotie von Zellen (hier *PLAUR-317P/L*) auf der Ebene genomischer DNA setzte sich wie folgt zusammen: 2 μ l PCR-Puffer (10x) inklusive Enzym, 0,8 μ l $MgCl_2$ (50 mM), 0,5 μ l je Sonde „Anker“ bzw. „Sensor“ (6 pmol/ μ l), 0,5 μ l je Primer A bzw. B (20 pmol/ μ l), 200 ng genomische DNA (*template*), ad 20 μ l H_2O . Die genomische DNA stammte aus einer kliniksinternen Bank von primärem Leukämie material und Material von gesunden Spendern. Das Programm zur Durchführung einer Real-Time-PCR lautete wie folgt. Die Wiederholung der Schritte II.-IV. erfolgte 45-fach.

I.	Denaturierung Initial	4 min	94°C
II.	Denaturierung	1 min	94°C
III.	Annealing	30 sec	54°C
IV.	Extension	45 sec	72°C
V.	Extension	10 min	72°C

Die Schmelzpunktkurven, die für homo- und heterozygote Proben erhalten wurden, definieren sich wie folgt: Die für *PLAUR-317P* spezifische „Sensor“-Sonde überdeckt die variable Sequenz im Allel *PLAUR-317L*. Die Sequenzänderung unter der „Sensor“-Sonde führt zu einer Erniedrigung des Schmelzpunktes. Für heterozygote Proben, hier

PLAUR-317L/P, werden daher zwei definierte Schmelzpunkte, für homozygote Proben, hier *PLAUR-317L/L*, wird ein definierter Schmelzpunkt erhalten.

B) Quantitative PCR

Der quantitative Nachweis eines Zielgens (hier *PLAUR*) in Zellen und Geweben erfolgte in Relation zu dem Haushaltsgen *β-Aktin* auf cDNA-Ebene. Ein 20 µl Reaktionsansatz enthielt die Komponenten in genannter Zusammensetzung (siehe 2.2.1.4A), jedoch 2 µl RT-cDNA aus Zellen bzw. Referenz-cDNA *β-Aktin* (jeweils 1:5 verdünnt nach RT-PCR). Für eine gewebespezifische Quantifizierung von *PLAUR* wurde 5 µl RT-cDNA (jeweils 1:3 verdünnt nach RT-PCR) des *Human Total RNA Master Panel II* (Clontech) bzw. 2 µl titrierter ($10^1 - 10^5$) Referenz-cDNA (hier cDNA aus Hepatozyten) für die Erstellung der Standardkurve eingesetzt. Die Quantifizierung von *PLAUR* und *β-Aktin* erfolgte jeweils in einem Reaktionsansatz.

Das relative Verhältnis eines Zielgen (*PLAUR*) zu einem Referenzgen (*β-Aktin*) wurde mit Hilfe einer automatischen Relativen Quantifizierungs Software und Effizienz-Korrektur berechnet. Basis für die Berechnung der Effizienzkorrektur, die Normalisierung des relativen Verhältnisses, bildet dabei der so genannte *Crossing Point*. Dieser ist eine Funktion der Amplifikationseffizienz der jeweiligen Probe und spiegelt die Menge an initial eingesetzter cDNA-Menge wider. Für die Standardkurve wird eine Verdünnungsreihe (2 µl > 1:10 > 1:100) einer für das Zielgen *PLAUR* positiven Probe (hier MZ201-AML) angelegt. Optimale Messverhältnisse werden nur dann erreicht, wenn die Standardkurve einen linearen Verlauf hat. Das Programm zur Durchführung einer Quantitativen-PCR lautete wie oben für die Real-Time-PCR beschrieben.

2.2.1.5 In Vitro-Transkription (IVT)

Die *In Vitro*-Transkription erfolgte mittels des *RiboMAX™ Large Scale RNA Production System- T7 Kits* (Promega) und ermöglicht die Synthese klonaler RNA aus rekombinanten DNA Templates, deren Plasmid über einen T7-Promotor verfügt. Die Linearisierung von 2,5 - 10 µg Plasmid-DNA (pro Ansatz) erfolgte mittels eines hinter dem STOP-Kodon der Insertsequenz schneidenden Restriktionsenzym. Anschließend

wurde die Reaktion mit dem *High Pure[®] PCR Product Purification Kit* (Roche) aufgereinigt (siehe 2.2.1.6G). Eine 50 µl IVT-Reaktion enthielt 10 µl T7-Puffer (5x), dNTPs (100 mM) (3,75 µl rATP, rCTP, rUTP und 0,5 µl rGTP), 2 µl Ribo m⁷G Capping Analog (100 mM), 2 - 5 µg linearisiertes DNA-Templete, 5 µl T7-Enzym Mix und wurde mit Nuklease freiem H₂O auf das Endvolumen aufgefüllt. Die Reaktion wurde nach gutem Mischen bei 37°C für 3 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfernung des DNA-Templates durch die Zugabe von DNase (1 U/µg DNA) und Inkubation bei 37°C für 15 min. Nach Aufkonzentrierung der IVT-Reaktion durch Zugabe von 1/10 Volumen Natriumazetat (3 M) (siehe 2.2.1.6N), wurden die Proben in 100 µl Nuklease-freiem H₂O resuspendiert und 2 µl auf einem Formaldehyd-Gel (siehe 2.2.1.6I) analysiert. Ein 60 µl Reaktionsansatz enthielt 10 - 20 µg IVT-RNA, 12 µl PolyA-Polymerase Puffer (5x), x₄ µl rATP (10 mM), x₆ µl Poly-A-Polymerase (600 U/µl) und wurde mit Nuklease freiem H₂O auf das Endvolumen aufgefüllt. Die Berechnung der rATP- und PolyA-Polymerase-Mengen erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{x_1 \text{ pg IVT-RNA}}{330 \text{ (Molekulargewicht einer Base in g/mol)} * \text{Anzahl der Basen des Templates}} = x_2 \text{ pmol}$$

rATP (10mM) - Bedarf

$$x_2 \text{ pmol} * 300 \text{ (Länge der Poly-A-Basen)} * 2 \text{ (Überschuss)} = x_3 \text{ nmol}$$

$$\text{rATP (10 mM)} = 10 \text{ nmol/}\mu\text{l} \rightarrow x_3 \text{ nmol} = x_4 \mu\text{l}$$

PolyA-Polymerase -Bedarf

$$\frac{x_2 \text{ pmol} * 300 \text{ (PolyA-Länge)}}{15 - 90 \text{ min}} = x_5 \text{ U} = x_6 \mu\text{l}$$

Von den Herstellern wird eine Poly-A-Länge von 300 Nukleotiden empfohlen. In den hier durchgeführten Experimenten stellte sich jedoch eine Poly-A-Länge von 120 Nukleotiden als optimal für die Stabilisierung von mRNA heraus. Dies wurde durch Verkürzung der Inkubationszeit (15 - 90 min) oder durch Zugabe einer geringeren Menge an PolyA-

Polymerase erreicht. Die Aufkonzentrierung des IVT-Produktes erfolgte durch anschließende Präzipitation mit 1/10 Volumen Natriumazetat (3 M) (siehe 2.2.1.6N). Der Erfolg der Polyadenylierung wurde auf einem Formaldehyd-Gel (siehe 2.2.1.6I) im Vergleich zu nicht-polyadenylierter Probe untersucht. Die photometrisch bestimmte RNA-Konzentration (siehe 2.2.1.6K) der IVT-mRNA-Reaktion diente als Grundlage für weitere Berechnungen. Die Lagerung von IVT-mRNA erfolgte bei -80°C.

2.2.1.6 Standardtechniken

A) Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase-Chain-Reaction, PCR*)

Eine PCR-Reaktion zur Amplifikation definierter DNA-Bereiche enthielt in einem Gesamtansatz von 20 µl standardgemäß 2 µl PCR-Puffer (10x), 1 µl dNTP-Mix (100 mM), jeweils 0,5 - 1 µl Primer A bzw. B (20 pmol/µl), 0,2 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl) (aus *Thermus aquaticus*) und *template*, 1 - 10 ng cDNA bzw. 50 - 100 ng genomische DNA. Zur Erhöhung der Stringenz wurde einer PCR-Reaktion gegebenenfalls 5% DMSO [CHESTER & MARSHAK, 1993] zugesetzt. Für sämtliche diagnostische PCR-Reaktionen wurde der *PCR Taq Core Kit* (QIAGEN) bzw. *Taq-DNA-Polymerase Kit* (Peqlab) verwendet.

Die Amplifikation definierter DNA-Bereiche, die im Anschluss unter Verwendung des *pcDNA3.1/V5-His*© *TOPO*® *TA Expression Kit* (Invitrogen) in den Vektor *pcDNA3.1/V5-His TOPO* ligiert wurden, erfolgte mittels Easy-A-Polymerase. Ein 30 µl Standardansatz enthielt die Komponenten in oben genannten Konzentrationen, jedoch 0,5 µl Easy-A-Polymerase (5 U/µl). Die Reaktionsansätze wurden mit H₂O auf das entsprechende Gesamtvolumen aufgefüllt. Das folgende Beispiel zeigt ein typisches, programmierbares Protokoll zur Durchführung einer PCR, wobei sich die Annealingtemperatur nach den jeweiligen Schmelzpunkten der verwendeten Oligonukleotide richtete (siehe 2.1.11). Die Amplifikationsschritte II. – IV. wurde 25 - 35-fach wiederholt. Die Lagerung von PCR-Produkten erfolgte bei -20°C.

I. Denaturierung Initial	3 min	94°C
II. Denaturierung	30 sec	94°C
III. Annealing	30 sec	60°C
IV. Extension	2 min	72°C
V. Extension	10 min	72°C

B) Sequenzanalysen

Sämtliche Sequenzierungsreaktionen wurden im Labor als *cycle sequencing* mittels des *Thermo SequenaseTM Cy5TM Dye Terminator Sequencing Kits* (Amersham) durchgeführt. Dabei erfolgte die Markierung der Sequenzierprodukte durch den Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide (*dye terminators*). Eine Sequenzierungsreaktion von 10 µl Gesamtvolumen enthielt standardgemäß 2 µl Reaktionspuffer (5x), 2 µl BigDye (*dye terminators*), 0,5 µl Primer (20 pmol/µl) und DNA-*template* (150 - 300 ng Plasmid-DNA bzw. 50 - 170 ng PCR-Produkt). Das programmierbare Protokoll zur Durchführung einer Sequenzierung lautete wie folgt:

I. Denaturierung	2 min	96°C
II. Denaturierung	20 sec	96°C
III. Annealing	4 min	55°C

Die Wiederholung des Schritte II. - III. erfolgte 30-mal. Die weitere Analyse der Proben, die elektrophoretischen Auftrennung auf einem Polyacrylamidgel und die Sequenzanalyse mittels des Kapillar-Sequenziergerätes *ABI Prism 3730* wurde bei der Firma GENterprise (Universitätsklinikum Mainz) in Auftrag gegeben. Die Auswertung der erhaltenen Sequenz-Dateien erfolgte unter Verwendung der Programme von *DNA-Star* (GATC-Biotech, Konstanz).

C) DNA-Ligation

Die Ligation von HLA-cDNA und kürzeren Fragmenten antigenkodierender cDNA erfolgten standardgemäß in den *pcDNA3.1/V5-His TOPO* Vektor mittels des *pcDNATM3.1/V5-His© TOPO® TA Expression Kits* (Invitrogen). Die bi-direktionale Ligation erfolgt über ein flankierendes Adenin-Nukleotid, welches während der Amplifikation mittels Easy-A-Polymerase der RT-cDNA C- beziehungsweise N-terminal angehängt wird. Der Vektor enthält entsprechend komplementäre C- bzw. N-terminale Thymin-Nukleotide. Abweichend zum Protokoll des Herstellers enthielt ein Ligationsansatz 2 µl des aufgereinigten PCR-Produktes (RT-cDNA), 0,5 µl Vektor und

0,5 µl Salzlösung (200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂), der für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Anschließend erfolgte die Transformation in *E. coli* TOP10 (siehe 2.2.1.6O). Ein 10 µl Ligationsansatz unter Verwendung der T4 DNA-Ligase setzte sich wie folgt zusammen: 1 µl T4 DNA Ligase-Puffer (10x), 125 ng Plasmid (linearisiert), 20 ng Insert und 0,5 µl T4 DNA-Ligase (5 U/µl). Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte bei 16°C für 1h.

D) DNA-Restriktionsverdau

Ein 10 µl Restriktionsansatz enthielt standardgemäß zwischen 0,5 - 10 µg DNA, 1 µl Reaktionspuffer (10x) und 2 - 5 U Restriktionsenzym (8 - 20 U/µl). Für jede Restriktionsendonuklease gab es einen optimalen Reaktionspuffer, der von den Herstellern zur Verfügung gestellt wurde. Die Inkubationszeit betrug zwischen 60 - 90 Min bei 37°C. Gegebenenfalls wurden im Anschluss die Restriktionsenzyme für 10 min bei 65°C inaktiviert. In einer sich anschließenden Gelelektrophorese (siehe 2.2.1.6I) erfolgte die Analyse der aus der Restriktion resultierenden DNA-Fragmente.

E) Auffüllen von überhängenden 5'-Vektorenden mittels T4 DNA-Polymerase

Eine Reaktion für das Auffüllen von überhängenden 5'-Vektorenden enthielt 1/10 T4 DNA-Polymerase Reaktionspuffer (10x), 1/10 Volumen dNTPs (100 mM), und T4 DNA-Polymerase (1 U/µg DNA). Die Reaktion wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgten die Extraktion der Vektor-DNA mittels Phenol-Chloroform und die Präzipitation mittels Natriumazetat (siehe 2.2.1.6N).

F) Dephosphorylierung von 5'-Phosphaten

Eine Religation linearisierter Vektoren wird durch die Entfernung der 5'-terminalen Phosphatgruppe verhindert. Ein Reaktionsansatz, der linearisiertes Plasmid enthielt, wurde mit 1/10 Volumen Dephosphorylierungspuffer (10x) und 1U alkalischer Phosphatase (20 U/µl) versetzt. Die Reaktion wurde für 1h bei 37°C inkubiert. Zur

Inaktivierung der alkalischen Phosphatase wurde dem Reaktionsansatz 1/10 Volumen EGTA (200 mM) zugesetzt und für 10 min auf 65°C erhitzt. Um eine komplette Inaktivierung der alkalischen Phosphatase zu erreichen, erfolgten die Extraktion der Plasmid-DNA mittels Phenol-Chloroform und anschließend die Präzipitation mittels Natriumazetat (siehe 2.2.1.6N).

G) Reinigung von Reaktionsansätzen

PCR-Reaktionen, denen DMSO zugesetzt war, sowie Restriktionsverdauansätze wurden für Folgereaktionen, wie Sequenzierungen, Klonierungen und IVT-Reaktionen, mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche) aufgereinigt.

H) Isolierung von genomischer DNA

Für die Isolierung von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen wurde der *QIAamp DNA Mini Kit* (QIAGEN) verwendet. Die Isolierung erfolgte aus maximal 5×10^6 Zellen wobei bis zu 160 µg genomische DNA erhalten wurde. Genomische DNA wurde bei 4°C in TE-Puffer gelagert.

I) Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgte in einer Agarose-Matrix. Die Agarose-Konzentration (0,7 - 2 %) war abhängig von dem DNA-Molekulargewichtsbereich, in dem die effektive Auftrennung der Fragmente erfolgen sollte. In 0,5 x TBE-Puffer aufgekochte Agarose wurde zum Färben der DNA mit Ethidiumbromidlösung (0,4 µg/ml) und die Proben zur Kontrolle der Lauffront mit 1x Bromphenolblau versetzt. Die angelegte konstante Spannung betrug 100 V. Die Analyse von RNA-Molekülen erfolgte auf einem 1%igen denaturierenden Formaldehyd-Gel. Dazu wurden 0,6 g Agarose *Ultrapure* in 60 ml DEPC behandeltem H₂O aufgeköcht, auf ca. 60°C abgekühlt, anschließend mit 7,2 ml 10x MOPS-Puffer und 7,2 ml Formaldehyd (37%) versetzt. Die RNA-Proben (1 - 3 µl/Probe) inklusive RNA-Standard wurden in 20 µl RNA-

Probenpuffer aufgenommen, für 10 min bei 75°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte in 1x MOPS-Puffer für etwa 1 h bei 80 V. Das Ergebnis der Elektrophorese von Nukleinsäuren wurde mit dem BioDoc-Analyse-System (Biometra) dokumentiert.

K) Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte durch die Bestimmung der Extinktion mit einem Spektralphotometer. Nach Abgleichen des Photometers mit destilliertem H₂O wurden die Nukleinsäurekonzentrationen von DNA bzw. RNA durch die Absorptionswerte im UV-Bereich bei 260 nm photometrisch bestimmt. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA/ml bzw. 40 µg einzelsträngiger RNA/ml [SAMBROOK *ET AL.*, 1989]. Das Verhältnis zwischen den Extinktionen bei 260 und 280 nm (OD₂₆₀/OD₂₈₀) ist ein Maß für die Reinheit von Nukleinsäuren und sollte 2,0 +/- 0,2 betragen.

L) Isolierung von RNA

Für sämtliche RNA-Isolierungen wurde der *RNeasy Mini Kit* von Qiagen verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die Isolierung der RNA erfolgte aus 5 - 10x10⁶ Zellen, wobei eine Menge zwischen 10 - 60 µg an Total-RNA erhalten wurde. Die Qualität der RNA wurde auf einem analytischen 1%igen Agarosegel (siehe 2.2.1.6I) überprüft und die Konzentration (siehe 2.2.1.6K) mittels eines Spektralphotometers bestimmt. RNA wurde grundsätzlich bei -80°C gelagert.

M) Reverse Transkription (RT-PCR)

Für die Synthese von komplementärer DNA (*complementary DNA*, cDNA) durch reverse Transkription (RT) wurde standardgemäß der *Superscript™ III Reverse Transcriptase Kit* von Invitrogen verwendet. Ein Ansatz enthielt 1 - 5 µg Total-RNA und 1 µl Oligo-dT Primer (50 µM). Für sich anschließende PCR-Amplifikationen mittels

genspezifischer Primer wurde die cDNA 1:5 mit H₂O verdünnt. Die Lagerung von cDNA erfolgte bei -20°C.

N) Aufkonzentrierung von Nukleinsäuren

Für die Aufkonzentrierung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen wurden die zwei nachfolgend beschriebenen Techniken verwendet.

- Natriumazetat-Präzipitation nach Phenol-Chloroform Extraktion

Die Extraktion von (PolyA⁺)-RNA oder cDNA erfolgte durch Zugabe von 1x Volumen eines Phenol (pH4,5)-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1). Die Probe wurde gut gemischt und anschließend zentrifugiert (13.000 rpm, 3 min). Zu der entnommenen wässrigen Oberphase wurde 1 x Volumen eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) gegeben. Es folgte das Mischen und Zentrifugieren der Probe (13.000 rpm, 3 min). Die wässrige Oberphase wurde entnommen und durch Zugabe von 1/10 Volumen Natriumazetat (3 M) und 2,5 x Volumen an Ethanol_{absolut}, entweder über Nacht bei -20°C, für 30 - 60 min bei -80°C oder für 10 min auf Trockeneis präzipitiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (13.000 rpm, 20 min), 2 x mit 0,7 ml 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen (10 min) in jeweils 20 - 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

- Ammoniumazetat-Präzipitation

Die Aufkonzentrierung von DNA erfolgte durch Zugabe von 1 µl Glycogen (20 µg/µl), 1/3 Volumen Ammoniumazetat (7,5 M) und 2 x Volumen kaltem Ethanol_{absolut}. Nach Inkubation (10 min, -80°C) wurden die Proben abzentrifugiert (13.000 rpm, 25 min, 4°C), der Überstand abgekippt und das Pellet 2x mit 70% Ethanol gewaschen. Die Proben wurden getrocknet (10 min, RT) und anschließend in 9 µl TE-Puffer resuspendiert.

O) Arbeiten mit Bakterien

Für das Anlegen von Übernachtskulturen für eine DNA-Isolierung im Maxi-Format wurden in eine 1 L Duran-Glasflasche 200 ml LB-Flüssigmedium mit 200 µl einer

Vorkultur (4 h, 37°C) inokuliert. Für eine DNA-Isolierung im Mini-Format wurden Bakterienklone bzw. Bakterien-Pools in ein 50 ml Polypropylen-Falcon mit 5 ml LB-Flüssigmedium angeimpft. Dem LB-Flüssigmedium war das entsprechende Antibiotikum (siehe 2.1.6) zur Selektion in angegebener Konzentration zugesetzt.

Zur längerfristigen Lagerung von Bakterienkulturen wurde 1 ml der Übernachtskultur eines Bakterienklons und 0,5 ml 60%igen Glycerol gut gemischt und in einem 1,5 ml Einfrierröhrchen bei -80°C eingefroren. Beim Anlegen von Glycerolstocks von cDNA-Pools wurden 100 µl der Übernachtskulturen mit 50 µl Glycerol (60%) gut gemischt und in je eine KE einer 96-Lochboden-Platte bei -80°C eingefroren.

Für einen Transformationsansatz wurden jeweils 50 µl kompetenter *Escherichia coli* TOP10 auf Eis aufgetaut und anschließend mit 2 µl des Ligationsansatzes (siehe 2.2.1.6C) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem sich anschließenden Hitzeschock im Wasserbad zur Aufnahme der DNA (45 sec, 42°C), wurde der Ansatz für 2 min auf Eis gestellt und anschließend in 0,25 ml bzw. 0,5 ml S.O.C.-Medium in einem beheizbaren Schüttelblock (1 h, 37°C) vorkultiviert. Die Selektion von Transformanden erfolgte auf LB-Agarplatten, die mit Ampicillin (100 µg/ml) versetzt waren.

Für eine Plasmidisolierung aus *Escherichia coli* wurden standardgemäß je nach DNA-Isolationsformat, die „Kits“ der Firma QIAGEN (Invitrogen) eingesetzt. Durch die Verwendung von „high copy“ Vektoren, wie pcDNA3.1, wurden für eine DNA-Präparation im Mini-Format aus 5 ml Bakterienkultur bis zu 30 µg Gesamt-DNA und für eine DNA-Präparation im Maxi-Format aus 200 ml Bakterienkultur bis zu 0,7 mg Gesamt-DNA erhalten.

2.2.2 Immunologische- / Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Gamma-Interferon-“ELISPOT Assay“

Das Prinzip des ELISPOT-Assays (Enzyme-linked Immunosorbent **Spot**-Assay) [CZERKINSKY *ET AL.*, 1988] besteht darin, dass ein monoklonaler Antikörper gegen ein Zytokinepitop mit dem konstanten Teil seiner schweren Kette an eine Nitrozellulose- oder Nylonmembran gebunden wird. Daraufhin werden Lymphozyten, die bei Antigenkontakt das Zytokin sezernieren können, mit ihren Zielzellen auf der Membran koinkubiert und die dabei freigesetzten Zytokine durch den variablen Abschnitt des Antikörpers gebunden.

Nach Abwaschen der Zellen wird ein Deletionsantikörper, der ein zweites Epitop des Zytokins erkennt, dazugegeben. Der Zweitantikörper ist an Biotin gekoppelt, das wiederum durch Avidin nachgewiesen werden kann. Ein an Avidin gebundenes Enzym (Peroxidase oder Alkalische Phosphatase) setzt im nachfolgenden Schritt sein Substrat um und kennzeichnet dadurch die Orte Zytokinfreisetzung auf der Membran. In vorliegender Arbeit wurden Elispotplatten vom Typ Multiscreen_{HTS}-HP (Millipore) und Multiscreen_{HTS}-IP (Millipore) verwendet. Die Platten vom Typ -IP mussten vor der Primärantikörperbeschichtung mit 35% Ethanol vorbehandelt werden. Die Elispotplatte wurden dazu mit 35%igem Ethanol (40 µl/TE) für 2 min inkubiert und anschließend 3-mal mit PBS (100 µl/TE) gewaschen. Die Beschichtung der Elispotplatten mit dem Primärantikörper erfolgte am Vorabend des Testtages und wurden über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Der in PBS verdünnte Primärantikörper Klon 1-D1K für IFN- γ (10 µg/ml) wurde zu 50 µl/TE einer Elispotplatte eingesetzt. Nach Inkubation (ÜN, 4°C) wurde der nicht gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS (100 µl/TE) entfernt. Da freie Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden müssen, wurde die Platte entweder mit serumhaltigem Medium vorinkubiert oder die Zielzellen wurden in RPMI-1640 +10% FCS ohne PenStep auf die Platte vorgelegt. Zielzellen waren transient transfizierte COS-7 (20.000 Zellen/TE), mit RNA transfizierte Fast-DCs (20.000 Zellen/TE), Leukämie-, Malignom-Zelllinien (50.000 Zellen/TE) oder mit synthetischen Peptiden beladene EBV-B-Zellen (75.000 Zellen/TE). Während die Belegung transfizierter Zielzellen mit T-Lymphozyten 20 h nach der Transfektion (siehe 2.2.2.3) erfolgte, wurden die T-Lymphozyten auf Leukämie- bzw. mit synthetischen Peptiden beladene EBV-B-Zellen nach einer 30 - 60 minütigen Inkubationszeit gegeben (siehe 2.2.2.4). T-Lymphozyten wurden 2-mal mit PBS gewaschen, in AIM-V + 10% Humanserum aufgenommen und auf eine Zellzahl zwischen 5.000 bis 30.000 Zellen/TE eingestellt. Dem Medium wurden keine Zytokine zugesetzt. Die Entwicklung des Tests erfolgte nach einer Inkubation von 20 h bei 37°C. Dazu wurden die ELISPOT-Platten sechsmal mit PBS/0,5% Tween20 mit Hilfe des Nunc-ImmunoTMWasher gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation (2 h, 37°C) mit dem Detektionsantikörper Biotin 7-B6-1 (2 µg/ml in PBS/0,5% BSA), der zu 60 µl/TE eingesetzt wurde. Nach dreimaligem Waschen wurde der Avidin-Peroxidase-Komplex für 1 h auf die Platte gegeben. Der Komplex musste bereits 20 min vorher angesetzt werden, indem zu je 10 ml PBS/0,1% Tween20 je ein Tropfen Reagenz A und Reagenz B aus *Vectastain*[®] *Elite Kit* gegeben wurden (100 µl/TE). Die Platte wurde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation (1h, im Dunkeln) wurde

die Platte dreifach mit PBS/0,1% Tween20 und dreifach mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 100 µl/TE AEC-Substratlösung wurde der Test entwickelt. Die Substratlösung bestand aus einer AEC-Tablette, die in 2,5 ml Dimethylformamid gelöst und mit 47,5 ml Acetatpuffer verdünnt und gut gemischt wurde. Nach Zugabe von 25 µl H₂O₂ (30%) und Filtration durch einen 0,22 µm Spritzenfilter war die Substratlösung gebrauchsfertig. In der Regel war die Färbung nach wenigen Minuten intensiv genug, so dass die Reaktion durch Abspülen der Platte unter fließendem Leitungswasser abgestoppt werden konnte. Erst nach vollständiger Abtrocknung der Nitrozelluloseplättchen wurde diese, für die automatische Auswertung durch das *KS ELISPOT-System Version 4.9* der Firma Zeiss (Jena), vom Plastikträger gelöst und auf eine Folie geklebt. Das System besteht aus einem Auflichtmikroskop mit Motortisch und Autofocus. Jede einzelne Testeinheit (TE) der Elispotplatte kann vom Motortisch präzise angesteuert werden. Eine angeschlossene Farbkamera nimmt die IFN- γ -Spots mit einer 5-fachen Vergrößerung auf, die digitalisiert und anschließend durch die *KS ELISPOT-Software Version 4.9* (Zeiss) ausgewertet werden.

2.2.2.2 cDNA-Expressionsklonierung mit Hilfe des IFN- γ -ELISPOT-Assays

Das cDNA-Expressionscreening (siehe 2.2.2.2) der MZ201-AML cDNA-Bank (siehe 2.2.1.1) erfolgte mit Hilfe der AML-reaktiven T-Zell-Populationen 1C6 und 4D7 in Kombination mit dem jeweiligen HLA-Restriktionsallelen, welche in einem Expressionsvektor kloniert vorlagen. Zunächst wurden die Vorverdünnungsplatten (siehe 2.2.1.1E) der MZ201-AML cDNA-Bank aufgetaut und die cDNA der zu testenden 100x Pools in das 96-TE-Format einer Rundboden-Platte überführt (300 ng/5µl pro TE). Das Präparationsformat der 100x cDNA-Pools blieb somit im ELISPOT-Testformat erhalten. Die Transfektion durch Lipofektion mittels IFN- γ -ELISPOT-Assay wurde durchgeführt, indem die 100x cDNA-Pools und HLA-cDNA in COS-7-Zellen kotransfiziert wurden (siehe 2.2.2.3). Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die T-Lymphozyten eingesetzt, die 5 Tage vor dem Test rekultiviert und restimuliert worden waren (siehe 2.2.2.5C). Die Entwicklung der ELISPOT-Platte erfolgte wie unter 2.2.2.1 beschrieben. Ein positiver 100x cDNA-Pool wurde subkloniert, indem der Glycerolstock des Pools zunächst auf LB-Amp-Agarplatten, zwischen 1:10 und 1:1000 titriert, ausgestrichen wurde. Auf diese Weise wurde die Anzahl der Bakterienklone pro ml

festgestellt. Dies war erforderlich, um eine optimale Wuchsdichte der Bakterienklone auf der Agarplatte für das Sammeln von 10x Bakterien-Pools zu erreichen. Die nach Titration berechnete Menge an Bakteriensuspension wurde nun in 5 ml LBamp-Flüssigmedium auf einer 25 x 25 cm großen LBamp-Agarplatte gleichmäßig ausgestrichen und inkubiert (ÜN, 37°C). Nach dem Sammeln von 10x Bakterien-Pools und der Inkubation über Nacht bei 37°C, erfolgte die DNA-Präparation der 10x Bakterien-Pools und das Anlegen von Vorverdünnungen (300 ng/5µl). Das cDNA-Expressionsscreening der 10x cDNA-Pools wurde wie beschrieben durchgeführt. Diese Prozedur wiederholte sich für das Screening von cDNA-Klonen. Nach Identifizierung eines positiven cDNA-Klones wurde aus dessen Glycerolstock durch erneutes Ausstreichen auf einer LB-Amp-Agarplatte und Inkubation über Nacht bei 37°C ein Subklon isoliert. Die präparierte cDNA des Subklons wurde für weiterführende Experimente, wie z. B. Sequenzanalysen verwendet (siehe 2.2.1.6B).

2.2.2.3 Transfektion von Zellen

A) Transfektion durch Lipofektion

Die Lipofektion diente als Standard-Methode für die Transfektion von rekombinanter Plasmid-cDNA in COS-7-Zellen. Im standardisierten Transfektionsformat einer 96-TE-Rundboden-Platte wurden in einer Testeinheit (TE) zunächst 300 ng/5µl cDNA mit 100 ng/8µl HLA-cDNA in RPMI-1640 gemischt. Das Lipofektamin (LF2000, Invitrogen) wurde vor Gebrauch gut gemischt und nach Einstellen der Konzentration auf 0,2 - 0,5 µl LF2000/TE in 21 µl RPMI-1640 für 5 min vorinkubiert. Die Menge zu verwendenden Lipofektamins war chargenabhängig und wurde zuvor ausgetestet. Zur Bildung der Transfektionskomplexe wurde 21 µl/TE Lipofektamin und das cDNA/HLA-Gemisch gut gemischt und 20 min inkubiert. Die Transfektion erfolgte durch das Mischen von 30 µl/TE des cDNA/HLA/Lipofektamin-Gemisches mit den Zielzellen, die in der ELISPOT-Platte vorgelegt waren. Die Vorbehandlung und Beschichtung der ELISPOT-Platten mit dem Primärantikörper, sowie das Vorlegung der Zielzellen erfolgte wie unter 2.2.2.1 beschrieben. Die Belegung mit den Effektorzellen erfolgte nach einer 19 - 24 Stunden Inkubation des Transfektionsansatzes bei 37°C. Dazu wurde den transfizierten Zielzellen 100 µl Medium/TE entnommen und die Effektorzellen in einem Volumen von 70 µl/TE zugegeben. Die Entwicklung der ELISPOT-Platte erfolgte wie unter 2.2.2.1 beschrieben.

B) Transfektion durch Elektroporation

Die Elektroporation wurde in dieser Arbeit für die Transfektion von *in vitro*-transkribierter mRNA (IVT-mRNA) in Fast-DCs verwendet. Pro Ansatz wurden die Zielzellen in OPTI-MEM auf eine Endkonzentration von $0,5 - 1 \times 10^6$ Zellen/200 μ l eingestellt und in eine vorgekühlte Küvette (0,4 cm, Bio-Rad) gegeben. Die Transfektion von 10 μ g IVT-mRNA pro Ansatz erfolgte bei 350 V und 300 μ F unter Verwendung des Gene Pulser[®] V (Bio-Rad). Die Transfektionsansätze wurden sofort für 1 - 2 min auf Eis gestellt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die transfizierten Zellen für die Analyse im IFN- γ -ELISPOT-Assay (siehe 2.2.2.1) eingesetzt. Die Belegung mit entsprechenden Effektorzellen erfolgte unmittelbar.

2.2.2.4 Peptiderkennungstest im IFN- γ -ELISPOT- und Zytotoxizitäts-Assay

War durch molekularbiologische Methoden eine Annäherung an die peptidkodierende Region eines T-Zell-erkannten Antigens gelungen, sollte durch Peptiderkennungstests die genaue Spezifität der T-Zellen ermittelt werden. Peptiderkennungstests wurden entweder im Lysetest oder im IFN- γ -ELISPOT-Assay durchgeführt. In beiden Fällen dienten MZ201-EBV-B-Zellen bzw. K562 als antigenpräsentierende Zellen. Peptiderkennungstests im IFN- γ -ELISPOT-Assay wurden direkt in der Elispotplatte durchgeführt. MZ201-EBV-B-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in AIM-V + 10% Humanserum auf eine Konzentration von 3×10^6 /ml eingestellt (75.000 Zellen / 25 μ l Zellsuspension pro TE). Die Testung der Peptide und der jeweiligen Titrationstufen erfolgte jeweilig in Doppelwerten. Danach wurden die T-Zellen zweimal gewaschen und ebenfalls in AIM-V + 10% Humanserum auf eine Konzentration zwischen $0,1 \times 10^6 - 0,3 \times 10^6$ /ml eingestellt (5.000 bis 15.000 T-Zellen in 50 μ l Zellsuspension pro TE). Anschließend wurden die Peptide aufgetaut und in AIM-V + 10% Humanserum auf 400 μ g/ml verdünnt (im Testvolumen 4 x verdünnt auf 100 μ g/ml). Danach wurden 25 μ l der in 10er Schritten titrierten Peptide einer Konzentration zwischen $10^2 - 10^{-11}$ μ M zu den MZ201-EBV-B- und T-Zellen gegeben und die peptidbeladenen Zellen über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Entwicklung des Testes erfolgte nach 20 h Inkubationszeit nach Protokoll (siehe 2.2.2.1).

Zytotoxische T-Zellen (CTL) setzen bei Kontakt mit ihrem Antigen auf einer Zielzelle Zytokine frei und lysieren die Zielzelle durch verschiedene Effektormechanismen. Diese Zell-Zellinteraktion kann durch den ^{51}Cr -Freisetzungstest gemessen werden [WOELFEL *ET AL.*, 1993]. Pro Ansatz wurden 1×10^6 Zielzellen (hier MZ201-EBV-B und K562) mit $100 \mu\text{Ci Na}^{(51}\text{Cr})\text{O}_4$ gelabelt (1h, 37°C), anschließend zweimal mit PBS gewaschen und auf 80.000 Zellen/ml $\text{RPMI}_{\text{komplett}}$ eingestellt. In eine Testeinheit (TE) einer 96-TE-Rundboden-Mikrotiterplatte wurden $25 \mu\text{l}$ der Zellsuspension (2.000 Zellen/TE) vorgelegt. Peptide wurden in 10er Schritten einer Konzentration zwischen $10^2 - 10^{-11} \mu\text{M}$ titriert und in je $25 \mu\text{l}$ $\text{RPMI}_{\text{komplett}} / \text{TE}$ zu den ^{51}Cr -gelabelten MZ201-EBV-B-Zellen gegeben. T-Zellen wurden auf ein Effektor- zu Target-Verhältnis von 60:1 bis 1:1 eingestellt und in $50 \mu\text{l/TE}$ auf die Zielzellen gegeben. Der Test wurde für 4 h im Brutschrank inkubiert und durch Abzentrifugieren (1500 rpm, 15 min) der Zellen abgebrochen. $90 \mu\text{l}$ der Überstände wurden im Gamma-Counter auf freigesetztes Chrom überprüft. Als Positivkontrolle diente der Überstand mit ^{51}Cr -gelabelter Zellen, die durch Zugabe von Nonidet P-40 ($130 \mu\text{l/ Ansatz}$ einer 1%-igen Lösung) vollständig lysiert wurden. Die spezifische Lyse monospezifischer T-Zell-Populationen wurde nach folgender Formel bestimmt:

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

2.2.2.5 Zell-Kulturen

Die Kultur eukaryotischer Zellen erfolgte nach Standardmethoden [Lindl, Zell- und Gewebekultur, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag]. Alle Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen bearbeitet und in einer Wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO_2 Gehalt kultiviert.

A) Generierung AML-reaktiver, zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen in allogenen, HLA-Klasse I-identen Leukämie-Model MZ201-AML/Spender 332

In vorliegender Arbeit wurden für die Suche nach T-Zell-erkannten Leukämieantigenen AML-reaktive allogene CD8⁺ T-Zellen verwendet, die von Frau Dr. Eva Distler (Johannes Gutenberg-Universität, Mainz) im Rahmen ihrer Promotionsarbeit generiert und charakterisiert wurden [DISTLER *ET AL.*, 2008]. Hierzu wurden CD8⁺ CD62L^(high)+ T-Lymphozyten, die vorwiegenden Zellen des naiven/*central memory* Kompartiments enthalten, sowie CD8⁺ CD62L^{low+/neg} T-Zellen (*effector memory, late effectors*) [GATTINONI *ET AL.*, 2005; SALLUSTO *ET AL.*, 2004], aus PBMC des gesunden und zum Patienten MZ201-AML HLA-identen Spenders 332 über immunomagnetische Beads separiert. Diese wurden in sog. Mini-MLLCs (*mixed lymphocyte/leukemia culture*, Gemischte Lymphozyten/Leukämiezellkultur) in 96well-Mikrotiterplatten mit 10⁴ Zellen pro Kultureinheit (KE) mit primären, bestrahlten AML-Blasten (3500 rad, 10⁴/KE) stimuliert. Als Feederzellen wurden der Kultur an Tag 0 ebenso bestrahlte CD8⁻ PBMC des Spenders zugegeben (10⁴/KE). Es erfolgte eine wöchentliche Restimulation der Mini-Kulturen mit primären, bestrahlten AML-Blasten im Verhältnis 1:1. Als Zytokine wurden in den ersten beiden Wochen der Kultur Interleukin IL-7 (5 ng/ml), IL-12 (1 ng/ml) und IL-15 (5 ng/ml) eingesetzt. An Tag 14 wurde IL-12 durch IL-2 (250 IU/ml) ersetzt. An Tag 19 wurden die einzelnen Mini-MLLC Populationen im IFN- γ -ELISPOT-Assay auf Reaktivität gegen die zur Restimulation verwendeten Leukämiezellen getestet. Aufgrund dieser Testergebnisse wurden u.a. die Mini-MLLC Populationen 1C6 und 4D7 für eine Expansion und Charakterisierung ausgewählt. Weitere IFN- γ ELISPOT Assays sowie ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstests (**siehe Abb. 2.4**) zeigten eine spezifische Erkennung der AML Blasten. Nicht erkannt wurden Epstein-Barr Virus (EBV)-transformierte B-Zelllinien (B-LCL, *B-lymphoblastoid cell line*) des Patienten oder des Spenders, sowie die Zelllinie K562, die eine Zielzelle für Natürliche Killerzellen darstellt. Der Einsatz von HLA-spezifischen Blockadeantikörpern im ELISPOT sowie die Testung auf Kreuzreaktivität gegenüber anderen Leukämien zeigte, dass es sich um eine HLA-Klasse I-restringierte Erkennung handelte. Als Restriktionselemente konnten *HLA-A*0201* (1C6) bzw. *HLA-B*5601* (4D7) identifiziert werden. Eine durchflusszytometrische Charakterisierung der Mini-MLLC Populationen zeigte einen Phänotyp aktivierter, reifer Effektorzellen (CD45RA⁻, CD45RO⁺, CCR7^{(low)+/neg}, CD27⁻, CD28⁻, CD25⁺, CD69⁺). Die CD62L-Expression nahm im Laufe der Kultur ab. Mittels Färbung mit monoklonalen Antikörpern gegen einzelne

V β -Kettenfamilien konnte gezeigt werden, dass die Mini-MLLC Populationen 1C6 und 4D7 beide ausschließlich T-Zellrezeptoren mit V β .17 exprimieren; es handelt sich folglich um klonale T-Zellen. Diese konnten durch antigenspezifische Restimulation innerhalb von 6 - 10 Wochen auf Zellzahlen von 10^8 bis 10^9 expandiert werden. Für die Verwendung in cDNA-Expressionsanalysen wurden die expandierten Populationen an Tag 54 und 63 in Portionen von ca. 5×10^6 kryokonserviert. Nach Auftauen und erneuter Restimulation blieben sowohl Reaktivität als auch Proliferationsfähigkeit erhalten [DISTLER *ET AL.*, 2008].

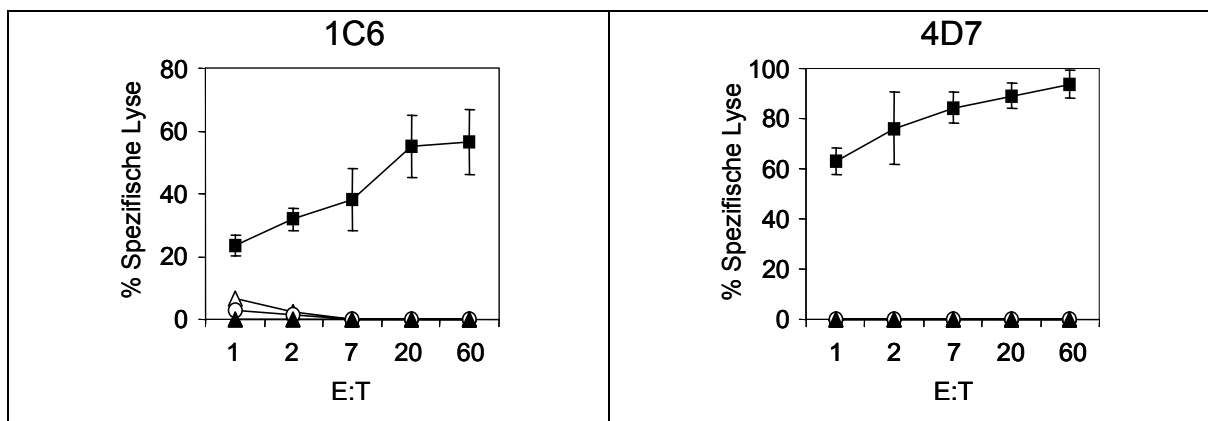


Abb. 2.4: Zytolytische Aktivität der Mini-MLLC Populationen 1C6 und 4D7. 51 Chrom-Zytotoxizitätstest zur Ermittlung der spezifischen Lyse der Mini-MLLC Populationene 1C6 und 4D7 gegenüber AML-Blasten des Patienten MZ201 (■), Patienten-B-LCLs (▲), Spender-B-LCLs (△), und K562 (○). E:T, Effektor-zu-Target Ratio [DISTLER *ET AL.*, 2008]

B) (Re)-Kultivierung und Kryokonservierung von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden zur Rekultivierung im Wasserbad (37°C) angetaut, in Serum-freies Medium überführt, abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min) und in AIM-V + 10% Humanserum (PBMC, T-Zellen, Leukämiezellen), RPMI + 10% FCS (Malignom- und EBV-B-Zelllinien) bzw. X-VIVO 15 (Fast-DCs) aufgenommen. Leukämiezellen wurden je nach Zellzahl in Petrischalen (Greiner) unterschiedlichen Durchmessers ausgesät.

Das Einfrieren von Zellen erfolgte portionsweise in 1,5 ml Einfrier-Röhrchen. T-Zellen, Fast-DC, EBV-B- und Malignom-Zelllinien wurden zu $2,5 - 5 \times 10^6$ / Nunc und PBMC zu $50 - 100 \times 10^6$ / Nunc eingefroren. Das Einfrieren von T-Zellen erfolgte an Tag 7 (dx+7) nach der letzten Restimulation. Zum Einfrieren wurden die Zellen pelletiert und anschließend in 1 ml Einfriermedium, dem zuvor 10% DMSO zugesetzt wurde, aufgenommen (siehe 2.1.17). Die Zellen wurden unverzüglich in Einfrierboxen (Nalge

Nunc) überführt und in einen -80°C Schrank gestellt. Das in den Einfrierboxen in einer abgeteilten Kammer enthaltene Isopropanol gewährleistete ein schonendes Einfrieren der Zellen ($1^{\circ}\text{C}/\text{Minute}$). Am nächsten Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

C) Restimulation AML-reaktiver T-Zellen

Die Restimulation kryokonservierter AML-reaktiver T-Zellen erfolgte in der Regel fünf Tage vor einem Test. Dazu wurden die T-Zellen, wie oben beschrieben aufgetaut, gezählt und anschließend in 24-Loch-Platten (Greiner) zu 1×10^6 Zellen/TE ausgesät. Dem Medium wurde zum Wachstum und zur Aktivierung der T-Zellen folgende Zytokine zugesetzt: IL-2 (250 U/ml), IL-7 (5 ng/ml) und IL-15 (5 ng/ml) (siehe 2.1.8). Die Restimulation der T-Zellen erfolgte im Verhältnis 1:1 mit bestrahlten Leukämiezellen der Patientin MZ201-AML ($^{137}\text{Cäsium}$ -Quelle, 3500 Rad), die einen Tag zuvor in Kultur genommen wurden. Je nach Konfluenz der T-Zellen wurden diese zwei Tage vor einem Test entweder 1:2 oder 1:3 ohne den Zusatz von Zytokinen gesplittet.

D) Kultivierung von adhärennten Zellen / Suspensionszellen

Die Subkultivierung der adhärennten COS-7-Zelllinie erfolgte zweimal wöchentlich in RPMI 1640_{komplett}. Mittels Trypsin-EDTA wurden diese vom Boden der Zellkulturflasche (ZKF) gelöst, nach einmaligem Waschen abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min) und in eine neue 175 cm^2 ZKF in 25 ml RPMI 1640_{komplett} zu $0,4 \times 10^6$ Zellen ausgesät. Die COS-7-Zelllinie erreichte bis zur nächsten Subkultivierung eine Konfluenz von 80 - 90%. In Transfektionsexperimenten wurden optimale Effizienzen erhalten, wenn am Testtag eine Konfluenz zwischen 60 - 70% erreicht wurde. Dazu wurden die Zellen 5 Tage vor einem Test zu $0,2 - 0,3 \times 10^6$ Zellen in 25 ml RPMI 1640_{komplett} einer 175 cm^2 ZKF eingestellt. Malignom-Zelllinien wurden zu $5 - 8 \times 10^6$ Zellen in RPMI 1640_{komplett} in einer 175 cm^2 ZKF kultiviert. Vor Gebrauch wurden die Zellen mittels Trypsin-EDTA vom Boden der ZKF gelöst und abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min). Stabil wachsende EBV-B-Zelllinien wurden bei einer Zelldichte von $0,2 - 0,4 \times 10^6/\text{ml}$ in RPMI 1640_{komplett} kultiviert.

E) Generierung von Fast-DC's aus plastik-adhärenenten Monozyten

Für die Generierung von Fast-DCs aus plastik-adhärenenten Monozyten wurden die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells* = *PBMC*) gesunder Spender zu $10 - 15 \times 10^6$ Zellen/KE einer 6-KE-Platte (KE = Kultureinheit) in jeweils 3 ml Fast-DC-Komplettmedium (siehe 2.1.17) ausgesät. Dies erfolgte entweder mit kryokonservierten oder frisch ficollisierten PBMC (siehe 2.2.2.5G). Nach 1 h wurden die nicht-adhärenenten Zellen durch gründliches, aber vorsichtiges 3-maliges Waschen mit PBS abgespült und wieder eingefroren. Zu den adhärenenten Monozyten wurde nun 3 ml Fast-DC-Komplettmedium/KE gegeben: GM-CSF (1000 U/ml) und IL-4 (500 U/ml). Nach 24 h wurde folgender Zytokincocktail zugegeben: IL-1 β (10 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml), IL-6 (1000 U/ml) und PGE₂ (1 μ g/ml). Achtundvierzig Stunden nach Ansetzen bzw. 24 h nach Gabe des Zytokincocktails wurden die Fast-DCs geerntet. Dies erfolgte durch 3-maliges Spülen der KEs mit kaltem PBS. Die Fast-DCs wurden auf Eis in Falcon-Röhrchen gesammelt und bei 4°C abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min). Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die generierten Fast-DCs in durchflusszytometrischen Analysen (siehe 2.2.2.6) mit Hilfe von monoklonalen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern (siehe 2.1.9A) auf die Expression der für DCs typischen CD-Moleküle CD80, CD86, CD83 und HLA-DR hin überprüft. Die Fast-DCs wurden entweder für weitere Studien verwendet oder kryokonserviert (siehe 2.2.2.5B).

F) Generierung von Epstein-Barr Virus (EBV)-transformierte B-Zelllinien

Für die Generierung von Epstein-Barr Virus (EBV)-transformierten B-Zelllinien wurden 1×10^7 PBMC der Patientin (MZ201-AML) bzw. des Spenders (Spender 332) für 4 h bei 37°C mit 0,5 ml EBV-Überstand von B95.8 Zellen [KLEIN *ET AL.*, 1974] in einem 15 ml Falcon-Röhrchen inkubiert. Zellen und Überstand wurden anschließend in 5 ml RPMI/20%FCS/1% PenStrep aufgenommen und in eine 25 cm² Zellkulturasche transferiert. Für eine Inhibierung von T-Zellen wurde dem Medium Cyclosporin A (CSA) in einer Konzentration von 1 μ g/ml zugesetzt. Nach 24 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen gewaschen, um Viruspartikel und CSA zu entfernen und in 5 ml frisches Medium aufgenommen.

G) Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC) aus Buffy coats

Mittels Dichtegradienten-Zentrifugation (Ficoll-Hypaque) lassen sich die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells* = PBMC) aus einem *Buffy coat* (Lymphozytenkonzentrat) isolieren. Nach Schichtung der von 15 ml Ficoll-Lösung unter den Leukosep-Ring eines 50 ml Leukosep-Röhrchens wurde das mit PBS 1:2 verdünnte Blut auf den Leukosep-Ring pipettiert und zentrifugiert (2200 rpm, 15 min, RT, ohne Bremse). Der Lymphozytenring, der sich entsprechend seiner spezifischen Dichte in der Interphase zwischen Überstand (Plasma, Thrombozyten) und Ficoll-Hypaque ansammelte, wurde abpipettiert, 2x mit jeweils 3 ml PBS gewaschen (1500 rpm, 10 min), gezählt, sofort verwendet oder in Portionen zu 100×10^6 /Nunc kryokonserviert (siehe 2.2.2.5B).

H) Anreicherung von PBMC-Subpopulationen mittels immunmagnetischer Zellseparation

Für die Anreicherung von PBMC-Subpopulationen wurden je nach Zelltyp magnetische, mit monoklonalen Antikörpern gekoppelte *Micro-Beads* der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach) verwendet (siehe 2.1.10). Die Selektion der Zellen erfolgte über MS-Säulen (Miltenyi) entsprechend der Angaben des Herstellers. Die Reinheit der isolierten Zellfraktionen wurde durchflusszytometrisch überprüft (siehe 2.2.2.6).

2.2.2.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient hier der Analyse immunphänotypischer Oberflächenmoleküle von Zellen mit Hilfe monoklonaler Antikörper (siehe 2.1.9A). Die Zellen wurden einmal mit FACS-Puffer gewaschen und gezählt. Für jeden zu testenden Antikörper wurden zwischen $0,2 - 0,5 \times 10^6$ Zellen in FACS-Röhrchen gegeben. Nach Zentrifugation (1500 rpm, 5min) und Resuspension des Zellpellets wurde der Antikörper (1:100 bis 1:1000 in AIM-V+ 10% HS oder RPMI + 10% FCS verdünnt) direkt zu den Zellen gegeben und für 20 min bei 4°C inkubiert. Meist waren die Antikörper bereits mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FITC = Fluoresceinisothiocyanat oder PE = Phytoerythrin)

gekoppelt. War dies nicht der Fall, wurde der gebundene Erstantikörper (meist Maus IgG), durch Inkubation mit einem FITC-gekoppelten Ziege-anti-Maus Fab-Fragment für 15 min bei 4°C markiert. Dieser Zweitantikörper wurde 1:100 mit PBS/1%BSA verdünnt und 50 µl pro Ansatz auf die resuspendierten Zellen gegeben. Die Analyse erfolgte nach einmaligem Waschen der Zellen mit FACS-Puffer und anschließender Fixierung mit 0,5 ml FACS-Fixierungs-Puffer im Durchflusszytometer. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der Software *ExpoTM32* (Beckman Coulter, Krefeld) und *BD FACS DIVA* (BD Biosciences).

2.2.3 Computer-gestützte Datenbanksuchen

Für Homologievergleiche von eigenen mit veröffentlichten Sequenzen wurden im Internet zugängliche Datenbanken verwendet. Von den spezialisierten Datenbanken für MHC-Klasse I-Sequenzen wurden die Datenbank des International Immunogenetics Projects (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>) und die KABAT-Datenbank, die mit dem BLAST-Programm des NCBI (National Center for Biotechnology Information) genutzt werden konnte (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), verwendet. Für sonstige Sequenzen wurden die Datenbanken GenBank und SwissProt über das NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), sowie EMBL des European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) herangezogen. Weitere nützliche Datenbanken, insbesondere mit Informationen über Tumorantigene von menschlichen Tumoren und Gene im Allgemeinen, sind über Internetseiten des Ludwig-Instituts für Krebsforschung: <http://www-ludwig.unil.ch/SEREX/> und das Weizmann Institute of Science in Israel: <http://www.genecards.org/background.shtml> zu erreichen. Für Vorhersagen von Peptidkandidaten wurde die SYFPEITHI-Datenbank für MHC-Liganden und Peptid-Motive Tübingen (<http://www.syfpeithi.de/>) verwendet [RAMMENSEE *ET AL.*, 1999]. Die Analyse von T-Zell-Rezeptoren erfolgte mit der Datenbank des International ImmunoGeneTics Information Systems: http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/share/textes/index.html.

3 ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit sollten in dem allogenen Leukämie-Modell MZ201-AML / Spender 332 T-Zell-erkannte Leukämie-assoziierte Antigene identifiziert werden. Voraussetzung dafür waren sowohl die Konstruktion einer cDNA-Bank, sowie die Klonierung der HLA-Klasse I-Allele aus AML-Zellen der Patientin MZ201 im Expressionsvektor *pcDNA3.1/V5-His TOPO*. Mit Hilfe kryokonservierter AML-reaktiver T-Zell-Populationen sollten unter Verwendung des Verfahrens der T-Zell-basierten cDNA-Expressionsklonierung die cDNA-Bank nach antigenkodierenden cDNAs durchsucht werden. Die Erfassung antigen-spezifischer T-Zellreaktivitäten erfolgte mittels des sensitiven IFN- γ -ELISPOT-Assays.

3.1 Allogenes Leukämie-Modell MZ201-AML

Auswahlkriterium für die als Untersuchungs-Modell gewählte Leukämie MZ201-AML vom Subtyp M5a war in erster Linie die Verfügbarkeit ausreichenden Patientenmaterials von circa 4×10^9 AML-Zellen. Zudem konnten in der kliniksinternen Blutbank drei in den HLA-Klasse I-Allelen übereinstimmende, unverwandte Spender gefunden werden. Durch Frau Dr. Eva Distler waren in der Promotionsarbeit „*In vitro generation and characterization of acute myeloid leukemia-reactive CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte clones from healthy donors*“ (Arbeitsgruppe PD Dr. Wolfgang Herr / III. Medizinische Klinik des Universitätsklinikums Mainz) AML-reaktive T-Zellen aus dem Spender 332 und 650 generiert worden (siehe 2.2.2.5A). Für die Suche nach T-Zell-erkannten Antigenen in der cDNA-Bank aus AML-Zellen der Patientin MZ201-AML mittels cDNA-Expressionsklonierung wurden T-Zell-Populationen verwendet, die aus den PBMC des Spender 332 generiert worden waren. Die Patientin MZ201-AML und die Spender wiesen identische HLA-Klasse I-Typen auf, die mittels Genotypisierung am Institut für Immunologie und Genetik in Kaiserlautern im Labor von Dr. Thiele ermittelt wurden und in **Tabelle 3.1** wiedergegeben werden.

Tab. 3.1: HLA-Klasse I-Allele der Patientin MZ201-AML und der Spender

	interne Bez.	HLA-A*	HLA-B*	HLA-Cw*
Patient	MZ201-AML	0101 / 0201	0801 / 5601	0102 / 0701
Spender	Donor 332	0101 / 0201	0801 / 5601	0102 / 0701
Spender	Donor 650	0101 / 0201	0801 / 5601	0102 / 0701
Spender	Donor 168	0101 / 0201	0801 / 5601	0102 / 0701

3.2 Herstellung einer cDNA-Bank aus Leukämiezellen

Für die Herstellung einer cDNA-Bank aus Leukämiezellen der Patientin MZ201-AML wurde der Expressionsvektor pcDNA3.1 mit Hilfe der Gateway-Technologie aus dem *CloneMiner™ cDNA Library Construction Kit* (Invitrogen) zu einem Gateway-kompatiblen Expressionsvektor modifiziert. Das genaue Vorgehen wurde in 2.2.1.1 beschrieben. Der so modifizierte Vektor trägt die Bezeichnung *pcDNA3.1/RfA/DEST#6*.

3.2.1 Funktionalität des neu konstruierten Vektors pcDNA3.1/RfA/DEST#6

Die Funktion des konstruierten pcDNA3.1/RfA/DEST#6-Vektors sollte im Vergleich zu dem herkömmlichen pcDNA3.1-Vektor durch Expressionsanalyse des punktmutierten, *HLA-A*0201*-restringierten Antigens CDK4mut erfolgen. Die Klonierung der CDK4mut-cDNA in den neu konstruierten Vektor pcDNA3.1/RfA/DEST#6-Vektors erfolgte wie unter Punkt 2.2.1.1C beschrieben. Die Vergleichsanalyse des sequenzierten cDNA-Klons *pcDNA3.1/RfA.DEST#6.CDK4mut#4* zu dem bereits vorhandenen cDNA-Klon *pcDNA3.1-CDK4mut* erfolgte durch Lipofektion. Dafür wurden COS-7-Zellen mit *HLA-A*0201*-cDNA und titrierten Mengen an Vektor-cDNA transfiziert und in einem IFN- γ -ELISPOT Assay auf Erkennung durch den *HLA-A*0201*-restringierten CTL-Klon 14/35 getestet, der mutiertes CDK4 spezifisch erkannte [WOELFEL *ET AL.*, 1995].

















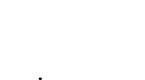

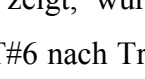
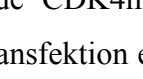
HLA-A*0201 Plasmid-DNA	CDK4mut Plasmid-DNA [ng/TE]	CDK4mut in pcDNA3.1/RfA/DEST#6	CDK4mut in pcDNA3.1
-	200		
+	200		
+	100		
+	50		
+	25		
+	12,5		
+	7,0		
+	3,5		
+	1,7		
+	0,8		

Abb. 3.1: *Testung der Funktionalität des neu konstruierten Vektors pcDNA3.1/RfA/DEST#6 im Vergleich zu dem Vektor pcDNA3.1, in die CDK4mut-cDNA einkloniert worden war. Durch Lipofektion wurden titrierte Mengen an rekombinanten Vektoren (0,8 - 200 ng/TE) mit HLA-A*0201 (100 ng/TE) in COS-7-Zellen (20.000 Zellen/TE) kotransfiziert und auf Erkennung mittels des HLA-A*0201-restringierten CDK4mut-reaktiven CTL 14/35 (10.000 T-Zellen/TE) getestet.*

Wie **Abbildung 3.1** zeigt, wurde CDK4mut im neu konstruierten Expressionsvektor pcDNA3.1/RfA/DEST#6 nach Transfektion ebenso gut durch den CTL 14/35 erkannt, wie CDK4mut im herkömmlichen Expressionsvektor pcDNA3.1. Die Titration der Vektor-cDNA zeigte deutlich die Abhängigkeit der Erkennung von der jeweils transfizierten cDNA-Menge. Beide Vektoren wiesen zudem eine identische Expressionseffizienz auf, da die Erkennung von CDK4mut durch den CTL 14/35 jeweils bis zu 1,7 ng transfizierter Vektor-cDNA/TE deutlich nachweisbar war. Die Funktionalität und die Expressionseffizienz des neu konstruierten Vektors pcDNA3.1/RfA/DEST#6 wurden hiermit gezeigt.

3.2.2 Konstruktion einer cDNA-Bank aus AML-Zellen der Patientin MZ201 in pcDNA.3.1/RfA/DEST#6

Bei der Konstruktion einer cDNA-Bank aus Leukämiezellen der Patientin MZ201-AML wurde zunächst eine *Entry library* im Vektor pDONR™222 hergestellt. Diese bestand nach Berechnung der Transformantenzahl aus $10,5 \times 10^6$ Klonen. Zur Bestimmung

der Rekombinationsfrequenz wurden 21 willkürlich ausgewählte Klone mit der Endonuklease *BsrGI* verdaut, deren Erkennungssequenzen innerhalb der flankierenden *attL1/2*-Adaptoren der *Entry library* lagen. Die Analyse ergab, dass 22 von 24 präparierten cDNA-Klonen ein Insert im Größenbereich von 0,5 - 5,0 kb trugen (Daten nicht gezeigt). Somit lag eine Rekombinationseffizienz von über 90% vor. Für die Erzeugung einer *Expression library* in *pcDNA.3.1/RfA/DEST#6* wurden 250 ng der *Entry library* eingesetzt. Dies entsprach 1/3 der verfügbaren Menge. Die resultierende *Expression library* bestand aus $1,98 \times 10^5$ Transformanten. **Abbildung 3.2** zeigt die Analyse der Rekombinationsfrequenz mittels *BsrGI*-Restriktionsverdau von 21 willkürlich ausgewählten Klonen.

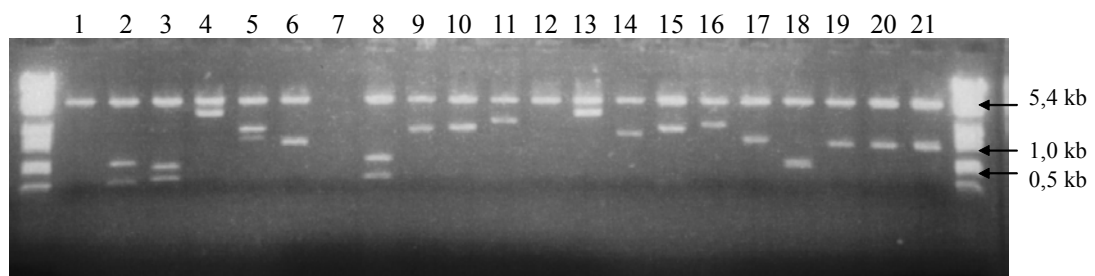


Abb. 3.2: *BsrGI*-Restriktionsverdau von 21 Kolonien der *Expression library* MZ201-AML im Expressionsvektor *pcDNA3.1/RfA/DEST*. Neben der Bestimmung des prozentualen Anteils insertierter cDNA in den Expressionsvektor erfolgte eine Analyse über die Verteilung der Fragmentgrößen. Im Schnitt wurden 500 ng DNA je Klon aufgetragen. Von einer der Kolonien (Nr.7) wurde keine DNA erhalten.

Achtzehn von 21 getesteten Klonen trugen ein Insert in einem repräsentativen Größenbereich von 0,5 - 4 kb. Dies entsprach einer Rekombinationsfrequenz von ca. 80% für die *Expression library*. Folglich trugen etwa $1,6 \times 10^5$ Plasmide ein Insert. Die *Expression library* wird fortan als MZ201-AML cDNA-Bank bezeichnet. Die hergestellte cDNA-Bank der Patientin MZ201-AML war **uni-direktional**. Für das cDNA-Expressionscreening wurden 1996 Pools von je 100 Bakterienklonen gebildet (100-fach Pools). Diese gepoolten Bakterien wurden expandiert, und es wurde Plasmid-DNA aus ihnen isoliert. Bei 1996 100-fach cDNA-Pools, einer Rekombinationsfrequenz von 80% und entsprechender Unidirektionalität ist davon auszugehen, dass circa 160.000 cDNA-Klone für das Screening-Experiment bereitstanden.

3.2.3 Funktionalität der MZ201-AML cDNA-Bank

Vor Verwendung der MZ201-AML cDNA-Bank in pcDNA.3.1/RfA/DEST#6 im T-Zell-basierten cDNA-Expressionsscreening erfolgte die Kontrolle ihrer grundsätzlichen Intaktheit. In den 100-fach cDNA-Pools 501 - 596 sollte die mutmaßlich häufig vorkommende *HLA-A*0201*-cDNA identifiziert werden. Dies erfolgte mit Hilfe des oben erwähnten CTL-Klons 14/35 gegen das durch *HLA-A*0201*-restringierte CDK4mut. In COS-7-Zellen wurde CDK4mut-cDNA in pcDNA3.1 zusammen mit den 100-fach cDNA-Pools kotransfiziert. Die Erkennung von COS-7-Transfektanten durch CTL 14/35 ließ auf die Präsenz von *HLA-A*0201* schließen.

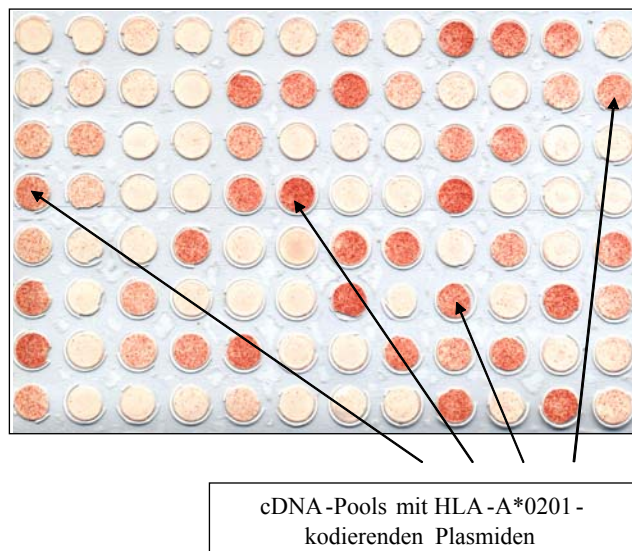


Abb. 3.3: *Testung der Intaktheit der MZ201-AML cDNA-Bank Expression library in pcDNA3.1/RfA/DEST#6. Die 100-fach Pools 501 - 596 (300 ng/TE) der MZ201-AML cDNA in pcDNA3.1/RfA/DEST#6 wurden mit CDK4mut-cDNA (100 ng/TE) in COS-7 (20.000 Zellen/TE) kotransfiziert. Die Erkennung der Transfektanten durch CTL 14/35 (gegen CDK4mut, 10.000 Zellen/TE) wurde in einem 24h-IFN- γ -ELISPOT-Assay getestet.*

Die in **Abbildung 3.3** gezeigten Ergebnisse ließen darauf schließen, dass *HLA-A*0201*-cDNA in ca. 60% der getesteten 100-fach cDNA-Pools enthalten war. Es war demnach davon auszugehen, dass die cDNA-Bank grundsätzlich intakt und für Screeningexperimente mit AML-reaktiven T-Zellen geeignet war.

3.3 Klonierung der HLA-Klasse I-Allele der Patientin M201-AML

Die am Institut für Immunologie und Genetik in Kaiserlautern (Labor Dr. Thiele) genotypisierten HLA-Klasse I-Allele der Patientin MZ201-AML (siehe 3.1) wurden aus Leukämiezellen kloniert. Die Klonierung der Allele *HLA-B*0801* und *-Cw*0102* in den Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His TOPO erfolgte wie in 2.2.1.6 beschrieben. Für sämtliche nachfolgenden Experimente wurden die sequenzierten Klone pcDNA3.1/V5-His TOPO/*HLA-B*0801* #12 und pcDNA3.1/V5-His TOPO/*HLA-Cw*0102* #1 verwendet. Da die in den Expressionsvektor pcDNA3.1 klonierten Allele *HLA-A*0201* bzw. *-A*0101* bereits im Labor vorhanden waren, wurden diese nicht aus den Leukämiezellen der Patientin MZ201-AML kloniert. Für sämtliche Experimente wurde der aus den Leukämiezellen der MZ50-AML isolierte Klon pcDNA3.1/*HLA-A*0201* #50 bzw. der aus den Leukämiezellen der MZ63-CML isolierte Klon pcDNA3.1/V5-His TOPO/*HLA-CW*0101* #1 verwendet. Die Klonierung des Allels *HLA-B*5601* war nach Standardverfahren (siehe 2.2.1.2) nicht erfolgreich. Die 67 getesteten Klone stellen sich nach Restriktionsverdau und Sequenzanalyse als *HLA-B*0801*-Klone heraus (Daten nicht gezeigt). Daraus wurde gefolgert, dass das Allel *HLA-B*5601* im Vergleich zu *HLA-B*0801* schwach exprimiert ist. Daher sollte durch den Einsatz des Zytokins IFN- γ untersucht werden, inwieweit sich die Expression des Allels *HLA-B*5601* auf den Leukämiezellen der Patientin MZ201-AML stimulieren ließ [SIKORSKI *ET AL.*, 2004]. Dazu wurden MZ201-AML-Zellen in Gegenwart von IFN- γ (200 U/ml) für 3 Tage kultiviert. Die Quantifizierung der HLA-B56-Expression nach IFN- γ -Vorbehandlung erfolgte mittels des HLA-B56-spezifischen Antikörpers *B56/B5/B49+* in durchflusszytometrischen Analysen (siehe 2.2.2.6) im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Abb. 3.4: Hochregulierung der *HLA-B*5601*-Expression auf den Leukämiezellen der Patientin MZ201-AML durch IFN- γ . Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der in Gegenwart von IFN- γ (200 U/ml) für 3 Tage kultivierten Leukämiezellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

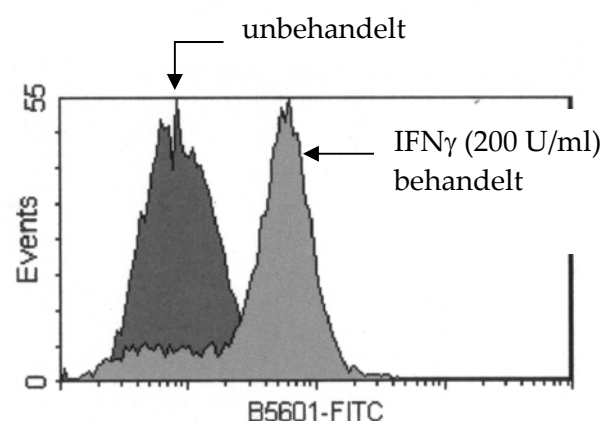


Abbildung 3.4 zeigt, dass im Vergleich zu unbehandelten Zellen IFN- γ eine deutliche Hochregulierung der HLA-B56-Expression auf MZ201-AML-Zellen erreicht wurde. Als Konsequenz dessen sollte das *HLA-B*5601*-Allel nun aus IFN- γ -behandelten MZ201-AML-Zellen kloniert werden. Nach Isolierung von Total-RNA (siehe 2.2.1.6L) aus 15×10^6 IFN- γ -behandelten Leukämiezellen (MZ201-AML) und Herstellung von cDNA (siehe 2.2.1.6M), erfolgte die Amplifikation mittels PCR unter Verwendung HLA-B-spezifischer Primer (siehe 2.1.11D). Nach Ligation der PCR-Produkte mit dem Vektor pcDNA3 und Transformation in *E. coli* TOP10 (siehe 2.2.1.6O), wurden insgesamt 1920 Klone gepickt und in 96 Bakterienpools zu je 20 Kolonien gesammelt. Nach der Kultivierung über Nacht bei 37°C wurde die DNA der 20x Bakterienpools präpariert (siehe 2.2.1.1E). Die 20-fach cDNA-Pools wurden im Anschluss mittels PCR und unter Verwendung *HLA-B*5601*-spezifischer Primer (siehe 2.1.11D) auf die Präsenz von *HLA-B*5601* getestet. Nur aus dem 20-fach cDNA-Pool 13 wurde ein Amplifikat der erwarteten Länge von 0,6 kb amplifiziert. Die anschließende Subklonierung des 20-fach cDNA-Pools, erfolgte methodisch wie unter Punkt 2.2.2.2 beschrieben. Die cDNA-Klone, bezeichnet mit #13.1 - 48, wurden wiederum mittels PCR mit *HLA-B*5601*-spezifischen Primern getestet. Nur ein Klon, Klon #13.5, enthielt eine für *HLA-B*5601*-kodierende cDNA in der richtigen Orientierung. Nach vollständiger Sequenzierung (siehe 2.2.1.6B) des Klons des Klons wurde eine 100% Homologie zu der bei NCBI veröffentlichten *HLA-B*5601*-Sequenz festgestellt. Für weitere Experimente wurde der Subklon pcDNA3/*HLA-B*5601* #13.5 verwendet. *HLA-Cw*0701* konnte auch nach mehrfachen Versuchen nicht kloniert werden. Freundlicherweise wurde von Professor P. van der Bruggen vom „Ludwig Institute for Cancer Research“ in Brüssel (Belgien) der Klon pcDNA3/*HLA-Cw*0701* zur Verfügung gestellt.

3.4 Identifizierung und Charakterisierung des Zielantigens der AML-reaktiven T-Zell-Population 4D7 im Leukämie-Modell MZ201-AML / Spender 332

3.4.1 Screening der MZ201-AML cDNA-Bank und Identifizierung antigenkodierender cDNA

Laut HLA-Blockaden ist die AML-reaktive T-Zell-Population 4D7 durch ein HLA-B- oder ein HLA-C-Allel restringiert [DISTLER *ET AL.*, 2008]. Das Screening der cDNA-Bank aus MZ201-AML-Zellen wurde zunächst mit zwei HLA-Allelen, *HLA-Cw*0701* und *-Cw*0102* durchgeführt. Das Verfahren der cDNA-Expressionsklonierung erfolgte grundsätzlich wie in 2.2.2.2 beschrieben. Jedoch wurden davon abweichend 75 ng je HLA-cDNA, also insgesamt 150 ng/TE, in COS-7-Zellen transfiziert. Hinzu kamen je 300 ng eines jeden 100-fach cDNA-Pools. Insgesamt wurden 1996 100-fach cDNA-Pools auf Erkennung durch 4D7-Zellen gescreent. Dies entsprach der gesamten präparierten MZ201-AML cDNA-Bank. Mit circa 70 IFN- γ -Spots / 5.000 4D7-Zellen über Hintergrundreaktivität, die bei circa 50 IFN- γ -Spots / 5.000 4D7-Zellen lag, wurde der 100-fach cDNA-Pool 1131 als positiv identifiziert (Daten nicht gezeigt). Im nachfolgenden Bestätigungsexperiment erfolgte die getrennte Transfektion beider HLA-Allele, um das zutreffende Restriktionselement zu identifizieren. Es zeigte sich jedoch, dass der cDNA-Pool 1131 auch ohne die Kotransfektion einer HLA-cDNA durch die T-Zell-Population 4D7 erkannt wurde. Daraufhin wurden alle vier in Frage kommenden HLA-Allele der Patientin, *HLA-B*0801*, *-B*5601*, *-Cw*0102* und *-Cw*0701* zusammen mit dem 100-fach cDNA-Pool 1131 in COS-7-Zellen kotransfiziert und auf Erkennung durch die T-Zell-Population 4D7 im IFN- γ -ELISPOT-Assay getestet. Die Kotransfektion von *HLA-B*5601* induzierte 121 IFN- γ -Spots / 5.000 4D7-Zellen gegenüber circa 60 IFN- γ -Spots / 5.000 4D7-Zellen bei Kotransfektion von *HLA-B*0801*, *-Cw*0102* oder *Cw*0701* (Daten nicht gezeigt). Dies deutete auf *HLA-B*5601* als eigentliches Restriktionselement von 4D7-Zellen hin. Die Erkennung des 100-fach cDNA-Pools 1131 auch ohne die Kotransfektion einer HLA-cDNA setzt die Existenz eines für *HLA-B*5601*-kodierenden cDNA-Klons innerhalb dieses Pools voraus. In einem Rescreening wurden die 100-fach cDNA-Pools 1101-1196 mit *HLA-B*5601* in COS-7-Zellen kotransfiziert und auf Erkennung durch 4D7-Zellen im IFN- γ -ELISPOT-Assay getestet. Auch hierbei induzierte nur der 100-fach Pool 1131 eine signifikante IFN- γ -Spotproduktion durch 4D7-Zellen

(**Abb. 3.5A**). Der cDNA-Pool wurde im Anschluss subkloniert, wie in 2.2.2.2 beschrieben. Es folgte zunächst das Screening von 200, aus Pool 1131 generierten, 10-fach cDNA-Pools. Nach Kotransfektion der 10-fach cDNA-Pools mit *HLA-B*5601*-kodierender cDNA und Test auf Erkennung durch die T-Zell-Population 4D7, wurde der positive 10-fach cDNA-Pool 1131.17 identifiziert (**Abb. 3.5B**), der im Anschluss kloniert wurde. Es folgte das Screening von 200 cDNA-Klonen aus dem 10-fach cDNA-Pool 1131.17. Schließlich wurde der cDNA-Klon #**1131.17.35** identifiziert, der in COS-7-Zellen eine starke IFN- γ -Antwort der T-Zell-Population 4D7 hervorrief (**Abb. 3.5C**).

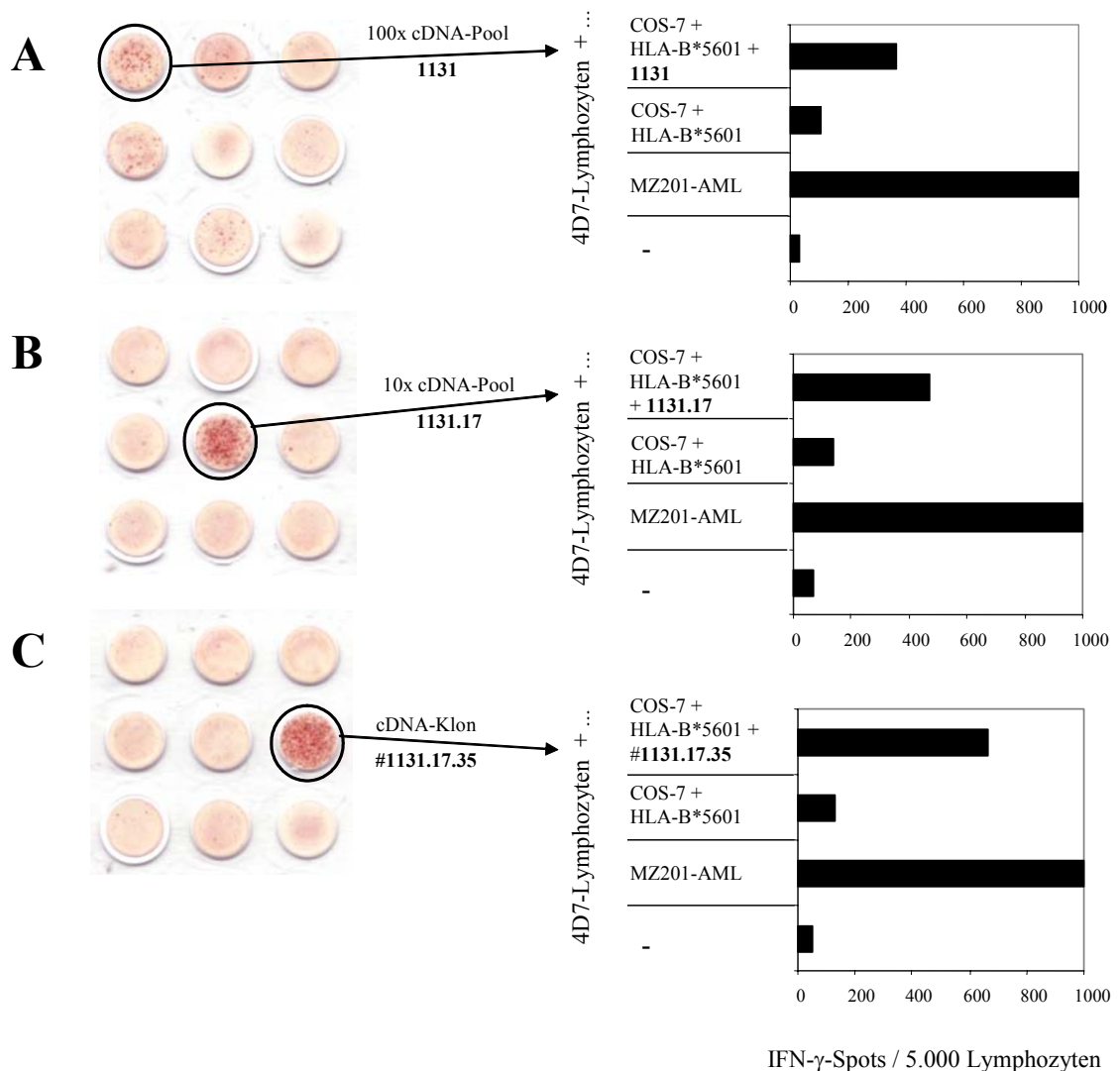


Abb. 3.5: Identifizierung eines T-Zell-erkannten cDNA-Klons aus der MZ201-AML cDNA-Bank durch cDNA-Expressionsklonierung mit Hilfe der T-Zell-Population 4D7 (*d62+5). **(A)** Ausschnitt aus der ELISPOT-Platte des Rescreenings der 100-fach cDNA-Pools 1101-1196 unter Kotransfektion von *HLA-B*5601*. Der 100-fach Pool 1131 induzierte Spotproduktion. **(B)** Ausschnitt der ELISPOT-Platte der Testung von 10-fach Pools, die aus Pool 1131 hergestellt wurden, und dem positiven 10-fach Pool 1131.17. **(C)** Ausschnitt aus der ELISPOT-Platte zur Testung von Klonen aus dem 10-fach Pool 1131.17. Das Ergebnis für #1131.17.35 (Klon 35) ist gezeigt. Durchgehend sind Daten von 24h-IFN- γ -ELISPOT-Assays gezeigt, in die jeweils 5.000 4D7-Lymphozyten/TE eingesetzt wurden. Unter A - C sind rechts neben den Originalfilterscans die zugehörigen Auswertungen mittels Computer-assistierter Videoimage-Analyse abgebildet.

Die *HLA-B*5601*-abhängige Erkennung des cDNA-Klons #1131.17.35 wurde demonstriert, indem *HLA-B*5601*-cDNA zusammen mit cDNA des Klons #1131.17.35 in COS-7-Zellen kotransfiziert wurde. Der Test auf Erkennung durch 4D7-Lymphozyten erfolgte im Vergleich zu einem Ansatz, in dem der cDNA-Klon #1131.17.35 ohne *HLA-B*5601*-cDNA in COS-7-Zellen transfiziert wurde.

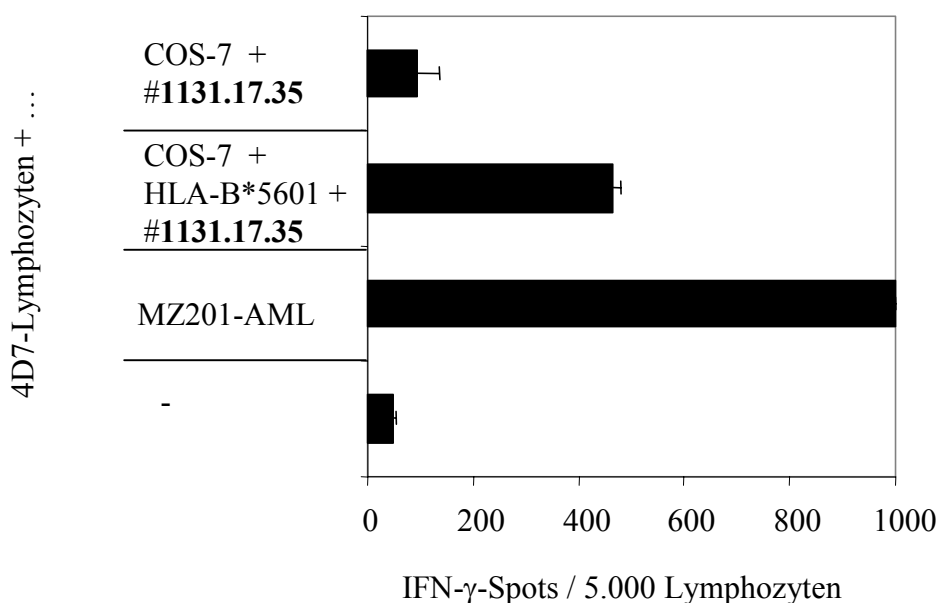


Abb. 3.6: *HLA-B*5601*-abhängige Erkennung des cDNA-Klons #1131.17.35. COS-7-Zellen (20.000 Zellen/TE) wurden mit *HLA-B*5601* (100 ng/TE) und cDNA-Klon #1131.17.35 (300 ng/TE) kotransfiziert. Sowohl die Transfektionsansätze als auch MZ201-AML-Zellen (50.000 Zellen/TE) wurden auf Erkennung durch 4D7-Lymphozyten (5.000 Zellen/TE) getestet. Gezeigt sind die Daten eines 24h-IFN-γ-ELISPOT-Assays. Sie entsprachen Mittelwerten von Doppelbestimmungen.

Abbildung 3.6 zeigt die *HLA-B*5601*-abhängige Erkennung des cDNA-Klons #1131.17.35 durch die T-Zell-Population 4D7. COS-7-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmidkombinationen transfiziert, um die Bedeutung der Präsenz von *HLA-B*5601* für die Erkennung durch 4D7-Zellen zu demonstrieren. Hiermit wurde die *HLA-B*5601*-abhängige Erkennung des cDNA-Klons #1131.17.35 gezeigt.

3.4.2 4D7-Lymphozyten erkennen ein polymorphes Allel des Plasminogen Aktivator Urokinase Rezeptors (PLAUR) in Assoziation mit *HLA-B*5601*

Die komplette Sequenzierung des cDNA-Klons #1131.17.35 ergab, dass er ein 1343 bp langes Insert trug. Dessen Sequenz war homolog zur veröffentlichten *PLAUR*- (*plasminogen activator urokinase receptor*) cDNA (NCBI-Accession-Nr. NM_002659). Das *PLAUR*-Gen wurde erstmals 1992 beschrieben [VAGNARELLI *ET AL.*, 1992]. Am 5'-Ende der Sequenz fehlten bei Vergleich der Datenbanksequenz 204 bp der untranslatierten Region. Gegenüber der zuerst herangezogenen Datenbanksequenz wurde im Exon 7 ein Nukleotidaustausch von Thymin (T) zu Cytosin (C) identifiziert, der einen Aminosäureaustausch von Leucin (L) zu Prolin (P) an Position 317 zur Folge hatte. *PLAUR-317P* stellte sich nach weiteren Datenbankrecherchen als ein polymorphes Allel des *PLAUR*-Gens heraus. Von den 247 bekannten *Single Nukleotide-Polymorphismen* (SNPs) des Gens *PLAUR* betreffen 236 Intronsequenzen. Weitere fünf betreffen untranslatierte Regionen der mRNA und lediglich sechs SNPs befinden sich in Exonsequenzen translatierter Regionen. Dazu zählt ein Polymorphismus an Position 317 (NCBI-Datenbank: *SNP rs4760*). Laut NCBI-Datenbank liegt die Frequenz des Allels *PLAUR-317P* bei circa 30% in kaukasischen Bevölkerungsgruppen [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.]. Der im Rahmen dieser Arbeit identifizierte antigenkodierende cDNA-Klon #1131.17.35 wird im Folgenden als *PLAUR-317P* bezeichnet.

3.4.3 Untersuchung der *PLAUR*-Allelie in Zellen der Patientin MZ201-AML und des Spenders 332

Aus MZ201-AML-, MZ201-EBV-B-, Spender 332-EBV-B-Zellen und Spender 332-PBL wurde genomische DNA isoliert (siehe 2.2.1.6H). Mittels spezifischer Primer (siehe 2.1.11G) wurde die Sequenz um das Kodon 317 von *PLAUR* amplifiziert, sequenziert (siehe 2.2.1.6B) und in **Abbildung 3.7** vergleichend analysiert.

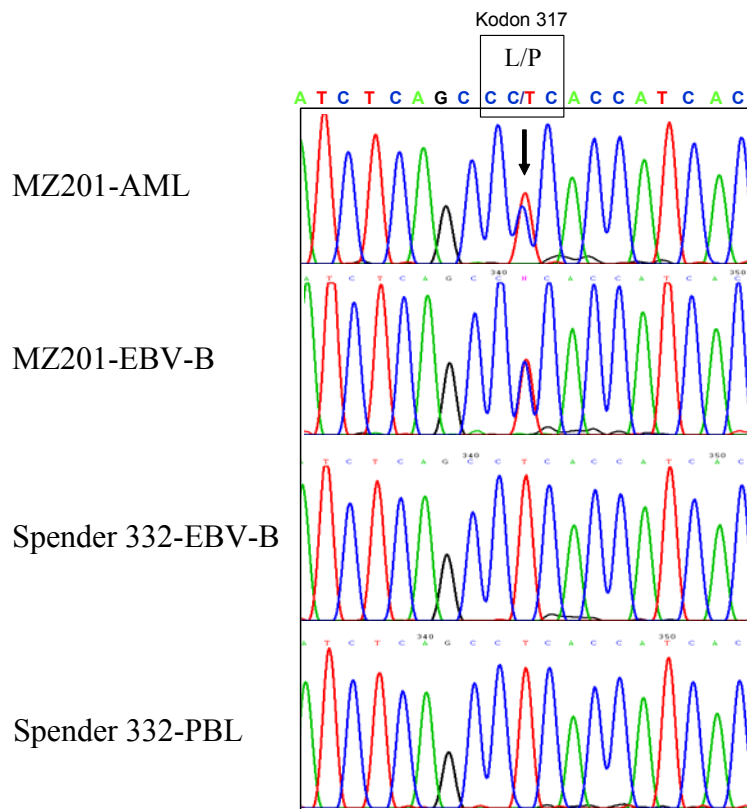


Abb. 3.7: Typisierung der Patientin MZ201-AML und des Spenders 332 hinsichtlich des PLAUR-317-Polymorphismus. Gezeigt werden Sequenzausschnitte um das polymorphe Kodon 317 der untersuchten Zellen

Zellen der Patientin MZ201, nämlich MZ201-AML- und MZ201-EBV-B-Zellen, sowie des Spenders 332, nämlich Spender-332-EBV-B-Zellen und Spender-332-PBL, wurden bezüglich des PLAUR-317-Polymorphismus typisiert. Die Analyse der Sequenzdaten ergab, dass die Zellen der Patientin MZ201-AML heterozygot für das Allel 317 waren, d.h. sie trugen sowohl das *PLAUR-317P*- als auch das *PLAUR-317L*-Allel. Die Zellen des Spenders 332 waren hingegen homozygot für *PLAUR-317L* (**Abb. 3.7**). Die Analyse auf der Ebene genomischer DNA konnte jedoch keinen Aufschluss über die Expression des jeweiligen Allele liefern (siehe dazu **Abschnitt 3.4.7**).

3.4.4 Eingrenzung der peptidkodierenden Region auf der *PLAUR-317P*-cDNA

Für die Eingrenzung der peptidkodierenden Region auf der *PLAUR-317P*-cDNA wurden neun Fragmente generiert, die in der 3'-Region von Kodon 317 jeweils um 1 Kodon verkürzt und mit einem künstlichen STOP-Kodon versehen waren. Mittels PCR und unter Verwendung spezifischer Primer (siehe 2.1.11G) wurden die Fragmente amplifiziert und in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His TOPO

kloniert (siehe 2.2.1.6C). Nach anschließender Transformation in *E. coli* TOP10 (siehe 2.2.1.6O) wurde von ausgewählten Klonen Plasmid-DNA präpariert und durch Sequenzanalyse (siehe 2.2.1.6B) deren Richtigkeit hinsichtlich Orientierung und Sequenzabfolge untersucht. Sequenzierte Klone wurden zusammen mit *HLA-B*5601* in COS-7-Zellen kotransfiziert und im IFN- γ -ELISPOT-Assay (siehe 2.2.2.1) auf Erkennung durch die T-Zell-Population 4D7 getestet. **Abbildung 3.8** zeigt die generierten Fragmente der *PLAUR-317P*-cDNA, sowie die Ergebnisse der Fragmententstung.

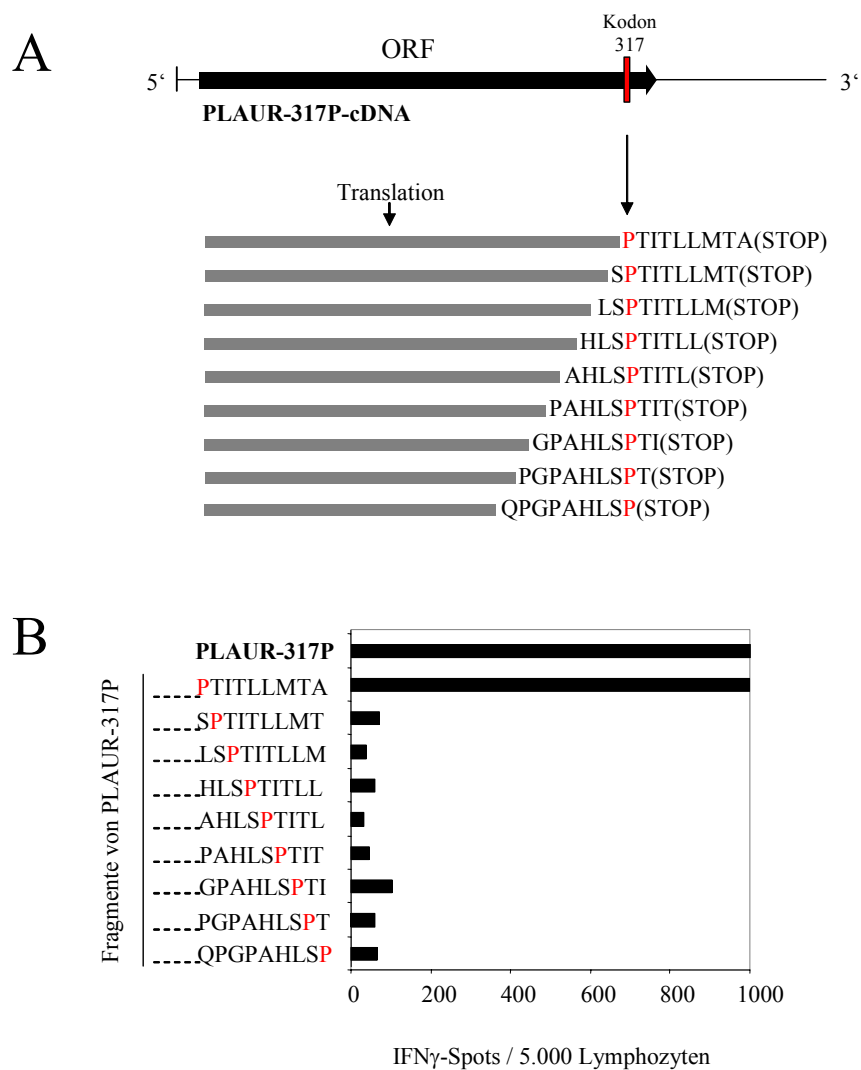


Abb. 3.8: Eingrenzung der peptidkodierenden Region auf der *PLAUR-317P*-cDNA. **(A)** Mittels PCR wurden neun Fragmente generiert, die in der 3'-Region des Kodons 317 endeten. Diese Fragmente wurden am 3'-Ende um jeweils 1 Kodon verkürzt und mit einem künstlichen STOP-Kodon versehen. **(B)** Die Fragmente wurden in pcDNA3.1/V5-His TOPO kloniert. Diese Plasmide (300 ng/TE) wurden zusammen mit *HLA-B*5601* (100 ng/TE) in COS-7-Zellen (20.000 Zellen/TE) kotransfiziert und im Vergleich mit *PLAUR-317P* voller Länge (300 ng/TE) auf Erkennung durch die T-Zell-Population 4D7 (5.000 Zellen/TE) im IFN- γ -ELISPOT-Assay getestet. Die gezeigten Daten entsprechen Mittelwerten aus Doppelbestimmungen.

Die Ergebnisse der Testung der Fragmente der *PLAUR-317P* zeigten, dass lediglich das an Position 325 endende Fragment von der T-Zell-Population 4D7 erkannt wurde. Kürzere Fragmente wurden nicht erkannt (**Abb. 3.8**). Daraus war zu folgern, dass die Aminosäure 325 das C-terminale Ende des gesuchten Peptids bildete.

3.4.5 Identifizierung des *HLA-B*5601*-restringierten *PLAUR-317P*-Peptids

Für die Identifizierung von Peptidkandidaten wurde die frei zugängliche SYFPEITHI-Datenbank für MHC-Liganden und Peptid-Motive verwendet, die Vorhersagen von Peptidkandidaten aufgrund geeigneter Ankerpositionen für wählbare MHC-Allele trifft. Da die Wahlmöglichkeit des Allels *HLA-B*5601* nicht gegeben war, erfolgte die Vorhersageanalyse von *PLAUR*-Peptidkandidaten anhand des *HLA-B7*-Supertyps. Unter Berücksichtigung der in **Abbildung 3.8B** gezeigten Ergebnisse wurden die fünfzehn C-terminalen Aminosäuren des einzig erkannten *PLAUR-317P*-Fragmentes in die Datenbank eingespeist. Sowohl für ein Dekamere- als auch für ein Nonapeptid wurden hohe Bindungswerte erzielt. Sehr schlechte Bindungswerte wurden für die korrespondierenden *PLAUR-317L*-Peptide erhalten. Schließlich wurden aufgrund ihrer relativ hohen Bindungsscores die Dekamere *SPTITLLMTA* und *SLTITLLMTA* sowie die Nonamere *PTITLLMTA* und *LTITLLMTA* zur Synthese in Auftrag gegeben. Die Testung dieser Peptide erfolgte zunächst mittels eines IFN- γ -ELISPOT-Assays (siehe 2.2.2.4). Als antigenpräsentierende Zellen wurden MZ201-EBV-B-Zellen verwendet, die mit synthetischen *PLAUR*-Peptiden in einem Konzentrationsbereich zwischen 10^2 - 10^5 μ M beladen waren und die auf Erkennung durch die T-Zell-Population 4D7 getestet wurden.

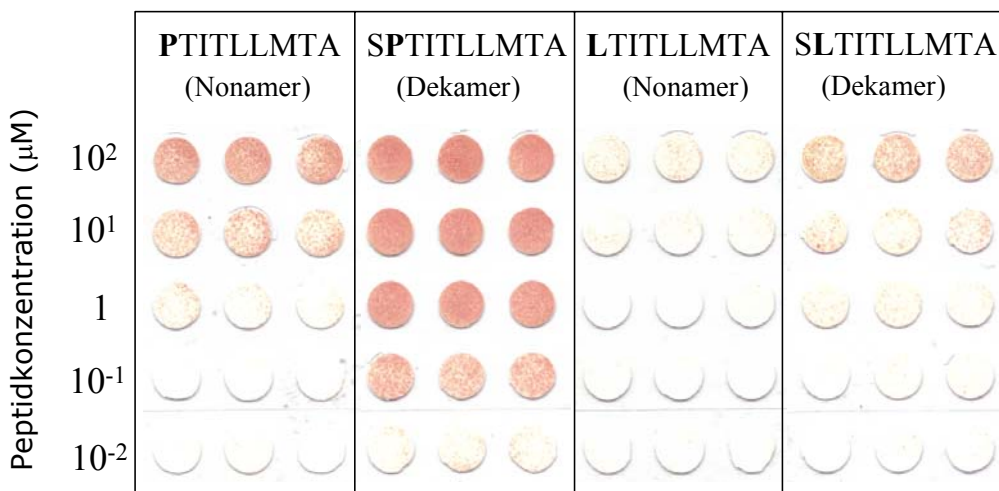


Abb. 3.9: *Testung synthetischer PLAUR-Peptide mit der T-Zell-Population 4D7.* Als antigen-präsentierende Zellen wurden MZ201-EBV-B-Zellen (75.000 Zellen/TE) mit titrierten Mengen an synthetischen PLAUR-Peptiden ($10^2 - 10^{-5}$ μM) beladen und auf Erkennung durch die T-Zell-population 4D7 (5.000 Lymphozyten/TE) in einem 24h-IFN- γ -ELISPOT-Assay getestet. Gezeigt wird ein Ausschnitt des Peptiderkennungstests für den Peptidkonzentrationsbereich von $10^2 - 10^{-2}$ μM. Die Peptiderkennung durch die T-Zell-Population 4D7 erfolgte in einem Effektor-zu Zielzellverhältnis von 10:1.

Das Dekamer SPTITLLMTA wurde von der T-Zell-Population 4D7 in niedrigster Konzentration (bis 10^{-3} μM) erkannt. Das zugehörige Nonamer PTITLLMTA, sowie die korrespondierenden PLAUR-317L-Peptide wurden demgegenüber deutlich schlechter erkannt. Erkennung für die letztgenannten Peptide war bestenfalls bis zu einer Konzentration von 1 μM nachweisbar (**Abb. 3.9**). Im Anschluss daran wurde die Erkennung der PLAUR-Peptide im Zytotoxizitätsassay untersucht. Als antigen-präsentierende Zielzellen wurden auch hier autologe EBV-B-Zellen verwendet, die zuvor mit $\text{Na}^{(51)\text{Cr}}\text{O}_4$ (100 μCi) markiert worden waren (siehe 2.2.2.4). Anschließend erfolgte deren Beladung mit titrierten Mengen an PLAUR-Peptiden in einem Konzentrationsbereich zwischen 10^2 bis 10^{-5} μM.

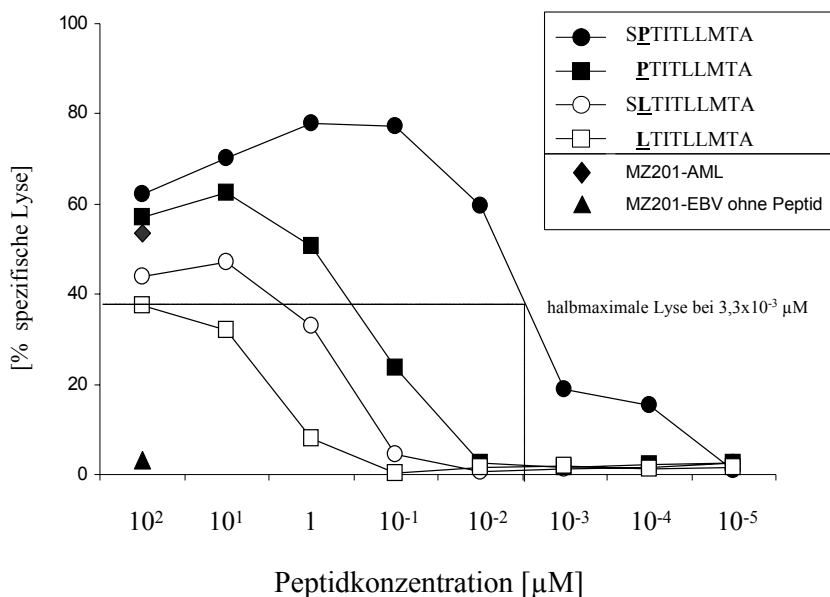


Abb. 3.10: Titration der PLAUR-317P Peptide. MZ201-EBV-B-Zellen (2.000 Zellen/TE) wurden mit Na(⁵¹Cr)O⁴ markiert, gewaschen, mit titrierten Mengen an PLAUR-Peptid (10² - 10⁻⁵ µM) beladen und mit den der T-Zell-Population 4D7 bei einem Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 10:1 getestet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen eines 4-stündigen ⁵¹Cr-Freisetzungstests.

Die mit dem Dekapeptid SPTITLLMTA beladenen MZ201-EBV-B-Zellen wurden bei einer eingesetzten Peptidkonzentration von 0,1 µM zu nahezu 80% lysiert. Bei einer 100-fach geringeren Konzentration des Peptids konnte noch eine lytische Aktivität von etwa 20% nachgewiesen werden. Sowohl für das entsprechende Nonapeptid PTITLLMTA als auch für die korrespondierenden PLAUR-317L-Peptide war ab einer Peptidkonzentration von 10⁻² µM keine Lyse mehr nachweisbar. Das in niedrigsten Konzentrationen erkannte Dekapeptid SPTITLLMTA induzierte halbmaximale Lyse bei einer Konzentration von 3,3 x 10⁻³ µM.

3.4.6 Frequenz des *PLAUR-317P*-Allels in gesunden Spendern und Patienten

Angaben von Datenbanken zufolge tragen 30% aller Menschen das Allel *PLAUR-317P* [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref]. Dies sollte durch die Testung von 100 Individuen in einer Real-Time PCR überprüft werden. Auf der Ebene von genomischer DNA wurden sowohl Leukämiepatienten als auch gesunde Spender hinsichtlich der Frequenz der 317P- und 317L-Allele von *PLAUR* getestet.

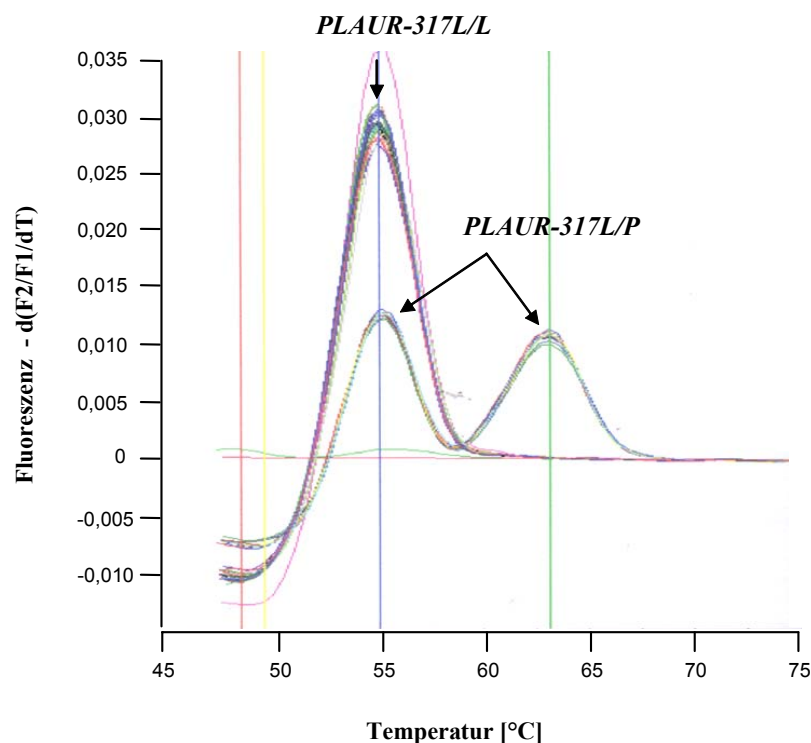


Abb. 3.11: Frequenzanalyse des Allels *PLAUR-317P*. Auf der Ebene genomischer DNA wurden 100 Individuen, Patienten und gesunde Spender, hinsichtlich ihrer *PLAUR*-Allelie untersucht. Dies erfolgte mittels spezifischer Primer und Sonden (siehe 2.1.11G und 2.1.12) in einer Real-Time PCR (siehe 2.2.1.4A). Hier gezeigt sind die Schmelzpunktkurven der Analyse von 30 Individuen.

Abbildung 3.11 zeigt die für hetero- bzw. homozygote Proben erhaltenen Schmelzpunktkurven. Homozygote Proben (*PLAUR-317L/L*) weisen einen definierten Schmelzpunkt bei 55°C, heterozygote Proben (*PLAUR-317L/P*) hingegen zwei Schmelzpunkte bei 55°C und 63°C auf (siehe 2.2.1.4). Die Untersuchung ergab, dass 67% der getesteten Individuen homozygot für das Allel *PLAUR-317L* und 30% neben *PLAUR-317L* auch *PLAUR-317P* trugen. Dies bestätigte die Literaturdaten

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref]. Lediglich 3% der getesteten Individuen erwiesen sich als homozygot für *PLAUR-317P* (Daten nicht gezeigt).

3.4.7 Quantifizierung der Expression von *PLAUR*-RNA in Normalgeweben

Die Untersuchung einer gewebespezifischen Expression von *PLAUR* erfolgte unter Verwendung des *Human RNA Master Panel Kit* von Clontech, der Gesamt-RNA aus zwanzig verschiedenen Gewebetypen enthielt. Die RNAs wurden zunächst in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss erfolgte mittels quantitativer PCR die Bestimmung des relativen Verhältnisses von *PLAUR*- zu β -Aktin-RNA (**Abb. 3.12**).

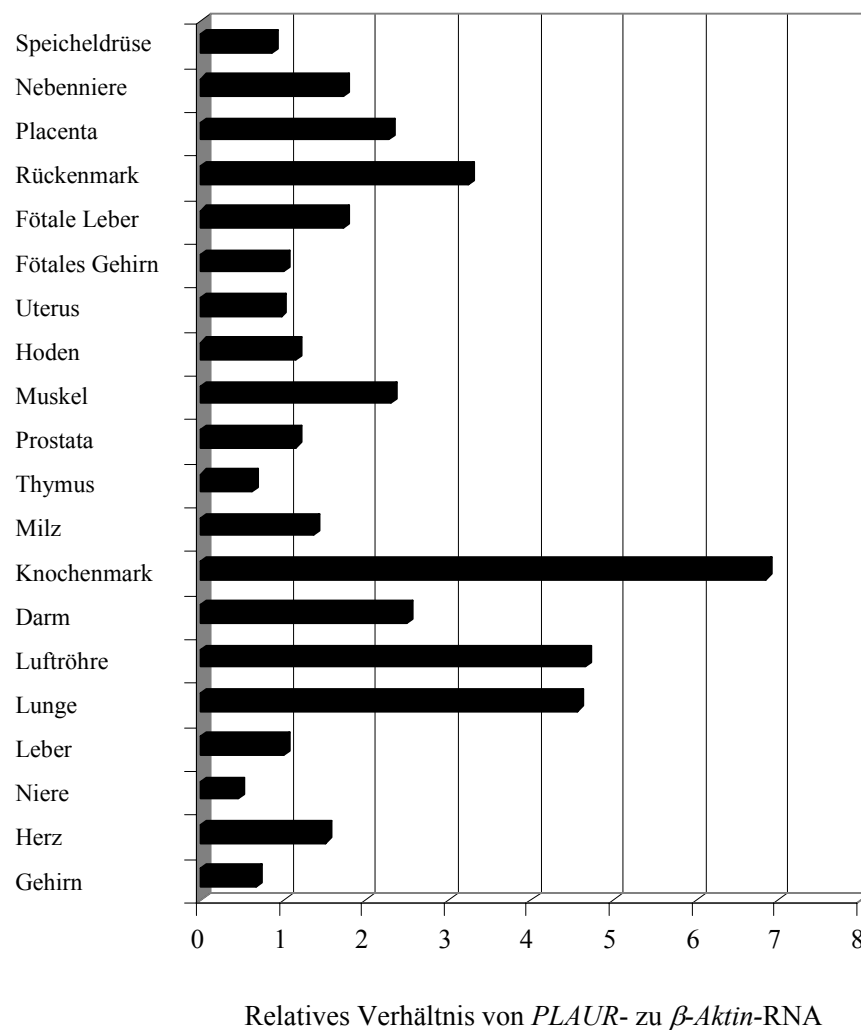
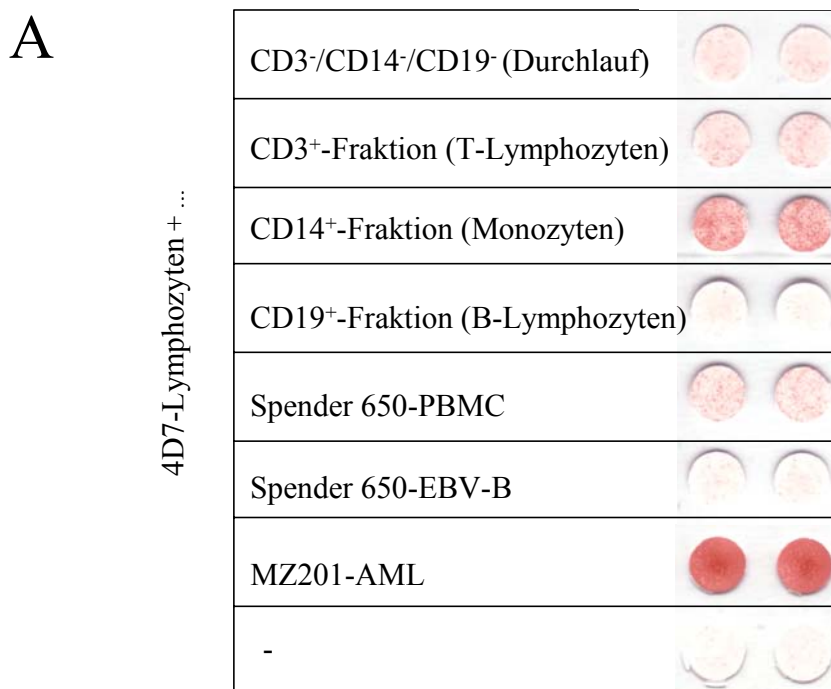


Abb. 3.12: *Quantitative Analyse der gewebespezifischen Expression von PLAUR-RNA.* Aus cDNA von 20 verschiedenen Geweben des *Human RNA Master Panel Kit* (Clontech) erfolgte die Quantifizierung von *PLAUR* relativ zu dem Haushaltsgen β -Aktin (Details siehe 2.2.1.4B).

Abbildung 3.12 zeigt, dass im Knochenmark im Vergleich zu den übrigen Geweben die höchste Expression von PLAUR-RNA nachgewiesen wurde. Dem Profil zufolge schien PLAUR-RNA jedoch ubiquitär exprimiert zu sein. Auf Nachfrage beim Hersteller konnten eine Blutverunreinigung der präparierten Gewebe und somit mögliche falsch positive Resultate nicht vollständig ausgeschlossen werden. Informationen über die gewebsspezifische Expression von PLAUR wurde nach persönlicher Korrespondenz von Andrew Mazar des Attenuon Corporate Office (San Diego, US) erhalten. Mit Hilfe des spezifischen Antikörpers ATN-658, Klon VIM5, der spezifisch ein Epitop in der uPA-Bindungsdomäne D₂D₃ nachweist, hatte er dreißig Normalgewebe von jeweils 8 Spendern auf die Expression von PLAUR untersucht. In keinem der getesteten Gewebe konnte PLAUR nachgewiesen werden. Lediglich in Histozyten und Neutrophilen, jedoch nicht in Lymphozyten wurde PLAUR detektiert (persönliche Mitteilung von Andrew Mazar).

3.4.8 Erkennung von PBMC-Subpopulationen des Spenders 650 durch 4D7-Lymphozyten

Der Spender 650 hatte im Vergleich mit MZ201-AML einen identischen HLA-Klasse I-Phänotyp (siehe **Abschnitt 3.1**) und war darüber hinaus heterozygot für *PLAUR-317L/P* [Daten nicht gezeigt]. In Kreuzreaktivitätsanalysen war gefunden worden, dass die gegen PLAUR-317P gerichteten 4D7-Lymphozyten die Spender 650-Monozyten erkannte, aber nicht EBV-B transformierte B-Zellen [DISTLER *ET AL.*, 2008]. Es sollte untersucht werden, ob weitere Subpopulationen aus den PBMC des Spenders 650 erkannt werden. Mittels immunmagnetischer Zellseparation erfolgte eine Positivselektion von B-Lymphozyten, Monozyten und T-Lymphozyten aus den PBMC des Spenders 650 (siehe 2.2.2.5H). Anschließend wurden die Zellen jeder Subpopulation im IFN- γ -ELISPOT-Assay auf Erkennung durch die T-Zell-Population 4D7 getestet. Die separierten Zellfraktionen wurden mittels monoklonaler fluoreszenzgekoppelter Antikörper markiert und im Durchflusszytometer (siehe 2.2.2.6) hinsichtlich ihrer Reinheit analysiert.



B

Fraktionen des Spenders 650	Anteil [%]			
	CD19 ⁺	CD14 ⁺	CD3 ⁺	CD19 ⁺ / CD14 ⁻ / CD3 ⁻
PBMC	6,2%	9,6%	67,4%	16,6%
CD19 ⁺ (B-Lymphozyten)	72,7%	1,6%	21,1%	4,5%
CD14 ⁺ (Monozyten)	13,2%	75,2%	8,8%	2,0%
CD3 ⁺ (T-Lymphozyten)	0,0%	0,1%	98,5%	0,8%
CD3 ⁻ /CD19 ⁻ /CD14 ⁻ (Durchlauf)	0,2%	0,8%	75,9%	20,7%

Abb. 3.13: T-Zellerkennungstest von Subpopulationen aus den PBMC des Spenders 650. **(A)** Mittels immunmagnetischer Zellseparation (siehe 2.2.2.5H) wurden B-Lymphozyten (CD19⁺), Monozyten (CD14⁺) und T-Lymphozyten (CD3⁺) aus den PBMC des Spenders 650 separiert und jeweils 50.000 Zellen/TE auf Erkennung durch 4D7-Lymphozyten (5.000 Zellen/TE) in einem 24h-IFN- γ -ELISPOT-Assay getestet. Gezeigt werden die Originalfilterscans. **(B)** Die Zellen der jeweiligen Fraktion wurden mittels monoklonaler, fluoreszenzgekoppelter Antikörper markiert und im Durchflusszytometer hinsichtlich ihrer Reinheit analysiert.

Abbildung 3.13A zeigt den T-Zellerkennungstest der Subpopulationen, die aus den PBMC des Spenders 650 separiert wurden. Die CD14⁺ Monozyten riefen die stärkste Reaktion durch die T-Zell-Population 4D7 hervor. CD19⁺ B-Lymphozyten, CD3⁺ T-Zellen, sowie der Separations-Durchlauf und die Spender 650-EBV-B-Zelllinie wurden vergleichsweise schwach erkannt. Die 4D7-Lymphozyten reagierten somit gegen das polymorphe *PLAUR-317P*-Allel. **Abbildung 3.13B** zeigt die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse, in der die separierten Fraktionen hinsichtlich ihrer Reinheit untersucht wurden. In den Spender 650-PBMC vor Separation waren Monozyten mit einem Anteil von 9,6%, B-Lymphozyten mit 6,2 % und T-Lymphozyten mit 67,4 % vertreten. Den Ergebnissen der Analyse zufolge wurden aus den PBMC separierte B-Lymphozyten zu 72,7 %, Monozyten zu 75,2% und T-Lymphozyten zu 98,5% angereichert. Aus den Ergebnissen des Erkennungstest in Verbindung mit den Daten der durchflusszytometrischen Analyse wurde ersichtlich, dass hauptsächlich Monozyten erkannt wurden.

3.4.9 Quantifizierung der Expression von *PLAUR*-RNA in verschiedenen Zellspezies

In **Abschnitt 3.4.8** wurde gezeigt, dass die T-Zell-Population 4D7 die Spender 650-Monozyten erkannte. Nicht erkannt wurden hingegen Spender 332-Monozyten, MZ201-EBV-B- und Spender 332-EBV-B-Zellen. Durch eine Quantifizierung des *PLAUR*-Expressionslevels in diesen Zellen sollte eine Korrelation zwischen Expression von *PLAUR-317P* und T-Zellerkennung untersucht werden. In einer quantitativen PCR (siehe 2.2.1.4B) wurde in MZ201-AML, MZ201-EBV-B, Spender 332-PBMC, Spender 332-EBV-B, Spender 332-Monozyten, sowie Spender 650-PBMC, Spender 650-EBV-B und Spender 650-Monozyten das relative Verhältnis von *PLAUR*-RNA zu β -*Aktin*-RNA auf cDNA-Ebene bestimmt (**Abb. 3.14**).

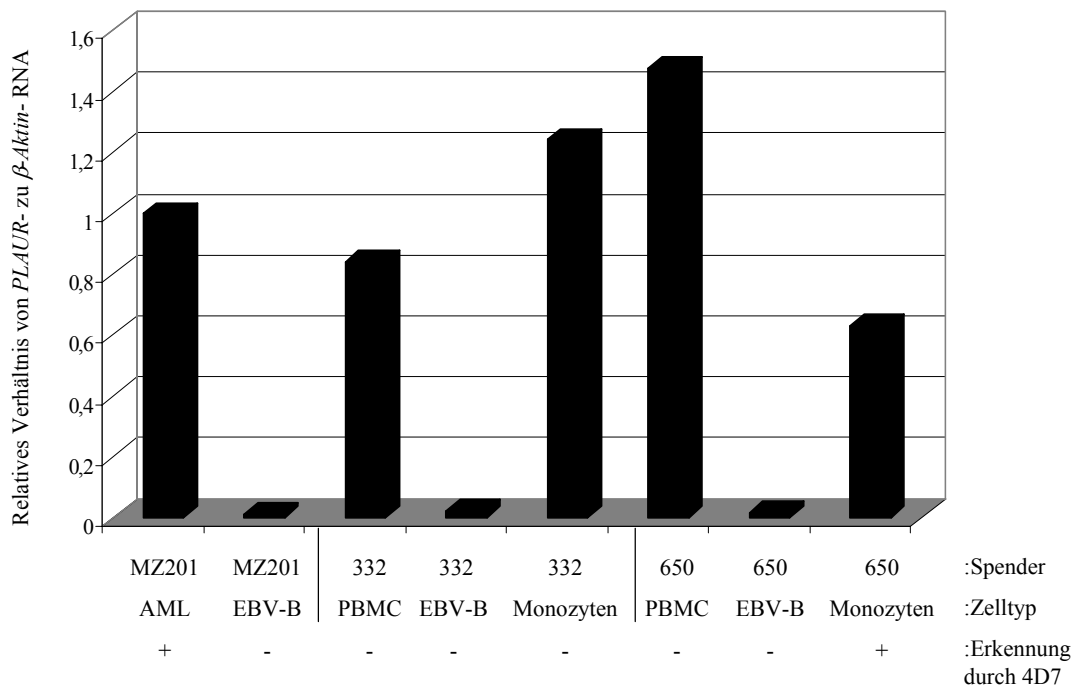


Abb. 3.14: *Quantitative Analyse der Expression von PLAUR.* In den angegebenen Zellspezies der Patientin MZ201 sowie der Spender 332 und 650 erfolgte die Quantifizierung von PLAUR-RNA relativ zu dem Haushaltsgen β -Aktin auf cDNA-Ebene (Details siehe 2.2.1.4B). Schematisch wird die Erkennung der jeweiligen Zellen durch 4D7-Lymphozyten angegeben.

Wie schon unter **Abschnitt 3.4.8** beschrieben unterscheiden sich die im Vergleich zur Patientin HLA-identen Spender 332 und 650 in ihrer PLAUR-Allelie. Die Zellen des Spenders 332 waren homozygot für das Allel *PLAUR-317L*, die Zellen des Spenders 650 hingegen waren heterozygot für das *PLAUR-317P*-Allel. Sowohl PBMCs als auch Monozyten wiesen zu MZ201-AML-Zellen vergleichbare PLAUR-Expressionslevel auf. 4D7-Lymphozyten erkannten die Zellen des Spenders 332 nicht, sie reagierten jedoch gegen Spender 650-PBMC und Spender 650-Monozyten, die das immunogene *PLAUR-317P*-Allel trugen (siehe **Abschnitt 3.4.8**). Im Vergleich zu MZ201-AML-Zellen wiesen EBV-B-Zelllinien nur ein geringes PLAUR-Expressionslevel auf. Dies korreliert mit dem Ergebnis, dass diese nur schwach durch 4D7-Lymphozyten erkannt wurden (siehe **Abb. 3.13A**).

3.4.10 Prozessierung des PLAUR-317P-Peptids in dendritischen Zellen (DCs)

Im Folgenden wurde untersucht, ob das PLAUR-317P-Peptid in dendritischen Zellen (DCs) prozessiert und in ausreichender Menge für die Erkennung durch T-Zellen auf deren Oberfläche präsentiert wird. Aus plastikadhärenten Monozyten des Spenders 332, der homozygot für *PLAUR-317L* waren, wurden Fast-DCs generiert (siehe 2.2.2.5E), die im Anschluss mit *in vitro*-transkribierter mRNA (IVT-mRNA) von *PLAUR-317P* transfiziert wurden. Der Test auf Erkennung durch die T-Zell-Population 4D7 erfolgte mittels eines IFN- γ -ELISPOT-Assays.

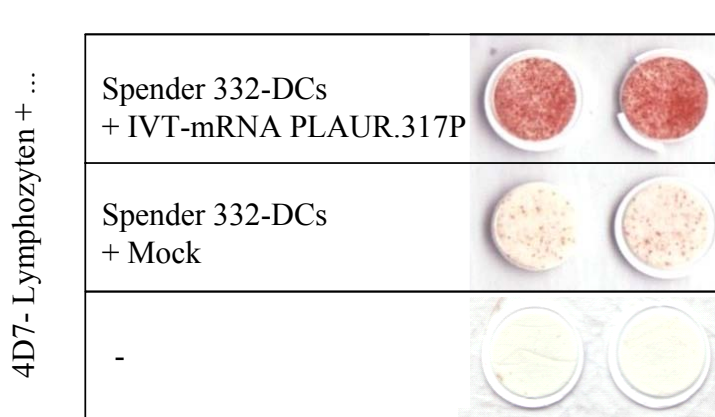


Abb. 3.15: *Prozessierung des PLAUR-317P-Peptids in DCs.* Aus plastikadhärenten Monozyten des Spenders 332 generierte Fast-DCs wurden mit IVT-mRNA von PLAUR-317P transfiziert (siehe 2.2.2.3B). Transfizierte Fast-DCs (15.000 Zellen/TE) wurden auf Erkennung durch 4D7-Lymphozyten (5.000 Zellen/TE) mittels eines 24h-IFN- γ -ELISPOT-Assays getestet. Mock-transfizierte Fast-DCs des gleichen Spenders dienten als Kontrolle.

Abbildung 3.15 zeigt die starke Reaktivität von 4D7-Lymphozyten gegen mit *PLAUR-317P* transfizierten DCs. Mock-transfizierte DCs des gleichen Spenders wurden nur schwach erkannt. Dieses Ergebnisse lies den Schluss zu, dass das *PLAUR-317*-Peptid durch das Immunproteasom der DCs generiert und somit durch professionell antigen-präsentierende Zellen für die Erkennung durch T-Zellen präsentiert wird.

3.5 Identifizierung und Charakterisierung des Zielantigens der AML-reaktiven T-Zell-Population 1C6 im Leukämie-Modell MZ201-AML / Spender 332

3.5.1 Screening der MZ201-AML cDNA-Bank und Identifizierung antigenkodierender cDNA

Das zweite „Screening“ der cDNA-Bank der Patientin MZ201-AML wurde mit der *HLA-A*0201*-restringierten T-Zell-Population 1C6 durchgeführt. Dazu wurde *HLA-A*0201*-cDNA zusammen mit der cDNA der 100-fach Pools 1-996 der cDNA-Bank in COS-7-Zellen kotransfiziert und auf Erkennung durch die T-Zell-Population 1C6 im IFN- γ -ELISPOT-Assay getestet. Nach Identifizierung des positiven Pools **250** erfolgte die schrittweise Subklonierung und Testung von 10-fach cDNA-Pools und cDNA-Klonen auf die gleiche Weise, wie im **Abschnitt 3.4** beschrieben. Auf diese Art wurde der cDNA-Klon **#250.8.21** identifiziert, der nach Kotransfektion mit *HLA-A*0201* in COS-7-Zellen eine starke IFN- γ -Antwort der T-Zell-Population 1C6 hervorrief (**Abb. 3.16C**).

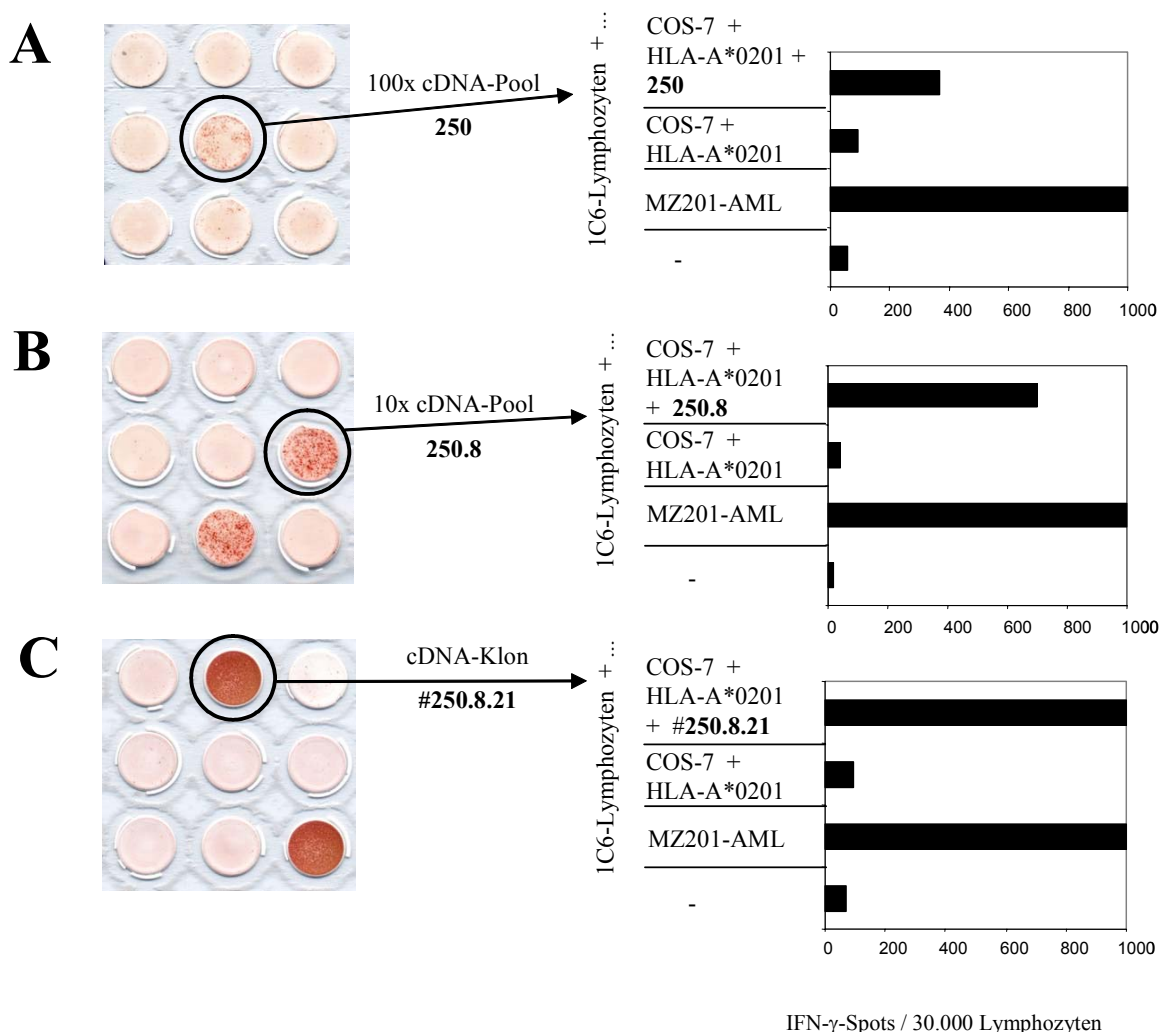


Abb. 3.16: Identifizierung eines T-Zell-erkannten cDNA-Klons aus der cDNA-Bank von MZ201-AML durch cDNA-Expressionsklonierung mit Hilfe der T-Zell-Population 1C6 (*d56+5). **(A)** Ausschnitt aus der ELISPOT-Platte des Expressionsscreenings des 100er cDNA-Pools 201 - 296 und dem positiven Pool 250. **(B)** Ausschnitt der ELISPOT-Platte mit den getesteten 10er Pools, die aus Pool 250 hergestellt wurden und dem positiven Pool 250.8. **(C)** Ausschnitt aus der ELISPOT-Platte mit den getesteten Klonen, hergestellt aus dem 10er Pool 250.8. Das Ergebnis für #250.8.21 (Klon 21) wird gezeigt. Durchgehend werden Daten von 24h-IFN- γ -ELISPOT-Assays gezeigt, in denen jeweils COS-7-Zellen (20.000 Zellen/TE) mit HLA-A*0201-cDNA (100 ng/TE) und cDNA-Pools bzw. cDNA-Klonen (300 ng/TE) transfiziert wurden. Transfektanten wurden auf Erkennung durch jeweils 1C6-Lymphozyten (30.000 Zellen/TE) getestet. Unter A - D sind rechts neben den Originalfilterscans die zugehörigen Auswertungen mittels Computer-assistierter Videoimage-Analyse abgebildet. Gezeigt werden die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Die Reaktivitäten gegen die MZ201-AML-Zellen (50.000 Zellen/TE) sowie unter (C) gegen den Klon #250.8.21 war so stark, dass die Anzahl der IFN- γ -Spots ($> 10^3$) nicht gemessen werden konnte.

Die *HLA-A*0201*-abhängige Erkennung des cDNA-Klons #250.08.21 wurde demonstriert, indem *HLA-A*0201* zusammen mit dem cDNA-Klon #250.8.21 in COS-7-Zellen kotransfiziert wurde. Der Test auf Erkennung durch 1C6-Lymphozyten erfolgte im Vergleich zu einem Ansatz, in dem der cDNA-Klon #250.8.21 ohne *HLA-A*0201* in COS-7-Zellen transfiziert wurde.

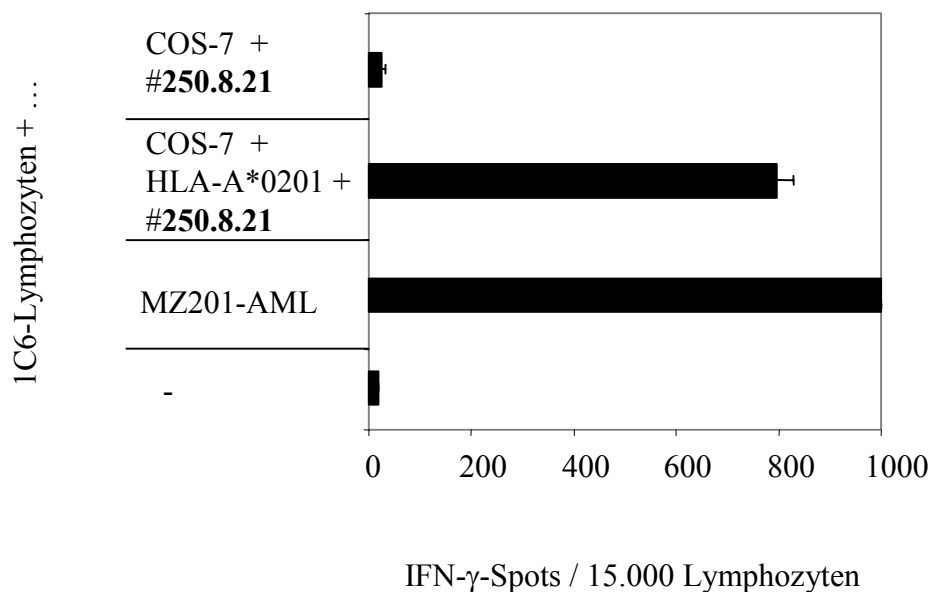


Abb. 3.17: *HLA-A*0201*-abhängige Erkennung des cDNA-Klons #250.8.21. COS-7-Zellen (20.000 Zellen/TE) wurden mit *HLA-A*0201* (100 ng/TE) und cDNA-Klon #250.8.21 (300 ng/TE) kotransfiziert. Sowohl die Transfektionsansätze als auch MZ201-AML-Zellen (50.000 Zellen/TE) wurden mit 15.000 1C6-Lymphozyten/TE auf Erkennung getestet. Gezeigt sind die Daten eines 24h-IFN- γ -ELISPOT-Assays. Sie entsprechen Mittelwerten von Doppelbestimmungen.

Abbildung 3.17 zeigt die *HLA-A*0201*-abhängige Erkennung des cDNA-Klons #250.8.21 durch die T-Zell-Population 1C6. Nur die Kotransfektion von *HLA-A*0201* führte zur T-Zellerkennung.

3.5.2 Die T-Zell-Population 1C6 erkennt eine Spleissvariante des Chemokine Ligand 3 (*CXCL3*) in Assoziation mit *HLA-A*0201*

Nach kompletter Sequenzierung des 1218 bp großen cDNA-Klons #250.8.21 und Vergleichsanalyse mit Hilfe der Internetdatenbank *BLAST*, wurde eine Homologie zu der veröffentlichten Sequenz des Chemokine Ligand 3 (*CXCL3*) festgestellt. Das *CXCL3*-Gen wurde erstmalig 1990 beschrieben [HASKILL *ET AL.*, 1990]. Die Analyse der Sequenz ergab,

dass 365 bp zur veröffentlichten *CXCL3*-Sequenz (NCBI-Accession-Nr. NM_002090) homolog waren, während die übrigen 751 Basen unvollständig gespleissten Intronsequenzen der genomischen *CXCL3*-Sequenz entsprachen. Der cDNA-Klon enthielt die vollständigen Sequenzen der Exons 1, 2 und 3, sowie der Introns 1 und 2. Intron 3 hingegen war nur unvollständig vorhanden und Exon 4 fehlte völlig. Im Folgenden wird der cDNA-Klon #250.8.21 als *CXCL3*-Spleissvariante bezeichnet. **Abbildung 3.18** stellt schematisch das *CXCL3*-Gen und die *CXCL3*-cDNA-Sequenz der *CXCL3*-Spleissvariante, gegenüber.

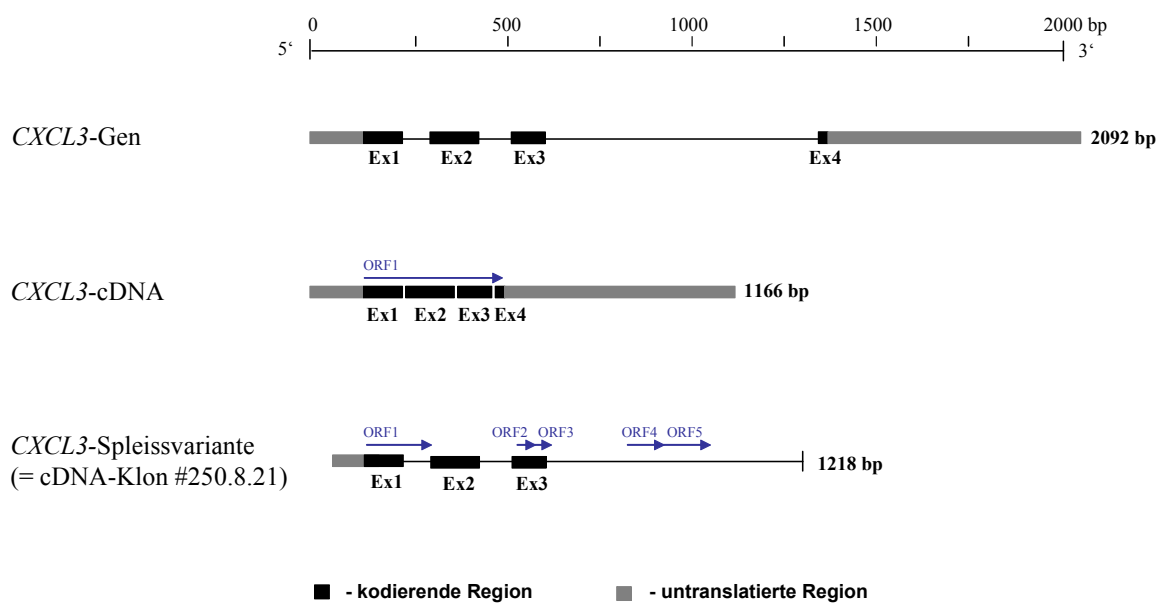


Abb. 3.18: Schematische Gegenüberstellung des *CXCL3*-Gens (Referenz in der NCBI-Datenbank: GI:89161207) und der *CXCL3*-mRNA (Referenz in der NCBI-Datenbank: NM_002090) im Vergleich mit der *CXCL3*-Spleissvariante (cDNA-Klon #250.8.21). Bei der *CXCL3*-cDNA und der *CXCL3*-Spleissvariante wurden die open reading frames (ORFs) angegeben..

Abbildung 3.18 zeigt, dass *CXCL3*-cDNA einen offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF) besitzt, wohingegen die identifizierte *CXCL3*-Spleissvariante durch das inkomplette Spleissen der Introns fünf Leserahmen (*open reading frames*, ORFs) gewinnt (siehe **Anhang 2**).

3.5.3 Eingrenzung der peptidkodierenden Region auf der cDNA der CXCL3-Spleissvariante

Die Eingrenzung der peptidkodierenden Region auf der cDNA der CXCL3-Spleissvariante erfolgte durch die Generierung kürzerer Fragmente mittels PCR unter Verwendung spezifischer Primer (siehe 2.1.11F). Die Fragmente wurden nach Amplifikation in den Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-HisTOPO kloniert (siehe 2.2.1.6C) und in *Escherichia coli* TOP10 transformiert (siehe 2.2.16O). Die Fragmente wurden nach Überprüfung der Sequenzen zusammen mit *HLA-A*0201* in COS-7-Zellen kotransfiziert. Die Transfektanten wurden mittels des IFN- γ -ELISPOT-Assays (siehe 2.2.2.1) auf Erkennung durch die T-Zell-Population 1C6 überprüft. Zunächst wurden die ORFs 1 - 5 der CXCL3-Spleissvariante kloniert (**Abb. 3.19A**). Im Anschluss folgte die schrittweise Verkürzung vom 3'-Ende des cDNA-Klons #250.8.21 (**Abb. 3.19B**).

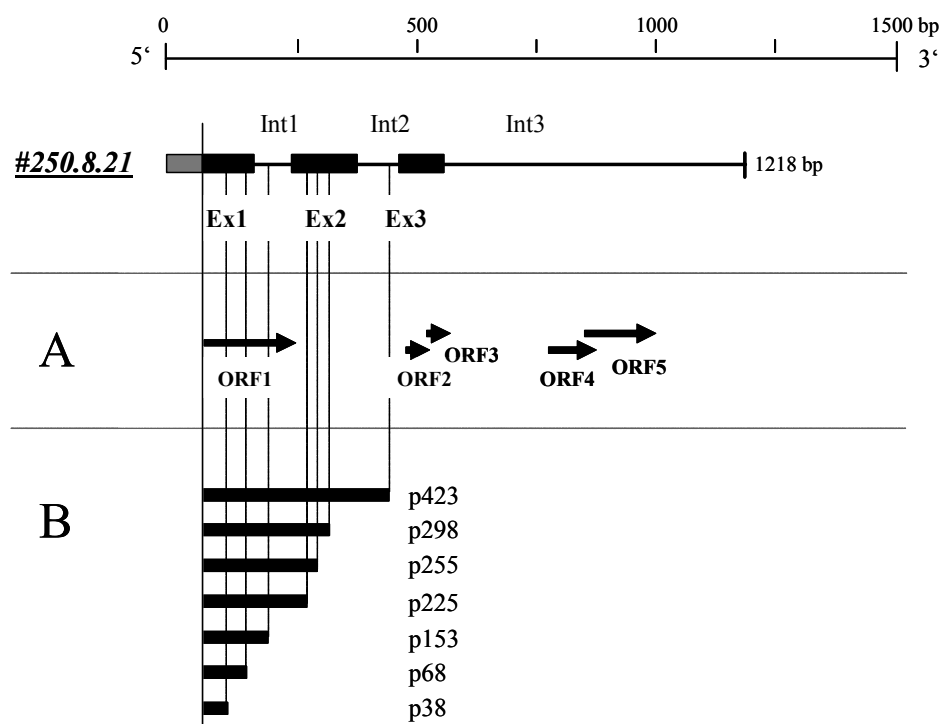


Abb. 3.19: Generierung von Fragmenten des cDNA-Klons #250.8.21, einer CXCL3-Spleissvariante (A) Mittels PCR wurden die ORFs 1 - 5 amplifiziert (B) Der cDNA-Klon #250.8.21 wurde schrittweise vom 3'-Ende verkürzt. Die Fragmente wurden in den Vektor pcDNA3.1/V5-His TOPO kloniert und durch Sequenzierung überprüft. Die Benennung der Klone bezieht sich auf die jeweils letzte Nukleinsäureposition in der amplifizierten Nukleotidsequenz.

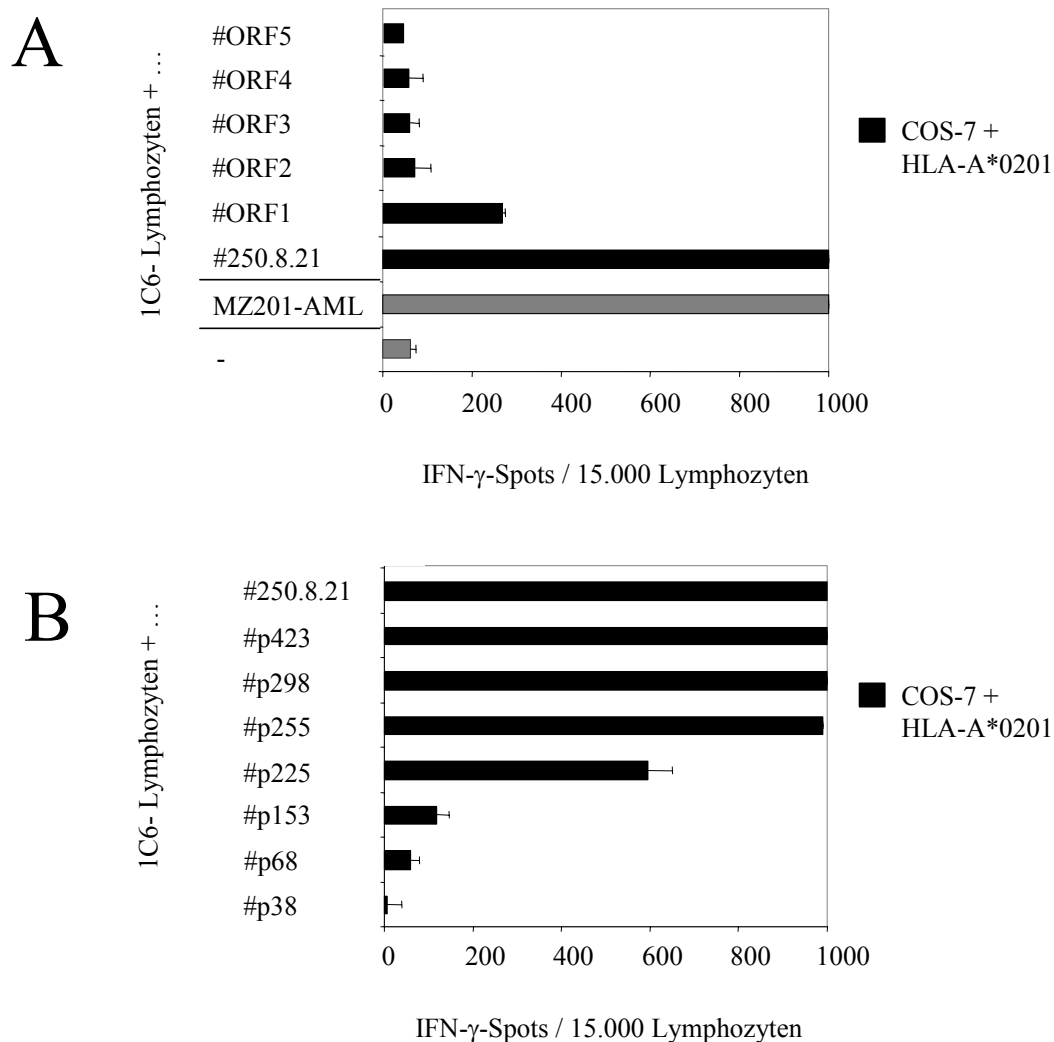


Abb. 3.20: *Testung von Fragmenten der CXCL3-Spleissvariante (#250.8.21) auf Erkennung durch 1C6-Lymphozyten.* Die Fragmente (siehe **Abb. 3.19**; 300 ng/TE) wurden zusammen mit HLA-A*0201 (100 ng/TE) in COS-7-Zellen (20.000 Zellen/TE) kotransfiziert und mittels IFN- γ -ELISPOT-Assay auf Erkennung durch 1C6-Lymphozyten (15.000 Zellen/TE) getestet. **(A)** Testung der ORF-Fragmente des cDNA-Klons #250.8.21 im Vergleich mit dem Klon #250.8.21 voller Länge und MZ201AML-Zellen. **(B)** Testung der 3'-verkürzten Fragmente des cDNA-Klons #250.8.21 im Vergleich mit dem Klon #250.8.21 voller Länge. Gezeigt werden Mittelwerte aus Doppelbestimmungen eines 24h-IFN- γ -ELISPOT-Assays.

Abbildung 3.20A zeigt, dass lediglich das Fragment #ORF1 durch 1C6-Lymphozyten erkannt wurde. Die Fragmente #ORF 2 - 5 wurden nicht erkannt, womit diese als peptidkodierende Regionen ausgeschlossen wurden. Die Testung der vom 3'-Ende des cDNA-Klones #250.8.21 verkürzten Fragmente (**Abb. 3.20B**) zeigte bis zum cDNA-Fragment #225 eine starke Erkennung durch 1C6-Lymphozyten. Kleinere cDNA-Fragmente, die nur Exon 1- und Intron 1-Sequenzen enthielten, wurden sehr schwach bzw.

nicht erkannt. Im Folgenden sollte die Relevanz der Intron 1-Sequenz für die Erkennung des cDNA-Klons #250.8.21 untersucht werden.

3.5.4 T-Zellerkennung von regulär gespleisstem *CXCL3*

Die mögliche Relevanz des Introns 1 für die Bildung des immunogenen *CXCL3*-Peptids sollte anhand eines regulär gespleissten *CXCL3*-Klons, der keine Introns enthielt, überprüft werden. Aus cDNA von Rückenmarksgewebe des *Human RNA Master Panel Kits* (Clontech) und MZ201-AML-Zellen wurde mittels RT-PCR und eines für Exon 4 spezifischen Revers-Primers (siehe 2.1.11F) *CXCL3* amplifiziert. Die sequenzierten cDNA-Klone *CXCL3#6* und *CXCL3#14* waren untereinander identisch und homolog zur Sequenz der gespleissten *CXCL3*-mRNA der NCBI-Datenbank (Referenz: NM_002090). Die Klone enthielten die Exons 1 bis 4, jedoch keine Introns. Für eine Vergleichsanalyse wurden die cDNA-Klone #250.8.21 und hier *CXCL3#6* mit *HLA-A*0201* in COS-7-Zellen kotransfiziert und mittels eines IFN- γ -ELISPOT-Assays auf Erkennung durch die T-Zell-Population 1C6 getestet.

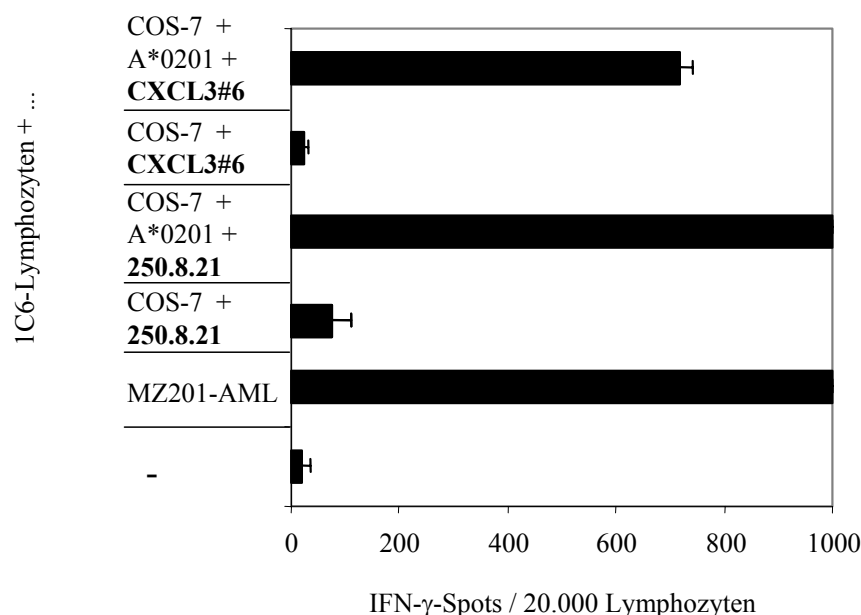


Abb 3.21: Relevanz des Intron 1 für die T-Zellerkennung des cDNA-Klons #250.8.21. Die Untersuchung erfolgte im Vergleich zu regulär gespleisstem *CXCL3*, das keine Introns enthielt. Aus cDNA von Rückenmarksgewebe des *Human RNA Master Panel Kits* (Clontech) wurde *CXCL3* amplifiziert und in den Vektor pcDNA3.1/V5-His TOPO kloniert. cDNA (300 ng/TE) des sequenzierten Klons *CXCL3#6* und des Klons #250.8.21 wurden zusammen mit *HLA-A*0201*-cDNA (100 ng/TE) in COS-7-Zellen (20.000 Zellen/TE) kotransfiziert und auf Erkennung durch 1C6-Lymphozyten (20.000 Zellen/TE) in einem 24h-IFN- γ -ELISPOT-Assay getestet. Die gezeigten Daten entsprechen Mittelwerten aus Doppelbestimmungen.

Abbildung 3.21 zeigt, dass der cDNA-Klon CXCL3#6, der keine Introns enthielt, vergleichbar gut erkannt wurde wie der cDNA-Klon #250.8.21. Aus diesem Ergebnis wurde gefolgert, dass Intron 1 für die Erkennung keine Rolle spielte. Alle folgenden Untersuchungen zur Eingrenzung des peptidkodierenden Bereiches wurden daher am cDNA-Klon CXCL3#6 bzw. dem äquivalenten Klon CXCL3#14, der aus MZ201-AML-Zellen mittels RT-PCR isoliert wurde, vorgenommen.

3.5.5 Eingrenzung der peptidkodierenden Region auf der CXCL3#14-cDNA

Zur Eingrenzung der peptidkodierenden Region wurden neue Fragmente vom 3'-Ende der CXCL3#14-cDNA generiert. Die Fragmentierung erfolgte ab Position 42 der Aminosäuresequenz. Mit Hilfe spezifischer Primer (siehe 2.1.11F) wurden die Fragmente aus cDNA von MZ201-AML-Zellen amplifiziert und in den Vektor pcDNA3.1/V5-His TOPO ligiert (siehe 2.2.1.6C). Die cDNA der sequenzierten Klone wurden zusammen mit *HLA-A*0201* in COS-7-Zellen kotransfiziert und im Vergleich auf Erkennung durch 1C6-Lymphozyten im IFN- γ -ELISPOT-Assay (siehe 2.2.2.1) getestet.

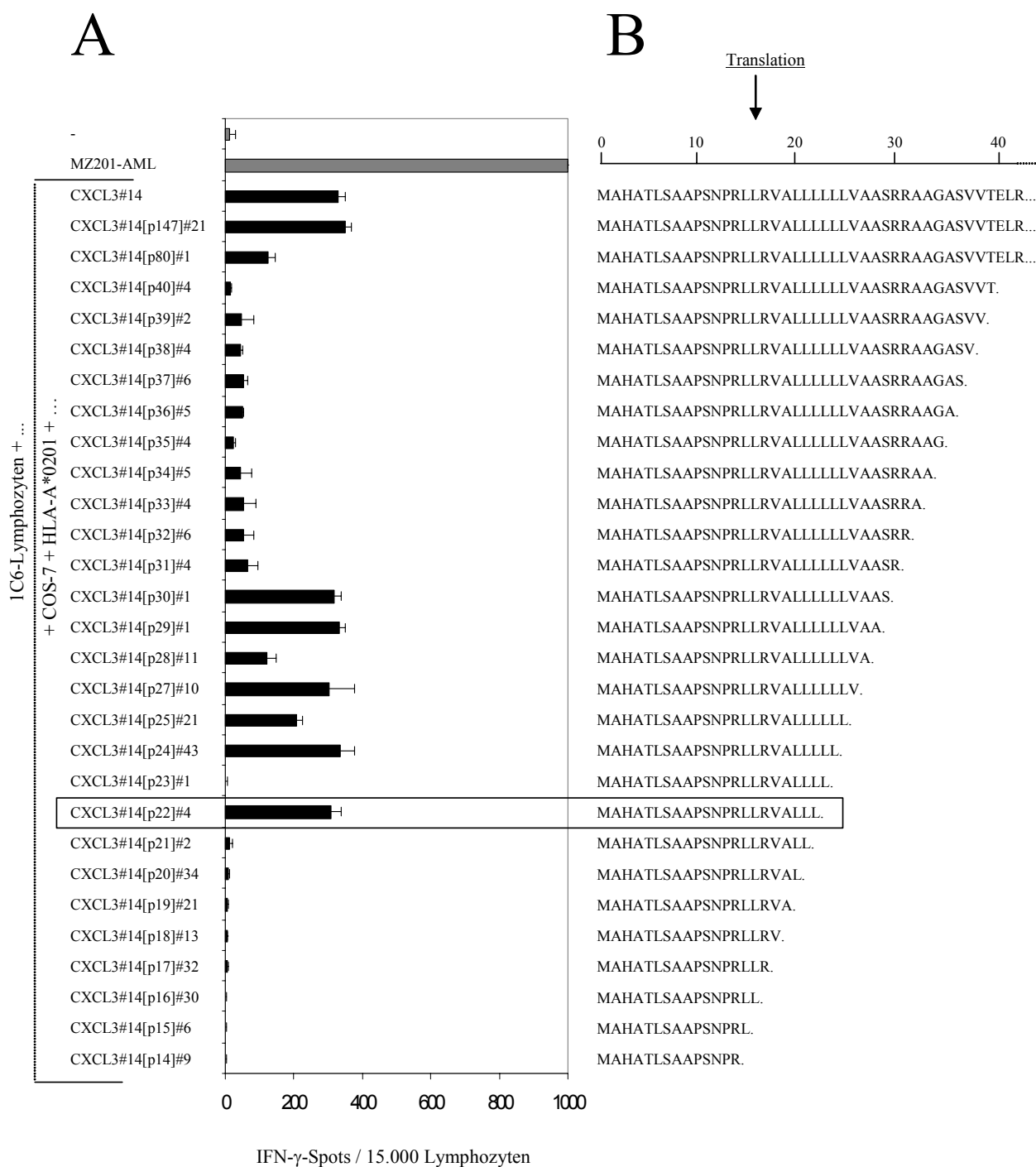


Abb 3.22: *Testung von 3'-Fragmenten von CXCL3#14 auf Erkennung durch IC6-Lymphozyten. Die Fragmente waren in den Vektor pcDNA3.1/V5-His TOPO kloniert worden (siehe 2.2.1.6C) (A) Die cDNA-Fragmente (300 ng/TE) wurden zusammen mit HLA-A*0201 (100 ng/TE) in COS-7-Zellen (20.000 Zellen/TE) kotransfiziert und auf Erkennung durch IC6-Lymphozyten (15.000 Zellen/TE) getestet (siehe 2.2.2.1). Gezeigt sind die Daten eines 24h-IFN- γ -ELISPOT-Assays (Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen) (B) Gezeigt ist die deduzierte Aminosäuresequenz der CXCL3-Fragmente nach Translation, wobei die Sequenz der CXCL3#14-Klone [p147], [p80] und [p40] nicht vollständig angegeben wurde. Der Punkt nach der Aminosäuresequenz der übrigen Klone kennzeichnet den Translationsstop, durch das Einfügen eines STOP-Kodons während der Amplifikation der CXCL3-Fragmente (siehe 2.2.1.3). Die Aminosäuresequenz des letzten T-Zell-erkannten Fragmentes CXCL3#14[p22]#4 war Ausgangspunkt für die Suche nach möglichen Peptidkandidaten. [pxy]: letzte Nukleotidposition der 3'-deletierten Fragmente.*

Abbildung 3.22A zeigt, dass CXCL3-Fragmente bis zu einer Länge von 22 Aminosäuren unterschiedlich stark durch 1C6-Lymphozyten erkannt wurden. Für CXCL3-Klone, die eine Länge von weniger als 22 Aminosäuren aufwiesen, konnte keine Erkennung nachgewiesen werden. Ausgangspunkt für die unter **Abschnitt 3.5.7** beschriebene Suche nach möglichen Peptidkandidaten bildete die deduzierte Aminosäuresequenz des letzten T-Zell-erkannten Fragmentes CXCL3#14[p22]#4 (**Abb. 3.22B**).

3.5.6 T-Zellerkennung von CXCL1 und CXCL2

Aufgrund ihrer Sequenzhomologien zu CXCL3 sollte untersucht werden, ob CXCL1 und CXCL2 ebenfalls durch 1C6-Lymphozyten erkannt werden. Die Resultate sollten zusätzliche Erkenntnisse zu dem peptidkodierenden Bereich auf der CXCL3-cDNA liefern. **Abbildung 3.23** zeigt die Homologie von CXCL1 und CXCL2 im Vergleich mit CXCL3 auf Aminosäureebene.

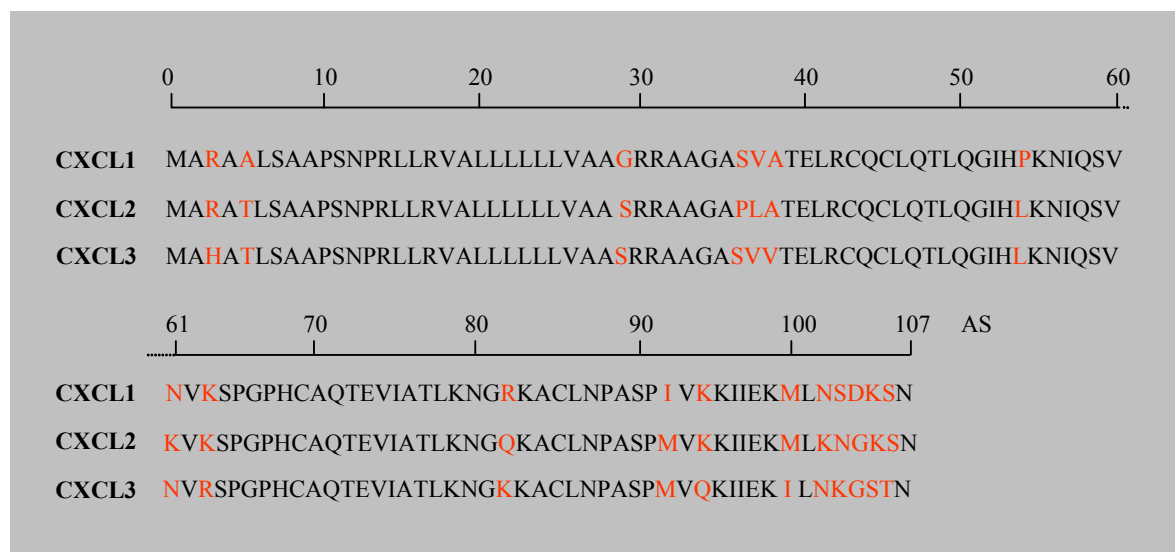


Abb. 3.23: Homologie von CXCL1 und CXCL2 im Vergleich zu CXCL3. Gezeigt ist jeweils die vollständige Aminosäuresequenz von CXCL1, -2 und -3. Nicht-homologe Aminosäuren sind rot gekennzeichnet. [Referenzsequenzen in der NCBI-Datenbank: für CXCL1 unter NM_002089.3; für CXCL2 unter NM_001511.1 und für CXCL3 unter NM_002090]

CXCL1- und CXCL2-cDNA wurden mittels spezifischer Primer (siehe 2.1.11F) aus cDNA von MZ201-AML-Zellen amplifiziert und im Anschluss in den Vektor pcDNA3.1/V5-His TOPO ligiert (siehe 2.2.1.6C). Die Transformation von *E. coli* TOP10, die DNA-

Präparation und die Überprüfung der cDNA-Klone erfolgte wie unter 2.2.1.60 beschrieben. Die cDNA der sequenzierten Klone CXCL1#7 und CXCL2#7 wurden zusammen mit *HLA-A*0201* in COS-7-Zellen kotransfiziert und im Vergleich zu CXCL3#14 auf Erkennung im IFN- γ -ELISPOT-Assay (siehe 2.2.2.1) getestet.

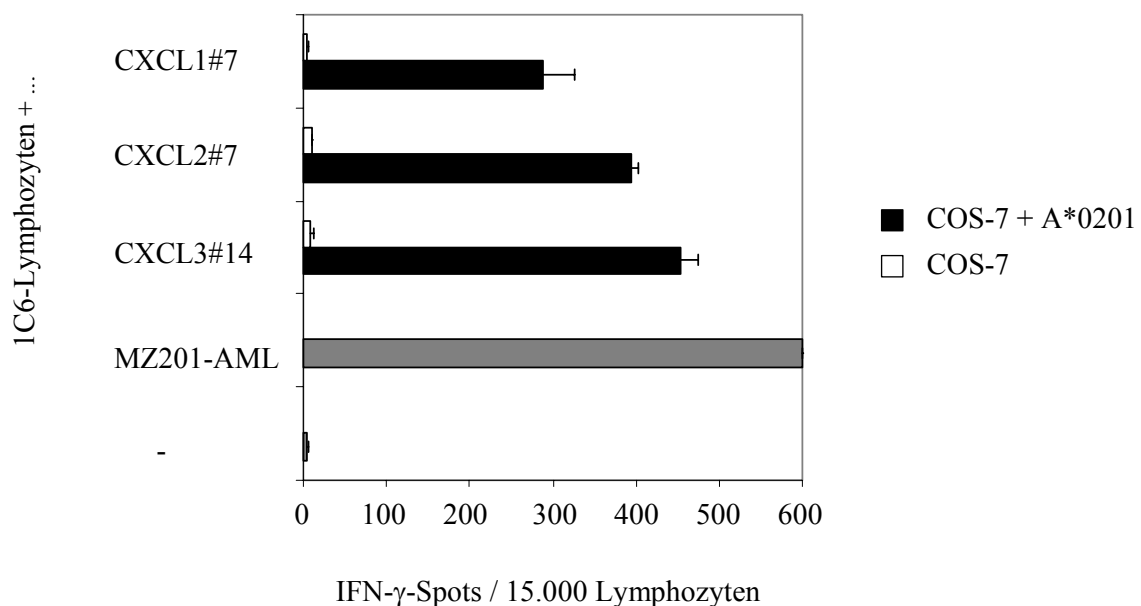


Abb 3.24: Erkennung von *CXCL1* und *CXCL2* durch 1C6-Lymphozyten. Aus cDNA von MZ201-AML-Zellen wurden *CXCL1* und *CXCL2* mittels spezifischer Primer amplifiziert und in den Vektor pcDNA3.1/V5-His TOPO kloniert. Die cDNA (300 ng/TE) der sequenzierten Klone CXCL2#7 und CXCL1#7 wurden jeweils zusammen mit *HLA-A*0201* (100 ng/TE) in COS-7-Zellen (20.000 Zellen/TE) kotransfiziert und im Vergleich zu CXCL3#14 auf Erkennung durch 1C6-Lymphozyten (15.000 Zellen/TE) in einem 24h-IFN- γ -ELISPOT-Assay getestet. Die Reaktivität gegen die MZ201-AML-Zellen war so stark, dass diese nicht ausgewertet werden konnte (> 600 Spots). Die Ergebnisse entsprechen Mittelwerten aus Doppelbestimmungen.

Abbildung 3.24 zeigt, dass die cDNA-Klone CXCL1#7 und CXCL2#7 vergleichbar gut erkannt wurden wie der cDNA-Klon CXCL3#14. Dies deutete darauf hin, dass das Peptid aus einem homologen Sequenzbereich der CXCL-Klone generiert wird. In **Abschnitt 3.5.5** wurde gezeigt, dass das kürzeste von 1C6-Lymphozyten erkannte CXCL3-Fragment die Aminosäuren 1 - 22 enthielt. Die vollkommene Sequenzhomologie im Bereich der Aminosäureposition 6 - 22 unterstützt die Vermutung, dass das Peptid innerhalb dieses Bereiches liegt.

3.5.7 Identifizierung des *HLA-A*0201*-restringierten CXCL3-Peptids

Für die Identifizierung von Peptidkandidaten wurde die frei zugängliche SYFPEITHI-Datenbank für MHC-Liganden und Peptid-Motive verwendet. Die Aminosäuren 1 - 22 des kürzesten T-Zell-erkannten Fragmentes (**Abb. 3.22B**) wurden in die Datenbank eingespeist. Für das Restriktionselement *HLA-A*0201* wurden sowohl für ein Dekam- als auch für ein Nonapeptid hohe Bindungswerte erzielt. Als Peptidkandidaten wurden schließlich das Dekamer PRLLRVALLL (Aminosäuren 13 - 22) sowie das Nonamer RLLRVALLL (Aminosäuren 14 - 22) zur Synthese in Auftrag gegeben. Die Testung der Peptide erfolgte zunächst mittels IFN- γ -ELISPOT-Assay (siehe 2.2.2.4). Als antigenpräsentierende Zellen wurden K562 verwendet, die mit synthetischen CXCL3-Peptiden in einem Konzentrationsbereich zwischen 10^2 - 10^{-4} μM beladen waren. Anschließend erfolgte die Analyse der Peptiderkennung durch die T-Zell-Population 1C6.

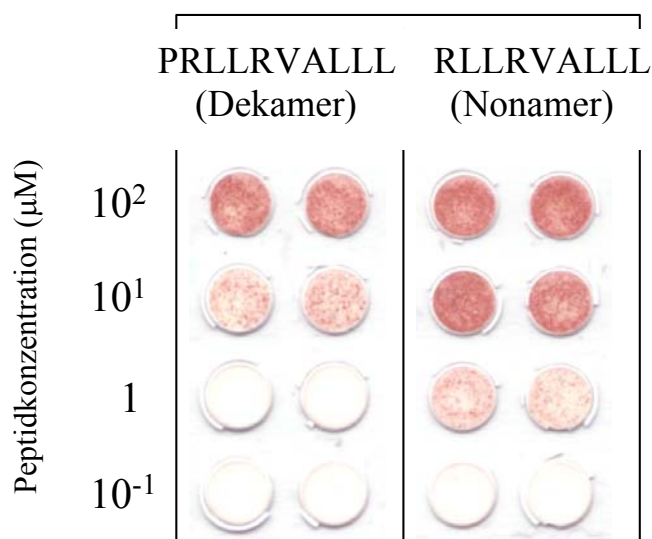


Abb. 3.25: Testung synthetischer CXCL3-Peptide auf Erkennung durch 1C6-Lymphozyten. Als antigenpräsentierende Zellen wurden K562 (50.000 Zellen/TE) eingesetzt, die stabil mit *HLA-A*0201* transfiziert waren. Die Zellen wurden mit titrierten Mengen an synthetischen CXCL3-Peptiden (10^2 - 10^{-10} μM) beladen und auf Erkennung durch die T-Zell-Population 1C6 (15.000 Lymphozyten/TE) in einem 24h-IFN- γ -ELISPOT-Assay getestet. Hier wird lediglich ein Ausschnitt des Erkennungstests für den Konzentrationsbereich von 10^2 - 10^{-1} gezeigt.

Abbildung 3.25 zeigt, dass sowohl das Dekamer PRLLRVALLL als auch das zugehörige Nonamer RLLRVALLL durch die T-Zell-Population 1C6 erkannt wurden. Erkennung war jedoch bestenfalls bis zu einer Konzentration von 1 μM nachweisbar. Die Erkennung dieser CXCL3-Peptide wurde auch im Zytotoxizitätsassay untersucht. Als antigenpräsentierende Zielzellen wurden auch hier stabil mit *HLA-A*0201*-transfizierte K562-Zellen verwendet, die zuvor mit $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ (100 μCi) markiert worden waren (siehe

2.2.2.4). Anschließend erfolgte deren Beladung mit titrierten Mengen an CXCL3-Peptiden in einem Konzentrationsbereich zwischen 10^2 - 10^{-10} μM .

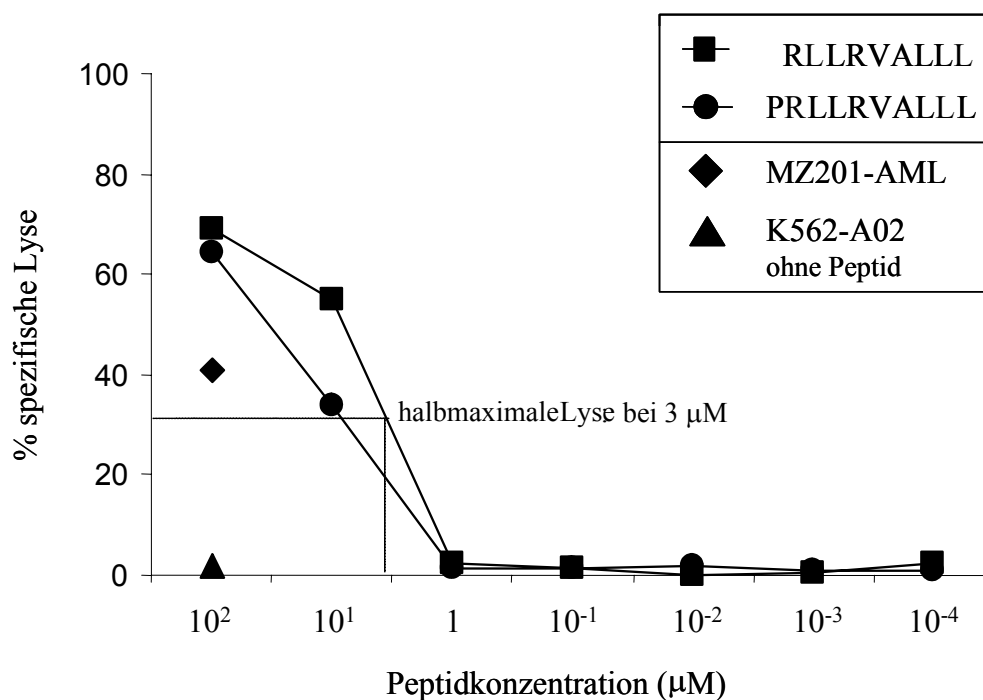


Abb. 3.26: Titration der CXCL3-Peptide. K562-A*0201-Zellen (2.000 Zellen/TE) wurden mit $\text{Na}^{(51}\text{Cr})\text{O}^4$ markiert, gewaschen, mit titrierten Mengen an CXCL3-Peptid (10^2 - 10^{-4} μM) beladen und mit 1C6-Lymphozyten bei einem Effektor- zu -Zielzell-Verhältnis von 10:1 getestet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen eines 4-stündigen ^{51}Cr -Freisetzungstests.

Abbildung 3.26 zeigt, dass sowohl die mit dem Nonapeptid RLLRVALLL als auch die mit dem Dekapeptid PRLLRVALLL beladenen Zielzellen K562-A*0201 bei einer Peptidkonzentration von 10^2 μM zu annähernd 70% lysiert wurden. Ab einer Peptidkonzentration von 1 μM war jedoch für keines der Peptide mehr spezifische Lyse nachweisbar. Das Nonapeptid RLLRVALLL wurde geringfügig besser durch 1C6-Lymphozyten erkannt, wobei die halbmaximale Lyse bei einer Peptidkonzentration von 3 μM erreicht wurde.

3.5.8 Prozessierung des immunogenen CXCL3-Peptids in dendritischen Zellen (DCs)

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob das immunogene CXCL3-Peptid in professionell Antigen-präsentierenden Zellen prozessiert und für die Erkennung durch T-Zellen in ausreichender Menge auf deren Oberfläche präsentiert wird. Dazu wurden DCs mit *in vitro*-transkribierter mRNA (IVT-mRNA) von CXCL3#6 durch Elektroporation transfiziert (siehe 2.2.2.3B) und auf Erkennung durch 1C6-Lymphozyten mittels IFN- γ -ELISPOT-Assay getestet (siehe 2.2.2.1). Fast-DCs wurden aus plastikadhärenten Monozyten des *HLA-A*0201*-positiven Spenders 332 generiert (siehe 2.2.2.5E).

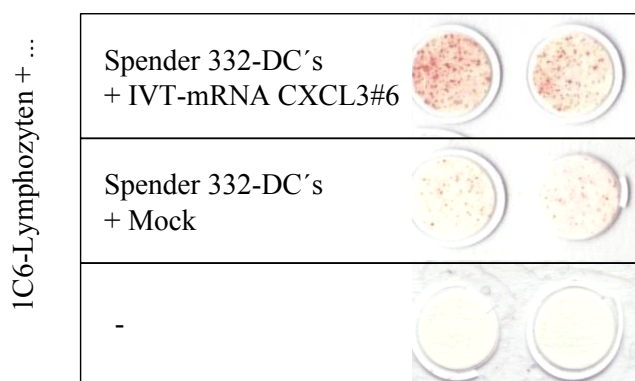


Abb. 3.27: Prozessierung des CXCL3-Peptids in DCs. Aus plastikadhärenten Monozyten des *HLA-A*0201*-positiven Spenders 332 generierte Fast-DCs (15.000 Zellen/TE) wurden mit IVT-mRNA von CXCL3#6 transfiziert und auf Erkennung durch 1C6-Lymphozyten (15.000 Zellen/TE) im IFN- γ -ELISPOT-Assay getestet. Als Kontrollansatz wurden Mock-transfizierte Fast-DCs mitgeführt.

Abbildung 3.27 zeigt die Erkennung von der mit CXCL3-IVT-mRNA transfizierten DCs durch 1C6-Lymphozyten. Mock-transfizierte DCs des gleichen Spenders wurden nur schwach erkannt. Durch diese Ergebnisse wurde geschlussfolgert, dass das CXCL3 -Peptid durch das Immunproteasom der DCs generiert und somit auch durch professionell antigenpräsentierende Zellen für die Erkennung durch T-Zellen präsentiert wird.

3.5.9 Expressionsanalyse von CXCL3 in verschiedenen Zellspezies

Für die Analyse der CXCL3-Expression wurden die AML-Zellen der Patienten MZ201, MZ418, MZ71, MZ70, sowie die mit Epstein-Barr Virus (EBV)-transformierte B-Zelllinien der Patienten MZ201 und MZ418, des Spenders 332, sowie PBMC des Spenders 332 ausgewählt. Kreuzreaktivitätsstudien hatten ergeben, dass die ausgewählten AML-Zellen durch 1C6-Lymphozyten ebenso gut erkannt wurden wie MZ201-AML-

Zellen [DISTLER ET AL, 2008]. EBV-B-Zelllinien und die PBMC des Spenders 332 wurden hingegen nicht durch 1C6-Lymphozyten erkannt [DISTLER ET AL, 2008]. Aus jeweils 5×10^6 Zellen wurde zunächst Gesamt-RNA (siehe 2.2.1.6L) präpariert und anschließend RT-cDNA (siehe 2.2.1.6M) hergestellt. Zur Vermeidung von DNA-Kontaminationen erfolgte zusätzlich ein DNase-Verdau [10 U/ μ l]. In einer PCR und unter Verwendung für Exon 4 bzw. Intron 3 spezifischer Revers-Primer (siehe 2.1.11F) erfolgte die Amplifikation des regulär gespleissten *CXCL3* bzw. der *CXCL3*-Spleissvariante aus cDNA der jeweiligen Zellen.

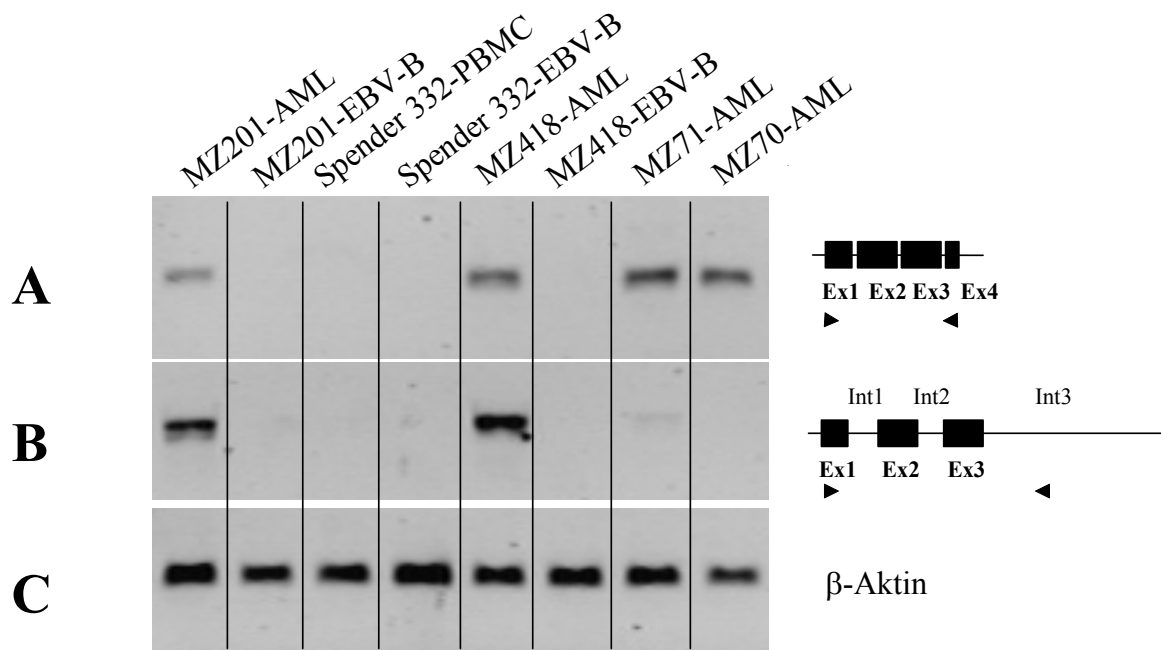


Abb. 3.28: Expressionsanalyse von *CXCL3* in verschiedenen Zellspezies. Aus RNA der angegebenen Zellen erfolgte in einer RT-PCR (A) die Amplifikation regulär gespleissten *CXCL3* mittels eines für Exon 4 spezifischen Revers-Primers und (B) die Amplifikation der *CXCL3*-Spleissvariante mittels eines für Intron 3 spezifischen Revers-Primers. (C) Zur Kontrolle der cDNA-Integrität wurde β -Aktin in einer parallel durchgeführten RT-PCR amplifiziert.

Abbildung 3.28A zeigt, das regulär gespleisstes *CXCL3* lediglich aus Malignomzellen amplifiziert werden konnte, nicht jedoch aus EBV-B-Zelllinien oder PBMC. Die *CXCL3*-Spleissvariante war nur aus MZ201-AML- und MZ418-AML-Zellen zu amplifizieren (**Abb. 3.28B**). Für die Kontrolle der cDNA-Integrität erfolgte in einem Parallelansatz die Amplifikation von β -Aktin (**Abb. 3.28C**). Anhand dieser Ergebnisse lässt sich zum einen schlussfolgern, dass die Zellen, die nicht durch 1C6-Lymphozyten erkannt werden, weder

CXCL3 noch die *CXCL3*-Spleissvariante exprimieren. Zum anderen wird aus diesem Ergebnis ersichtlich, dass eine Erkennung durch T-Zellen nicht notwendigerweise die Expression der *CXCL3*-Spleissvariante erfordert.

3.5.10 Expression von *CXCL3* in Normalgewebe

Die Analyse der *CXCL3*-Expression in Normalgewebe erfolgte durch Untersuchung von 20 verschiedenen Geweben des kommerziell verfügbaren *Human RNA Master Panel Kit* von Clontech. Gesamt-RNA der Gewebe-Proben wurde zunächst in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte in einer RT-PCR (siehe 2.2.1.6M) die Amplifikation von *CXCL3* unter Verwendung eines für Exon 4 spezifischen Revers-Primers (2.1.11F). Zur Kontrolle der cDNA-Qualität wurde in einer parallel durchgeführten PCR β -Aktin amplifiziert.

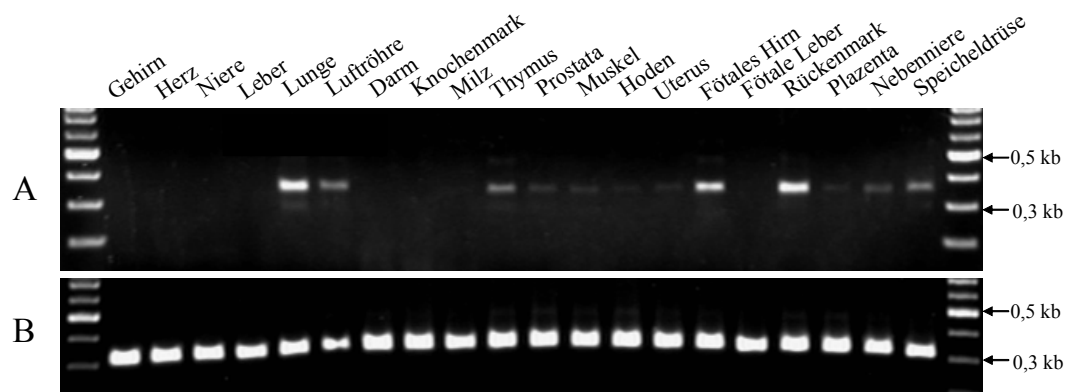


Abb. 3.29: Analyse der *CXCL3*-Expression in 20 verschiedenen Normalgeweben des *Human RNA Master Panel Kits* (Clontech). Aus Gesamt-RNA der angegebenen Gewebeprouben wurde cDNA hergestellt, worauf im Anschluss (A) die Amplifikation von *CXCL3* mittels eines für Exon 4 spezifischen Revers-Primers erfolgte. (B) Zur Kontrolle der cDNA-Qualität wurde in einer parallel durchgeführten PCR β -Aktin amplifiziert.

Abbildung 3.29A zeigt deutliche Amplifikate aus Lunge-, Fötalem Hirn und Rückenmark, sowie schwach aus Luftröhre, Thymus, Nebenniere und Speicheldrüse. Die Fragmentgröße von 0,35 kb stimmte mit der überein, die für vollständig gespleisstes *CXCL3* erwartet wurde. Nach Aufreinigung erfolgte die Sequenzierung und Analyse der PCR-Produkte aus Lungen- und Rückenmarksgewebe. Es handelte sich bei beiden PCR-Produkten um regulär gespleisstes *CXCL3* ohne Intronsequenzen. Das PCR-Produkt aus Rückenmarksgewebe wurde kloniert und führte nach Transfektion zu Erkennung durch 1C6-Lymphozyten (siehe

Abb. 3.21). Die hier erhaltenen Ergebnisse decken sich nur zum Teil mit dem unter <http://www.genecards.org/background.shtml> veröffentlichten CXCL3-Expressionsprofil in Normalgewebe. In Übereinstimmung mit dem veröffentlichten Profil wurde eine CXCL3-Expression in Lunge, Hirn und Rückenmark nachgewiesen, jedoch nicht in Knochenmark Niere, Herz oder Leber.

3.6 Erkennung von *PLAUR-317P* und *CXCL3* durch weitere T-Zell-Populationen

Mit dem folgenden Experiment sollte die Frage geklärt werden, ob weitere T-Zell-Populationen des Modells CXCL3 bzw. PLAUR-317P erkennen, bzw. ob die T-Zellen gegen CXCL3 bzw. PLAUR-317P zusätzliche HLA-Restriktions-Allele nutzen, die von MZ201-AML-Zellen exprimiert werden (siehe Promotionsarbeit Dr. Eva Distler, sowie **Abschnitt 2.2.2.5A** und **3.1**). Diese Fragestellungen wurden mit Hilfe von weiteren T-Zell-Populationen, die aus Spender 332 und 650 generiert wurden, untersucht. Es wurde überprüft, ob PLAUR-317P über *HLA-B*0801* bzw. die *Cw-Alle* und ob CXCL3 über *HLA-A*0102* durch eine der T-Zell-Populationen erkannt wird. Insgesamt wurden 11 aus dem Spender 332 und Spender 650 generierte T-Zell-Populationen getestet. Die in flüssigem Stickstoff gelagerten T-Zell-Populationen wurden 5 Tage vor dem Test rekultiviert und restimuliert (siehe 2.2.2.5C). Am Testtag wurden COS-7-Zellen mit *PLAUR-317P* (#1131.35.17) bzw. *CXCL3* (#250.8.21) zusammen mit den genannten HLA-Klasse I-Allelen kotransfiziert und auf Erkennung durch die T-Zell-Populationen mittels eines IFN- γ -ELISPOT-Assays (siehe 2.2.2.1) getestet.

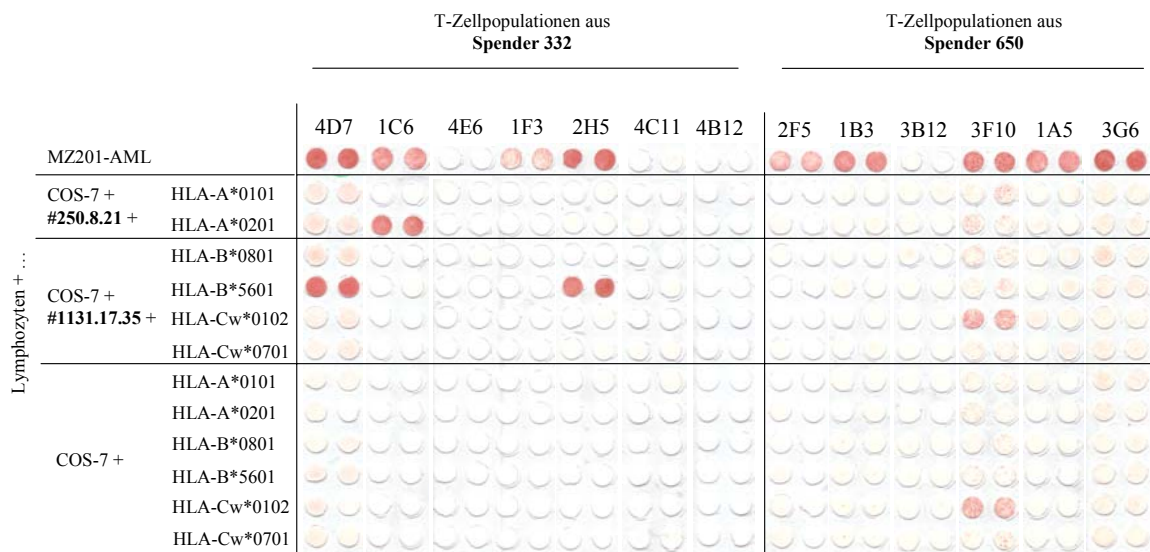


Abb. 3.30: Test hinsichtlich der Erkennung von *PLAUR-317P* und *CXCL3* durch T-Zell-Populationen aus Spender 332 und 650. COS-7-Zellen (20.000 Zellen/TE) wurden mit *PLAUR-317P* (#1131.17.35) bzw. *CXCL3* (#250.8.21) (300 ng/TE) und den angegebenen HLA-Klasse I-Allelen (100 ng/TE) kotransfiziert und auf Erkennung durch die T-Zell-Populationen (20.000 Zellen/TE) getestet. Gezeigt sind die Daten eines 24h-IFN- γ -ELISPOT-Assays. Die Ergebnisse entsprechen Mittelwerten aus Doppelbestimmungen.

Abbildung 3.30 zeigt den T-Zellerkennungstest der *PLAUR-317P*- und *CXCL3*-cDNA durch weitere aus Spender 332 und 650 generierte T-Zell-Populationen. Die aus Spender 332 generierte T-Zell-Population 2H5 erkannte *PLAUR-317P* in Assoziation mit *HLA-B*5601* vergleichbar gut wie 4D7-Lymphozyten. *PLAUR-317P* wurde von keiner der T-Zell-Populationen über ein anderes der HLA-B- bzw. HLA-C-Allele erkannt. Die aus Spender 650 generierte T-Zell-Population 3F10 zeigte eine relativ hohe Erkennung von COS-7-Zellen, die mit *HLA-Cw*0201* transfiziert waren. Möglicherweise erkennen sie ein xenogenes Peptid in Assoziation mit diesem HLA-Allel. Anhand dieser Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass die T-Zell-Populationen, die weder *CXCL3* noch *PLAUR-317P* erkennen, die Spezifität für andere Antigene aufweisen.

3.7 Expression von PLAUR-317P und CXCL3 auf B-Zellen nach Behandlung mit 2'-Aza-5'-Deoxycytidin (DAC)

Aus Arbeiten unter 2.2.2.5A geht hervor, dass MZ201-EBV-B-Zellen weder durch 4D7- noch durch 1C6-Lymphozyten erkannt werden (siehe **Abschnitt 3.4.9** und **3.5.9**). Es sollte herausgefunden werden, ob in MZ201-EBV-B-Zellen die Expression von PLAUR-317P und CXCL3 durch Demethylierung induziert werden kann. Dafür wurde 2'-Aza-5'-Deoxycytidin (DAC) eingesetzt. Als Inhibitor der DNA-Methyltransferase verhindert es die Neumethylierung von DNA in proliferierenden Zellen. Die Behandlung der MZ201-EBV-B-Zellen erfolgte nach CALLAGHER *ET AL.* mit 2 µg/ml DAC. An Tag 8 nach der Erstbehandlung erfolgte der Erkennungstest mit 1C6- bzw. 4D7-Lymphozyten.

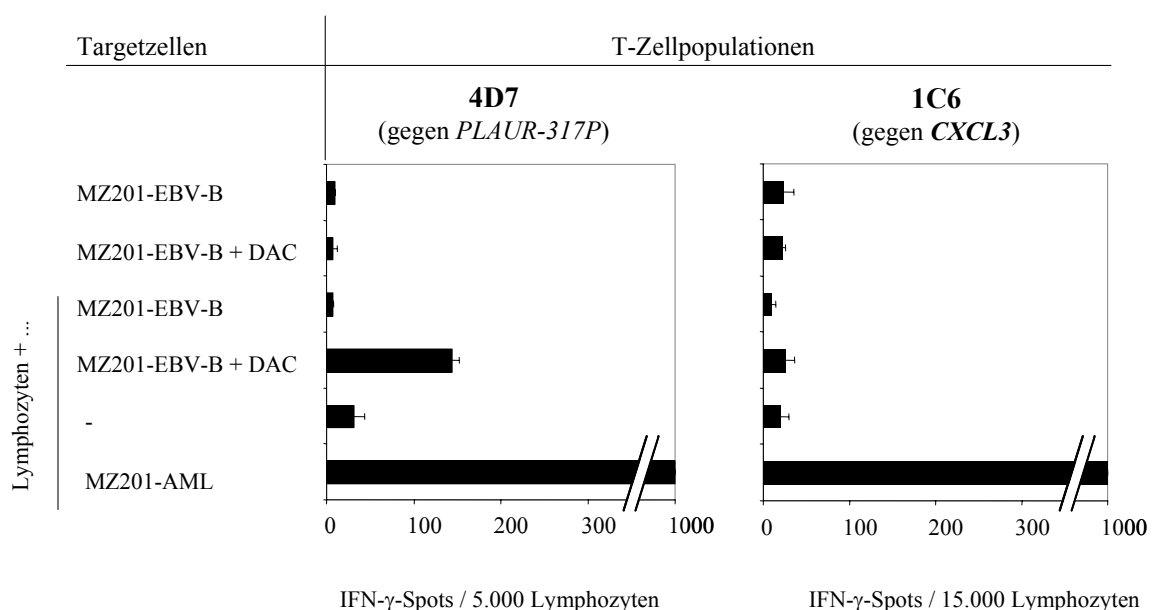


Abb. 3.31: T-Zellerkennung von MZ201-EBV-B-Zellen nach DAC-Behandlung. MZ201-EBV-B-Zellen wurden in RPMI 1640_{komplett} kultiviert, dem DAC (2 µg/ml) zugesetzt war [CALLAGHER *ET AL.*, 2005]. An Tag 8 nach der Erstbehandlung erfolgte der Test auf Erkennung durch 1C6- (15.000 Zellen/TE) bzw. 4D7-Lymphozyten (5.000 Zellen/TE) im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Gezeigt sind die Daten eines 24h-IFN-γ-ELISPOT-Assays. Sie entsprechen Mittelwerten aus Doppelbestimmungen. Die Reaktivität gegen die MZ201-AML-Zellen war so stark, dass die Anzahl der IFN-γ-Spots nicht ausgewertet werden konnte.

Abbildung 3.31 zeigt, dass DAC-behandelte MZ201-EBV-B-Zellen gegenüber unbehandelten durch 4D7-Lymphozyten erkannt wurden und demnach PLAUR-317P exprimierten. Auf die CXCL3-Expression hatte die DAC-Behandlung offensichtlich keinen Einfluss.

3.8 Sequenzanalyse der hypervariablen CDR3-Region der TCR-V β .17-Ketten der 1C6- und 4D7-Lymphozyten

DISTLER *ET AL.* zeigten in T-Zellrezeptoranalysen, dass 1C6- und 4D7-Lymphozyten klonal waren und beide die V β .17-Kette exprimierten. In vorliegender Arbeit sollte nun die Sequenzanalyse der hypervariablen CDR3-Region der jeweiligen TCR-V β .17-Kette erfolgen. Die Amplifikation erfolgte mittels PCR und unter Verwendung von Primern (siehe 2.1.11E), die spezifisch für konservierte Sequenzen innerhalb der CDR- (*complementarity determining region*)-kodierenden Region waren [PEGGS *ET AL.*, 2002]. Zur Kontrolle wurden willkürlich ausgewählte TCR-V β -Familien parallel amplifiziert (**Abb. 3.32A**). Für die Etablierung von optimalen PCR-Bedingungen erfolgte das Anlegen eines Gradienten für die Annealingtemperatur der verwendeten Primer (T_m °C).

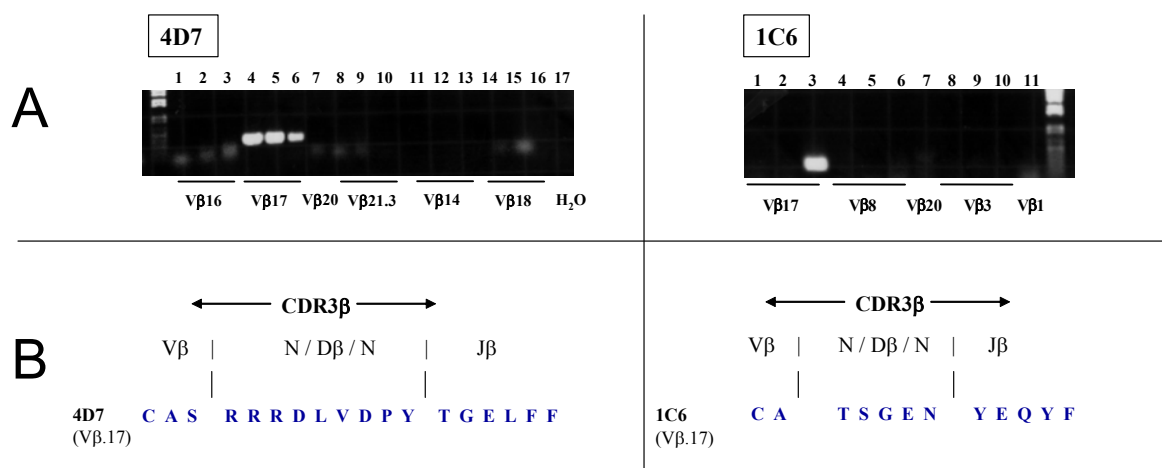


Abb. 3.32: Identifizierung der hypervariablen V β .17-Regionen der T-Zell-Populationen 1C6 und 4D7. **(A)** In einer Gradienten-PCR und unter Verwendung spezifischer Primer erfolgte die Amplifikation der TCR-Familie V β .17. Als Kontrolle wurden jeweils willkürlich ausgewählte TCR-V β -Familien amplifiziert. Durch das Anlegen eines Temperaturgradienten zwischen 60 - 72 °C wurden die optimalen PCR-Bedingungen für das Annealing der jeweiligen Primerpaare ausgetestet. Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt und sequenziert **(B)** Gezeigt wird die Aminosäuresequenz der variablen CDR3-Region der TZR-V β .17-Ketten von 4D7 und 1C6.

Abbildung 3.32A zeigt, dass lediglich für die jeweils amplifizierte TCR-Familie V β .17 Produkte erhalten wurden. Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt und sequenziert. Nach Einspeisung der Sequenzdaten in die Internet-Datenbank des *International ImmunoGeneTics Information Systems* wurden diese jeweils der TCR-Subfamilie V β .17

zugeordnet. **Abbildung 3.32B** zeigt die Aminosäuresequenz der hypervariablen CDR3 β -Region der jeweiligen V β .17-Kette. Das Analyseprogramm der Internet-Datenbank ordnete zudem die Aminosäuren dem jeweiligen Gensegment zu, von dem sie kodiert werden.

4 DISKUSSION

Das Ziel der hier vorgestellten Arbeit bestand in der Identifizierung und Charakterisierung von MHC Klasse-I-restringierten Minorhistokompatibilitätsantigenen und Leukämie-assoziierten Antigenen in Leukämiepatienten. Als Modell wurde für die vorliegende Arbeit die Akute Myeloische Leukämie vom Subtyp M5a der Patientin MZ201 gewählt. Dagegen gerichtete allogene T-Zellen waren aus Blut des unverwandten gesunden, und zum Patienten HLA-Klasse I-identen Spenders 332 generiert worden und standen dem Projekt zur Verfügung. Für die Identifizierung von Zielantigenen wurde das Verfahren der T-Zell-basierten cDNA-Expressionklonierung angewandt. Als Voraussetzung dafür wurden im Rahmen der Arbeit eine cDNA-Bank aus Leukämiezellen der Patientin MZ201 konstruiert und es wurden die HLA-Klasse I-Allele der Patientin in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert. Für das Screenen der cDNA-Bank wurden die kryokonservierten AML-reaktiven T-Zell-Populationen 4D7 und 1C6 verwendet, die durch Frau Dr. Eva Distler im Rahmen ihrer Promotionsarbeit generiert worden waren (III. Medizinische Klinik, Mainz, siehe **Abschnitt 2.2.2.5A**). Nach der Identifizierung T-Zell-erkannter Zielantigene erfolgt grundsätzlich deren nähere Charakterisierung. Dies beinhaltet die Identifizierung T-Zell-erkannter Peptide, die Expressionsanalyse in Tumor- und Normalgewebe, sowie bei mHAGs die Ermittlung der Häufigkeit ihres Auftretens in der Bevölkerung.

4.1 Identifizierung von MHC Klasse-I-restringierten Antigenen im Leukämie-Modell MZ201-AML / Spender 332

4.1.1 Charakterisierung des *HLA-B*5601*-restringierten Antigens PLAUR-317P

Aus den in **Abschnitt 2.2.2.5A** beschriebenen und bereits publizierten Arbeiten im Leukämie-Modell MZ201-AML [DISTLER *ET AL.*, 2008] ging hervor, dass *HLA-B*5601*-restringierte 4D7-Lymphozyten ausser MZ201-AML-Zellen in geringem Maße auch HLA-passende Monozyten erkennen. Durch cDNA-Expressionsklonierung mit 4D7-Lymphozyten wurde aus der MZ201-AML-cDNA-Bank ein cDNA-Klon isoliert, welcher

als #1131.17.35 bezeichnet wurde. Er kodiert für den *Urokinase Plasminogen Activator Receptor*, kurz *PLAUR*. Weitere Recherchen ergaben, dass es sich bei dem identifizierten cDNA-Klon um das genetisch polymorphe Allel *PLAUR-317P* des *PLAUR*-Gens handelte. In Übereinstimmung mit den Angaben der NCBI-Datenbank wurde gezeigt, dass 30% der 100 getesteten Individuen heterozygot und 3% homozygot für das Allel *PLAUR-317P* waren (siehe **Abschnitt 3.4.6**, www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref).

Das Gen *PLAUR* kodiert für ein 37 kDa grosses Molekül. *PLAUR* wurde auf dem Chromosom 19q13.31 lokalisiert und besteht aus sieben Exons und sechs Introns, die sich über 24 kb genomischer DNA erstrecken [Ensembl-Datenbank: Gen ENSG00000011422]. Die biologische Bedeutung von *PLAUR* ist die Bindung des *Urokinase Plasminogen Activators*, kurz *uPA*, und damit die zelloberflächengebundene Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin, welche in Folge einer proteolytischen Aktivität den Abbau der extrazellulären Matrix bedingt [PLESNER *ET AL.*, 1997]. Eine weitere Beteiligung von *PLAUR* wurde an Prozessen der Zellmigration, der Transmission extrazellulärer Signale durch die Zellmembran und der Tumorzellinvasion nachgewiesen [MAZAR, 2001; DE BOCK & WANG, 2004; SUBRAMANIAN *ET AL.*, 2006]. In der klinischen Diagnostik dient *PLAUR* als prognostischer Marker hämatologischer Erkrankungen wie z.B. den Akuten Myeloischen Leukämien vom Subtyp M5 und Multiplen Myelomen. Die Überexpression von *PLAUR* korreliert dabei mit einer schlechten Prognose dieser Erkrankungen [BÉNÉ *ET AL.*, 2004]. Bei Patienten mit Akuten Myeloischen Leukämien vom FAB-Subtyp M4 und M5 wurde eine leukämische Infiltration der Mundschleimhäute beobachtet [GALLIPOLI & LEACH, 2007]. Die aus Plasmazellen hervorgehenden Multiplen Myelome manifestieren sich zunächst in Knochenmark und Knochen, wobei im weiteren Krankheitsverlauf jedoch auch andere Organe betroffen sind. Die Infiltration extramedullärer Organe ist mit einer Überexpression von *PLAUR* in diesen Tumorzellen in Einklang zu bringen, da seine Beteiligung an der Tumorzellinvasion bereits vielfach belegt wurde [DE BOCK & WANG, 2004; SUBRAMANIAN *ET AL.*, 2006].

Das von CD8⁺ T-Zellen in Assoziation mit *HLA-B*5601* in niedrigster Konzentration erkannte *PLAUR*-Peptid enthält die Aminosäuren 316 - 324 (siehe **Abschnitt 3.4.5**). Für *HLA-B*5601*, welches in kaukasischer Bevölkerung eine Frequenz von weniger als 1% aufweist, sind bislang nur 3 Peptidliganden beschrieben worden [BARBER *ET AL.*, 1995]. Die Bestimmung der halbmaximalen Lyse wird zur Abschätzung der Avidität von T-Zellen gegenüber den Peptid-beladenen Zielzellen eingesetzt. Die Avidität einer T-Zelle wird teilweise bestimmt von der Affinität ihres T-Zellrezeptors für

dessen MHC-Ziel-Peptidkomplex, hängt aber auch beispielsweise von Adhäsionseigenschaften der jeweiligen T-Zelle ab. Hochavide T-Zellen benötigen für die halbmaximale Lyse Peptidkonzentrationen im picomolaren (pM) bis in den einstelligen nanomolaren (nM) Bereich [DERBY *ET AL.*, 2001]. Für das Dekamer SPTITLLMTA wurde eine halbmaximale Lyse bei 3,3 nM ermittelt. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass es sich bei dem Dekamer SPTITLLMTA um das natürlich prozessierte PLAUR-317P-Peptid handelt. In der Peptid-Datenbank der *Cancerimmunity*-Organisation werden lediglich Peptidantigene veröffentlicht, die bestimmte Kriterien erfüllen (<http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm>). Eines dieser Kriterien ist die deutliche Erkennung durch T-Zellen bei einer Peptidkonzentration von weniger als 1 μ M. Hinsichtlich dieses Kriteriums ist das dekamere PLAUR-317P-Peptid SPTITLLMTA als qualitativ hochwertig einzustufen, da es deutlich unterhalb dieser Konzentration durch T-Zellen erkannt wird (siehe **Abb. 3.9** und **Abb. 3.10**).

Die Charakterisierung des Antigens PLAUR-317P beinhaltete Untersuchungen zur Expressionsverteilung in Normalgeweben mittels RT-PCR. Dies sollte die Frage beantworten, ob die PLAUR-Expression Hämatopoese-spezifisch ist, oder ob das Gen ubiquitär exprimiert wird. Die Untersuchung von kommerziell verfügbaren RNA-Proben aus 20 verschiedenen Geweben ergaben jedoch keine eindeutigen Resultate. Die höchste Expression von PLAUR wurde zwar im Knochenmark nachgewiesen, dem Profil zufolge schien PLAUR jedoch in jedem der untersuchten Gewebe exprimiert zu werden (siehe **Abschnitt 3.4.7**). Dies schien mehr als unwahrscheinlich. Nach persönlicher Mitteilung von Andrew Mazar des Attenuon Corporate Office (San Diego, US) wird PLAUR lediglich in Histozyten und Neutrophilen, jedoch nicht in Normalgeweben oder Lymphozyten exprimiert. Eine weitere Quelle berichtet über eine PLAUR-Expression lediglich in Leukozyten [PLESNER *ET AL.*, 1997]. In der vorliegenden Arbeit wurden nun verschiedene Zellen des hämatopoetischen Systems auf eine Expression von PLAUR untersucht. Aus den peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMC) wurden die Subpopulationen Monozyten, B- und T-Lymphozyten separiert. Es wurde gezeigt, dass PLAUR neben AML-Blasten auch von Monozyten exprimiert wird (siehe **Abschnitt 3.4.8**). Dass PLAUR nicht in Lymphozyten exprimiert wird, konnte hier bestätigt werden. Demzufolge ist PLAUR am ehesten in Zellen myeloischen Ursprungs zu finden.

4.1.2 Charakterisierung des *HLA-A*0201*-restringierten Antigens CXCL3

Aus den in **Abschnitt 3.5** beschriebenen Vorarbeiten ging hervor, dass *HLA-A*0201*-restringierte 1C6-Lymphozyten neben MZ201-AML-Zellen eine geringfügige Reaktivität gegen *HLA-A*0201*-positive Monozyten aufwiesen. Im Rahmen der Expressionsklonierung wurde mit Hilfe der 1C6-Lymphozyten aus der MZ201-AML-cDNA-Bank ein cDNA-Klon isoliert, welcher als #250.8.21 bezeichnet und durch Sequenzanalyse als für den *Chemokine Ligand 3*, kurz *CXCL3*, kodierend identifiziert wurde. Bei Vergleich des cDNA-Klons #250.8.21 mit der veröffentlichten *CXCL3*-Sequenz, wurde der cDNA-Klon als eine inkomplett gespleisste Variante des *CXCL3*-Gens identifiziert (siehe **Abb. 3.18**).

Das *CXCL3*-Gen ist auf Chromosom 4q13.3 lokalisiert und kodiert für ein 11,3 kDa großes Molekül. Das Gen besteht aus 4 Exons und 3 Introns, die sich über 2,18 kb genomischer DNA erstrecken [Ensembl-Datenbank: Gen ENSG00000163734]. Als chemotaktisches Protein gehört *CXCL3* zur Familie der Zytokine, deren biologische Funktion in der Verständigung zwischen Zellen liegt. *CXCL3* kontrolliert die Migration und Adhäsion von Granulozyten und Epithelzellen. Den Chemokinen der CXC-Familie, zu denen auch *CXCL3* gehört, wird eine Schlüsselrolle im Rahmen der neoplastischen Transformation und bei der Tumordinvasion zugeschrieben [GOMPERS & STRIETER, 2006; BELPERIO *ET AL.*, 2000]. *CXCL3* vermittelt darüber hinaus angiogenetisches Potential durch die Bindung an den CXCR2-Rezeptor, welcher hauptsächlich von Neutrophilen exprimiert wird [WENTE *ET AL.*, 2006].

Für die Identifizierung des *CXCL3/HLA-A*0201*-Peptids wurden verschiedene Strategien verfolgt (siehe **Abschnitte 3.5.3 bis 3.5.6**). Durch Fragmentierung der *CXCL3*-cDNA wurde das Peptid schließlich auf dem Bereich der Signalregion eingegrenzt, wobei das kürzeste von 1C6-Lymphozyten erkannte Fragment die Aminosäuren 1 - 22 enthielt. Größere Fragmente wurden unterschiedlich stark durch T-Zellen erkannt (siehe **Abb. 3.22A**). Aus diesem Ergebnis wurde gemutmasst, dass das Peptid für die Prozessierung in einem bestimmten Sequenzkontext vorliegen muss. Die in **Abschnitt 3.5.6** gezeigte Kreuzreaktivität von *CXCL1* und *CXCL2* mit *CXCL3*-spezifischen T-Zellen führte zur Identifizierung des Peptides aufgrund homologer Sequenzbereiche innerhalb der Signalregionen (vergleiche dazu **Abb. 3.23**).

Das von 1C6-Lymphozyten in niedrigster Konzentration erkannte Peptid RLLRVALLL enthielt die Aminosäuren 14 - 22 (siehe **Abschnitt 3.5.7**). Im Zytotoxizitätsassay wurde für dieses Peptid eine halbmaximale Lyse bei 3 μ M ermittelt (siehe **Abb. 3.26**). Wie bereits in **Abschnitt 4.2.1** beschrieben, benötigen hochavide T-Zellen für die halbmaximale Lyse Peptidkonzentrationen im picomolaren (pM) bis in den einstelligen nanomolaren (nM) Bereich [DERBY *ET AL.*, 2001]. Als Erklärung kann die ausserordentlich schlechte Löslichkeit durch den hohen Anteil hydrophober Aminosäuren angeführt werden. CXCL3-Peptid/*HLA-A*0201*-Tetramere färbten allerdings 1C6-Lymphozyten sehr eindeutig und spezifisch an (persönliche Mitteilung Dr. Catherine Wölfel). Dies unterstützt die Annahme, dass das im Rahmen dieser Arbeit identifizierte CXCL3-Peptid tatsächlich das Targetepitop der 1C6-Lymphozyten enthält.

In DISTLER *ET AL.* wurde gezeigt, dass 1C6-Lymphozyten neben AML-Zellen der Patientin MZ201 weitere *HLA-A*0201*-positive myeloische Leukämien und Monozyten erkannten. Die allogenen AML-Zellen wurden dabei z.T. ebenso stark erkannt wie MZ201-AML-Zellen, CML-Zellen und Monozyten hingegen schwächer [DISTLER *ET AL.*, 2008]. Nicht erkannt wurden lymphatische Leukämien, B-Zellen und Fibroblasten. Diese Daten deuten darauf hin, dass es sich bei dem von 1C6-Lymphozyten erkannten CXCL3 um ein Antigen handelt, welches hauptsächlich auf Zellen der Myelopoese exprimiert wird. Diese Annahme wird zusätzlich durch die in dieser Arbeit in **Abschnitt 3.5.9** gezeigten Daten unterstützt. Mit Hilfe von RT-PCR-Analysen wurde gezeigt, dass sowohl regulär gespleisstes *CXCL3* als auch die *CXCL3*-Spleissvariante in AML-Zellen exprimiert werden, nicht jedoch in mit Epstein-Barr Virus transformierten (EBV)-B-Zellen oder PBMC (siehe **Abb. 3.28**). Die Annahme, dass das CXCL3-Peptid aus einem strukturell normalen Gen generiert wird, entspricht der Beobachtung, dass CXCL3-spezifische T-Zellen die partiell homologen Chemokine ebenso erkennen (siehe **Abb. 3.23**).

Durch die Untersuchung der Expressionsverteilung von CXCL3 in Normalgeweben sollte die Frage beantwortet werden, ob dieses Antigen ubiquitär exprimiert wird oder ob seine Expression ausschließlich auf hämatopoetische Zellen beschränkt ist. In Übereinstimmung mit veröffentlichten Expressionsprofilen (www.genecards.org) wurde eine Expression von CXCL3 in Lunge, Rückenmark- und Hirn, jedoch nicht in Knochenmark, Leber und Niere nachgewiesen (siehe **Abschnitt 3.5.10**). Der Nachweis einer CXCL3-Expression in Lungengewebe kann jedoch auf den hohen Anteil von alveolaren Macrophagen und Granulozyten zurückzuführen sein [HASKILL *ET AL.*, 1990,

BECKER *ET AL.*, 1994]. Eine weitere Quelle berichtet, dass CXCL3 auf hämatopoetischen Zellen hoch exprimiert wird [BIÈCHE *ET AL.*, 2007].

Zur Induktion einer Immunantwort *in vivo* ist es notwendig, dass das Peptid von dendritischen Zellen präsentiert werden kann. Dies wurde in **Abschnitt 3.5.8** untersucht. Es wurde gezeigt, dass das CXCL3-Peptid durch das Immunproteasom der DCs generiert und somit von professionell Antigen-präsentierenden Zellen für die Erkennung durch T-Zellen präsentiert wird (siehe **Abb. 3.27**).

4.2 Bedeutung der identifizierten Antigene für aktuelle Konzepte der Immuntherapie

Die Entdeckung, dass die Antigene einer Tumorzelle die Basis ihrer Erkennung und Zerstörung darstellt, hat den Weg bereitet, sie als essentielle Werkzeuge der Immuntherapie bei der Bekämpfung von Tumoren einzusetzen [DUDLEY & ROSENBERG, 2003]. Daher stellt die Identifizierung der molekularen Identität von Zielantigenen die Grundlage für die Weiterentwicklung immuntherapeutischer Verfahren dar. Ganz gleich mit welchem Verfahren Kandidaten-Antigene identifiziert wurden, ihre Eignung für die Verwendung in der Immuntherapie erfordert eine Reihe von Validierungsschritten. Diese umfassen Untersuchungen zur Verteilung, Homogenität, und Stärke der Expression, auch die Analyse ihrer funktionellen Bedeutung und ihrer tatsächlichen Immunogenität.

Als „ideale“ GvL-Zielstrukturen bzw. Zielstrukturen für die Krebsimmuntherapie wären generell Antigene zu bezeichnen,

- deren Expression auf maligne Zellen beschränkt ist,
- die auf einem möglichst hohen Anteil individueller Malignome exprimiert werden,
- deren Expression ursächlich mit dem malignen Phänotyp verbunden ist und somit alle Stadien der Tumorprogression überdauert,
- aus denen Peptidantigene hervorgehen, die an häufige HLA-Moleküle binden, und
- die gleichzeitig in einem hohen Anteil von Individuen immunogen sind.

Im Rahmen einer allo-HSCT bei Leukämien wären auch Antigene als „ideale“ GvL-Zielstrukturen zu bezeichnen,

- die in Hämatopoese-Stammzellen sowie Leukämiezellen stabil und spezifisch exprimiert werden.

Als Kandidatenantigene für GvHD wären generell Zielstrukturen einzustufen,

- die nicht nur auf Malignom-, sondern auch auf Normalgeweben und zumindest gewebespezifisch exprimiert werden.

Aus den verschiedenen Antigen-Kategorien sind bislang eine Vielzahl von Zielantigenen identifiziert worden, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* CD8⁺ T-Zellantworten induzieren können [www.cancerimmunity.org]. Die tatsächliche Effizienz der *in vivo* induzierten T-Zellantworten wird derzeit in klinischen Studien mit Peptiden dieser Antigene geprüft, z.B. für WT1, PR1 [REZVANI *ET AL.*, 2008], Melan A/MART-1 [BUTTERFIELD *ET AL.*, 2008] und gp100 [MEIJER *ET AL.*, 2007]. Für bestimmte Tumorarten zeichnet sich die Existenz von Zielantigenen für CD8⁺ T-Zellen ab, die *in vivo* eine Tumorabstoßung bewirken könnten. Ein viel versprechender Kandidat ist MAGE3-A1. Im Zusammenhang der MAGE3-A1-Vakzinierung von Melanom-Patienten wurde über eine Tumorregression in ca. 20% der Patienten berichtet [LONCHAY *ET AL.*, 2004]. In Patienten mit myeloischen Erkrankungen wurde ein antileukämischer Effekt nach kombinierter WT1/PR1-Vakzinierung beschrieben, was erstmals die Immunogenität der Vakzinekombination demonstrierte [REZVANI *ET AL.*, 2008].

4.2.1 Das Minorhistokompatibilitätsantigen (mHAg) PLAUR-317P

Das im Rahmen dieser Arbeit identifizierte mHAg PLAUR-317P resultiert aus der Prozessierung eines genetisch polymorphen Proteins, wird durch T-Zellen auf AML-Blasten und Monozyten erkannt und scheint somit Hämatopoese-spezifisch zu sein. Die potentielle Eignung von Kandidaten-Antigenen für die Immuntherapie wird oftmals durch die niedrige Expressionshäufigkeit bzw. Allelfrequenz oder durch die Seltenheit des restringierenden HLA-Allels limitiert. In der Antigen-Kategorie der mHAgS ist das Hämatopoese-spezifische HA-1 mit einer Prävalenz von 10,3 % der derzeit interessanteste

Kandidat für eine Verwendung in der Immuntherapie [MARIJT *ET AL.*, 2003; SPIERINGS & GOULMY, 2005]. Für das hier vorgestellte mHAg PLAUR-317P lässt sich, trotz der vergleichsweise hohen Allelfrequenz von 30%, aufgrund der niedrigen Frequenz des restringierenden Allels *HLA-B*5601* von 0,3%, lediglich eine Prävalenz von 0,1% ableiten. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass aus dem PLAUR-317P-Protein Peptidliganden prozessiert werden, die über verwandte, strukturell ähnliche HLA-Allele präsentiert werden. Von einer Reihe von Antigenen existieren mehrere Peptidliganden sowohl für MHC I- als auch MHC II-Allele, wie z.B. NY-ESO-1, MAGE-A1 oder gp100 [www.cancerimmunity.org]. Diese Möglichkeit soll auch für PLAUR-317P untersucht werden. Als mögliche Restriktionselemente der PLAUR-317P-Peptide kamen die Allele *HLA-B*5101*, *-B*0701* und *-B*3501* in Frage, da sie laut den Vorhersagen des SYFPEITHI-Algorithmus zu *HLA-B*5601* ähnliche MHC/Peptidbindungsmotive aufwiesen und ebenfalls Prolin (P) als Ankeraminosäure an Peptid-Position 2 favorisieren. Es wurde untersucht, ob die PLAUR-317P-Peptide in Assoziation mit *HLA-B*5101*, *-B*0701* oder *-B*3501* durch 4D7-Lymphozyten erkannt werden. K562-Zellen, die stabil mit diesen HLA-B-Allelen transfiziert waren, wurden mit den PLAUR-317P-Peptiden beladen und auf Erkennung durch 4D7-Lymphozyten mittels IFN- γ -ELISPOT-Assay getestet. Die Peptide wurden jedoch über keines der HLA-B-Allele erkannt (Daten nicht gezeigt). Über die Existenz von weiteren Peptidantigenen, die aus dem PLAUR-Protein prozessiert werden, ist bislang nichts bekannt.

In **Abschnitt 3.7** wurde gezeigt, dass sich die Expression von PLAUR-317P durch 2'-Aza-5'-Deoxycytidin (DAC) in MZ201-EBV-B-Zellen modulieren lässt. Im Gegensatz zu unbehandelten wurden DAC-behandelte MZ201-EBV-B-Zellen durch 4D7-Lymphozyten erkannt (siehe **Abb. 3.31**), was durch die Expression von PLAUR-317P nach DAC vermittelter DNA-Demethylierung erklärbar war. Mit DAC könnte die Möglichkeit überprüft werden, ob sich die Expression von PLAUR-317P in weiteren soliden Malignomen modulieren bzw. verstärken lässt und anschließend zur Erkennung durch T-Zellen führt. DAC als kombinatorisches Agens zur Behandlung von malignen Erkrankungen befindet sich derzeit in der klinischen Erprobung [SCHRUMP *ET AL.*, 2006].

Nicht zuletzt ist die tatsächliche Immunogenität *in vivo* ein entscheidendes Kriterium für die Eignung von Kandidaten-Antigenen in der Immuntherapie. Innerhalb der verschiedenen Antigen-Kategorien, deren Mitglieder Zielstrukturen von antigenspezifischen T-Zellen sein können, haben mHAg den Vorteil, dass sie nicht das Ziel von Selbsttoleranz-Mechanismen (siehe Einleitung **Abschnitt 1.1.5**) sind und gegen sie somit

per se eine starke Immunantwort erwartet werden kann. mHAgS repräsentieren daher nach einer allo-HSCT attraktive Zielstrukturen für den adoptiven T-Zelltransfer von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen [SCHILBACH *ET AL.*, 2005]. Für die therapeutische Nutzbarkeit von Antigenen ist entscheidend, ob *in vivo* T-Zellantworten gegen sie generiert und aufrecht gehalten werden können. Im **Abschnitt 3.4** wurde gezeigt, dass zumindest *in vitro* durch Stimulation mit AML-Zellen T-Zellantworten gegen PLAUR-317P generiert werden können.

4.2.2 Das Leukämie-assoziierte Antigen CXCL3

Das hier vorgestellte *HLA-A*0201*-restringierte Antigen CXCL3 ist in die Kategorie der überexprimierten Leukämie-assoziierten Antigene (LAA) einzuordnen. Quellen zufolge ist die Überexpression von CXCL3 in Tumorzellen nicht Ursache einer Gen-Amplifikation, sondern einer verstärkten Gen-Transkription [BIÈCHE *ET AL.*, 2007]. Bei dem primär identifizierten cDNA-Klon handelte es sich um eine inkomplett gespleisste Variante des *CXCL3*-Gens (siehe **Abschnitt 3.5.2**). Es wurde jedoch gezeigt, dass das von T-Zellen erkannte CXCL3-Peptid auch nach Translation komplett gespleisster mRNA prozessiert wird (siehe **Abschnitte 3.5.4** und **3.5.8**). Hinsichtlich seiner Expressionsverteilung ist CXCL3 eher als Hämatopoese-spezifisch einzustufen. Es wurde auf Blasten myeloischer Leukämien und in geringem Maße auf Monozyten und Granulozyten von T-Zellen erkannt [DISTLER *ET AL.*, 2008]. Die in **Abschnitt 3.5.10** durchgeführten RT-PCR Analysen zeigten eine vergleichsweise hohe CXCL3-Expression in der Lunge. Diese könnte jedoch möglicherweise auf einen erhöhten Anteil an Gewebemakrophagen und Granulozyten zurückzuführen sein [HASKILL *ET AL.*, 1990; BECKER *ET AL.*, 1994]. Klinische Beobachtungen nach allo-HSCT legen nahe, dass Infektionen der Lunge GvHD-Reaktionen in diesem Organ triggern können [LIM *ET AL.*, 2006]. Eine Erklärung hierfür könnte das aufgrund inflammatorischer Prozesse verstärkte Einwandern von Gewebemakrophagen und Granulozyten in die Lunge sein. Möglicherweise stehen dabei sogar die gegen diese Zellen gerichteten GvHD-Reaktionen mit der Expression von CXCL3 in Zusammenhang. In Leber und Darm wurde eine Expression von CXCL3 nicht nachgewiesen (siehe **Abb. 3.29A**). In Kreuzreaktivitätsanalysen waren Hautfibroblasten ebenfalls nicht durch die gegen CXCL3-gerichteten 1C6-Lymphozyten erkannt worden [DISTLER *ET AL.*, 2008]. Diese Organe sind die am häufigsten betroffenen bei durch

Spender T-Zellen-vermittelten GvHD-Reaktionen [LINK *ET AL.*, 1997]. Bezogen auf dieses Organe ist CXCL3 folglich nicht als GvHD-Zielantigen einzustufen.

4.2.3 TCR-Analyse der 4D7- und 1C6-Lymphozyten

In DISTLER *ET AL.* wurde gezeigt, dass die gegen PLaur-gerichteten 4D7- bzw. die gegen CXCL3-gerichteten 1C6-Lymphozyten klonalen Ursprungs waren und TCR-V β .17 exprimierten. In **Abschnitt 3.8** wurde die Sequenzanalyse der antigenspezifischen CDR3-V β -Region der TCR-Regionen beider T-Lymphozytenpopulationen durchgeführt. Es wurde erwartungsgemäß gezeigt, dass die Lymphozyten-Populationen die TCR-V β .17-Ketten mit unterschiedlichen CDR3-V β -Regionen exprimierten (siehe **Abb. 3.32B**).

TAA-spezifische TCRs sind therapeutisch nutzbar. Das Konzept des Transfers von TAA-spezifischen TCR-Genen befindet sich bereits in klinischer Erprobung. Ein TCR, der die Spezifität für das melanomassoziierte Differenzierungsantigen gp100 aufweist, wird beispielsweise derzeit bei Patienten mit malignem Melanom getestet [ROSENBERG & DUDLEY, 2004]. In Planung sind *in vivo*-Versuche im Mausmodell, in denen die Effizienz des CXCL3-spezifischen TCR untersucht werden soll. Der CXCL3-spezifische TCR wurde dazu bereits in einen retroviralen Vektor kloniert [Arbeitsgruppe Dr. H. Voss, III. Medizinische Klinik des Universitätsklinikums Mainz].

4.2.4 Sind die Antigene PLaur-317P und CXCL3 immuntherapeutisch nutzbar?

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei neue Zielantigene von allo-reaktiven T-Zellen in einer Akuten Myeloischen Leukämie identifiziert. Beide Peptid-Antigene entstammen Genen, die bereits vielfach mit der Pathogenese von Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht wurden [DE BOCK & WANG, 2004; BESCH *ET AL.*, 2007; GOMPERS & STRIETER, 2006; BIÈCHE *ET AL.*, 2007; MENG *ET AL.*, 2006; KUMANO *ET AL.*, 2008; TANG & WEI, 2008]. Die Frage, ob es sich bei diesen Antigenen um „ideale“ Tumorabstoßungsantigene handelt, die GvL-Effekte nach allo-HSCT auszulösen können, kann nicht mit Sicherheit beantwortet werden. Dazu muss erst gezeigt werden, dass *in vivo* effiziente gegen sie gerichtete T-Zellantworten ausgelöst werden können. Die Ergebnisse aus den durchgeführten *in vitro* Experimenten zeigen jedoch, dass die hier identifizierten Antigene

durchaus Eigenschaften eines immuntherapeutisch nutzbaren Zielantigens besitzen. Im Rahmen einer allo-HSCT ist ihre Myelopoese-betonte Expression vorteilhaft. Nach einer allo-HSCT wäre somit ein GvL-Effekt zu erwarten, bei dem sich die Spender-T-Zell-vermittelte Immunreaktion ausschließlich gegen die Resthämatopoese des Patienten einschließlich verbliebener Leukämiezellen richtet [AKATSUKA *ET AL.*, 2007].

Ein Hinweis auf die antileukämische Wirkung von CXCL3-spezifischen T-Zellen wurde in DISTLER *ET AL* in einem NOD/SCID IL2Rgamma(null)-Mausmodell gezeigt. Durch den Transfer von CXCL3-spezifischen T-Zellen wurde das Anwachsen von leukämischen Stammzellen in immundefizienten Mäusen verhindert [DISTLER *ET AL.*, 2008]. Allerdings werden mit diesem Mausmodell mögliche, gegen CXCL3 gerichtete, GvHD-Reaktionen nicht erfasst und können somit nicht ausgeschlossen werden.

Das von T-Zellen erkannte CXCL3-Peptid entstammt der Signalregion des CXCL3-Proteins (siehe **Abschnitte 3.5.5** und **3.5.7**). Von Peptiden, die aus Signalsequenzen generiert werden, ist ein alternativer Prozessierungsmechanismus beschrieben, der *transporter associated with antigen-processing* (TAP)- und Proteasom-unabhängig ist [WOELFEL C *ET AL.*, 2000; HAGE *ET AL.*, 2008]. Durch diesen Mechanismus wird ein alternatives Repertoire von Peptidepitopen generiert, der die Erkennung von TAP- und demzufolge prozessierungsdefizienten Tumoren durch eine eigene Kategorie von T-Zellen ermöglicht, den sog. *T-cell epitopes associated with impaired peptide processing* (TEIPPs) [VAN HALL *ET AL.*, 2006]. In der Immuntherapie können diese Epitope zur Eliminierung prozessierungsdefizienter Tumoren eingesetzt werden. Ob das aus der Signalregion generierte CXCL3-Peptid in diese Kategorie von Peptidepitopen einzureihen ist, kann nicht mit Sicherheit beantwortet werden, da seine TAP-unabhängige Prozessierung bislang nicht gezeigt wurde.

4.2.5 Weiterführende Untersuchungen im Leukämie-Modell MZ201-AML

Durch die in **Abschnitt 3.6** durchgeführten Analysen wurde gezeigt, dass das hier untersuchte Leukämie-Modell MZ201-AML zur Identifizierung weiterer Antigene genutzt werden könnte. Für das Leukämie-Modell MZ201-AML standen drei in den HLA-Klasse I-Allelen passende unverwandte Spender zur Verfügung (siehe **Abschnitt 3.1**). Aus den PBMC des Spenders 332 und 650 wurden von Dr. Eva Distler im Rahmen ihrer Promotionsarbeit AML-reaktive T-Zell-Populationen generiert (siehe Promotionsarbeit Dr.

Eva Distler, sowie **Abschnitt 2.2.2.5A**). Durch Kreuzreaktivitätsanalysen wurde überprüft, ob weitere T-Zell-Populationen des Modells die Antigene PLAUR-317P bzw. CXCL3 erkennen, bzw. ob die T-Zellen gegen PLAUR-317P bzw. CXCL3 zusätzliche HLA-Restriktions-Allele nutzen, die von MZ201-AML-Zellen exprimiert werden (siehe **Abschnitt 3.1**). PLAUR-317P wurde von einer der getesteten T-Zell-Populationen in Assoziation mit *HLA-B*5601*, jedoch von keiner T-Zell-Population über ein anderes der Patienten-HLA-Allele erkannt (siehe **Abb. 3.30**). CXCL3 wurde von keiner der T-Zell-Populationen erkannt. Die T-Zell-Populationen, die weder CXCL3 noch PLAUR-317P erkennen, müssen demzufolge die Spezifität für andere Antigene aufweisen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (allo-HSCT) bietet bei einem hohen Anteil akuter Leukämien die einzige kurative Behandlungsmöglichkeit. Um die mit ihr assoziierte Morbidität und Mortalität zu senken und ihre Effektivität zu steigern, soll die GvL (graft-versus-leukemia)-Reaktion als eigentliches Therapieziel gegenüber der unerwünschten GvHD (graft-versus-host disease) möglichst selektiv verstärkt werden. Wesentliche Mediatoren beider Effekte sind alloreaktive T-Zellen. Bei HLA-Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger sind so genannte Minorhistokompatibilitätsantigene (mHAg) und Leukämie-assoziierte Antigene (LAA) die mutmaßlichen Zielstrukturen beider Reaktionen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in dem Leukämie-Modell der Patientin MZ201 [akute myeloische Leukämie (AML) vom Subtyp FAB M5] mittels T-Zell-basierter cDNA-Expressionsklonierung zwei neue Antigene identifiziert, die von allogenen, AML-reaktiven CD8⁺ T-Lymphozyten aus Blut eines HLA-passenden gesunden Spenders erkannt wurden. Es handelt sich zum einen um das *HLA-B*5601*-restringierte mHAg PLAUR-317P, das aus einem Polymorphismus des Gens *PLAUR* (plasminogen activator, urokinase receptor) resultiert. Das von den T-Zellen am Besten erkannte Peptid enthält die Aminosäuren 316 - 327. PLAUR wird in lymphohämatopoetischen Zellen und in verschiedenen Malignomen überexprimiert und ist dabei mit schlechterer Prognose und vermehrter Gewebeinvasivität assoziiert. Etwa 30% getesteter Individuen tragen das Allel *PLAUR-317P*. Zum anderen handelt es sich um ein Epitop aus der Signalregion des Chemokins CXCL3 [chemokine (C-X-C motif) ligand 3], das von CD8⁺ T-Zellen des gleichen Spenders auf Leukämiezellen der Patientin MZ201 in Assoziation mit *HLA-A*0201* erkannt wurde. Auch CXCL3 wird vorwiegend in Zellen der Myelopoese exprimiert. Aufgrund ihres Expressionsmusters sind beide Antigene potentielle Zielstrukturen für die Elimination der Empfänger-Hämatopoese unter Einschluss der Leukämieblasten im Rahmen der allo-HSCT. Weiterführende Untersuchungen müssen zeigen, ob diese Antigene tatsächlich *in vivo* GvL-Reaktionen hervorrufen. Die Kenntnis eines repräsentativen Spektrums solcher Antigene würde verbesserte Spenderselektionen erlauben und neue Wege des adoptiven T-Zelltransfers erschließen helfen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Abbas AK, Lohr J, Knoechel B, Nagabhushanam V: **T cell tolerance and autoimmunity.** *Autoimmun Rev.* 2004, **3(7-8)**:471-5.

Akatsuka Y, Morishima Y, Kuzushima K, Kodera Y, Takahashi T: **Minor histocompatibility antigens as targets for immunotherapy using allogeneic immune reactions.** *Cancer Sci.* 2007, **98(8)**:1139-1146.

Appelbaum FR: **The current status of hematopoietic cell transplantation.** *Annu Rev Med.* 2003, **54**:491-512.

Arai J, Yasukawa M, Ohminami H, Kakimoto M, Hasegawa A & Fujita S: **Identification of human telomerase reverse transcriptase-derived peptides that induce HLA-A24-restricted antileukemia cytotoxic T lymphocytes.** *Blood* 2001, **97**:2903–2907.

Aruffo A, Seed B: **Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1987, **84**:8573-8577.

Barber LD, Gillece-Castro B, Percival L, Li X, Clayberger C, Parham P: **Overlap in the repertoires of peptides bound in vivo by a group of related class I HLA-B allotypes.** *Curr Biol.* 1995, **5(2)**:179-90.

Baron F, Siquet J, Schaaf-Lafontaine N, Baudoux E, Hermanne JP, Fillet G, Beguin Y: **Pre-emptive immunotherapy with CD8-depleted donor lymphocytes after CD34-selected allogeneic peripheral blood stem cell transplantation.** *Haematologica.* 2002, **87(1)**:78-88.

Becker S, Quay J, Koren HS, Haskill JS: **Constitutive and stimulated MCP-1, GRO alpha, beta, and gamma expression in human airway epithelium and bronchoalveolar macrophages.** *Am J Physiol.* 1994, **266**:278-286.

Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, Strieter RM: **CXC chemokines in angiogenesis.** *J Leukoc Biol.* 2000, **68(1)**:1-8.

Béné MC, Castoldi G, Knapp W, Rigolin GM, Escribano L, Lemez P, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, Lanza F, van't Veer M: **EGIL, European Group on Immunological Classification of Leukemias. CD87 (urokinase-type plasminogen activator receptor), function and pathology in hematological disorders: a review.** *Leukemia.* 2004, **18(3)**:394-400. Review.

Berger C, Jensen MC, Lansdorp PM, Gough M, Elliott C, Riddell SR: **Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates.** *J Clin Invest.* 2008, **118(1)**:294-305.

Besch R, Berking C, Kammerbauer C, Degitz K: **Inhibition of urokinase-type plasminogen activator receptor induces apoptosis in melanoma cells by activation of p53.** *Cell Death Differ.* 2007, **14(4)**:818-829.

Bièche I, Chavey C, Andrieu C, Busson M, Vacher S, Le Corre L, Guinebretière JM, Burlinchon S, Lidereau R, Lazennec G: **CXC chemokines located in the 4q21 region are up-regulated in breast cancer.** *Endocr Relat Cancer* 2007, **14(4)**:1039-1052.

Bleakley M, Brown M, Riddell S: **Human CD8+ minorhistocompatibility antigen specific cytotoxic T lymphocytes clones can be generated by primary in vitro stimulation of naive T cells with dendritic cells from HLA identical siblings.** *Blood* 2004, **104**:582a, abstract 2116.

Brichard V, Van Pel A, Wölfel T, Wölfel C, De Plaen E, Lethé B, Coulie P, Boon T: **The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas.** *J Exp Med.* 1993, **178(2)**:489-495.

Broudy VC: **Stem Cell Factor and Hematopoiesis.** *Blood* 1997, **90**:1345 -1364.

Buckanovich RJ, Facciabene A, Kim S, Benencia F, Sasaroli D, Balint K, Katsaros D, O'Brien-Jenkins A, Gimotty PA, Coukos G: **Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy.** *Nat Med.* 2008, **14(1)**:28-36. Epub 2008 Jan 6

Butterfield LH, Comin-Anduix B, Vujanovic L, Lee Y, Dissette VB, Yang JQ, Vu HT, Seja E, Oseguera DK, Potter DM, Glaspy JA, Economou JS, Ribas A: **Adenovirus MART-1-engineered Autologous Dendritic Cell Vaccine for Metastatic Melanoma.** *J Immunother.* 2008, **31(3)**:294-309.

Cabrera T, López-Nevot MA, Gaforio JJ, Ruiz-Cabello F, Garrido F: **Analysis of HLA expression in human tumor tissues.** *Cancer Immunol Immunother.* 2003, **52(1)**:1-9.

Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Tureci O, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ: **A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1997, **94**:1914-1918.

Chester, N.; Marshak, D. R.: **"Dimethyl sulfoxide-mediated primer Tm reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction."** *ANAL BIOCHEM.* 1993, **209(2)**:284-90.

Childs R, Chernoff A, Contentin N, Bahceci E, Schrupp D, Leitman S, Read EJ, Tisdale J, Dunbar C, Linehan WM, Young NS, Barrett AJ: **Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation.** *N Engl J Med.* 2000, **343(11)**:750-758.

Choi S, Schwartz RH: **Molecular mechanisms for adaptive tolerance and other T cell anergy models.** *Semin Immunol.* 2007, **19(3)**:140-52.

Clark RE, Dodi IA, Hill SC, Lill JR, Aubert G, Macintyre AR, Rojas J, Bourdon A, Bonner PL, Wang L, Christmas SE, Travers PJ, Creaser CS, Rees RC, Madrigal JA: **Direct evidence that leukemic cells present HLA-associated immunogenic peptides derived from the BCR-ABL b3a2 fusion protein.** *Blood* 2001, **98**:2887-2893.

- Clay TM, Custer MC, Sachs J, Hwu P, Rosenberg SA, Nishimura MI: **Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity.** *J Immunol.* 1999, **163(1)**:507-513.
- Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, Schneider J, Traversari C, Mattei S, De Plaen E, Lurquin C, Szikora JP: **A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas.** *J Exp Med* 1994, **180**:35-42.
- Coulie PG, Ikeda H, Baurain JF, Chiari R: **Antitumor immunity at work in a melanoma patient.** *Adv Cancer Res.* 1999, **76**:213-42.
- Crotzer VL, Christian RE, Brooks JM, Shabanowitz J, Settlage RE, Marto JA, White FM, Rickinson AB, Hunt DF, Engelhard VH: **Immunodominance among EBV-derived epitopes restricted by HLA-B27 does not correlate with epitope abundance in EBV-transformed B-lymphoblastoid cell lines.** *J Immunol.* 2000, **164(12)**:6120-6129.
- Cox AL, Skipper J, Chen Y, Henderson RA, Darrow TL, Shabanowitz J, Engelhard VH, Hunt DF, Slingluff CLJ: **Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines.** *Science* 1994, **264**:716-719.
- Czerkinsky C, Andersson G, Ekre HP, Nilsson LA, Klareskog L, Ouchterlony O: **Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gammainterferon-secreting cells.** *J.Immunol.Methods* 1988, **110**:29-36.
- Davis MM, Bjorkman PJ: **T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition.** *Nature* 1988, **334**:395-402.
- De Bock CE, Wang Y: **Clinical significance of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression in cancer.** *Med Res Rev.* 2004, **24(1)**:13-39.
- Deo YM, Graziano RF, Repp R, van de Winkel JG: **Clinical significance of IgG Fc receptors and Fc gamma R-directed immunotherapies.** *Immunol Today.* 1997, **18(3)**:127-135.
- De Plaen E, Lurquin C, Van Pel A, Mariamé B, Szikora JP, Wölfel T, Sibille C, Chomez P, Boon T : **Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988, **85(7)**:2274-2278.
- De Plaen E, Lurquin C, Brichard V, van der Bruggen P, Renauld J-C, Coulie P, Szikora J-P, Wölfel T, Van Pel A, Boon T: **Cloning of genes coding for antigens recognized by cytolytic T lymphocytes.** *Immunology Methods Manual* 1997, ISBN 0-12-442712-X:691-718.
- Derby M, Alexander-Miller M, Tse R, Berzofsky J: **High-avidity CTL exploit two complementary mechanisms to provide better protection against viral infection than low-avidity CTL.** *J Immunol.* 2001, **166(3)**:1690-7.

- Distler E, Wölfel C, Köhler S, Nonn M, Kaus N, Schnürer E, Meyer RG, Wehler TC, Huber C, Wölfel T, Hartwig UF, Herr W: **Acute myeloid leukemia (AML)-reactive cytotoxic T lymphocyte clones rapidly expanded from CD8⁺ CD62L^{high+} T cells of healthy donors prevent AML engraftment in NOD/SCID IL2Rgamma^{null} mice.** *Exp Hematol.* 2008, **36(4)**:451-463.
- Dobrzanski MJ, Reome JB, Hollenbaugh JA, Dutton RW: **Tc1 and Tc2 effector cell therapy elicit long-term tumor immunity by contrasting mechanisms that result in complementary endogenous type 1 antitumor responses.** *J Immunol.* 2004, **172(3)**:1380-1390.
- Drexler HG, Matsuo AY, MacLeod RA: **Continuous hematopoietic cell lines as model systems for leukemia-lymphoma research.** *Leuk Res.* 2000, **24(11)**:881-911.
- Driessche AV, Gao L, Stauss HJ, Ponsaerts P, Bockstaele DRV, Berneman ZN, Tendeloo VFIV: **Antigen-specific cellular immunotherapy of leukemia.** *Leukemia* 2005, **19**:1863–1871.
- Dudley ME and Rosenberg SA: **Adoptive -Cell-Transfer Therapy for the treatment of patients with Cancer.** *Nature Reviews* 2003, **3**:666-675.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD: **Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape.** *Nat Immunol.* 2002, **3(11)**:991-998.
- Eaves CJ, Henderson ES, Lister A, Greaves MF: **Leukemia.** *W.B. Saunders Company* 1996, **6.** Auflage, Seite 46-64.
- Ehrlich P: **On immunity with special reference to cell life.** *Proc Royal Soc London* 1900, **66**:424-448.
- Falkenburg JH, van de Corput L, Marijt EW, Willemze R: **Minor histocompatibility antigens in human stem cell transplantation.** *Exp Hematol.* 2003, **31(9)**:743-51.
- Folch G, Lefranc MP: **The human T cell receptor beta variable (TRBV) genes.** *Exp Clin Immunogenet.* 2000, **17(1)**:42-54.
- Frank R, Zhang J, Uchida H, Meyers S, Hiebert SW, Nimer SD: **The AML1/ETO fusion protein blocks transactivation of the GM-CSF promoter by AML1B.** *Oncogene* 1995, **11(12)**:2667-2674.
- Frankfurt O, Licht JD, Tallman MS: **Molecular characterization of acute myeloid leukemia and its impact on treatment.** *Curr Opin Oncol.* 2007, **19(6)**:635-49.
- Gajewski TF: **Failure at the effector phase: immune barriers at the level of the melanoma tumor microenvironment.** *Clin Cancer Res.* 2007, **13(18 Pt 1)**:5256-61. Review.
- Gallipoli P, Leach M: **Gingival infiltration in acute monoblastic leukaemia.** *Br Dent J.* 2007, **10;203(9)**:507-9.

Gao L, Bellantuono I, Elsässer A, Marley SB, Gordon MY, Goldman JM, Stauss HJ: **Selective elimination of leukemic CD34(+) progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT1.** *Blood* 2000, **95**(7):2198-2203.

Garrido F, Algarra I: **MHC antigens and tumor escape from immune surveillance.** *Adv Cancer Res.* 2001, **83**:117-158.

Gattinoni L, Klebanoff CA, Palmer DC, Wrzesinski C, Kerstann K, Yu Z, Finkelstein SE, Theoret MR, Rosenberg SA, Restifo NP: **Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells.** *J Clin Invest.* 2005, **115**(6):1616-26.

Gluzman Y: **SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants.** *Cell* 1981, **23**:175-182.

Gnjatic S, Nagata Y, Jager E, Stockert E, Shankara S, Roberts BL, Mazzara GP, Lee SY, Dunbar PR, Dupont B, Cerundolo V, Ritter G, Chen YT, Knuth A, Old LJ: **Strategy for monitoring T cell responses to NY-ESO-1 in patients with any HLA class I allele.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, **97**:10917-10922.

Goldman JM, Melo JV: **BCR-ABL in chronic myelogenous leukemia--how does it work?** *Acta Haematol.* 2008, **119**(4):212-7. Epub 2008 Jun 20. Review.

Goldrath AW, Bevan MJ: **Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire.** *Nature* 1999, **402**(6759):217-328

Gomperts BN, Strieter RM. **Chemokine-directed metastasis.** *Contrib Microbiol.* 2006, **13**:170-190.

Graf C, Heidel F, Tenzer S, Radsak MP, Solem FK, Britten CM, Huber C, Fischer T, Wölfel T. **A neoepitope generated by an FLT3 internal tandem duplication (FLT3-ITD) is recognized by leukemia-reactive autologous CD8+ T cells.** *Blood* 2007, **109**(7):2985-2988.

Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D: **Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, **87**:4645-4649.

Gratwohl A, Baldomero H, Horisberger B, Schmid C, Passweg J and Urbano-Ispizua A: **Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe.** *Blood* 2002, **100**(7):2374-2386.

Greiner J, Li L, Ringhoffer M, Barth TF, Giannopoulos K, Guillaume P, Ritter G, Wiesneth M, Döhner H, Schmitt M: **Identification and characterization of epitopes of the receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM/CD168) recognized by CD8+ T cells of HLA-A2-positive patients with acute myeloid leukemia.** *Blood* 2005, **106**(3):938-945.

- Greiner J, Schmitt M, Li L, Giannopoulos K, Bosch K, Schmitt A, Dohner K, Schlenk RF, Pollack JR, Dohner H, Bullinger L: **Expression of tumor-associated antigens in acute myeloid leukemia: Implications for specific immunotherapeutic approaches.** *Blood* 2006, **108(13)**:4109-4117.
- Gundlach BR, Wiesmuller KH, Junt T, Kienle S, Jung G, Walden P: **Determination of T cell epitopes with random peptide libraries.** *J. Immunol. Methods.* 1996, **192**:149-155.
- Hage FE, Stroobant V, Vergnon I, Baurain JF, Echchakir H, Lazar V, Chouaib S, Coulie PG, Mami-Chouaib F: **Preprocalcitonin signal peptide generates a cytotoxic T lymphocyte-defined tumor epitope processed by a proteasome-independent pathway.** *PNAS* 2008, **105(29)**:10119-10124.
- Hall T, Wolpert EZ, Veelen P, Laban S, Veer M, Roseboom M, Bres S, Grufman P, Ru A, Meiring H, Jong A, Franken K, Teixeira A, Valentijn R, Drijfhout JW, Koning F, Camps M, Ossendorp F, Kärre K, Ljunggren HG, Melief CJM, Offringa R: **Selective cytotoxic T-lymphocyte targeting of tumor immune escape variants.** *Nature Medicine* 2006, **12(4)**:417-424.
- Hartley JL, Temple GF, Brasch MA: **DNA cloning using in vitro site-specific recombination.** *Genome Res.* 2000, **10(11)**:1788-95.
- Hartwig UF, Nonn M, Khan S, Meyer RG, Huber C, Herr W: **Depletion of alloreactive T cells via CD69: implications on antiviral, antileukemic and immunoregulatory T lymphocytes.** *Bone Marrow Transplant.* 2006, **37(3)**:297-305.
- Haskill S, Peace A, Morris J, Sporn SA, Anisowicz A, Lee SW, Smith T, Martin G, Ralph P, Sager R: **Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990, **87(19)**:7732-6
- Hausmann J, Hallensleben W, de la Torre JC: **T cell ignorance in mice to Borna disease virus can be overcome by peripheral expression of the viral nucleoprotein.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, **96**:9769-9774.
- Heemskerk B, Liu K, Dudley ME, Johnson LA, Kaiser A, Downey S, Zheng Z, Shelton TE, Matsuda K, Robbins PF, Morgan RA, Rosenberg SA: **Adoptive cell therapy for patients with melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered to secrete interleukin-2.** *Hum Gene Ther.* 2008 May, **9(5)**:496-510.
- Heslop HE, Stevenson FK, Molldrem JJ: **Immunotherapy of hematologic malignancy.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2003, **1**:331-49.
- Ho VT, Soiffer RJ: **The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.** *Blood.* 2001, **98(12)**:3192-204.
- Hofmann S, Glückmann M, Kausche S, Schmidt A, Corvey C, Lichtenfels R, Huber C, Albrecht C, Karas M, Herr W: **Rapid and sensitive identification of major histocompatibility complex class I-associated tumor peptides by Nano-LC MALDI MS/MS.** *Mol Cell Proteomics* 2005, **4(12)**:1888-97.

- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC: **p53 Mutations in human cancers.** *Science* 1991, **253**:49-53.
- Hughes MM, Yassai M, Sedy JR, Wehrly TD, Huang CY, Kanagawa O, Gorski J, Sleckman BP. **T cell receptor CDR3 loop length repertoire is determined primarily by features of the V(D)J recombination reaction.** *Eur J Immunol.* 2003, **33(6)**:1568-1575.
- Jäger E, Nagata Y, Gnjatich S, Wada H, Stockert E, Karbach J, Dunbar PR, Lee SY, Jungbluth A, Jäger D, Arand M, Ritter G, Cerundolo V, Dupont B, Chen YT, Old LJ, Knuth A: **Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000, **97(9)**:4760-4765
- Janeway CA, Travers P: **Immunobiology the immun system in health and disease 6th Edition.** *Garland Science Publishing* 2005.
- Johnson BD, Becker EE, Truitt RL: **Graft-vs.-host and graft-vs.-leukemia reactions after delayed infusions of donor T-subsets.** *Biol Blood Marrow Transplant.* 1999, **5(3)**:123-132.
- Karttunen J, Sanderson S, Shastri N: **Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992, **9(13)**:6020-6024.
- Kemp RA, Ronchese F: **Tumor-specific Tc1, but not Tc2, cells deliver protective antitumor immunity.** *J Immunol.* 2001, **167(11)**:6497-6502.
- Kessels HW, Wolkers MC, van den Boom MD, van der Valk MA, Schumacher TN: **Immunotherapy through TCR gene transfer.** *Nat Immunol.* 2001, **2(10)**:957-961.
- Kessler JH, Beekman NJ, Bres-Vloemans SA, Verdijk P, van Veeler PA, Kloosterman-Joosten AM, Vissers DC, Ten Bosch GJ, Kester MG, Sijts A, Wouter Drijfhout J, Ossendorp F, Offringa R, Melief CJ: **Efficient identification of novel HLA-A*0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis.** *J Exp Med.* 2001. **193**:73-88.
- Kiyoi H, Ohno R, Ueda R, Saito H, Naoe T: **Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain.** *Oncogene* 2002, **21**:2555-2563.
- Klaus M, Haferlach T, Schnittger S, Kern W, Hiddemann W, Schoch C: **Cytogenetic profile in de novo acute myeloid leukemia with FAB subtypes M0, M1, and M2: a study based on 652 cases analyzed with morphology, cytogenetics, and fluorescence in situ hybridization.** *Cancer Genet Cytogenet.* 2004, **155(1)**:47-56.
- Klein G, Wiener F, Zech L, zur Hausen H, Reedman B: **Segregation of the EBV-determined nuclear antigen (EBNA) in somatic cell hybrids derived from the fusion of a mouse fibroblast and a human Burkitt lymphoma line.** *Int J Cancer.* 1974 **14(1)**:54-64. Review.
- Kirkin AF, Dzhandzhugazyan K, Zeuthen J: **Melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes.** *APMIS* 1998, **106(7)**:665-679.

- Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, van Rhee F, Mittermueller J, de Witte T, Holler E, Ansari H; European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia: **Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients.** *Blood* 1995, **86(5)**:2041-2050.
- Kolb HJ, Simones B, Schmid C: **Cellular immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation in hematologic malignancies.** *Curr Opin Oncol.* 2004, **16**:167-173.
- Köhler G, Milstein C: **Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.** *Nature* 1975, 256(5517):495-507.
- Krüger T, Schoor O, Lemmel C, Kraemer B, Reichle C, Dengjel J, Weinschenk T, Müller M, Hennenlotter J, Stenzl A, Rammensee HG, Stevanović S: **Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy.** *Cancer Immunol Immunother.* 2005, **54(9)**:826-3
- Kumano M, Miyake H, Muramaki M, Furukawa J, Takenaka A, Fujisawa M: **Expression of urokinase-type plasminogen activator system in prostate cancer: Correlation with clinicopathological outcomes in patients undergoing radical prostatectomy.** *Urol Oncol.* 2008 Apr 23. [Epub ahead of print]
- Landy A: **Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination.** *Annu Rev Biochem.* 1989, **58**:913-49.
- Leary AG, Zeng HQ, Clark SC, Ogawa M: **Growth factor requirements for survival in G₀ and entry into the cell cycle of primitive human hemopoietic progenitors.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, **89**:4013-4017.
- Lennerz V, Fatho M, Gentilini C, Frye RA, Lifke A, Ferel D, Wölfel C, Huber C, Wölfel T: **The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005, **102(44)**:16013-16018.
- Li A, Varney ML, Singh RK: **Constitutive expression of growth regulated oncogene (gro) in human colon carcinoma cells with different metastatic potential and its role in regulating their metastatic phenotype.** *Clin Exp Metastasis* 2004, **21(7)**:571-579.
- Li MO, Wan YY, Flavell RA: **T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation.** *Immunity* 2007, **26(5)**:579-591.
- Lim H, Lee J, Lee HG, Park BB, Peck KR, Oh WS, Ji SH, Lee SH, Park JO, Kim K, Kim WS, Jung CW, Park YS, Im YH, Kang WK, Park K: **Pulmonary complications after hematopoietic stem cell transplantation.** *J Korean Med Sci.* 2006, **21(3)**:406-411.
- Linnemann T, Tumenjargal S, Gellrich S, Wiesmuller K, Kaltoft K, Sterry W, Walden P: **Mimotopes for tumor-specific T lymphocytes in human cancer determined with combinatorial peptide libraries.** *Eur. J. Immunol.* 2001, **31**:156-165.

- Link H, Kolb HJ, Ebell W, Hossfeld DK, Zander A, Niethammer D, Wandt H, Grosse-Wilde H, Schaefer UW: **Transplantation of hematopoietic stem cells. I: Definitions, principle indications, complications.** *Med Klin (Munich)*. 1997, **92(8)**:480-491.
- Liu ET: **The role of ras gene mutations in myeloproliferative disorders.** *Clin Lab Med* 1990, **10**:797-807.
- Loeb DM, Evron E, Patel CB, Sharma PM, Niranjan B, Buluwela L, Weitzman SA, Korz D, Sukumar S. **Wilms' tumor suppressor gene (WT1) is expressed in primary breast tumors despite tumor-specific promoter methylation.** *Cancer Res*. 2001, **61(3)**:921-925.
- Lonchay C, van der Bruggen P, Connerotte T, Hanagiri T, Coulie P, Colau D, Lucas S, Van Pel A, Thielemans K, van Baren N, Boon T: **Correlation between tumor regression and T cell responses in melanoma patients vaccinated with a MAGE antigen.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004, **101(2)**:14631-14638.
- Lopes L, Flechter K, Ikeda Y, Collins M: **Lentiviral vector expression of tumour antigens in dendritic cells as an immunotherapeutic strategy.** *Cancer Immunol. Immunother*. 2006, **55(8)**:1011-1016.
- Mackensen A, Meidenbauer N, Vogl S, Laumer M, Berger J, Andreesen R: **Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8+ T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma.** *J Clin Oncol*. 2006, **24(31)**:5060-5069.
- Maecker B, von Bergwelt-Baildon , Anderson KS, Vonderheide RH, Schultze JL: **Linking genomics to immunotherapy by reverse immunology--'immunomics' in the new millennium.** *Curr Mol Med*. 2001, **1(5)**:609-619.
- Mahajan VS, Leskov IB, Chen JZ: **Homeostasis of T cell diversity.** *Cell Mol Immunol*. 2005, **2(1)**:1-10.
- Majsterek I, Arabski M, Czechowska A, Pytel D, Morawiec Z, Morawiec-Bajda A, Blasiak J: **Imatinib (STI571) inhibits DNA repair in human leukemia oncogenic tyrosine kinase-expressing cells.** *Z Naturforsch [C]*. 2006, **61(11-12)**:896-902.
- Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT: **Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage.** *Nature* 2006, **441(7090)**:231-4.
- Mandruzzato S, Brasseur F, Andry G, Boon T, van der Bruggen P: **A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma.** *J Exp Med*. 1997, **186(5)**:785-793.
- Marijt WA, Heemskerk MH, Kloosterboer FM, Goulmy E, Kester MG, van der Hoorn MA, van Luxemburg-Heys SA, Hoogeboom M, Mutis T, Drijfhout JW, van Rood JJ, Willemze R, Falkenburg JH: **Hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, **100(5)**:2742-2747.
- Mazar AP: **The urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) as a target for the diagnosis and therapy of cancer.** *Anticancer Drugs*. 2001, **12(5)**:387-400. Review.

- McHugh RS, Shevach EM: **The role of suppressor T cells in regulation of immune responses.** *J Allergy Clin Immunol.* 2002, **110(5):**693-702.
- Meijer SL, Dols A, Jensen SM, Hu HM, Miller W, Walker E, Romero P, Fox BA, Urban WJ: **Induction of circulating tumor-reactive CD8⁺ T cells after vaccination of melanoma patients with the gp100 209-2M peptide.** *J Immunother.* 2007, **30(5):**533-543
- Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Saboorian H, Haley B, Frenkel E, Euhus D, Leitch M, Osborne C, Clifford E, Perkins S, Beitsch P, Khan A, Morrison L, Herlyn D, Terstappen LW, Lane N, Wang J, Uhr J: **uPAR and HER-2 gene status in individual breast cancer cells from blood and tissues.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 **103(46):**17361-5. Epub 2006 Nov 1.
- Menssen HD, Bertelmann E, Bartelt S, Schmidt RA, Pecher G, Schramm K, Thiel E: **Wilms' tumor gene (WT1) expression in lung cancer, colon cancer and glioblastoma cell lines compared to freshly isolated tumor specimens.** *J Cancer Res Clin Oncol.* 2000, **126(4):**226-232.
- Mitchison NA: **Immunologic approach to cancer.** *Transplant Proc.* 1970, **2(1):**92-103.
- Molldrem JJ, Lee PP, Wang C, Champlin RE, Davis MM: **A PR1-human leukocyte antigen-A2 tetramer can be used to isolate low-frequency cytotoxic T lymphocytes from healthy donors that selectively lyse chronic myelogenous leukemia.** *Cancer Res.* 1999, **59(11):**2675-2681.
- Molldrem JJ, Lee PP, Wang C, Felio K, Kantarjian HM, Champlin RE, Davis MM: **Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia.** *Nat Med.* 2000, **6:**1018-1023.
- Molldrem JJ, Komanduri K, Wieder E: **Overexpressed differentiation antigens as targets of graft-versus-leukemia reactions.** *Curr Opin Hematol.* 2002, **9(6):**503-508.
- Monteiro JP, Benjamin A, Costa ES, Barcinski MA, Bonomo A: **Normal hematopoiesis is maintained by activated bone marrow CD4⁺ T cells.** *Blood* 2005, **105:**1484 -1491.
- Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA: **Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes.** *Science* 2006, **314(5796):**126-9. Epub 2006 Aug 31.
- Mottet C, Golshayan D: **CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells: from basic research to potential therapeutic use.** *Swiss Med Wkly.* 2007, **137(45-46):**625-634.
- Munker R, Schmid C, Madrigal JA, Kolb HJ: **An update on graft-versus-host and graft-versus-leukemia reactions: a summary of the sixth International Symposium held in Schloss Ellmau, Germany, January 22-24, 2004.** *Bone Marrow Transplant.* 2004, **34(9):**767-780.

- Mutis T, Verdijk R, Schrama E, Esendam B, Brand A, Goulmy E: **Feasibility of immunotherapy of relapsed leukemia with ex vivo-generated cytotoxic T lymphocytes specific for hematopoietic system-restricted minor histocompatibility antigens.** *Blood* 1999, **93(7)**:2336-2341.
- Mutis T, Goulmy E: **Hematopoietic systemspecific antigens as targets for cellular immunotherapy of hematological malignancies.** *Semin Hematol.* 2002, **39**:23-31.
- Needleman SW: **Ras protooncogene activation in acute myeloid leukemia and related disorders.** *Leuk Lymphoma* 1991, **5**:85-91.
- Nimer SD: **AML1/ETO. Molecular Pharmacology & Chemistry Memorial Sloan-Kettering Cancer Center 2007, 212-639-2000.**
- Nino-Vasquez JJ, Allicotti G, Borrás E, Wilson DB, Valmori D, Simon R, Martin R, Pinilla C: **A powerful combination: the use of positional scanning libraries and biometrical analysis to identify cross-reactive T cell epitopes.** *Mol Immunol.* 2004 **40(14-15)**:1063-74.
- Ohm JE, Carbone DP: **VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency.** *Immunol Res.* 2001, **23(2-3)**:263-272.
- Ohnishi H, Yasukawa M, Fujita S: **HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide.** *Blood* 2000, **95(1)**:286-293.
- Oelke M, Maus MV, Didiano D, June CH, Mackensen A, Schneck JP: **Ex vivo induction and expansion of antigen-specific cytotoxic T cells by HLA-Ig-coated artificial antigen-presenting cells.** *Nat Med.* 2003, **9(5)**:619-624.
- Orentas RJ, Roskopf SJ, Nolan GP, Nishimura MI: **Retroviral transduction of a T cell receptor specific for an Epstein-Barr virus-encoded peptide.** *Clin Immunol.* 2001, **98(2)**:220-228.
- Osman Y, Takahashi M, Zheng Z, Koike T, Toba K, Liu A, Furukawa T, Aoki S, Aizawa Y: **Generation of bcr-abl specific cytotoxic T-lymphocytes by using dendritic cells pulsed with bcr-abl (b3a2) peptide: its applicability for donor leukocyte transfusions in marrow grafted CML patients.** *Leukemia* 1999, **13(2)**:166-174.
- Peggs K, Verfuert S, Pizzey A, Ainsworth J, Moss P, Mackinnon S: **Characterization of human cytomegalovirus peptide-specific CD8(+) T-cell repertoire diversity following in vitro restimulation by antigen-pulsed dendritic cells.** *Blood* 2002, **99(1)**:213-23.
- Pinilla C, Appel JR, Houghten RA: **Identification of B cell and T cell epitopes using synthetic peptide combinatorial libraries.** *Curr Protoc Immunol.* 2001 **9**:9.5.
- Plesner T, Behrendt N, Ploug M: **Structure, function and expression on blood and bone marrow cells of the urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR.** *Stem Cells* 1997, **15(6)**:398-408.

- Radich JP, Kopecky KJ, Appelbaum F, Willman CL, Collins SJ: **N-ras mutations in acute myelogenous leukemia: a review of the current literature and an update of the Southwest Oncology Group experience.** *Leuk Lymphoma* 1992, **6**:325-334.
- Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanović S: **SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs.** *Immunogenetics* 1999, **50**(3-4):213-219.
- Rezvani K, Yong AS, Mielke S, Savani BN, Musse L, Superata J, Jafarpour B, Boss C, Barrett AJ: **Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies.** *Blood* 2008, **111**(1):236-242.
- Rezvani K. **PR1 vaccination in myeloid malignancies.** *Expert Rev Vaccines.* 2008, **7**(7):867-75.
- Kindler T, Breitenbuecher F, Kasper S, et al.: **Identification of a novel activating mutation (Y842C) within the activation loop of FLT3 in patients with acute myeloid leukemia (AML).** *Blood* 2005, **105**:335-334.
- Kloetzel PM: **The proteasome and MHC class I antigen processing.** *Biochim Biophys. Acta.* 2004, **1695**(1-3):225-233.
- Rosenberg SA, Dudley ME: **Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, **101**(2):14639-14645.
- Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME: **Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy.** *Nat Rev Cancer.* 2008, **8**(4):299-308. Review.
- Sahin U, Türeci Ö, Pfreundschuh M: **Serological identification of human tumor antigens.** *Current Opinion in Immunology* 1997, **9**:706-716.
- Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A: **Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance.** *Annu Rev Immunol.* 2004, **22**:745-63. Review.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T: **Molecular cloning: a laboratory manual.** *Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York* 1989.
- Schenk T, Stengel S, Goellner S, Steinbach D, Saluz HP: **Hypomethylation of PRAME is responsible for its aberrant overexpression in human malignancies.** *Genes Chromosomes Cancer* 2007, **46**(9):796-804.
- Schilbach K, Kerst G, Walter S, Eyrich M, Wernet D, Handgretinger R, Xie W, Rammensee HG, Müller I, Bühring HJ, Niethammer D: **Cytotoxic minor histocompatibility antigen HA-1-specific CD8+ effector memory T cells: artificial APCs pave the way for clinical application by potent primary in vitro induction.** *Blood* 2005, **106**(1):144-149.

Schrump DS, Fischette MR, Nguyen DM, Zhao M, Li X, Kunst TF, Hancox A, Hong JA, Chen GA, Pishchik V, Figg WD, Murgo AJ, Steinberg SM: **Phase I study of decitabine-mediated gene expression in patients with cancers involving the lungs, esophagus, or pleura.** *Clin Cancer Res.* 2006, **12(19)**:5777-5785.

Seed B, Aruffo A: **Molecular cloning of the CD2 antigen, the T-cell erythrocyte receptor, by a rapid immunoselection procedure.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1987, **84**:3365-3369.

Sensi M, Anichini A: **Unique tumor antigens: evidence for immune control of genome integrity and immunogenic targets for T cell-mediated patient-specific immunotherapy.** *Clin Cancer Res.* 2006, **12(17)**:5023-5032.

Sikorski M, Bobek M, Zrubek H, Marcinkiewicz J: **Dynamics of selected MHC class I and II molecule expression in the course of HPV positive CIN treatment with the use of human recombinant IFN-gamma.** *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2004, **83(3)**:299-307.

Skipper JCA, Hendrickson RC, Gulden PH, Brichard V, Pel AV, Chen Y, Shabanowitz J, Wolfel T, Slingluff CL, Boon T, Hunt DF, Engelhard VH: **An HLA-A2-restricted Tyrosinase Antigen on Melanoma Cells Results from Posttranslational Modification and Suggests a Novel Pathway for Processing of Membrane Proteins.** *J. Exp. Med.* 1996, **183**:527-534.

Smith C, Cerundolo V: **Immunotherapy of melanoma.** *Immunology* 2001, **104(1)**:1-7.

Soussi T, Jonveaux P: **p53 Gene alterations in human hematological malignancies: a review.** *Nouv Rev Fr Hematol.* 1991, **33**:477-480.

Spierings E, Goulmy E: **Expanding the immunotherapeutic potential of minor histocompatibility antigens.** *J Clin Invest.* 2005, **115(12)**:3397-400

Stanislowski T, Voss RH, Lotz C, Sadovnikova E, Willemsen RA, Kuball J, Ruppert T, Bolhuis RL, Melief CJ, Huber C, Stauss HJ, Theobald M: **Circumventing tolerance to a human MDM2-derived tumor antigen by TCR gene transfer.** *Nat Immunol.* 2001, **2(10)**:962-970.

Subramanian R, Gondi CS, Lakka SS, Jutla A, Rao JS: **siRNA-mediated simultaneous downregulation of uPA and its receptor inhibits angiogenesis and invasiveness triggering apoptosis in breast cancer cells.** *Int J Oncol.* 2006, **28(4)**:831-9.

Tang CH, Wei Y: **The urokinase receptor and integrins in cancer progression.** *Cell Mol Life Sci.* 2008, **65(12)**:1916-32. Review.

Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T: **A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma.** *Science* 1991, **254(5038)**:1643-1647.

Van de Putte G, Kristensen GB, Lie AK, Baekelandt M, Holm R. **Cyclins and proliferation markers in early squamous cervical carcinoma.** *Gynecol Oncol.* 2004, **92(1)**:40-46.

- Vagnarelli P, Raimondi E, Mazzieri R, De Carli L, Mignatti P: **Assignment of the human urokinase receptor gene (PLAUR) to 19q13.** *Cytogenet Cell Genet.* 1992, **60(3-4)**:197-9.
- Vigneron N, Stroobant V, Chapiro J, Ooms A, Degiovanni G, Morel S, van der Bruggen P, Boon T, Van den Eynde BJ : **An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome.** *Science* 2004, **304(5670)**:525-527.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM, Bos JL: **Genetic alterations during colorectal-tumor development.** *N Engl J Med.* 1998, **319(9)**:525-532.
- Warner JK, Wang JC, Takenaka K, Doulatov S, McKenzie JL, Harrington L, Dick JE: **Direct evidence for cooperating genetic events in the leukemic transformation of normal human hematopoietic cells.** *Leukemia* 2005, **19(10)**:1794-805.
- Warren EH, Gavin MA, Simpson E, Chandler P, Page DC, Disteché C, Stankey KA, Greenberg PD, Riddell SR: **The human UTY gene encodes a novel HLA-B8-restricted H-Y antigen.** *J Immunol.* 2000, **164(5)**:2807-2814.
- Weiden PL, Sullivan KM, Flournoy N, Storb R, Thomas ED: **Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation.** *N Engl J Med.* 1981, **304(25)**:1529-1533.
- Wente MN, Keane MP, Burdick MD, Friess H, Büchler MW, Ceyhan GO, Reber HA, Strieter RM, Hines OJ: **Blockade of the chemokine receptor CXCR2 inhibits pancreatic cancer cell-induced angiogenesis.** *Cancer Lett.* 2006, **241(2)**:221-227.
- Willman CL, Whittaker MH: **The molecular biology of acute myeloid leukemia. Proto-oncogene expression and function in normal and neoplastic myeloid cells.** *Clin Lab Med* 1990, **10**:769-796.
- WÖLFEL T, HERR W, COULIE P, SCHMITT U, MEYER ZUM BÜSCHENFELDE KH, KNUTH A: **LYSIS OF HUMAN PANCREATIC ADENOCARCINOMA CELLS BY AUTOLOGOUS HLA-CLASS I RESTRICTED CYTOLYTIC T-LYMPHOCYTE (CTL) CLONES.** *Int.J.Cancer* 1993, **54**:636-644.
- Wölfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wölfel C, Klehmann-Hieb E, De Plaen E, Hankeln T, Meyer zum Büschenfelde KH, Beach D: **A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma.** *Science* 1995, **269(5228)**:1281-1284.
- Wölfel C, Drexler I, Van Pel A, Thres T, Leister N, Herr W, Sutter G, Huber C, Wölfel T: **Transporter (TAP)- and proteasome-independent presentation of a melanoma-associated tyrosinase epitope.** *Int J Cancer.* 2000, **88(3)**:432-438.
- Wölfel C, Lennerz V, Lindemann E, Hess G, Derigs HG, Huber C, Herr W, Wölfel T: **Dissection and molecular analysis of alloreactive CD8+ T cell responses in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation.** *Cancer Immunol Immunother.* 2007, **57(6)**:849-857

Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, et al.: **Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies.** *Blood* 2001, **97**:2434-2439.

Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, Greenberg PD: **Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002, **99(25)**:16168-16173.

Yokota S, Kiyoi H, Nakao M, et al.: **Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromen among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines.** *Leukemia* 1997, **11**:1605-1609.

Yotnda P, Firat H, Garcia-Pons F, Garcia Z, Gourru G, Vernant JP, Lemonnier FA, Leblond V, Langlade-Demoyen P: **Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 BCR-ABL protein in patients with chronic myelogenous leukemia.** *J Clin Invest.* 1998, **101(10)**:2290-2296. (a)

Yotnda P, Garcia F, Peuchmaur M, Grandchamp B, Duval M, Lemonnier F: **Cytotoxic T cell response against the chimeric ETV6-AML1 protein in childhood acute lymphoblastic leukemia.** *J Clin Invest* 1998, **102**:455-462. (b)

Yong AS, Rezvani K, Savani BN, Eniafe R, Mielke S, Goldman JM, Barrett AJ: **High PR3 or ELA2 expression by CD34+ cells in advanced-phase chronic myeloid leukemia is associated with improved outcome following allogeneic stem cell transplantation and may improve PR1 peptide-driven graft-versus-leukemia effects.** *Blood* 2007, **110(2)**:770-5.

Young KM: **Myeloproliferative disorders.** *Vet Clin N Am: Small Anim Prac.* 1985, **15**:769-781.

Yu H, Kortylewski M, Pardoll D: **Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment.** *Nat Rev Immunol.* 2007, **7(1)**:41-51. Review.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALL	Akute lymphatische Leukämie
allo-HSZT	allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	antigenpräsentierende Zelle
bp	Basenpaare
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre cDNA, <i>complementary cDNA</i>
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i>
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CTL	zytotoxische T-Zelle
CXCL3	<i>chemokine ligand 3</i>
DC	dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
EBV	Epstein-Barr Virus
ELISPOT-Assay	<i>enzyme-linked immunosorbent spot assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fötale Kälberserum
HLA	humanes Leukozytenantigen
Gy	Gray, Energiedosis in der Strahlentherapie; 1 Gy = 100 rad.
GvHD	<i>graft versus host disease</i>
GvL	<i>graft versus leukemia</i>
GvT	<i>graft versus tumour</i>
IL	Interleukin
IFN	Interferon
Kb	Kilobasen
KE	Kultureinheit

LAA	Leukämie - assoziiertes Antigen
M	Molarität
mHAg	<i>minor histocompatibility antigen</i>
μ	mikro (10 ⁻⁶)
m	milli (10 ⁻³)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NK	Natürliche Killerzelle
ORF	<i>open reading frame</i>
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBSZT	periphere Stammzellen-Transplantation
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PLAUR	<i>plasminogen activator, urokinase receptor</i>
PLAUR-317P	PLAUR, polymorphes Allel mit Prolin an Position 317
PRAME	<i>preferentially expressed antigen in melanoma</i>
PP	Polypropylen
RNA	Ribonukleinsäure
RT	<i>reverse transcriptase</i>
SEREX	Serologisches Screening von rekombinanten cDNA – Expressionsbanken
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SV40	simian virus 40
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAB	<i>transporter associated with antigen-processing</i>
Tab.	Tabelle
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TE	Testeinheit
WT1	Wilms -Tumor - Gen 1

8 ANHANG

Anhang 1: *PLAUR-317P* (cDNA-Klon #1131.17.35)

MGHPPLLPLLLLHTCVPASWGLRCMQCKTNGDCRVEECALGQDLCRTTIVRLW
EEGEELELVEKSCTHSEKTNRTLSYRTGLKITSLTEVVCGLDLCNQGNSGRAVTYS
RSRYLECISCGSSDMSERGRHQSLQCRSPEEQCLDVVTHWIQEGEEGRPKDDRHL
RGCGYLPGCPGSNGFHNNDTFHFLKCCNTTKCNEGPILELENLPQNGRQCYSCKG
NSTHGCSSEETFLIDCRGPMNQCLVATGTHEPKNQSYMVRGCATASMCQHAHLG
DAFSMNHIDVSCCTKSGCNHPDLDVQYRSGAAPQP^PGAHLSPTITLLMTARLWG
GTLLWT

*Aminosäuresequenz von PLAUR-317P und Position des immunogenen Peptids. Das von den T-Zellen erkannte, über HLA-B*5601-präsentierte Peptid wurde hervorgehoben. Die polymorphe Aminosäure Prolin (P) wurde unterstrichen.*

Anhang 2: CXCL3-Spleissvariante (cDNA-Klon #250.8.21)

5'UTR Ex1
→
 ggcacctccccgccagctctcccgttctcgacagcttcccagcgcgtctgtagccccATGGCCCACGCC
orf1
ACGCTCTCCGCCGCCCCAGCAATCCCCGGCTCCTGCGGGTGGCGCTGCTG
Int1
→
CTCCTGCTCCTGGTGGCCGCCAGCCGGCGCGCAGCAGgtgggtcccggcgcctggggt
Ex2
→
 cccgggcccggacgcggtggggtggcgccccgcgacagccccgctcaatcagcaggtctattcttcctagGA
 GCGTCCGTGGTCACTGAACTGCGCTGCCAGTGCTTGCAGACACTGCAGGGA
 ATTCACCTCAAGAACATCCAAAGTGTGAATGTAAGGTCCCCGGACCCCAC
Int2
→
 TGCGCCAAACCGAAGTCATgtaagtccccccccgcgtccgctgccaccgctggggtccccgactct
Ex3
→
 cccgctgcccgaacctgtcccagcccagacctctgtctcacggaattccctctctgcagAGCCACACTCAA
GAATGGGAAGAAAGCTTGTCTCAACCCCGCATCCCCATGGTTCAGAAAAT
orf2 orf3
Int3
→
CATCGAAAAGATACTGAACAAgtgagttgtaattccatatacacaggcgactggagccgttggtcagaa
 atactggcatctgccccataaaataaaatcaggaaccccaagagttagctgaaggactagaaattgtattattttcac
 aattaaagttgccattaaggttattaatctgctctggtgccagaggatattcagtttcagtgtcttccattccaggcctaacc
 ctgggagggtaaatgtgggtttctagaataactaaatgactaacaatgccaaaatgccccctgcctgtttgggacgttt
orf4 orf5
acctcagtcctaataagggttcagacctgaaaaatgcaatgtctgtttgggcactttggcctgtaagccttctgtgaaga
gcagaaacttgcagtaacaccttcagtgagttcaaggctaggatccctgtcaacattatftaatcttttagctttagcaaaaat
 aggtagataatgtagttattcatagggtgtgtgcagcttaaggagatcatgaatggacatttcaaccaatgtgacaat
 cagtaccaatatgtttggcttttcaaccaagaatctagttgagtcacagccacttcttcttgaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Aminosäuresequenz der Spleissvariante des CXCL3-Gens. Exonsequenzen wurden in Grossbuchstaben, 5'UTR und Intronsequenzen in Kleinbuchstaben gekennzeichnet. Die ORFs 1-5 wurden unterstrichen.

Angang 3: CXCL3

MAHATLSAAPSNPRLLRVALLLLLLVAASRRAAGASVVTELRCQCLQTLQGIHL
KNIQSVNVRSPGPHCAQTEVIATLKNKGKACLNPASPMVQKIIKILNKGSTN

*Aminosäuresequenz von CXCL3 und Position des immunogenen Peptids. Das von den T-Zellen erkannte, über HLA-A*0201-präsentierte Peptid wurde hervorgehoben.*

Anhang 4: CXCL2

MARATLSAAPSNPRLLRVALLLLLLVAASRRAAGAPLATELRCQCLQTLQGIHL
KNIQSVKVKSPGPHCAQTEVIATLKNQGKACLNPASPMVKKIIEKMLKNGKSN

Aminosäuresequenz von CXCL2.

Angang 5: CXCL1

MARAALSAAPSNPRLLRVALLLLLLVAAGRRAAGASVATELRCQCLQTLQGIHP
KNIQSVNVKSPGPHCAQTEVIATLKNRKAACLNPASPIVKKIIEKMLNSDKSN

Aminosäuresequenz von CXCL1.

LEBENS LAUF

Angaben zur Person

NAME: Sylvia Köhler, geb. Pesth
 GEBURTSDATUM: 02.03.1978
 GEBURTSORT: Radebeul (Sachsen)
 STAATSANGEHÖRIGKEIT: deutsch
 FAMILIENSTAND: verheiratet
 ELTERN: Michael und Sigrid Pesth

Schul Ausbildung

1985 – 1989 Friedrich Wolf-Oberschule, Langebrück
 1989 – 1990 Ludwig Richter Gesamtschule, Frankfurt am Main
 1990 – 1998 Grimmelshausen-Gymnasium, Gelnhausen
 1998 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

10/1998 – 10/2003 Studium der Biologie an der Johann Wolfgang-Goethe
 Universität, Frankfurt am Main
 01/2003 – 08/2003 Diplomarbeit im Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main
 08/2003 Diplom-Biologin
 seit 05/2004 Promotionsarbeit, Johannes-Gutenberg
 Universitätsklinikum, Mainz
 III. Medizinische Klinik, Hämatologie/Onkologie
 Thema: „Die Identifizierung und
 Charakterisierung von HLA-Klasse I-restringierten
 Minorhistokompatibilitätsantigenen und Leukämie-
 assoziierten Antigenen mittels cDNA-
 Expressionsklonierung“

Berufliche Tätigkeit

seit 05/2008

Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main

wissenschaftliche Mitarbeiterin

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

SYLVIA KÖHLER